

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**Posztvakcinációs rotavírus surveillance Magyarországon,  
2007-2011**

**Antalné László Brigitta**

**Témavezetők:**

**Dr. Bányai Krisztián és Dr. Kónya József**



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2013

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	3
<b>BEVEZETÉS</b> .....	4
<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	6
A rotavírusok felfedezése és jelentősége.....	6
A rotavírusok morfológiája és nevezéktana.....	9
A rotavírus-fertőzés patogenezise és klinikai megjelenése .....	11
Diagnosztika .....	13
Molekuláris epidemiológia .....	14
A rotavírusok evolúciós stratégiái .....	16
Immunválasz és vakcináció.....	18
Surveillance .....	21
<b>CÉLKITŰZÉSEINK</b> .....	24
<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	25
Minták és háttér adatok .....	25
A virális nukleinsav tisztítása.....	26
Genotipizáló multiplex nested PCR.....	27
Reverz-transzkripció PCR .....	27
Multiplex nested PCR .....	27
Agaróz gélelektroforézis .....	28
VP6 génre specifikus PCR .....	28
Nukleinsav szekvenálás .....	30
A PCR termékek tisztítása.....	30
Szekvenáló PCR.....	30
Szekvenancia- és filogenetikai elemzés .....	31
<b>EREDMÉNYEK</b> .....	32
Minták és epidemiológiai háttérinformációk.....	32
Rotavírus G és P típusok előfordulása Magyarországon.....	34
Antigén kombinációk .....	35
A magyarországi gyakori törzsek földrajzi és időbeli dinamikája .....	37
Szekvenálások és filogenetikai elemzések eredményei.....	38
G9P[6] genotípusú törzsek szekvenciaelemzése – egy Indiából behurcolt törzs?.....	38
G1P[8] genotípusú törzsek filogenetikai elemzése.....	41
G2, G3 és G4 genotípusú törzsek szekvenciaelemzése .....	43
Metodikai megfontolások.....	44
A rotavírus elleni vakcináció helyzete Magyarországon .....	46
<b>MEGBESZÉLÉS</b> .....	48
Néhány szó a jövőről.....	56
<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	58
<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	60
<b>TÁRGYSZAVAK</b> .....	74
<b>KEYWORDS</b> .....	74
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	75
<b>FÜGGELÉK</b> .....	76

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS
DE OEC	Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum
dsRNS	duplaszálú-RNS
EuroRotaNet	European Rotavirus Network; Európai Rotavírus törzs-figyelő Hálózat
G	<u>G</u> likoprotein antigén
IgA, IgG	A- és G-típusú immunglobulin (ellenanyag)
MAB-EIA	monoclonal antibody- based enzyme-immunosorbent assay; monoklonális ellenanyag alapú EIA
NSP	non-structural protein; nem strukturális fehérje
nt	nukleotida
OEK	Országos Epidemiológiai Központ
P	<u>P</u> roteáz érzékeny antigén
PCR	polymerase chain reaction; polimeráz láncreakció
RT-PCR	reverz transzkripció PCR
Tris	Tris-hidroximetil-aminometán
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
VP	viral protein; szerkezeti fehérje

## BEVEZETÉS

A humán A-csoportú rotavírusokat (hGARV) az újszülöttkori és gyermekkori virális gastroenteritisek világszerte leggyakoribb kórokozóiként tartjuk számon. A rotavírusok globálisan előforduló, ubiquiter kórokozók. A vírussal történő fertőződés 5 éves kor előtt biztosan bekövetkezik és életünk során gyakoriak a reinfekciók (*Parashar, 2003; Thapar és Sanderson, 2004*). Évente kb. 130-140 millió új, gastroenteritises tünetekkel kísért primer rotavírus-fertőzés fordul elő a világon. A betegség legjellemzőbb tünetei az étvágytalanság, hasi fájdalom, hányás, hasmenés és a hőemelkedés/láz, leggyakoribb szövődménye pedig a dehidráció, amely akár életet veszélyeztető súlyosságú is lehet (*Estes és Kapikian, 2007*). A fertőzés következtében évente átlagosan kb. 2 millió kórházi felvétel és 400-600 ezer haláleset történik világszerte. A halálesetek jelentős része elsősorban a fejlődő országokban fordul elő, míg a fejlett országokban, így Magyarországon is, a kórházi ápolással kapcsolatos költségek jelentenek súlyos problémát az egészségügy és a gazdaság számára (*Szűcs, 1999; Parashar, 2003*). A rotavírus-fertőzés komoly közegészségügyi és járványtani jelentőségére való tekintettel a rotavírusok okozta gyermekkori gastroenteritisek megelőzésében a vakcináció kapott főszerepet.

A vírus szegmentált, duplaszálú RNS genomja által kódolt fehérjék közül a két legfontosabb talán a VP4 és VP7 gének által meghatározott, a víruskapszid külső burkát alkotó fő virion (P és G) antigének. Ismereteink szerint rotavírus infekció során e két felszíni antigének kitüntetett szerepe van a protektív immunválasz kialakulásában, mivel a szervezetben neutralizáló ellenanyagok termelődését indukálják (*Hoshino, 1985; Estes és Kapikian, 2007; Yuan, 2009*). Ezek az antigének ezért a vakcina fejlesztések legfőbb célpontjaivá váltak. A több mint húsz éve elkezdődött vakcinafejlesztési kísérletek eredményeképpen 2006-ban két élő, attenuált orális rotavírus vakcina került a piacra világszerte és vált elérhetővé Magyarországon is (*Dennehy, 2008*). Az egyik forgalomban lévő vakcina a monovalens G1P[8] genotípusú törzset tartalmazó Rotarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline). A másik az állati-humán reasszortáns, pentavalens RotaTeq<sup>®</sup> (Merck), amelyben a leggyakoribb humán G1, G2, G3, G4 és P[8] típusú törzsek találhatóak meg (*Bernstein és Ward, 2006; Offit és Clark, 2006; Ruiz-Palacios, 2006; Vesikari, 2006*). Feltételezzük, hogy a vakcinák a legelterjedtebb humán törzsek elleni szerotípus-specifikus, illetve a szerológiailag eltérő törzsek elleni keresztvédelem kialakulását indukálják. A széleskörű és nagy biztonságú oltáshatékonyági vizsgálatok mindkét vakcinát hatásosnak és biztonságosnak találták. A rotavírusok heterogenitása és változatos evolúciós stratégiái miatt a

vakcinák bevezetésétől nem várhatjuk a rotavírus-fertőzések teljes visszaszorítását, de remélhetjük a halálesetek számának csökkenését és a kórházi ápolási költségek mérséklését.

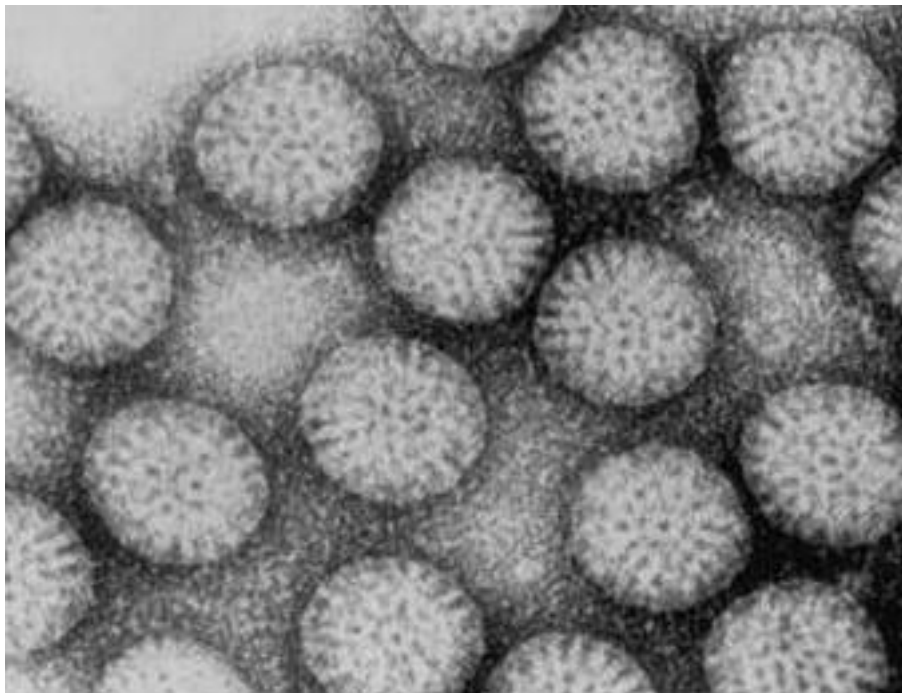
A rotavírus elleni vakcináció eredményeit szerte a világon nagy érdeklődéssel figyelik, aminek következtében számos posztvakcinációs rotavírus surveillance-t végző konzorcium jött létre, köztük az Európai Rotavírus-törzs-figyelő Hálózat (European Rotavirus Network, EuroRotaNet), melyhez Magyarország is alapító tagként csatlakozott. A szerveződések legfőbb célja a posztvakcinációs törzsmonitorozás, a vizsgálati módszerek egységesítése, a hatékony adatcsere és a klinikai szempontból fontos rotavírus törzsek gyakoriságában és összetételében észlelt változások gyors felismerése és nyomon követése (*Bányai, 2007a; Nelson, 2008; Iturriza-Gómara, 2009, 2011*).

2004-ben még szakdolgozóként kerültem a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC), Orvosi Mikrobiológiai Intézetének genitális fertőzések munkacsoportjához, ahol „Epigenetikai szabályozó mechanizmusok szerepe a humán interleukin-10 gén expressziójának szabályozásában” címmel készítettem el a diplomamunkámat. Ötödéves egyetemi hallgatóként, 2007 év elején kerültem kapcsolatba a hazai rotavírus surveillance-szel, így a diploma sikeres megvédése után, első éves doktoranduszként új kutatási téma várt rám, amikor csatlakoztam az EuroRotaNet munkájához. Hazánkban 2007 októberétől 2011 végéig így a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében folytak a magyarországi rotavírus törzsdiverzitást feltáró laboratóriumi vizsgálatok a magyarországi rotavirus surveillance hazai koordinátora, Dr. Bányai Krisztián és az intézet igazgatója, Dr. Kónya József közvetlen felügyelete mellett.

# IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## A rotavírusok felfedezése és jelentősége

A rotavírusok felfedezése az 1960-as évekig nyúlik vissza. Hasmenéses állatok, elsősorban egerek, majmok és szarvasmarhák bélszövetét és bélsarát elektronmikroszkópos technikával vizsgálva új, reovírusokhoz hasonló morfológiájú partikulumokat figyeltek meg és írtak le a kutatók. A korai laboratóriumi vizsgálatok a hasmenéses megbetegedésekben és a tünetek kialakulásában a mikroba etiológiai szerepére utaltak. A korábbi leírások alapján 1973-ban *Bishop és munkatársai* hasmenésben szenvedő gyermekek vékonybél-mukózájában és székletében is megfigyelték az új vírusokat, amely szintén a tünetek és a kórokozó közötti kapcsolatra utalt. Elektronmikroszkóppal vizsgálva ezek a vírusok küllős kerékre emlékeztető morfológiát mutatnak, így végül az újonnan azonosított kórokozók a rotavírus elnevezést kapták (rota= kerék; latin; **1. ábra**) (*Bishop, 1976, 2009; Parashar, 1998; Estes és Kapikian, 2007*).

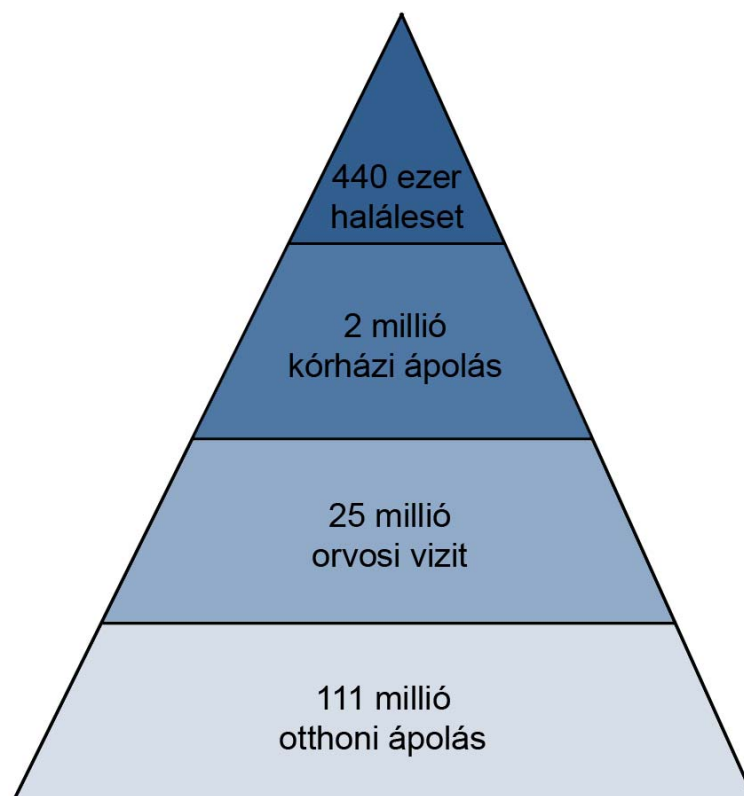


**1. ábra:** Rotavírus partikulumok elektronmikroszkópos képe

(forrás: <http://www.vaccineorb.com>; Dr. Erskine Palmer)

Ma, több mint 50 évvel első megfigyelésük óta már tudjuk, hogy ezek a vírusok világszerte elterjedt, ubiquiter kórokozók, melyek számos állatfajt (sertés, szarvasmarha,

szárnyasok, kutya, macska, különféle háziállatok és vadon élő patások és rágcsálók) és az embert is képesek megfertőzni és megbetegíteni. A haszonállatok rotavírus-fertőzése olykor komoly állategészségügyi problémát okoz (Martella, 2010; Midgley, 2012a). A humán rotavírusokat (elsősorban az A-csoport) a csecsemő- és gyermekkori virális gastroenteritisek világszerte leggyakoribb kórokozóinak tartjuk. Epidemiológiai adatok alapján ezek a vírusok az embereket 5 éves koruk előtt nagy valószínűséggel megfertőzik, és életünk során igen gyakoriak a reinfekciók. Morbiditási és mortalitási adatok alapján Parashar és munkatársai megkísérelték megbecsülni a rotavírus-fertőzések által okozott gazdasági és szociális kihatásokat. A "Parashar piramis" a rotavírusok fontos járványügyi és közegészségügyi jelentőségét támasztja alá (2. ábra).

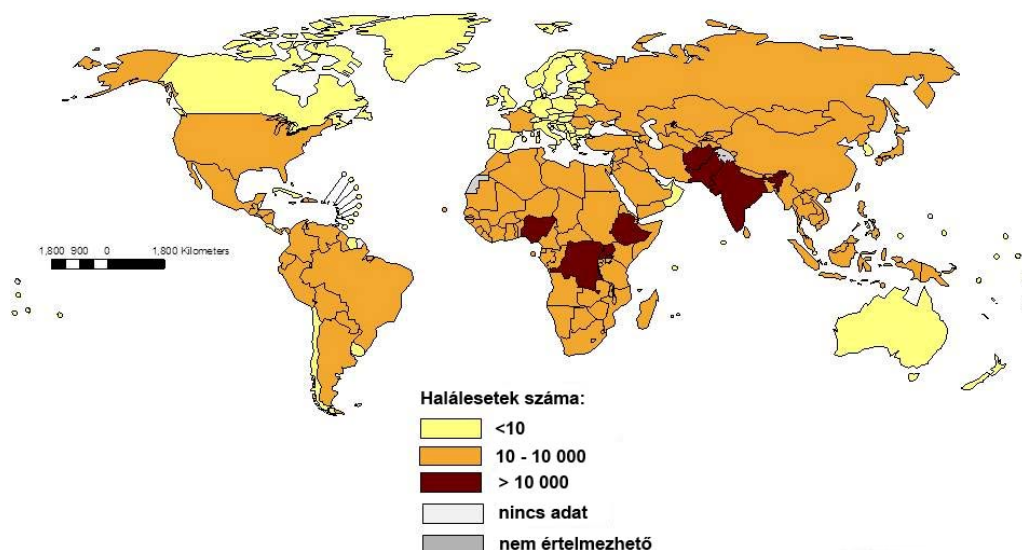


**2. ábra:** Parashar és munkatársai szemléltető piramisa a rotavírus-fertőzések járványügyi jelentőségéről (forrás: Parashar, 2003, módosítva)

Az adatokból kiderül, hogy világszerte évente mintegy 100-140 millió, új, gastroenteritises tünetekkel kísért primer rotavírus-fertőzés fordul elő, jellemzően az 5 évesnél fiatalabb gyermekek körében. A rotavírusos gastroenteritisek nagy része enyhe lefolyású, otthoni ellátással gyógyuló eset. A mintegy 25 millió orvosi ellátást igénylő megbetegedés

közül azonban világszerte mintegy 2 millió fertőzés válik olyan súlyossá, hogy hosszabb-rövidebb kórházi benttartózkodás válik szükségessé. Végül, becslések alapján évente közel 400-600 ezer haláleset hozható összefüggésbe ezekkel a kórokozókkal, amely a hasmenéssel együtt járó halálozások 25-40%-a az öt évesnél fiatalabb gyermekek körében, és az összes gyermekkori halálozás mintegy 5%-át jelenti (Parashar, 2003). A halállal végződő rotavírus-fertőzések elsősorban a fejlődő országokat érintik, a halálozások 63 százalékán pedig csupán néhány ország osztozik (Kongói Demokratikus Köztársaság, Uganda, Etiópia, Nigéria, India, Afganisztán, Pakisztán, Banglades) (3. ábra). Ez egyrészt a higiéniai körülmények és az egészségügyi ellátás hiányosságainak, másrészt a magas népességszámnak köszönhető.

## Világszerte 453 000 rotavírus által okozott gyermekkori haláleset 2008-ban



2012. február 21.



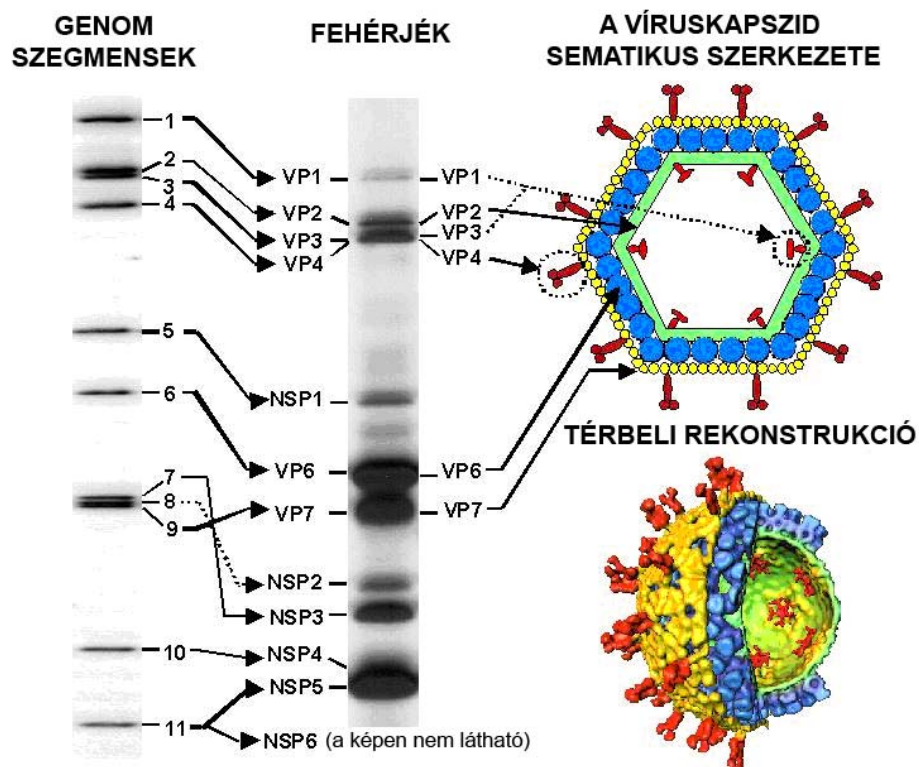
**3. ábra:** A rotavírus gastroenteritisek okozta gyermekkori halálozások száma és eloszlása 2008-ban az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) jelentése alapján

(forrás: [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/burden/rotavirus\\_estimates/en/](http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/rotavirus_estimates/en/) , módosítva)

A fejlett országokban, így Magyarországon is, elsősorban az orvosi és kórházi ellátással kapcsolatos költségek jelentenek súlyos problémát az egészségügy és a gazdaság számára (Szűcs, 1999; Bányai, 2006b).

## A rotavírusok morfológiája és nevezéktana

Morfológiájuk és replikációs stratégiájuk alapján a rotavírusokat a *Reoviridae* család *Rotavirus* genusába soroljuk. A virionok ~70-75 nm átmérőjűek (a virion síkjából kinyúló VP4 fehérje tüskeszerű nyúlványai nélkül), ikozaéderez szimmetriájú, többrétegű, burok nélküli víruskapsziddal rendelkeznek. A külső és belső kapszid egyenként 132 kapszomerből épül fel. A többrétegű kapszid rejtja a 11 génszegmensből álló, lineáris duplaszálú RNS (dsRNS) genomot. A teljes genom mintegy 18,5 kilobázis méretű, amely hat strukturális (VP1- VP4, VP6, VP7) és hat nem-strukturális (NSP1- NSP6) proteint kódol. A 11. génszegmensen két, egymással átfedő gén helyezkedik el, amelyek két nem-strukturális fehérjét (NSP5 és NSP6) kódolnak. (4. ábra) (Parashar, 1998; Hoshino és Kapikian, 2000; Estes és Kapikian, 2007).



**4. ábra:** A rotavírus partikulum morfológiája és genomszerkezete.

Az ábrán látható a többrétegű víruskapszid felépítése, a strukturális és nem strukturális fehérjék és az azokat kódoló génszegmensek, valamint a vírus térbeli szerkezete. (forrás: <http://www.reoviridae.org>; Figure supplied by Eric Mossel, Mary Estes and Frank Ramig, *módosítva*)

A VP2 fehérje alkotja a víruskapszid magját (core) a dsRNS-sel asszociálódott VP1 és VP3 proteinekkel együtt. A VP1 fehérje a vírus saját RNS-függő RNS-polimeráz enzime, a VP3 protein pedig a vírus guanilil-transzferáza. A két enzim egymással komplexet alkotva végzi a vírus RNS transzkripciót és a dsRNS szintézisét (Szűcs, 2005; Estes és Kapikian, 2007).

A víruspartikulum belső kapszidrétegét felépítő VP6 fehérje trimerjei kapcsolódnak mind a vírus magjának VP2 fehérjéjével, mind a külső kapszidréteg VP4 és VP7 fehérjéivel. A VP6 fehérje a csoportspecifitást meghatározó antigén, mely alapján jelenleg hét egymástól különböző és egymással szerológiai keresztreaktivitást nem mutató csoportot (A-G) különböztetünk meg. Az A-, B- és C-csoportú rotavírusok emberi és állati megbetegedéseket egyaránt okozhatnak, de a humán megbetegedések tekintetében az A-csoportba tartozó vírusokat tartjuk a legfontosabbnak. A B-csoportú rotavírusok regionális, míg a C-csoportba tartozó törzsek előfordulása humán megbetegedésekben inkább sporadikus jellegű. A D-G csoportba tartozó törzseket eddig állatokból sikerült kimutatni. A jelenlegi taxonómia a rotavírusokat már specierekbe sorolja, amelyek a korábbi szerocsoportok megfelelői. Így a jövőben a *Rotavirus A*, *Rotavirus B* stb. elnevezés használata indokolt. A mindennapi gyakorlatban azonban az új elnevezés még nem terjedt el, így a mai napig széles körben a rotavírus szerocsoportok megjelölését használjuk (Bányai, 2011).

A víruskapszid külső köpenyét két fehérje alkotja. A külső réteg fő alkotóeleme a VP7 fehérje, mely a G (Glikoprotein antigén) típust meghatározó antigén. A másik alkotóelem a VP4 polipeptid, amely dimerek formájában tüskeszerű nyúlványokat képez a virion felszínén. Ez a fehérje a P (Proteáz érzékeny antigén) típus meghatározásáért felelős antigén. A két felszíni fehérje antigéntulajdonságai, illetve az őket kódoló gének genetikai sajátosságai alapján különböző szero-, illetve genotípusokat különböztetünk meg. A rotavírusok szerotípusokba való sorolása szerotípus-specifikus monoklonális ellenanyagokkal és/vagy hiperimmun savókkal végzett neutralizációs tesztek alapján történik. Általánosságban elmondható, hogy az azonos VP7 szerotípushoz tartozó törzsek fehérjéjének aminosavsorrendje legalább 90-91%-os egyezést mutat, míg a VP4 esetében ez a határérték 89%. Ez a felismerés nagy hatással volt a rotavírus törzsek jellemzésére is, hiszen megengedte, hogy a törzsek szerotípusának predikcióját az aminosavsorrend alapján végezzék el (Gorziglia, 1990; Szűcs, 2005; Martella, 2006a; Estes és Kapikian, 2007). A természetes rotavírus-fertőzés során a víruskapszid felszíni fehérjéi egymástól függetlenül specifikus neutralizáló ellenanyagok termelődését indukálják, így érthető, hogy a protektív immunválasz kialakulása szempontjából kiemelkedő jelentőséggel bírnak (Gorrell és Bishop, 1999; Yuan,

2009). A gyakorlatban éppen ezért a különböző vírustörzsek megjelölésére a kettős nevezéktan terjedt el, melyben a két felszíni fehérje betűjele és az utána írt arab szám jelzi a törzsek szero-/geno-típusát: pl. G1P[8], G2P[4], G4P[6]. Mivel a P szerotípusok és genotípusok csak részben fedik egymást, a nevezéktanban gyakran találkozunk a P típus kettős megjelölésével is, ekkor a kapcsos zárójelben szereplő genotípus előtt megjelöljük a törzs szerotípusát is: pl. G1P1A[8] (*Hoshino és Kapikian, 2000; Estes és Kapikian, 2007*). Nemrég egy új rotavírus klasszifikáció került bevezetésre, amelynek alapján a rotavírusok minden egyes génjét különböző genotípusokba sorolhatjuk. Az egyes genotípusok azonosítása a gének teljes (bizonyos esetekben részleges) kódoló régiójának nukleinsav-szekvencia meghatározásán alapul. Tapasztalati úton meghatározott szekvenciahasonlósági határértékek alapján soroljuk a vizsgált géneket azonos vagy különböző genotípusokba. A gének és genotípusaik megjelölése a korábbi nevezéktan tovább gondolva nagybetűkkel és az azt követő arab számmal történik. A teljes vírusgenom genetikai összetételét a következő séma alapján írhatjuk le: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, ahol a betűk sorban a VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 géneket, az utánuk írt x pedig a megfelelő genotípus számát jelölik (*Matthijssens, 2008a; 2011*).

Nukleinsav-hibridizációs tanulmányok alapján a humán rotavírusokon belül két nagyobb (Wa és DS-1) és egy kisebb (AU-1) genocsoportot különböztetünk meg. Az elkülönítés alapja a génszegmensek hibridizációs tulajdonságain, azaz a rotavírus genomok közötti kisebb vagy nagyobb fokú homológián alapul. Azonos genocsoportba soroljuk azokat a törzseket, amelyeknek 11 génszegmense közül legalább 7 hibridizál egymással (*Hoshino és Kapikian, 2000; Estes és Kapikian, 2007*).

A szegmentált RNS genom poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) történő vizsgálata során a 10. és 11. génszegmens relatív vándorlási sebessége alapján rövid és hosszú genom mintázatot különböztetünk meg. A rotavírusok genommintázatának (elektroferotípus, E-típus) e két alaptípusán belül a különböző törzsek esetében nagy variabilitást figyelhetünk meg (*Estes és Kapikian, 2007*).

## **A rotavírus-fertőzés patogenezise és klinikai megjelenése**

A rotavírus-fertőzés jellemzően feko-orális úton terjed, a vírust tartalmazó széklettel szennyezett kéz, tárgyak, esetleg étel vagy víz közvetítésével. A beteg a vírust székletével nagy mennyiségben üríti a külvilágba ( $10^9$ - $10^{11}$  partikulum/ml), a fertőződéshez azonban kis

mennyiségű vírus (körülbelül 10-100 partikulum) is elegendő lehet. Ennek is köszönhető, hogy egy közösségben megjelenő rotavírus-fertőzés könnyen és gyorsan elterjed. Ehhez hozzájárul a lipidburok nélküli vírus viszonylag nagy ellenálló képessége is (*Szűcs, 2005; Estes és Kapikian, 2007*).

A rotavírus a vékonybél differenciált enterocytáit fertőzi meg. A célsejtbe történő adhézióban fontos szerepe van mindkét felszíni fehérjének. A VP4 antigén proteolitikus (tripszines) hasítása olyan konformációváltozást okoz a fehérje szerkezetében, amely elősegíti a célsejt és a virion interakcióját. A célsejtbe történő kapcsolódás és a vírus sejtbe jutása soklépéses, komplex folyamat, amelyben a VP4 és VP7 antigének, egymással szoros interakcióban, egyaránt részt vesznek. A citoplazmába már a külső burkát elvesztett partikulum kerül. A vírusfehérjék transzkripciója és az RNS genom replikációja a citoplazmában történik, viroplazmáknak nevezett specializált struktúrákban. Replikáció után az érett virionok a bél lumenébe jutva onnan továbbsodródhatnak, és megfertőzik a vékonybél további területeit is. A fertőzés hatására a sejtek közötti szoros kapcsolatok feloldódnak, sérül a mikrofilamentáris rendszer és a sejt lízise következik be. A sejtkárosodás és az emésztőenzimek elégtelen termelődése következtében a tápanyagok felszívódási zavara alakul ki. A rotavírusos hasmenésnek azonban van egy szekretoros komponense is. Ezt a hatást a vírus NSP4 fehérjéjének tulajdonítják, amely tulajdonképpen egy virális enterotoxin. Az NSP4 aktiválja az enterális idegrendszert valamint celluláris klorid csatornákat, így fokozott klorid és egyéb elektrolit szekréciót és következményes vízvesztést okoz (*Estes és Kapikian, 2007; Greenberg és Estes, 2009*).

A rotavírussal való találkozást követően 12-48 órás inkubációs időszak után jelennek meg a klinikai tünetek. A fertőzés súlyossága a tünetmentes állapottól egészen a halálos kimenetelű megbetegedésig terjedhet. A betegséget leggyakrabban a hányás és hasmenés jellemzi, mely akár 3-9 napig is eltarthat. Emellett jellemző még a láz, hasi fájdalom, levertség és étvágytalanság. A hányás és a több napig tartó vizes hasmenés nagy mennyiségű folyadék- és elektrolitvesztést okoz, amely megfelelő folyadékpótlás nélkül akár az életet is veszélyeztetheti. A legtöbb beteg gyermek kiszáradás miatt vagy azt megelőzően szorul többnapos ambuláns vagy kórházi ápolásra. A kezelés elsősorban szupportív, specifikus antivirális terápia nem áll rendelkezésünkre. A legfontosabb a beteg só- és vízháztartásának rendezése orális vagy intravénás rehidrációs terápiával (*Szűcs, 2005; Estes és Kapikian, 2007*). A fertőzöttek a tünetek megjelenése előtti napokban és a betegség lezajlása után akár 1-2 hétig még üríthetik a vírust. Úgy tűnik, hogy a tünetmentes és a tünetekkel kísért rotavírus-fertőzésekben egyaránt általános a hosszabb-rövidebb ideig tartó viraemia, és a vírus

kimutatható az extraintesztinális szövetekben (vesében, májban) is. Immunkomprimált betegeknél azonban mind a betegség mind a vírusürítés több hétig, hónapig is elhúzódhat, és a virális antigének expressziója extraintesztinálisan is hosszabb ideig mutatható ki (*Franco és Greenberg, 2002; Blutt, 2003*). A rotavírus-infekció felnőttekben általában tünetmentesen vagy nagyon enyhe tünetekkel zajlik. A betegek mellett a tünetmentes vírusürítők is hozzájárulnak a vírus szóródásához, így fertőző forrást jelentenek a környezetük számára (*Parashar, 1998; Anderson és Weber, 2004*).

## Diagnosztika

A vírus kimutatása legtöbbször székletből történik. Felfedezésüket követően a rotavírusok kimutatását még elektronmikroszkópos technikával végezték. Később azonban felmerült az igény a gyorsabb, olcsóbb és széles körben könnyen alkalmazható diagnosztikai eljárások iránt. Így a nagy költség- és eszközigényű, nehézkesen kivitelezhető elektronmikroszkópos technikát felváltották a virális antigén- és/vagy nukleinsav-kimutatáson alapuló módszerek (*Roberton, 1979; Ibrahim, 1990; Fischer és Gentsch, 2004*). A mai rutin diagnosztikában elsősorban az olcsó, könnyen és gyorsan kivitelezhető, ugyanakkor kellően specifikus szerológiai tesztek használata terjedt el. Ezek elsősorban a csoportspecifikus VP6 antigén elleni monoklonális és poliklonális antitestekre épülő latexagglutinációs vagy immunkromatográfiás tesztek, amelyek segítségével a széklettel nagy mennyiségben ürülő rotavírus partikulumok VP6 antigénjeit detektáljuk (*Herring, 1982; Dolan, 1985; Alvarez, 1989*).

A diagnosztikai módszerek között korábban szerepelt a vírusgenom poliakrilamid gélelektroforézissel történő detektálása is. A 11 szegmensből álló vírusgenom jellegzetes mintázata alapján a rotavírus-fertőzés egyértelműen igazolható (*Chudzio, 1989; Ibrahim, 1990*). Időigényessége miatt ezt a módszert azonban leginkább csak a molekuláris epidemiológiai vizsgálatokban alkalmazták. A módszer ad némi felvilágosítást a genom felépítéséről (rövid vagy hosszú E-típus) és alkalmas az azonos genotípuson belüli finomabb különbségek és a kevert fertőzések vizsgálatára.

A felszíni antigének elleni specifikus monoklonális antitestekre épülő szerológiai (monoclonal antibody-based enzyme immunoassay (MAb-EIA), kereszt-neutralizációs próbák) vizsgálatok az 1980-as években elsősorban a G-szerotípusok azonosítására irányultak (*Green, 1990*). A rotavírus törzsek egy része azonban az alkalmazott monoklonális

ellenanyagok segítségével nem tipizálható, és viszonylag gyakoriak a szerológiailag rokon törzsek közötti keresztreakciók is, amelyek így téves eredményekhez vezettek. Az 1990-es évektől a molekuláris epidemiológiai kutatásokban a szerotípus-specifikus monoklonális antitestekkel végzett neutralizációs vizsgálatokat helyettesítve elsősorban a korszerűbb, specifikusabb és érzékenyebb nukleinsav-meghatározáson alapuló molekuláris biológiai technikák terjedtek el. A rotavírus surveillance vizsgálatokban, a törzsek genotipizálásában ma világszerte a reverz transzkripció polimeráz láncreakciót (RT-PCR) és hibridizációs technikákat alkalmazzuk (*Nakagomi, 1991; Fischer és Gentsch, 2004; Szűcs, 2005*). A rutin-diagnosztikai és tipizáló módszerek mellett a rotavírusok molekuláris epidemiológiai vizsgálataiban ma már egyre szélesebb körben használjuk a törzsek nukleinsav-szekvencia és filogenetikai elemzését (*Fischer és Gentsch, 2004*). Ezek a modern molekuláris biológiai vizsgálatok nemcsak a PCR-rel nem tipizálható törzsek azonosításában vagy a PCR eredmények megerősítésében segítenek, de lehetővé teszik a vírusok mélyrehatóbb vizsgálatát is. A vírusgenom részleges vagy teljes szekvenálása segíthet a törzsek közötti rokonsági kapcsolatok és a ritka vagy potenciálisan zoonotikus törzsek eredetének pontosabb feltárásában, bepillantást enged a vírusok genetikai változatosságába és evolúciós folyamataiba (*Matthijnsens, 2011*).

A rotavírusok, különösen a humán törzsek nehezen adaptálhatók sejtkultúrákhoz, ezért *in vitro* tenyésztésüknek a diagnosztikában nincs helye, elsősorban a molekuláris biológiai vizsgálatoknál alkalmazzák ezt a módszert (*Szűcs, 2005; Estes és Kapikian, 2007*).

## **Molekuláris epidemiológia**

A rotavírus-fertőzések komoly közegészségügyi jelentőségére való tekintettel a törzsek azonosítását célzó molekuláris epidemiológiai vizsgálatok nem sokkal a vírus felfedezése után, már a '80-as években elkezdődtek. A szegmentált RNS genom különösen hajlamossá teszi ezeket a vírusokat a folyamatos és időnként gyors genetikai változásokra, így a fertőzésekből izolált törzsek pontos meghatározása nem mindig könnyű feladat. Az előző fejezetben ismertetett molekuláris biológiai technikák segítségével az 1980-as évek végére világossá vált, hogy a világszerte cirkuláló, klinikailag releváns törzsek 80-90%-át négy G-típus alkotja. A súlyosabb, kórházi ápolást igénylő esetek jelentős részéért felelős G1, G2, G3 és G4 törzsek közül is a G1 genotípusúak bizonyultak a legelterjedtebbnek (csaknem 50%-os

relatív gyakorisággal). A P antigén tekintetében az adatok két típus, a P[4] és főleg a P[8] törzsek hasonlóan magas arányát mutatták (Szűcs, 1995; Gentsch, 1996; Parashar, 1998).

Az 1990-es években a nukleinsav-alapú vizsgálati módszerek megjelenése és elterjedése hozzájárult a rotavírusokkal kapcsolatos kutatások intenzitásának növekedéséhez. Ennek eredményeképpen újabb, addig nem ismert genotípusokat és antigénkombinációkat sikerült azonosítani állatokból és emberekből egyaránt (Gentsch, 2005; Santos és Hoshino, 2005). Két új kombináció, a G9P[8] és G9P[6] humán megbetegedésekből történő kimutatása fontos felismerés volt, ugyanis ezek a törzsek világszerte rendkívül gyorsan elterjedtek, mára pedig a G9 genotípust a G1-G4 genotípusok mellett az ötödik leggyakoribb típusként tartjuk számon (Ramachandran, 2000; Bányai, 2004a, 2005a). A 2000-es évek elejétől egy újabb, gyorsan terjedő G12 törzs - elsősorban P[6] és P[8] típusal kombinációban - felbukkanását és gyors terjedését dokumentálták a világ számos országában, amelyről ma úgy gondoljuk, hogy a G9 törzsekhez hasonlóan a leggyakoribb genotípusok közé emelkedhet (Uchida, 2006; Bányai, 2007b, 2009a; Rahman, 2007; Sharma, 2008).

A világ különböző részein az egymást követő években végzett rotavírus tipizálási tanulmányok eredményei azt is megmutatták, hogy az egyes törzsek előfordulása és gyakorisága nemcsak a különböző földrajzi területek között, de ugyanabban a régióban évről-évre is változik. A különböző genotípusok dominanciájának fluktuációját a világ számos területén megfigyelték (Santos és Hoshino, 2005; Parra, 2009, Bányai, 2012). Sikerült továbbá olyan lokálisan elterjedt genotípus-kombinációkat is azonosítani, amelyeknek egy adott területen van fontos járványtani jelentőségük az általános törzsek mellett (Iturriza-Gómara, 2004; Bányai, 2012). Afrika egyes területein például G8P[6] és G8P[4] törzsek, Brazíliában G5P[8] törzsek, Indiában pedig G9P[6], G12P[6] genotípusok lokális cirkulációja figyelhető meg. Hazánkban a G6P[9], G3P[9] és G4P[6] törzsek évről-évre megjelennek és okoznak sporadikus megbetegedéseket (Bányai, 2003a, 2003b, 2004b, 2004c, 2005a; Santos és Hoshino, 2005).

A G és P típust meghatározó génszegmenssek egymástól függetlenül kombinálódhatnak, így a természetben potenciálisan számos antigénkombináció kialakulhat. A valóságban azonban a lehetséges kombinációknak csak egy része fordul elő. Megfigyelések szerint az egyes G és P típusok között bizonyos fokú genetikai kapcsoltság van és bizonyos antigénkombinációk gyakrabban fordulnak elő, mint mások (Heiman, 2008). A G1, G3, G4 és G9 típusokat elsősorban P[8] antigénnel (Wa genocsoport), míg a G2 törzseket általában P[4] antigénnel (DS-1 genocsoport) kombinációban találjuk (Parashar, 1998; Matthijnsens és Van Ranst, 2012). A mai napig mintegy 27 G és 35 P típust azonosítottak, és több mint 120

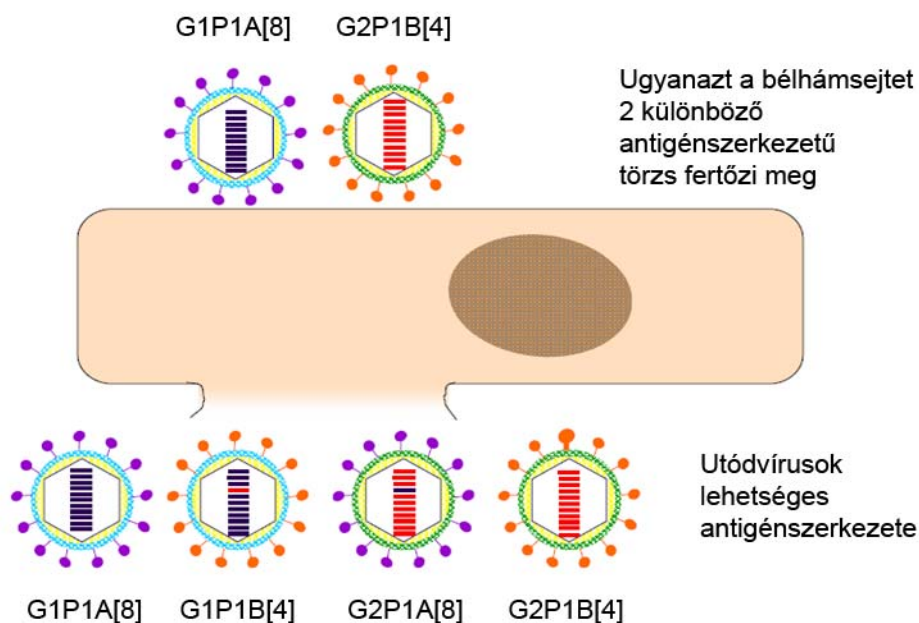
különféle G-P kombinációt ismerünk (*Gentsch, 2005; Matthijnsens, 2009; Bányai, 2012*). Ezek közül 12 G és 15 P típust és több mint 70 különböző antigénkombinációt izoláltak emberekből, de járványügyi jelentősége csak néhánynak van közülük. (*Gentsch, 2005; Santos és Hoshino, 2005; Bányai, 2012*).

A rotavírus-fertőzések megjelenése a mérsékelt éghajlati övben jellegzetes szezonalitást mutat. Míg ezeken a területeken a téli és kora tavaszi hónapokban figyelhetünk meg halmozódást addig a trópusi-szubtrópusi országokban a megbetegedések egész évben közel egyenletesen fordulnak elő (*Cook, 1990; Bányai, 2006b; Levy, 2009*).

## **A rotavírusok evolúciós stratégiái**

A rotavírusok sokféleségüket és változékonyságukat kifinomult evolúciós mechanizmusaiknak köszönhetik (*Estes és Kapikian, 2007; Matthijnsens, 2010*). A vírusgenom replikációja során bekövetkező pontmutációk felhalmozódása következtében megváltozott antigenitású törzsek alakulhatnak ki. A fertőzés során, a neutralizáló ellenanyagok elsődleges célpontjai a vírus felszíni antigénjei. A VP4 és VP7 variábilis, az antigéndeterminánsokat kódoló génszakaszokban történő sorozatos nukleotidcserék az ellenanyagválaszt kikerülni képes vírusváltozatok kialakulásához vezethetnek. Ezt a folyamatot nevezzük antigén sodródásnak (drift).

Ha ugyanazt a sejtet azonos időben két eltérő genotípusú rotavírus törzs fertőzi meg, akkor előfordulhat, hogy a vírusreplikáció során különböző törzsek a szegmentált genomnak köszönhetően egymás között kicserélik a különböző nukleinsav-szegmentjeiket. A génszegmens-cserék eredményeképpen új antigénkombinációjú reasszortáns vírusok alakulnak ki, melyek így szintén képesek kitérni az immunrendszer támadása elől. Ezt az evolúciós stratégiát hívjuk antigén váltásnak (shift) (**5. ábra**). Az antigén shift-nek köszönhetően a rotavírusok képesek rendkívül gyorsan megváltoztatni antigenitásukat (*Iturriza-Gómara, 2001b; Gentsch, 2005; Estes és Kapikian, 2007*). A közös előfordulású humán rotavírus genotípusok szokatlan kombinációja a törzsek közötti reasszortáció eredménye, melyet számos esetben dokumentáltak (*Iturriza-Gómara, 2001b; Santos és Hoshino, 2005; Bányai, 2012*).



**5. ábra:** A rotavírusok egyik fő evolúciós stratégiája, az antigén váltás (antigén shift) folyamata.

Az ugyanazt a gazdasejtet egy időben fertőző, eltérő genotípusú rotavírus törzsek a szegmentált genomnak köszönhetően a replikáció során képesek kicserélni megfelelő génszegmentumokat, így új antigénszerkezetű reassortáns vírusok is keletkezhetnek. (forrás: Bányai K: *Reoviridae*. Klinikai és járványügyi virológia, Takács Mária (szerk.), Vox Medica Kiadói Kft., 2011. pp. 467-73., módosítva)

A rotavírus törzsdiverzitás másik forrása az állati eredetű törzsek megjelenése a humán populációban. Az átfogó genotipizálási vizsgálatok meggyőző bizonyítékok sorát tárták elénk azzal kapcsolatban, hogy ezek a vírusok képesek átlépni a faji határokat. Nukleinsavszekvencia és filogenetikai vizsgálatok arra utalnak, hogy emberekből kimutatott G5, G6, G8, G9, G10, G12, P-típusok közül a P[3], P[6], P[9] és P[14] genotípusok különböző állatokból (sertésekből, szarvasmarhákból vagy macskafélékből) kerülhettek át a humán populációba. (Iturriza-Gómara, 2000a, 2001b; Palombo, 2002; Cook, 2004; Hoshino, 2005; Martella, 2006b, 2010). A legújabb, teljes genom alapú filogenetikai kutatások eredményei pedig azt a lehetőséget is felvetik, hogy a gyakori humán törzsek is bizonyos állati eredetű vírusokkal mutatnak szoros evolúciós kapcsolatot (Matthijssens, 2008b). A fajok közötti direkt vírustranzmisszió feltételezhetően nem túl gyakori jelenség, filogenetikai tanulmányok azonban néhány esetben egyértelmű genetikai kapcsolatot írtak le állatokból és emberekből izolált rotavírus törzsek között. Így közvetett bizonyítékaink vannak egyes G8P[14], G8P[1], G3P[14], G3P[3] vagy G9P[6] törzsek állati eredetéről (De Leener, 2004; Matthijssens, 2006; Tsugawa, 2008; Bányai, 2009b; Ghosh, 2011a; Midgley, 2012b; Zeller, 2012).

A rotavírusok evolúciójában sokkal nagyobb jelentőséget tulajdonítunk annak, amikor nem a teljes vírusgenom, hanem egyes állati eredetű rotavírus gének kerülnek át a humán populációba. Ennek feltétele az állati és emberi rotavírus törzssel történő egyidejű kevert fertőzések kialakulása. Kevert fertőzések során a két vírustörzs között génszegmens-cserék játszódhatnak le, így olyan állati-humán reasszortáns törzsek alakulhatnak ki, melyek génszegmenseik egy része állati, míg más része emberi rotavírusoktól származik (Cook, 2004; Gentsch, 2005; Steyer, 2008; Ghosh, 2011b). A különböző génszegmens-cserék többször is lejátszódhatnak, így egyre újabb antigénkombinációjú, multireasszortáns törzsek jelenhetnek meg. Ezek a törzsek evolúciós előnyre tehetnek szert a vad típusú törzsekkel szemben, mert a humán eredetű genetikai háttérnek köszönhetően jól adaptálódnak és terjednek emberről-emberre, míg az állati eredetű génszegmenseik miatti megváltozott antigénjük ellen az emberek nagy része nem rendelkezik típus-specifikus ellenanyaggal. Növeli a kevert fertőzések esélyét, ha adott területen egyszerre nagyszámú, különböző genotípusú rotavírus törzs cirkulál. Törzsdiverzitási vizsgálatok szerint a fejlődő országokban a reasszortációnak kedvező kevert fertőzések gyakrabban fordulnak elő, mint a fejlett országokban, ahol az adott régióban előforduló genotípus-kombinációk száma kisebb. A fejlődő országokban az emberek és az állatok szorosabb kontaktusban élnek egymás mellett, továbbá a higiéniai és közegészségügyi problémák is jelentősebbek, ami különösen kedvez az állati-humán reasszortáns vírusok kialakulásának (Santos és Hoshino, 2005; Esona, 2010).

Az adott RNS szegmens belüli részleges duplikációk, illetve deléciók és a különböző törzsek közötti génen belüli rekombináció (intragenic recombination) ugyan ritkábban dokumentált események, mint a reasszortációk, mégis hozzájárulnak a rotavírusok diverzitásának növeléséhez (Phan, 2007; Ghosh, 2011b; Mukherjee, 2012).

## **Immunválasz és vakcináció**

Újszülött és csecsemőkorban a rotavírus-fertőzés elleni védelemben a terhesség alatt transzplacentárisan, illetve az anyatejes táplálással megszerzett anyai ellenanyagok játsszák a főszerepet. Ezek az ellenanyagok életünk első 3-6 hónapja alatt részleges védelmet biztosítanak a rotavírus-infekcióval szemben. A másik tényező, amely szerepet játszhat a védelemben, hogy az újszülöttek bélcsatornájában a proteáz szint alacsonyabb, így a rotavírus kevésbé képes megfertőzni a vékonybél polarizált sejtjeit. Mindezek azonban nem nyújtanak teljes körű védelmet a fertőzés és a hasmenés ellen. Az újszülöttekben zajló rotavírus-fertőzés

gyakran tünetmentes vagy enyhe tünetek formájában zajlik, de egyes esetekben csecsemők súlyos fertőzését is dokumentálták (*Bhan, 1993; Widdowson, 2002*).

Az anyai ellenanyagok védő hatásának megszűntével az első, tünetekkel kísért rotavírus-infekció leggyakrabban 12-24 hónapos kor között jelentkezik. A szerzett immunitás az első fertőzés során alakul ki és az újabb infekciók ezt tovább erősítik, de életre szóló védettséget nem szerzünk a rotavírus ellen. Az óvodás és kisiskolás korú gyermekek már legalább részben védettek a rotavírus-fertőzéssel szemben a korábban átvészelt fertőzések eredményeként visszamaradt protektív ellenanyagoknak köszönhetően. Ebben az életkorban és a felnőttek körében már az újabb rotavírus-infekciók általában enyhébb tünetekkel vagy tünetmentesen zajlanak. Az idős korrallal vagy egyes krónikus betegségekkel együtt járó immunkomprimált állapot ismét növeli a súlyosabb tünetekkel kísért rotavírus-fertőzés lehetőségét (*Velázquez, 1996; Hoshino és Kapikian, 2000*).

A rotavírus-fertőzés során az immunrendszernek mind a celluláris, mind a humorális komponensei szerephez jutnak, bár a celluláris immunválasz részleteit még kevésbé ismerjük. Úgy tűnik, hogy a humorális immunválasznak kitüntetett szerepe van a további rotavírus-fertőzések és súlyosabb megbetegedések elleni védelemben. A víruskapszid VP4 és VP7 fehérjéi ellen termelődött szérumban IgA és IgG, valamint szekretoros IgA ellenanyagok neutralizálják a vírust. A legfontosabb szerepe a bélcsatornába kiválasztódó szekretoros IgA antitesteknek van, amelyek hatékony mukozális védelmet alakítanak ki. A VP4 és VP7 elleni antitestek akadályozzák a vírus célsejt-receptorokhoz történő kapcsolódását, gátolják továbbá a dekapszidációt. A vakcinafejlesztések emiatt elsősorban a VP4 és VP7 felszíni antigéneket veszik célba. A belső kapszidot felépítő VP6 antigén igen erős immunogén, de neutralizáló ellenanyagok nem termelődnek ellene. Azonban a szérumban VP6 elleni IgA és IgG ellenanyagok szintje jelzi a védettséget egy átvészelt rotavírus-fertőzést követően. A VP6 ellenes IgA antitestek intracellulárisan gátolják a vírus replikációját (*Szűcs, 2005; Estes és Kapikian, 2007; Dennehy, 2008; Ward, 2008; Greenberg és Estes, 2009*).

Az első rotavírus-fertőzés során elsődlegesen homotípusos immunválasz kialakulását észlelték, így a fertőzés átvészelését követően típus-specifikus ellenanyagok maradnak vissza. Az újrafertőzések során azonban heterotípusos immunválasz is kialakul, így a típus-specifikus antitestek mellett keresztreaktív ellenanyagok termelődése is zajlik (*Parashar, 1998; Szűcs, 2005*).

A rotavírusok változékonyságára, diverzitására, valamint a morbiditási, mortalitási mutatókra és a specifikus terápia hiányára tekintettel a súlyos rotavírusos gastroenteritis megelőzésében a vakcináció kapott főszerepet. A világon először az USA-ban 1998-ban

került forgalomba humán rotavírus elleni vakcina. Ez volt a RotaShield, amely egy élő, attenuált tetravalens rhesus-humán reasszortáns vakcina (RRV-TV). A vakcina alapját egy állati (majom) törzs adta, amelyben a VP7 felszíni fehérjét kódoló génszegmenst különböző humán rotavírus törzsekből származó azonos génszegmessel cserélték ki. A vakcina fejlesztése során humán G1, G2 és G4 típusú törzsek VP7 génjét tartalmazó majom rotavírusokat állítottak elő, így a vakcina végső soron e három reasszortáns törzsből, plusz a G3 szerotípusú VP7 gént eredetileg is kifejező majom rotavírus törzsből állt. A RotaShield-et az USA-ban bevezették a kötelező gyermekkori oltási programba is, azonban mintegy kilenc hónappal a bevezetése után a vakcinát kivonták a forgalomból. A visszavonás oka az volt, hogy az oltott gyerekek egy részénél oltási szövődményként súlyos és életveszélyes bélbetüremkedést (intussusceptio) észleltek (*Parashar, 1998; Bányai, 2006a; Dennehy, 2008; Greenberg és Estes, 2009*). A bélbetüremkedés és a vakcináció közötti összefüggés máig tisztázatlan és vitatott kérdés, a RotaShield többé mégsem került újra a felhasználókhoz. Az első sikertelenség azonban nem vetette vissza a vakcinafejlesztésekbe vetett hitet. Mivel az állati rotavírus törzsek többsége természetesen attenuált az ember számára, nagyon jó alapot adnak a vakcinák kifejlesztéséhez. Az állati-humán reasszortáns vakcinák fejlesztése így továbbra is az egyik fő irányát adja a kísérleteknek. Végül 2006-ban két élő, attenuált, orális rotavírus vakcina került a piacra a világ számos országában és vált elérhetővé Magyarországon is (*Dennehy, 2008*).

Az egyik forgalomban lévő vakcina a monovalens Rotarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline). Az oltóanyag a G1P[8] genotípusú 89-12 humán törzset tartalmazza, amelyet sejt kultúráján történő sorozatos passzálásokkal attenuáltak. A másik az állati-humán reasszortáns, pentavalens RotaTeq<sup>®</sup> (Merck). Ennek az oltóanyagának az alapját egy szarvasmarha eredetű, G6P[5] genotípusú WC3 törzs adja, amelyben a felszíni fehérjéket kódoló géneket a leggyakoribb humán G1, G2, G3, G4 és P[8] típust meghatározó génekre cserélték. Így a vakcina az említett VP4 és VP7 antigéneket expresszáló öt állati-humán reasszortáns törzs keverékéből áll. Mindkét oltóanyag alkalmazható a mai gyermekkori kötelező oltásokkal párhuzamosan. A rotavírus vakcinák 6 hetes kortól adhatók, de az oltási sorozatot legkésőbb 24 hetes kor előtt be kell fejezni. A monovalens Rotarix<sup>®</sup> oltóanyagból két dózis, míg a RotaTeq<sup>®</sup>-ből három dózis az előírt mennyiség, két adag beadása között legalább 4 hétnek kell eltelnie. A széleskörű oltáshatékonyági vizsgálatok során különös figyelmet fordítottak a bélbetüremkedés kialakulására, azonban a nagyszabású klinikai próbák során mindkét vakcinát biztonságosnak és hatásosnak találták. A vakcináktól a legelterjedtebb humán törzsek elleni szerotípus-specifikus, illetve a szerológiailag eltérő törzsek elleni keresztvédelem kialakulását

remélhetjük (Bernstein, 2006; Offit, 2006; Ruiz-Palacios, 2006; Vesikari, 2006). További vakcinafejlesztési és klinikai kísérletek folynak rekombináns vírusszerű partikulumokkal (virus-like particle, VLP), elölt vírust tartalmazó és DNS vakcinákkal is (Dennehy, 2008; Ward, 2008).

## Surveillance

Az 1990-es évek közepétől, a rotavírus vakcinák bevezetése előtt felerősödtek a törzsek azonosítására irányuló törekvések és a világ számos országában indítottak nemzeti rotavírus surveillance tevékenységet. A surveillance a vakcinafejlesztések legfőbb célpontjai, a felszíni antigének (G és P) geno- és szerotípusainak meghatározására irányult. A prevakcinációs törzsmonitorozás során a legfőbb cél az volt, hogy azonosítsák a különböző földrajzi területeken klinikailag fontos, legelterjedtebb rotavírus törzseket és meghatározzák a különböző genotípusok relatív gyakoriságát. Az intenzív vizsgálatoknak köszönhetően képet kaptunk arról, hogy mely törzseknek van helye a fejlesztés alatt álló vakcinákban, valamint számos, korábban nem azonosított antigénkombináció került leírásra. Megállapítást nyert az is, hogy a rotavírus törzsek diverzitásában komoly regionális különbségek lehetnek (Gentsch, 2005, 2009; Santos és Hoshino, 2005; Bányai, 2012).

Az újgenerációs rotavírus vakcinák 2006-os bevezetése óta a surveillance programok céljai némileg átalakultak, és a lehetséges vakcinálási programokkal párhuzamosan talán még fontosabb, hogy a törzsmonitorozás tovább folytatódjon. A rotavírus elleni vakcinálás eredményeinek nyomon követése céljából újabb surveillance programok alakultak és a korábbi prevakcinációs programok immár posztvakcinációs konzorciumként folytatják a munkájukat. 2007 januárjában létrejött az Európai Rotavírus-törzs-figyelő Hálózat (European Rotavirus Network; EuroRotaNet), melybe Magyarországot is meghívták tagnak. A konzorcium munkája az első évben a következő 11 európai ország részvételével indult: Dánia, Finnország, Franciaország, Németország, Magyarország, Olaszország, Hollandia, Szlovénia, Spanyolország, Svédország és Egyesült Királyság (Bányai, 2007a). 2008 januárjában Belgium, Bulgária és Litvánia is csatlakozott a hálózathoz, majd a 2009 év elején csatlakozó Görögország és Románia részvételével az adott évben már 16 tagúra bővült a network. Ausztria és Törökország csatlakozásával mára a hálózat 18 tagországgal büszkélkedhet (6. ábra). Az EuroRotaNet vezető laboratóriuma az angliai Egészségvédelmi Ügynökség (Health Protection Agency; HPA). Hazánkban 2007 első felében Pécsen, az Állami

Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat Dél-dunántúli Regionális Intézete, Regionális Virologiai Laboratórium, Gasztroenterális Vírusok Nemzeti Referencialaboratóriumában zajlottak a rotavírus törzsmonitorozási vizsgálatok, majd az év második felében átkerültek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Orvosi Mikrobiológiai Intézetébe, ahol 2011 év végéig folytattuk a vizsgálatokat.

## Résztevő országok



**6. ábra:** Az EuroRotaNet munkájában résztvevő országok (forrás: <http://www.eurorota.net>; módosítva)

Az EuroRotaNet mindenekelőtt azért jött létre, hogy átfogó vizsgálatok alapján részletes képet kapjunk az Európában cirkuláló rotavírus törzsek genotípusainak gyakoriságáról és elterjedéséről, feltárva az esetleges regionális különbségeket, és a rotavírus vakcinák bevezetését követően a számos országban évek óta működő prevakcinációs vizsgálatokat tovább folytatva hatékony posztvakcinációs surveillance tevékenységet folytasson. A posztvakcinációs törzsmonitorozás értékes adatokat szolgáltat az adott földrajzi régióban előforduló rotavírus törzsek gyakoriságáról és összetételéről, azok időbeli változásáról. A

vakcinációs adatok tükrében a következő fontos kérdésekre kaphatunk választ: hogyan befolyásolja a vakcinák használata az adott területen cirkuláló rotavírus genotípusok összetételét és gyakoriságát; kialakulnak-e az oltóanyagok indukálta ellenanyagválasz kikerülésére képes mutáns törzsek; létrejönnek-e új reasszortánsok az oltóanyagban szereplő és a vad vírusok keveredéséből; a jelenleg kisebbségben cirkuláló, eltérő antigéntulajdonságú rotavírusok átveszik-e az oltások miatt esetlegesen kiszoruló törzsek helyét; milyen új antigénkombinációk jelennek meg. A rotavírusok genetikai állománya különösen hajlamos a gyors genetikai változásokra, így az egységesített tipizáló algoritmus bevezetése és az alkalmazott laboratóriumi módszerek hatékonyságának és megbízhatóságának folyamatos nyomon követése szintén elengedhetetlen. A résztvevő laboratóriumok így minden évben meghatározott számú rotavírus pozitív mintát dolgoznak fel egységes protokoll alapján annak érdekében, hogy az adott ország teljes területét lefedő, megfelelően pontos epidemiológiai háttér adatokhoz jussunk (*Bányai, 2007a; Iturriza-Gómara, 2009, 2011*).

## CÉLKITŰZÉSEINK

- A korábbi prevakcinációs rotavírus surveillance terület kiterjesztése, további földrajzi régiók (kelet-magyarországi és nyugati megyék) posztvakcinációs vizsgálatokba való bevonása.
- Rotavírus pozitív székletmintákból azonosított rotavírus törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálata a fő felszíni antigéneket (G és P) kódoló gének (VP7 és VP4) multiplex, reverz-transzkripció nested PCR-rel történő genotipizálásával.
- Az azonosított rotavírus törzsek területi és időbeli megoszlásának vizsgálata, a G és P genotípus-kombinációk gyakoriságának elemzése és a vakcina törzsgyakoriságra gyakorolt hatásának felmérése.
- A PCR módszerrel nem tipizálható minták genotípusának meghatározása nukleinsav-szekvenálással.
- A vakcinákban is megtalálható, általánosan elterjedt törzsek VP4 és VP7 génjeinek nukleinsav szekvenálása.
- Egyes ritka G-P kombinációk genotípusának megerősítése a VP4 és/vagy VP7 génjeik részleges nukleinsav szekvencia meghatározásával.
- A vakcinációs helyzet és a célpopuláció rotavírus elleni átoltottságának felmérése hazánkban.

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

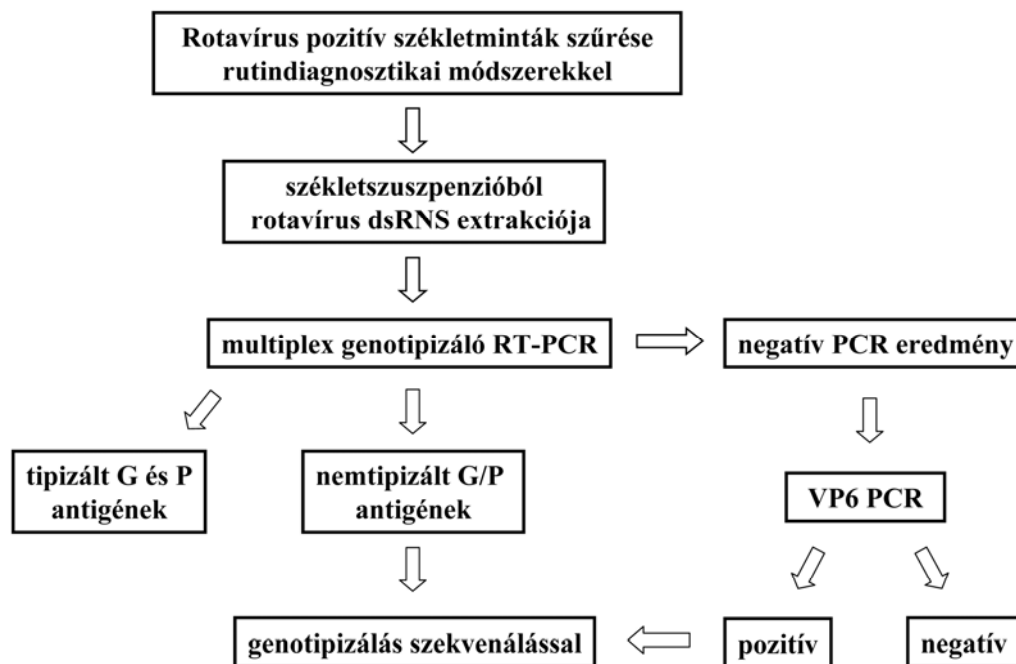
## Minták és háttér adatok

Rotavírus törzsmonitorozásunkhoz székletmintákat gyűjtöttünk Magyarország hét különböző régiójából (Baranya, Borsod-Abaúj-Zemplén, Csongrád, Heves, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg és Vas megye) valamint Budapest és vonzásterületéről a hazai rotavírus hálózatba bevont rendelőintézetek, klinikák és regionális mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumok együttműködése révén 2007. január 1. és 2011. december 31. közötti időszakban. A székletmintákban az A-csoportú rotavírus antigén kimutatását a regionális laboratóriumok szakmai személyzete végezte kereskedelmi forgalomban kapható latexagglutinációs (LA, Rotalex, Orion Diagnostica) vagy immunkromatográfiás (ICh, Rota Uni-Strip, Coris BioConcept; Vikia Rota-Adeno, Biomerieux) diagnosztikai tesztek segítségével a gyártók utasításainak megfelelően. Kutatásainkhoz a szerológiai tesztekkel igazolt A-csoportú rotavírusra pozitív székletmintákat gyűjtöttük össze, melyeket a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum Orvosi Mikrobiológiai Intézetébe szállítottunk és felhasználásig -20 °C-on tároltunk.

A genotipizáló vizsgálatainkhoz gyűjtött rotavírus pozitív székletminták kórházban ápolat vagy ambuláns ellátásban részesült, akut gastroenteritisszel kezelt betegektől származtak. A betegek életkorát illetően célcsoportunk a rotavírus gastroenteritis által leginkább veszélyeztetett 5 éven aluli korcsoport volt, de idősebb gyermekektől és felnőttektől is kaptunk mintákat.

Eredményeink alapvető epidemiológiai kiértékeléséhez a következő háttér adatokat igyekeztünk összegyűjteni: a beteg születési dátuma, a beteg neme, a betegség kezdete, a mintavétel dátuma, ellátás típusa (kórházi/ambuláns), a beteg lakóhelyének postai irányítószáma. A rotavírus elleni oltottsági állapotra utaló értékelhető információkat sajnos egyetlen esetben sem kaptunk.

A **7. ábra** szemlélteti a következőkben ismertetett rotavírus genotipizálási protokollt.



**7. ábra:** A rotavírus pozitív székletminták genotipizálása során alkalmazott protokoll folyamatábrája

## A virális nukleinsav tisztítása

A mintákhoz 800-1000  $\mu$ l, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) puffert hozzáadva 10-20 v/v %-os székletsuszpenziót készítettünk. Centrifugálás után (3000 g, 10 perc) a minták felülúszójának 200  $\mu$ l-éből TriReagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) felhasználásával a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el a rotavírus RNS izolálását. Centrifugálás után az RNS-t tartalmazó felső vizes fázishoz azonos térfogatú (250-300  $\mu$ l) izopropanolt adtunk hozzá. Az izopropanollal kicsapott RNS pelletet 75 v/v %-os etanollal mostuk, majd 55 °C-on teljes száradásig inkubáltuk. A székletmintákból nyert RNS-t 40-60  $\mu$ l nukleázmentes vízben (Promega, Madison, WI, USA) vagy dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízben oldottuk be.

A mintákban esetlegesen még jelen lévő, a PCR-t gátló komponenseket további tisztítással távolítottuk el. Ehhez a nukleázmentes vízben oldott RNS-t 200  $\mu$ l 6M guanidin-izotiocianát (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) jelenlétében silica-mátrix (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) felszínére adszorbeáltattuk (inkubálás 450 rpm-en szobahőmérsékleten 10 percig). A felülúszó eltávolítása után a mintákat 75 v/v %-os etanollal kétszer mostuk, majd centrifugálás (10000g, 1 perc, szobahőmérséklet) és szárítás (55 °C, 10 perc) után az RNS-t nukleázmentes vízzel oldottuk le a silica-mátrix felszínéről (65 °C, 10 perc) és további felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

A fentebb részletezett RNS extrakciós módszert alkalmaztuk a vizsgálat első két évében (2007-2008) gyűjtött székletminták esetében. 2009 év elején áttértünk a kereskedelmi forgalomban kapható nukleinsav izoláló kitek alkalmazására. A 2009-2011 időszakban gyűjtött minták RNS extrakcióját a High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Basel, Switzerland) segítségével végeztük a gyártó utasításait követve. Ebben az esetben is a 10-20 v/v %-os székletsuszpenzió felülúszójának 200 µl-éből indultunk ki. A nukleinsav-extrakció utolsó lépésében a virális RNS-t 50 µl DEPC-es vízben eluáltuk a silica-mátrixot tartalmazó oszlop felszínéről és további felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

## **Genotipizáló multiplex nested PCR**

A különböző reakciókban alkalmazott oligonukleotid primerek elnevezését, felismerő helyét a célgénekben, szekvenciáját, a PCR termékek hosszát és a reakciók hőmérsékleti profilját az **1. táblázat** tartalmazza.

## **Reverz-transzkripció PCR**

A cDNS-szintézishez mintánként 5 µl tisztított virális dsRNS-t használtunk, melyet random hexamer (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) vagy a vírus VP4 és VP7 génjére specifikus VP4-F/con3 és VP7-F konszenzus primerek jelenlétében 97 °C-on 5 percig denaturáltunk (*Gentsch, 1992; Iturriza-Gómara, 2001a; Simmonds, 2008*). Az RT-PCR-t AMV reverz-transzkriptáz enzim (AMV reverse transcriptase, Promega, Madison, WI, USA) segítségével végeztük 42 °C-on 60 percig, 30 µl végtérfogatban (2U AMV, 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, egyenként 300 µM deoxiribonukleinsav trifoszfát (dNTP), oligonukleotid primerek: 1,6 µM random hexamer vagy 0,6µM VP7-F/ VP4-F/con3 primer).

## **Multiplex nested PCR**

A cDNS amplifikációja és genotipizálása multiplex nested PCR rendszerben történt. A nested PCR első körében 5 µl cDNS-t használtunk templákként, melyben a vírus VP4 és VP7 génjeinek meghatározott régióját az adott génre specifikus konszenzus primerek (VP4-F+VP4-R/con2+con3 és VP7-F+VP7-R) segítségével amplifikáltuk. A reakcióhoz Taq DNS-polimeráz enzimet (GoTaq DNA-polymerase, Promega, Madison, WI, USA/MyTaq DNA-polymerase, BioLine, London, UK) használtunk (1U Taq polimeráz, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,

egyenként 200  $\mu$ M dNTP, egyenként 0,4  $\mu$ M primer 50  $\mu$ l végtérfogatban). A reakció hőmérsékleti profilja a következő volt: kezdeti denaturáció 94 °C, 3 min; 35 ciklus: denaturáció 94 °C, 30 s, annelláció 50 °C, 45 s, elongáció 72 °C, 1 min/30 s; végleges elongáció 72 °C, 5 min.

A nested PCR második körében történt az amplifikált DNS szakaszok genotipizálása, melyet a vírus VP4 és VP7 génjeinek variábilis régióra tervezett és a legelterjedtebb genotípusokra specifikus primerek jelenlétében végeztünk. A multiplex genotipizáló reakcióban a G1-G4, G8-G10 és G12 VP7 génre specifikus, illetve a P[4], P[6] és P[8]-P[11] VP4 génre specifikus primereket használtuk a megfelelő konszenzus primerekkel kombinálva (VP4-F/con3 és VP7-F/VP7-R) (*Gouvea, 1990; Gentsch, 1992; Das, 1994; Iturriza-Gómara, 2000b, 2004; Bányai, 2005a*). A reakcióban ugyanazt a Taq DNS-polimeráz enzimet alkalmaztuk, mint az első körben. A reakcióelegy összetétele és a reakció hőmérsékleti profilja megegyezett a nested PCR első körében leírtakkal, kivéve az annellációs hőmérsékletet, amely a genotipizáló reakció esetében 45 °C vagy 42 °C volt.

### **Agaróz gélelektroforézis**

A multiplex PCR második körében nyert, az egyes rotavírus genotípusokra jellemző, de egymástól különböző méretű PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével választottuk el. Az amplimereket 1,5 v/w %-os agaróz gélben (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 120 V-on, 60-90 percig elektroforetizáltuk (1,5 v/w %-os agaróz TBE [Tris-bórsav-EDTA] pH 8,3 pufferben; ethidium-bromid festés), majd UV-átvilágítás mellett BioRad GelDoc géldokumentációs (BioRad, Hercules, CA, USA) rendszerben rögzítettük az eredményeket.

### **VP6 génre specifikus PCR**

Azoknál a mintáknál, amelyeknél mind a G, mind a P tipizáló PCR eredménytelennek bizonyult, elvégeztünk a víruskapszid középső rétegét alkotó VP6 fehérjét kódoló génre specifikus PCR-t. A VP6 génre specifikus reakcióban a VP6-F és VP6-R, A-csoportú rotavírusokra nézve specifikus, széles reaktivitású konszenzus primereket alkalmaztuk (*Iturriza-Gómara, 2002*). A reakció során az annelláció 55 °C-on történt, a PCR reakcióelegy összetétele és a reakció hőmérsékleti profilja egyebekben megegyezett a fent leírtakkal. Amennyiben a VP6-specifikus reakció is negatív eredményt hozott, úgy az adott mintát rotavírus RNS negatívnak tekintettük és kizártuk a további vizsgálatokból.

**1. táblázat:** A PCR-ok során alkalmazott oligonukleotid primerek és a reakciók hőmérsékleti profilja

Primer neve, target	Primer szekvenciája	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
<b>VP6-génre specifikus primerek</b>			
VP6-F, nt 747-766 VP6-R, nt 1106-1126	5'-GACGGVGCRACTACATGGT-3' 5'-GTCCAATTCATNCCTGGTGG-3'	380	94°C 3 m 94°C 30 s 55°C 45 s 72°C 30 s 72°C 5 m
40 ciklus			
<b>A nested PCR első körében használt konszenzus primerek</b>			
VP4-F, nt 132-149 VP4-R, nt 775-795	5'-TATGCTCCAGTNAATTGG-3' 5'-ATTGCATTTCCTCCATAATG-3'	664	94°C 3 m
con3, nt 11-32 con2, nt 868-887	5'-TGGCTTCGCCATTTTATAGACA-3' 5'-ATTTCCGGACCATTTATAA-3'	877	94°C 30 s 50°C 45 s 72°C 60 s
VP7-F, nt 51-71 VP7-R, nt 914-932	5'-ATGTATGGTATTGAATATACCAC-3' 5'-AACTTGCCACCATTTTCC-3'	882	72°C 5 m
40 ciklus			
<b>A nested PCR második körében használt típus-specifikus primerek</b>			
VP4-génre specifikus primerek		VP4-F/con3 primerekkel kombinálva	
3T-1 (P[6]), nt 259-278	5'-TGTTGATTAGTTGGATTCAA-3'	147/268	
P[11], nt 305-323	5'-GTAAACATCCAGAATGTG-3'	192/313	94°C 3 m
1T-1D (P[8]), nt 339-356	5'-TCTACTGGRTRACNTGC-3'	225/346	94°C 30 s
4T-1 (P[9]), nt 385-402	5'-TGAGACATGCAATTGGAC-3'	271/392	45°C 45 s
2T-1 (P[4]), nt 474-494	5'-CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC-3'	363/484	72°C 60 s
5T-1 (P[10]), nt 575-594	5'-ATCATAGTTAGTAGTCGG-3'	463/584	72°C 5 m
35 ciklus			
VP7-génre specifikus primerek		VP7-R primerrel kombinálva	
G9, nt 757-776	5'-CTTGATGTGACTAYAAATAC-3'	176	
G10, nt 666-687	5'-ATGTCAGACTACARATACTGG-3'	267	
G12, nt 548-567	5'-CCGATGGACGTAACGTTGTA-3'	385	94°C 3 m
aDT4 (G4), nt 480-499	5'-CGTTTCTGGTGAGGAGTTG-3'	453	94°C 30 s
aCT2 (G2), nt 411-435	5'-CAATGATATTAACACATTTTCTGTG-3'	522	45°C 45 s
aBT1 (G1), nt 314-335	5'-CAAGTACTCAAATCAATGATGG-3'	619	72°C 60 s
G3, nt 250-269	5'-ACGAACTCAACACGAGAGG-3'	683	72°C 5 m
aAT8 (G8), nt 178-198	5'-GTCACACCATTTGTAAATTCG-3'	755	
35 ciklus			
VP7-génre specifikus primerek		VP7-F primerrel kombinálva	
9T-9B (G9), nt 131-147	5'-TATAAAGTCCATTGCAC-3'	97	
9T1-1 (G1), nt 176-195	5'-TCTTGTCAAAGCAAATAATG-3'	145	94°C 3 m
9T1-2 (G2), nt 262-281	5'-GTTAGAAATGATTCTCCACT-3'	231	94°C 30 s
9T-4 (G4), nt 423-440	5'-GGGTCGATGGAAAATTCT-3'	390	42°C 45 s
9T-3P (G3), nt 484-503	5'-GTCCAGTTGCAGTGTTAGC-3'	453	72°C 30 s
35 ciklus			

## **Nukleinsav-szekvenálás**

### **A PCR termékek tisztítása**

A VP6 specifikus PCR-rel pozitív, de a VP4 és/vagy VP7 génre nézve a multiplex PCR-rel nem tipizálható törzsek genotípusát nukleinsav-szekvenálással próbáltuk meghatározni. Ezen kívül elvégeztük a vizsgált időszakban azonosított G1P[8] törzsek egy válogatott, reprezentatív alcsoportjának szekvencia meghatározását is. A szekvenáláshoz a multiplex nested PCR első körében nyert, con2+con3 és VP7-F+VP7-R konszenzus primerpárokkal amplifikált PCR termékeket használtuk fel. Ahol arra szükség volt (nem állt rendelkezésre elegendő PCR termék vagy a meglévő PCR termék nem volt alkalmas a további amplifikálásra) a -20 °C-on tárolt széklétszuspenziókból újra elvégeztük a virális RNS extrakcióját a High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Basel, Switzerland) segítségével a gyártó utasításait követve. Az így nyert RNS mintákból a con3 és VP7-F konszenzus primerekkel elvégeztük a reverz transzkripció PCR-t, majd a con2+con3 és VP7-F+VP7-R primerkombinációkkal a nested-PCR első körét az előzőekben már ismertetett módon. Az első körös ampliconokat preparatív agaróz gélelektroforézissel választottuk el (1 v/w %-os preparatív agaróz (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) TBE pufferben; ethidium-bromid festés, 100 V-on 60 perc). A megfelelő méretű DNS szakaszokat a gélből Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) gélextrakciós kit segítségével nyertük vissza a gyártó utasításait követve. A tisztított PCR terméket további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

### **Szekvenáló PCR**

A gélből visszanyert, tisztított PCR termékekből 4-4 µl-t használtunk fel a szekvenáló reakcióban, melyet ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California) segítségével végeztünk el a gyártó utasításait követve. A DNS szakaszok direkt szekvenálása a VP4 és VP7 génekre specifikus PCR primerekkel történt. A reakciót 10 µl végtérfogatban végeztük, a hőprofil a következő volt: kezdeti denaturáció 96 °C, 1 min; 25 ciklus: denaturáció 96 °C, 20 s, annealáció 50 °C, 5 s, elongáció 60 °C, 4 min.

A szekvenáló PCR után a termékeket etanol-Na-acetát keverékével (96 v/v %-os etanol + 3M, pH 5,2 Na-acetát) csaptuk le, majd centrifugálás után (16000g, 30 min, 4 °C) 75 v/v %-os etanollal mostuk és szobahőmérsékleten szárítottuk.

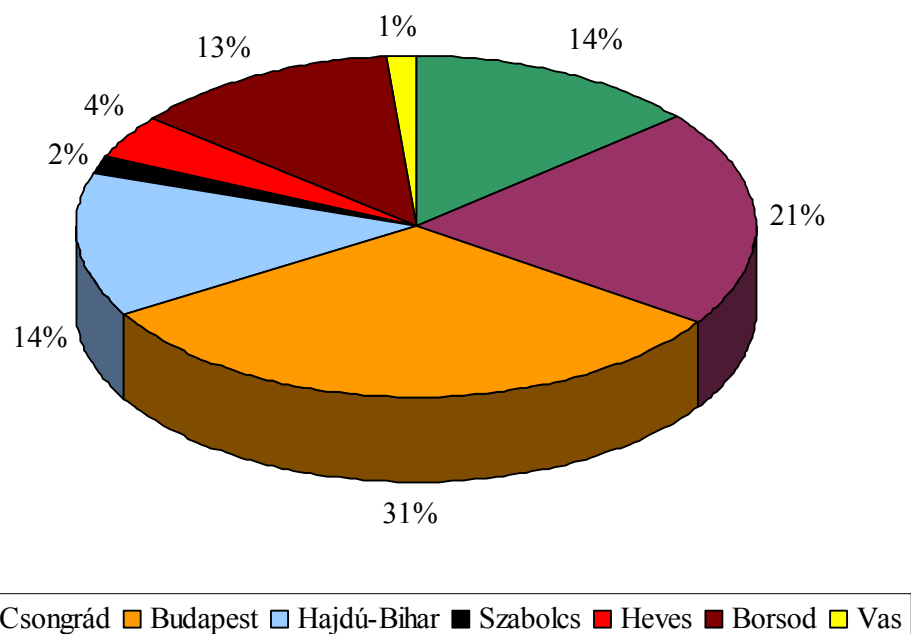
### **Szekvencia- és filogenetikai elemzés**

A jelölt termékek kapilláris elektroforézise és a szekvenaciaadatok gyűjtése automata szekvenaciaanalizáló ABIPrism 3100 Avant vagy ABI3500 (Applied Biosystems, Carlsbad, California) berendezéssel történt, a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Genetikai Intézetében és a Magyar Honvédség Dr. Radó György Honvéd Egészségügyi Központ laboratóriumában. A nyers szekvenciakromatogramokat a BioEdit (*Hall, 1999*) program segítségével ellenőriztük és tisztítottuk, majd a génbankban (GenBank) elérhető rotavírus szekvenciákhoz hasonlítottuk a Blast program (*Altschul, 1990*) segítségével. A szekvenciák manuális illesztését a GeneDoc programcsomag segítségével végeztük (*Nicholas, 1997*). A filogenetikai analízishez a MEGA5 programban a neighbor-joining algoritmust és a *p*-distance modelt használtuk (*Tamura, 2011*). Eredményeink statisztikai megerősítése érdekében bootstrap analízist is végeztünk.

# EREDMÉNYEK

## Minták és epidemiológiai háttérinformációk

A 2007-2011 közötti vizsgálati időszakban összesen 2615 rotavírus pozitív székletmintát gyűjtöttünk, többségében 5 éven aluli, akut gastroenteritisben szenvedő betegektől. A minták Magyarország 7 különböző földrajzi régiójából, valamint a fővárosból és vonzaskörzetéből származtak. A hazai surveillance első évében a rotavírus pozitív minták túlnyomó többsége még a fővárosi és baranya megyei sentinel kórházakból érkezett, továbbá Csongrád megyéből is jelentős számú mintát kaptunk. A következő években további földrajzi területeket vontunk be a vizsgálatokba (Hajdú-Bihar, Heves és Szabolcs megyék), így egyre növekvő számú rotavírus törzset tudunk vizsgálni az ország keleti régiójából is. A különböző földrajzi régiók az egymást követő években eltérő mértékben, változó számú mintával járultak hozzá a vizsgálatokhoz. Öt földrajzi régióból mindegyik évben kaptunk feldolgozásra váró mintákat, a többi területről azonban rendszertelenül érkeztek a székletminták. A **8. ábra** szemlélteti, hogy az öt év alatt a különböző földrajzi régiók milyen arányban járultak hozzá a vizsgálatokhoz.

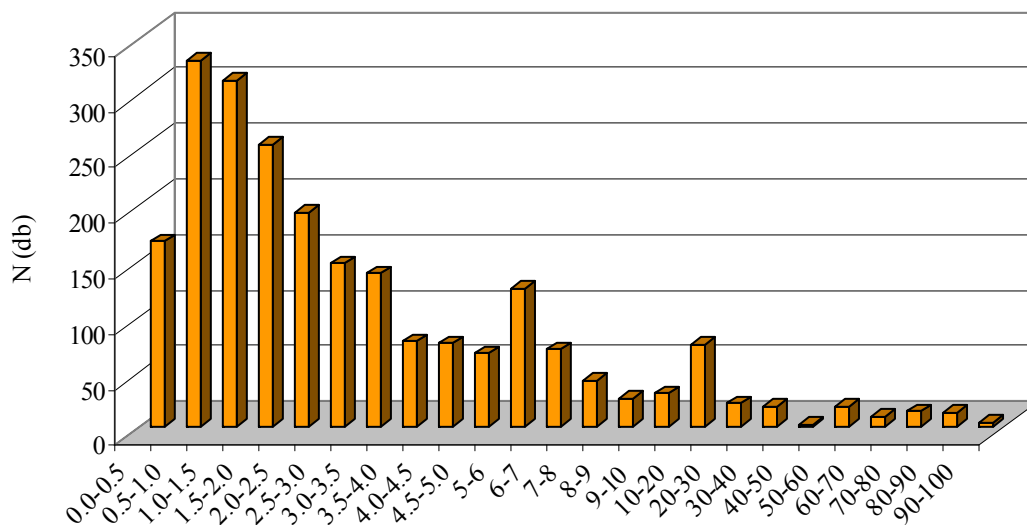


**8. ábra:** A 2007-2011 között feldolgozott 2380 székletminta beküldőnkénti megoszlása

A 2615 pozitív mintából 2526 esetében állt rendelkezésünkre elegendő mennyiség a molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséhez. További 146 mintát kizártunk a végső analízisből, mert nem sikerült A-csoportú rotavírus RNS-t detektálnunk a beküldött vizsgálati anyagban. Munkánk során így összesen 2380 székletmintából izolált rotavírus törzs genotipizálását végeztük el.

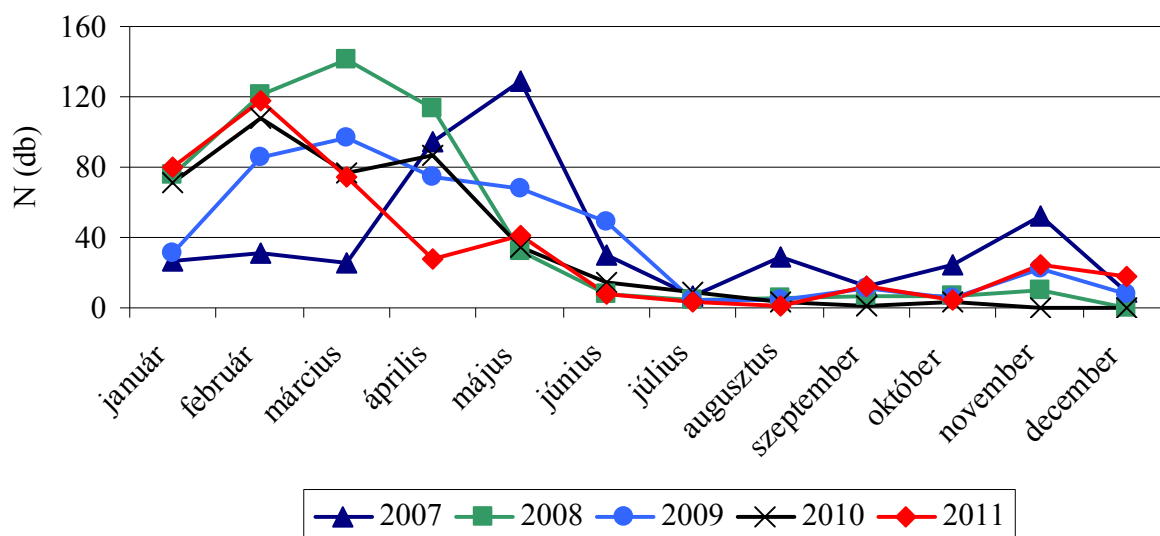
Az alapvető epidemiológiai háttér adatok közül az ellátás típusára vonatkozó adatok 2213 (92,9%) minta esetében álltak rendelkezésünkre. Adataink alapján a minták 84%-a (N=1859) fekvőbetegektől származott, míg a páciensek 16%-a (N=354) járóbeteg ellátásban részesült.

Összesen 2228 (93,6%) minta esetében voltak információink a betegek életkorát illetően. A koreloszlás azt mutatta, hogy a rotavírus-fertőzések 79,0 %-a az 5 évesnél fiatalabbak körében zajlott le, ezen belül a 0,5-2,0 éves korosztály volt a leginkább érintett (40,5%). Az infekciók kisebb része, mintegy 21%-a zajlott az 5 évesnél idősebb korosztályban, a serdülők és felnőttek körében 465 tünetekkel kísért esetet figyelhettünk meg (max. életkor 91 év) (**9. ábra**).



**9. ábra:** A rotavírus-fertőzések életkor szerinti eloszlása  
N=2228

A rotavírus pozitív székletminták mintavételi időpontjai alapján megvizsgáltuk a rotavírus-fertőzések időbeli eloszlását az egyes években. A rotavírus-fertőzések jellegzetes szezonalitást mutatnak (**10. ábra**). A rotavírus-infekciók nagy része a téli-tavaszi hónapokban zajlott, február-májusi járványcsúcsokkal. Az egyes genotípus-kombinációk relatív gyakorisága nem mutatott jelentős különbséget a járványos időszakban a többi hónap törzsgyakorisági adataival összevetve.



**10. ábra:** A rotavírus-fertőzések szezonális előfordulása 2007-2011 között Magyarországon  
N=2278

## Rotavírus G és P típusok előfordulása Magyarországon

A 2380 feldolgozásra került mintából 2338 (98,23%) minta esetében sikerült a genotipizáló PCR módszerrel és/vagy nukleinsav szekvenálással a G felszíni antigént kódoló VP7 gén genotípusát meghatározni. A vizsgálat öt éve alatt 7 különböző G-típust sikerült kimutatni, amelyek a G1, G2, G3, G4, G6, G9 és G12 genotípusok voltak. A hét genotípus relatív gyakoriságának vizsgálata a G1 törzsek dominanciáját mutatta, a tipizált minták 46,34%-a ehhez a genotípushoz tartozott. A második leggyakoribb genotípusnak a G4 törzsek bizonyultak, amelyek a vizsgált minták 24,03%-ában voltak kimutathatóak, ezt követték a G2 (15,50%), G9 (7,48%), G12 (2,10%), G3 (1,47%) és G6 (0,34%) típusú törzsek. A világszerte leggyakrabban elterjedtként számon tartott ötféle genotípushoz (G1-G4 és G9) tartozott a tipizált minták 94,91%-a. A genotipizáló vizsgálataink során néhány esetben egynél több, különböző antigéntulajdonságú rotavírus törzset sikerült kimutatni ugyanabból a mintából, ami több különböző típusú rotavírus törzssel történő egyidejű fertőzésre utal. Az ilyen kevert fertőzések aránya a vizsgált betegcsoportban nem érte el az 1%-ot. A következő kevert G-típusokat azonosítottuk: G1+2, G1+4, G1+9, G2+4, G2+12, G4+9 és G4+12. 42 (1,77%) minta esetében nem sikerült a G típust megállapítanunk.

A P felszíni fehérjét kódoló VP4 gén típusának meghatározását szintén 2338 minta esetében végeztük el sikeresen. A következő négyféle P típust tudtuk kimutatni a vizsgált mintákban: P[4], P[6] P[8] és P[9]. A leggyakoribb genotípusnak a P[8] bizonyult, a törzsek 78,95%-ánál ezt a genotípust találtuk. A másik három típus előfordulása összesen nem érte el

a 20%-ot: P[4] (15,55%), P[6] (2,18%) és P[9] (0,80%). A vizsgált minták 0,76%-ában találtunk egynél több, különböző P típust. A következő kevert P-típusokat azonosítottuk: P[4]+[6], P[4]+[8], P[6]+[8] és P[8]+[9]. 42 (1,77%) minta esetében nem sikerült a P típust megállapítanunk.

A vizsgált minták egy része az alkalmazott multiplex PCR rendszerrel nem volt genotipizálható, ami leggyakrabban azt jelentette, hogy az agaróz gélelektroforézis során nem tudunk detektálni méretspecifikus terméket a nested PCR második körében. Abban az esetben, ha detektálható mennyiségű első körös amplifikációs termék állt rendelkezésünkre, a genotípus megállapítását nukleinsav-szekvenálással kíséreltük meg. Ha sem az első, sem a második amplifikációs kör után nem tudtunk PCR terméket detektálni, akkor a virális nukleinsav újraizolálása után megismételtük a PCR-t és/vagy szekvenálást végeztünk. Ha mégis maradt nem tipizálható minta, az a következő okok valamelyikére vezethető vissza: 1: nem állt rendelkezésünkre elegendő mennyiségű széklétszuszpenzió a nukleinsav extrakció ismétléséhez; 2: az ismételt nukleinsav-izolálás után sem sikerült szekvenálható PCR terméket nyernünk az alkalmazott PCR primerekkel; 3: az első körös PCR termék mennyisége és minősége nem volt alkalmas a további amplifikáláshoz és szekvenáláshoz; 4: a szekvenáló reakció elvégzése és tisztítása után a szekvencia leolvasása sikertelen volt. Összességében, a 2380 mintából 41 törzsnél nem sikerült a G típus meghatározása, ismét 41 mintánál nem tudtunk P típust megállapítani, míg egy olyan rotavírus pozitív mintával talákoztunk, amelynél egyik felszíni antigént sem tudtuk genotipizálni.

### **Antigénkombinációk**

Összességében 2297 (96,5%) minta esetében sikerült mindkét felszíni antigén genotípusát meghatározni, a részlegesen tipizált minták aránya 3,5% maradt. A vizsgált időszakban 17 különböző antigénkombináció előfordulását detektáltuk, amelyek között akadt néhány olyan is, amelyeknek jelenlétét korábban még nem mutatták ki hazánkban. A feldolgozott 2380 mintából izolált rotavírus törzs csaknem 91%-a az öt, világszerte elterjedt genotípus kombináció valamelyikéhez tartozott. A hazánkban is előforduló leggyakoribb genotípus-kombinációk relatív gyakorisága a következő volt: G1P[8] 44,9%; G4P[8] 23,4%; G2P[4] 14,8%; G9P[8] 6,8%; G3P[8] 0,9%. Annak ellenére, hogy a G3P[8] rotavírus törzs világszerte általánosan elterjedtnek mondható, hazánkban ennek az antigénkombinációnak az előfordulása nem érte el az 1%-ot, és a gyakori típusok közül ez volt az egyetlen, amelyet nem sikerült kimutatnunk minden évben.

Az általános elterjedést mutató törzseken kívül ritkábban előforduló törzseket is ki tudunk mutatni a minták kisebb (4,12%) részében. Ezek a törzsek egyrészt a gyakori törzsek reasszortációja révén kialakult ritka kombinációk (G1P[4] 0,38%; G2P[8] 0,30%; G3P[4] 0,08% és G9P[4] 0,08%), részben pedig egyéb ritka, szokatlan antigénkombinációt hordozó vírusok (G1P[6] 0,04%; G2P[6] 0,04%; G3P[9] 0,38%; G4P[6] 0,38%; G6P[9] 0,30% és G9P[6] 0,17%), amelyek között Magyarországon endémiásnak számító és/vagy feltételezhetően állati eredetű törzsek is vannak. Figyelmet érdemel a G12P[6] és G12P[8] törzsek megnövekedett jelenléte a 2009-2010 években, amelyek relatív gyakorisága (1,97%) hazánkban így meghaladja az egyébként általánosan elterjedt G3P[8] törzsekét. A vizsgált időszakban kimutatott G-P genotípus kombinációkat és azok relatív gyakoriságát az egymást követő években az **2. táblázat** mutatja.

## 2. táblázat: Általános és ritka genotípus-kombinációk előfordulási gyakorisága 2007-2011

között Magyarországon (forrás: László *et al.* Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains. J Clin Virol. 2012;55(2):140-6., *módosítva*)

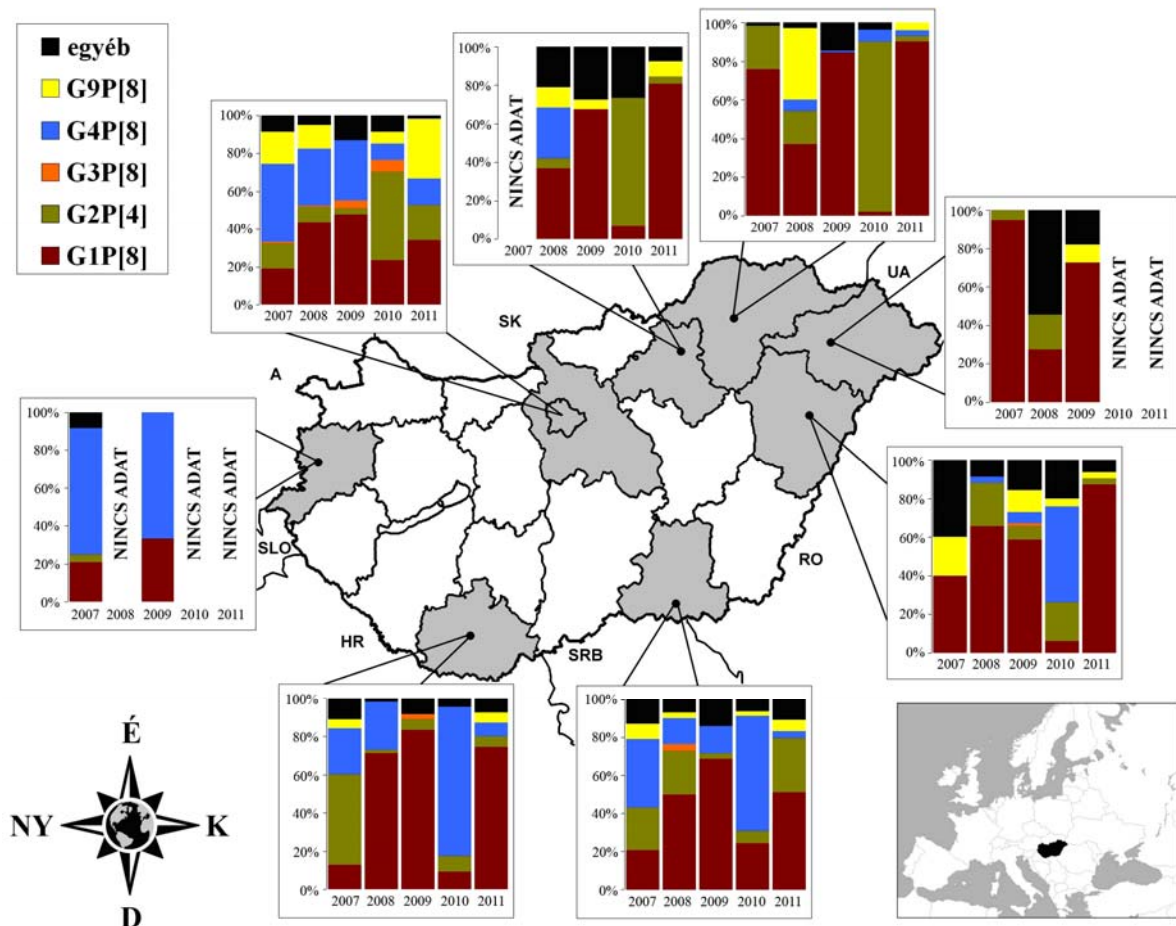
Genotípus kombinációk	Évenkénti mintaszámok N (%)					Összes
	2007	2008	2009	2010	2011	
<b>Általános genotípusok</b>						
G1P[8]	139 (28,60)	259 (49,81)	319 (62,92)	52 (12,53)	299 (66,15)	1068 (44,87)
G2P[4]	95 (19,55)	75 (14,42)	15 (2,96)	112 (26,99)	54 (11,95)	351 (14,75)
G3P[8]	2 (0,41)	7 (1,35)	10 (1,97)	3 (0,72)	0 (0,00)	22 (0,92)
G4P[8]	157 (32,30)	99 (19,04)	79 (15,58)	198 (47,71)	24 (5,31)	557 (23,40)
G9P[8]	50 (10,29)	43 (8,27)	10 (1,97)	9 (2,17)	50 (11,06)	162 (6,81)
Subtotal	443 (91,15)	483 (92,88)	433 (85,40)	374 (90,12)	427 (94,47)	2160 (90,75)
<b>Ritka genotípusok</b>						
G1P[4]	2 (0,41)	4 (0,77)	2 (0,39)	1 (0,24)	0 (0,00)	9 (0,38)
G1P[6]	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,20)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,04)
G2P[6]	0 (0,00)	1 (0,19)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,04)
G2P[8]	6 (1,23)	1 (0,19)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	7 (0,29)
G3P[4]	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,39)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,08)
G3P[9]	1 (0,21)	1 (0,19)	2 (0,39)	0 (0,00)	5 (1,11)	9 (0,38)
G4P[6]	4 (0,82)	2 (0,38)	0 (0,00)	2 (0,48)	1 (0,22)	9 (0,38)
G6P[9]	2 (0,41)	1 (0,19)	3 (0,59)	1 (0,24)	0 (0,00)	7 (0,29)
G9P[4]	1 (0,21)	1 (0,19)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,08)
G9P[6]	4 (0,82)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (0,17)
G12P[6]	0 (0,00)	2 (0,38)	15 (2,96)	14 (3,37)	1 (0,22)	32 (1,34)
G12P[8]	2 (0,41)	3 (0,58)	5 (0,99)	5 (1,20)	0 (0,00)	15 (0,63)
Subtotal	22 (4,53)	16 (3,08)	30 (5,92)	23 (5,54)	7 (1,55)	98 (4,12)
NT	16 (3,29)	13 (2,50)	23 (4,54)	15 (3,61)	16 (3,54)	83 (3,49)
Kevert	5 (1,03)	8 (1,54)	21 (4,14)	3 (0,72)	2 (0,44)	39 (1,64)
<b>Összes</b>	<b>486</b>	<b>520</b>	<b>507</b>	<b>415</b>	<b>452</b>	<b>2380</b>

NT: nem tipizálható törzsek

## A magyarországi gyakori törzsek földrajzi és időbeli dinamikája

Az egyes mintákhoz tartozó háttér adatok (postai irányítószám, beküldő betegellátó vagy diagnosztikai intézmény, a betegség és a mintavétel ideje) alapján megpróbáltuk feltérképezni a hazánkban leggyakrabban előforduló genotípus-kombinációk földrajzi és időbeli megoszlását. A mintagyűjtés területi egyenlőtlenségeinek ellenére, az öt általános rotavírus törzs relatív gyakoriságának regionális és évenkénti különbségeit vizsgálva értékes információkat nyerhetünk a törzsek időbeli és térbeli megjelenésének és terjedésének dinamikájáról.

Az egyes antigénkombinációk megjelenése és relatív gyakorisága nemcsak évről évre változott, de ugyanabban az évben a különböző földrajzi területek között is eltéréseket mutatott (11. ábra).



**11. ábra:** A 2007-2011 között Magyarországon genotipizált általános törzsek relatív gyakoriságában tapasztalható időbeli és földrajzi különbségek (forrás: László *et al.* Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains. J Clin Virol. 2012;55(2):140-6., *módosítva*)

A surveillance első évében a G1P[8] volt a domináns genotípus az ország északkeleti területén, míg a nyugati országrészben valamint a fővárosban és vonzásterületén G4P[8] törzsek fordultak elő leggyakrabban. Baranya megyében ezzel szemben G2P[4] genotípusokat találtunk többségben, míg Csongrádban kiegyenlítettebb volt az egyes típusok előfordulása. A következő két évben csaknem az egész ország területén a G1P[8] bizonyult a legelterjedtebb genotípusnak, emellett a G2P[4] és G4P[8] törzsek fordultak elő az ország különböző régióiban második leggyakoribb genotípusként. 2010-ben az azt megelőző évekhez képest a G1P[8] törzsek számának drámai csökkenését tapasztaltuk, ezzel párhuzamosan pedig előtérbe kerültek a G2P[4] és G4P[8] típusú vírusok. A G2P[4] törzsek Budapesten és az északi megyékben tudtak jelentősen elterjedni, míg az ország keleti és déli-délnyugati területeiről érkezett mintákban G4P[8] genotípusú törzseket tudtunk nagy számban kimutatni. 2011-ben a rotavírus-fertőzésekért ismét a G1P[8] törzsek voltak a felelősek a legtöbb érintett régióban. Ennek hatására a G2P[4] és G4P[8] vírusok a legtöbb helyen ismét visszaszorultak a második és harmadik helyre. A G9P[8] genotípusú törzsek nagyobb arányban 2008-ban az ország északkeleti területén okoztak betegséget, 2011-ben Budapesten és Közép-Magyarországon pedig ez volt a második leggyakoribb antigénkombináció.

## **Szekvenálások és filogenetikai elemzések eredményei**

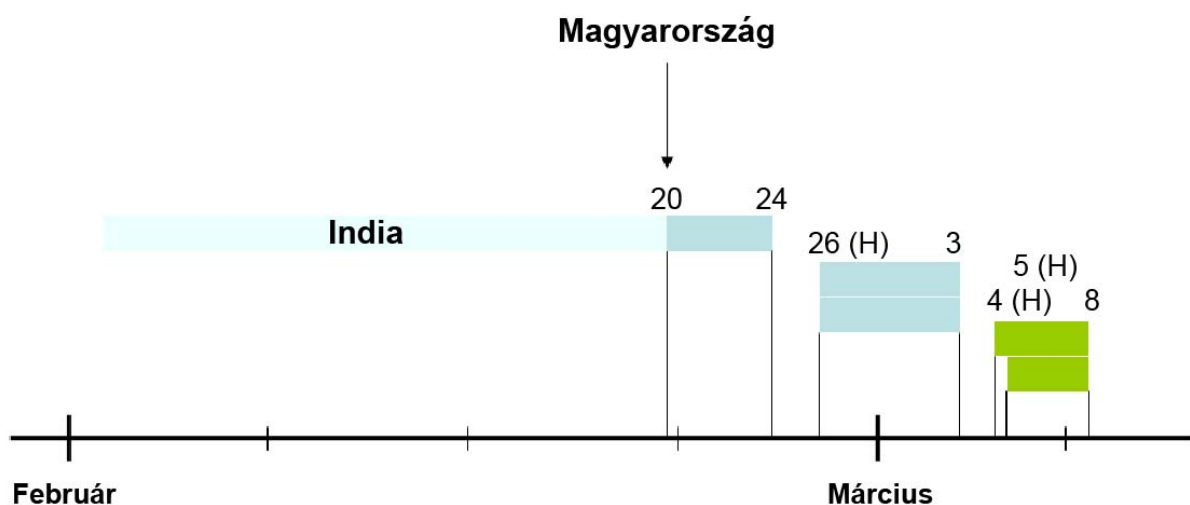
Szekvencia- és filogenetikai elemzéseinket a VP4 és VP7 gének részleges (500-700 bp hosszúságú) nukleinsav-sorrendjének meghatározása alapján végeztük el. Ezek a vizsgálatok részben a nem tipizálható minták genotípusának megállapításában, egyes esetekben a PCR eredményeink alátámasztásában segítettek. Ezeknek a szekvenálásoknak az eredményei az előző fejezetben tárgyalt G és P típusok gyakorisági adataiban megjelennek. Filogenetikai elemzéseket végeztünk azért is, hogy az újonnan felbukkanó ritka genotípus-kombinációk eredetét megállapítsuk, a monovalens és pentavalens vakcinákban is megtalálható, általános törzsek szekvenciavizsgálatával pedig választ kerestünk arra, hogy a hazánkban is forgalomban lévő oltóanyagok hogyan befolyásolják a cirkuláló törzsek genetikai összetételét.

### **G9P[6] genotípusú törzsek szekvenciaelemzése – egy Indiából behurcolt törzs?**

Nem sokkal a konzorcium indulása után, a surveillance első évében négy olyan rotavírus-fertőzést detektáltunk, melyeknél G9P[6] genotípusú vírustörzset tudtunk kimutatni

a székletmintákból. A fertőzések mind Baranya-megyében zajlottak, a minták ugyanabból a pécsi kórházból származtak, a mintavételi időpontok csupán néhány nap eltérést mutattak. A G9P[6] törzsek kimutatása a genotípus első hazai dokumentációját jelentette, és felkeltette a figyelmünket a fertőzések területi és időbeli egybeesése is. Ezért tovább vizsgálódtunk, hogy kiderítsük, lehet-e összefüggés az esetek között. A páciensek anamnézisének feltárása során, a kórházi személyzettel és a szülőkkel történő információcserék után rajzolódott ki előttünk a G9P[6] törzs Indiából történő behurcolásának és transzmissziójának lehetősége.

Az esetek rövid leírása és a fertőzések/tünetek megjelenésének időbeli egymásutánisága a témát feldolgozó publikációnkban részletesen olvasható, itt most csak vázlatosan, néhány mondatban szeretnék szólni a háttérinformációkról. A kórházban ápoltságok egy lány (4 és 7 évesek), és egy fiú (10 hónapos és 3 éves) testvérpár voltak. A rotavírus-fertőzés a lányok édesapjától származhatott, aki indiai utazásáról hazatérve, már a repülőút alatt akut gastroenteritises tüneteket produkált. Az apa a fertőzést továbbadta feleségének és két lánygyermekének, a gyerekek esetén kórházi felvétel vált szükségessé. Kórházi benttartózkodásuk alatt ugyanazon az osztályon feküdt a fiú testvérpár idősebb tagja, aki itt fertőződhetett a vírussal és adta át később fiatalabb testvérének a kórokozót (**12. ábra**).

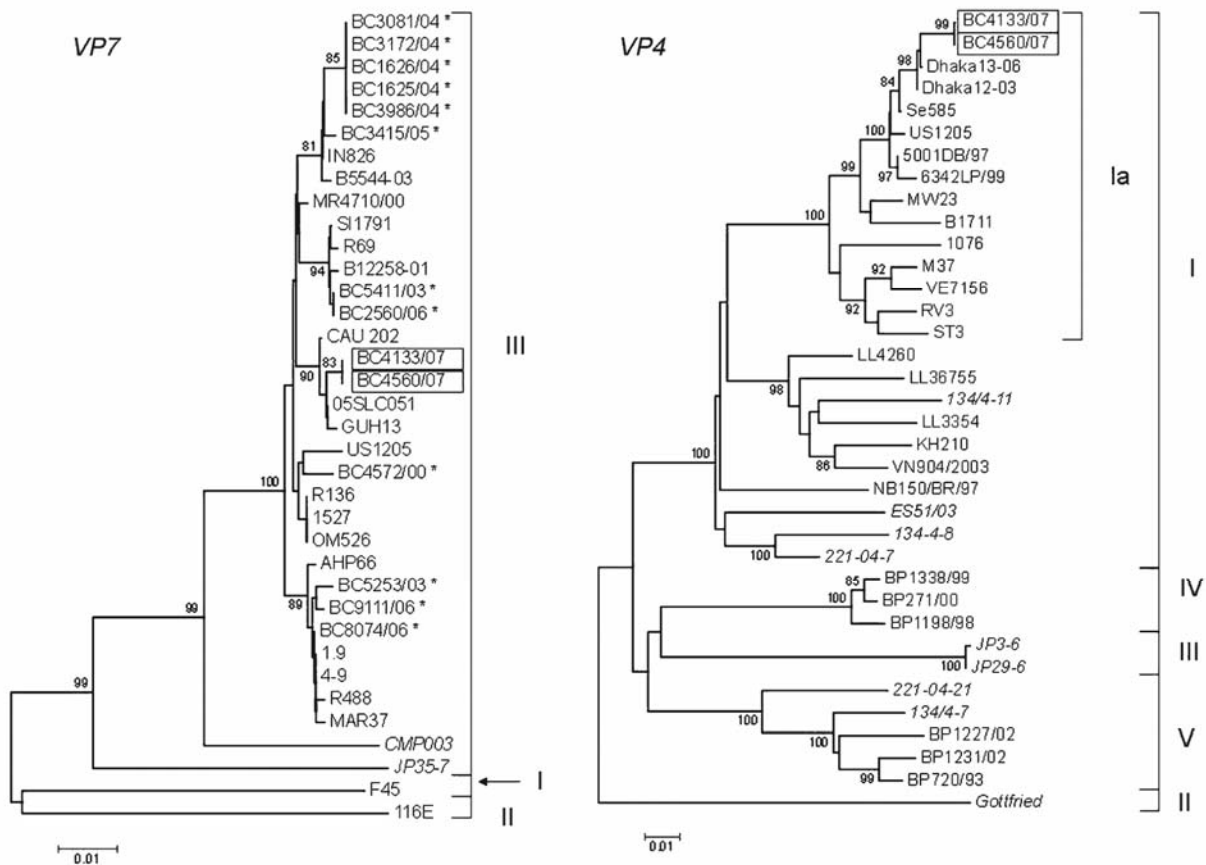


**12. ábra:** A G9P[6] törzs behurcolásával kapcsolatos események időbeli egymásutánisága. A dátumok a tünetek megjelenését és időtartamát jelzik.

A kék szín jelzi az Indiából hazatérő apát és mindkét gyermekét. A zöld szín jelzi a korábbi kórházi ápolása során megfertőződő gyermeket és annak fiútestvérét. H: kórházi felvételek időpontja.

Két kiválasztott törzs VP4 és VP7 génjének részleges szekvencia- és filogenetikai elemzését végeztük el, hogy az elméletünket molekuláris biológiai vizsgálatokkal is alátámasszuk. A filogenetikai elemzés 100%-os szekvenciaegyezést mutatott a vizsgált

génszakaszok (VP7: nt 95-791 és VP4: nt 62-637) között, így megerősítette az első és a második eset közötti epidemiológiai összefüggést. A G9P[6] törzsek VP7 génjének nukleinsav-szekvenciája szoros genetikai hasonlóságot ( $\geq 99\%$  nt azonosság, 95-791 bp közötti génszakaszon) mutatott a világ számos más részén (Európában, Amerikában, Ázsiában és Afrikában) azonosított humán G9 törzsekével, de valamivel alacsonyabb szintű nukleotid azonosságot (98-99% nt azonosság, 95-628 bp közötti génszakaszon) találtunk a korábbi években (2000-2006), ugyanabban a régióban cirkuláló hazai G9 izolátumokkal összehasonlítva. A szekvenált törzsek VP4 génjei a P[6] genotípuson belül a Magyarországon eddig még azonosítatlan Ia filogenetikai vonalhoz tartoztak, és szoros rokonságot ( $\geq 99\%$  nt azonosság, 42-794 bp közötti génszakaszon) mutattak Dél-Ázsiából (Banglades) származó P[6] törzsekkel (**13. ábra**).



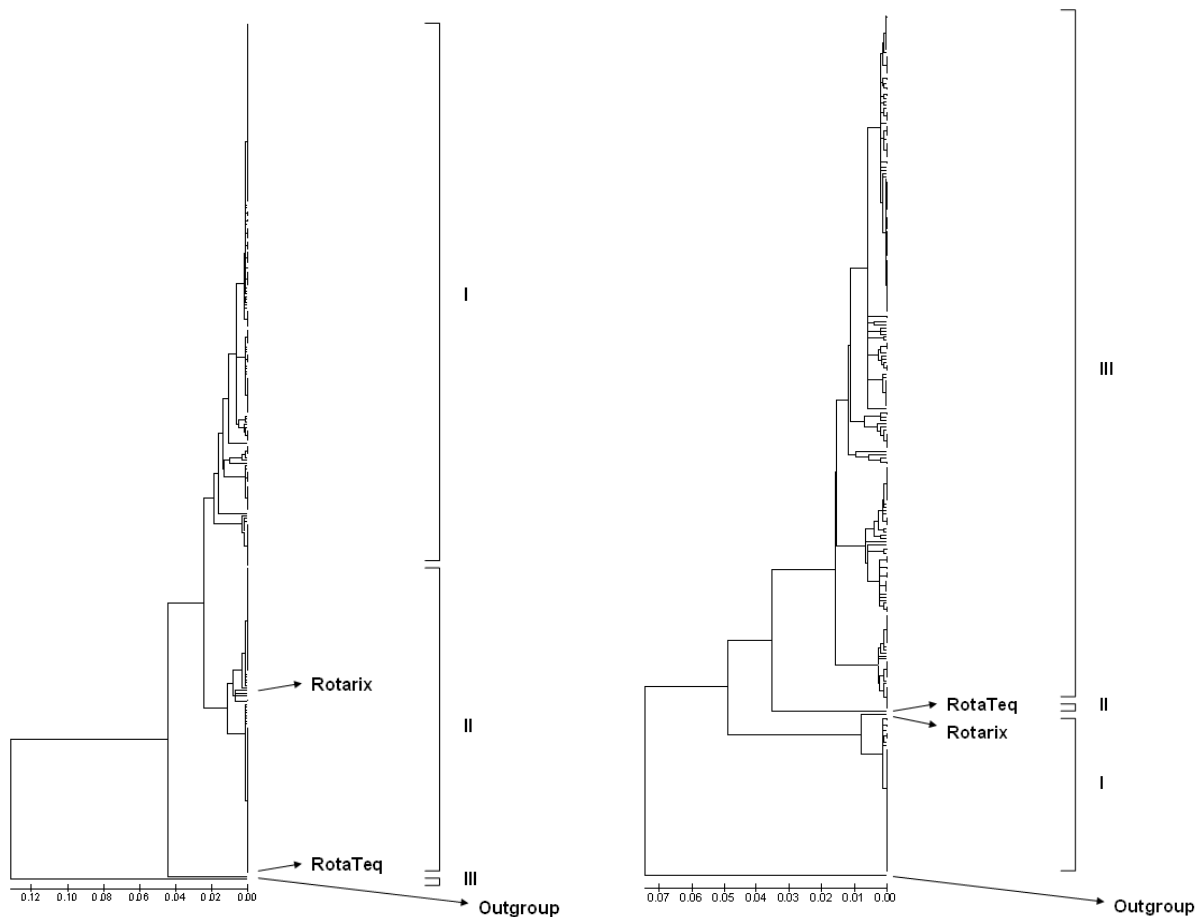
**13. ábra:** A G9P[6] törzsek filogenetikai analízise a VP4 és VP7 gének részleges szekvencia meghatározása alapján.

A genotípusokon belüli törzsfajlódási vonalakat római számok jelölik. A 2007-ben azonosított G9P[6] törzseket bekeretezve tüntettük fel. A korábbi évekből származó hazai G9 és P[6] törzseket csillaggal jelöltük. A sertés eredetű törzsek dőlt betűvel olvashatók. (forrás: László *et al.* First detection of P[6],G9 rotaviruses in Hungary--an imported strain from India? J Travel Med. 2009;16(2):141-3.)

Sajnos nem történt víruskimutatás az Indiából hazatérő apa hasmenéses székletéből, és nem volt elérhető szekvencia adat sem a térségből az adott rotavírus szezonból, így a vizsgált törzsek pontos eredetére nem derült fény. Szekvencia- és filogenetikai elemzésünk azonban szorosabb genetikai rokonságot tárt fel a Dél-Ázsiából származó rotavírus törzsek és a magyarországi G9P[6] törzsek között, mint a korábban azonosított hazai G9 és P[6] specificitású vírusokkal. Genetikai elemzésünkkel ugyan nem tudtuk minden kétséget kizáróan bizonyítani, de a kórtörténet és a fertőzések megjelenésének időbeli egymásutánisága alapján feltételezhetjük a G9P[6] törzsek Dél-Ázsiából történő behurcolását.

### **G1P[8] genotípusú törzsek filogenetikai elemzése**

A vakcina eladási adatok elemzéséből kitűnik, hogy hazánkban elsősorban a monovalens, G1P[8] specificitású törzset tartalmazó Rotarix<sup>®</sup> vakcina használata terjedt el, de a kisebb számban alkalmazott pentavalens RotaTeq<sup>®</sup> oltóanyagban is megtalálhatók a G1 és P[8] típusú gének. Az általunk azonosított, Magyarországon domináns G1P[8] törzsek szekvencia- és filogenetikai elemzését azért végeztük el, hogy megvizsgáljuk, van-e közvetlen genetikai kapcsolat a cirkuláló vad törzsek és a vakcina törzsek között, illetve képes-e a vakcina törzs virulenciáját visszanyerve betegséget okozni a közösségben. Ezért a 2007-2011 között kimutatott, különböző földrajzi területekről származó nagyszámú G1P[8] törzs egy reprezentatív alcsoportjának vizsgálatát és a vakcina törzsekkel való összehasonlítását tűztük ki célul. Összehasonlító vizsgálatunkat a VP4 gén esetében egy 530 bp (nt 305-834 génszakasz) hosszúságú, míg a VP7 gén esetében 503 bp (nt 372-874 génszakasz) hosszúságú, az antigenspecificitást meghatározó variábilis génszakasz részleges szekvencia sorrendje alapján végeztük el. A 318 sikeresen szekvenált törzs filogenetikai elemzése során mind a VP4, mind a VP7 gén esetében az adott genotípuson belül két törzsfajlódási vonalat sikerült kimutatnunk. A G1 VP7 gének az I és II filogenetikai vonalhoz tartoztak, míg a P[8] VP4 gének az I és III leszármazási vonalat képviselték (**14. ábra**).



**14. ábra:** A G1P[8] törzsek filogenetikai analízise a VP4 és VP7 gének részleges szekvenciameghatározása alapján.

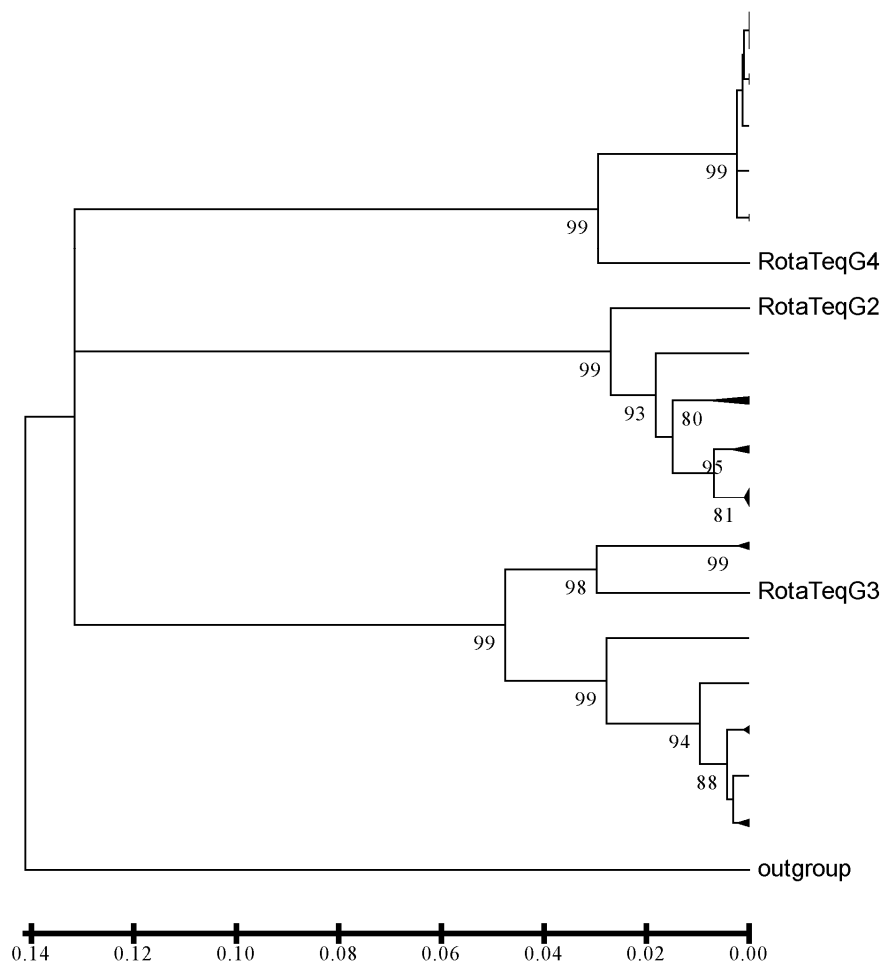
A genotípusokon belüli törzspejlődési vonalakat római számok jelölik. A vakcinák pozícióját nyilakkal jelöltük. Outgroup-ként a DS-1 (G2P[4]) törzs szerepel. (forrás: László *et al.* Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains. *J Clin Virol.* 2012;55(2):140-6.)

A vizsgált G1P[8] törzsek mindkét gén esetében egyértelműen elkülönültek a RotaTeq<sup>®</sup> vakcinában található G1 VP7 (max. nt azonosság 93%) és P[8] VP4 (max. nt azonosság 94%) génektől. Ezzel szemben négy közösségi törzs esetében a VP7 gén szorosabb kapcsolatot mutatott a Rotarix<sup>®</sup> oltóanyagban található 89-12 vakcina törzs G1 génjével, itt mintegy 97,9%-os szekvencia homológiát tudtunk kimutatni. További 51 törzs VP4 génje azonos filogenetikai vonalba tartozott a Rotarix<sup>®</sup> eredetű VP4 génnel, amelyek között 98,3-98,5%-os szekvenciahasonlóságot találtunk. Az említett 55 törzs mindegyike 2007 és 2009 közötti időszakban került azonosításra, de ezek egyike sem hordozta egyszerre a 89-12 törzs VP4 és VP7 szekvenciáihoz nagyon hasonló G1 és P[8] géneket. Az 55 törzs VP4 és VP7 szekvenciáiban több, eltérő pozícióban lévő nukleotidcserét találtunk, amely azt jelzi számunkra, hogy ezek a törzsek a vakcina törzshöz ugyan nagyon hasonló, de azzal mégsem

azonos génekkel rendelkeznek, és ezek a gének feltehetően már hosszabb ideje cirkulálhatnak a közösségben.

### **G2, G3 és G4 genotípusú törzsek szekvenciaelemzése**

Összesen 36 darab G2, G3 és G4 genotípusú törzs VP7 génjének részleges nukleinsav-sorrendjét határoztuk meg és hasonlítottuk össze a RotaTeq<sup>®</sup> vakcinában megtalálható azonos genotípusú törzsek VP7 génszekvenciáival. Célunk ugyanaz volt, mint a G1P[8] törzsek szekvenálása esetén, tehát megállapítani, hogy találunk-e olyan, a közösségben cirkuláló rotavírus törzset, amelynek VP7 génje esetleg a RotaTeq<sup>®</sup> vakcina törzsek valamelyikétől származhat. Összehasonlító vizsgálatainkat a VP7 gén ~ 680 bp (G2: 669 bp, nt 219-887; G3: 679 bp, nt 212-890; G4: 679 bp, nt 220-895) hosszúságú, az antigenitást meghatározó variábilis régiókat is tartalmazó szakaszai alapján végeztük el. A nukleinsav-szekvenciák összehasonlításakor a surveillance során azonosított törzsek mindhárom genotípus esetén egyértelműen elkülönültek a vakcina törzsektől (**15. ábra**). A G2 törzsek VP7 génjei 93,4-94,9% nukleotidegyezést, a G3 törzsek 89,6-93,9% nukleotidegyezést, végül a G4 törzsek 94,8-95,1%-os szekvenciaazonosságot mutattak a RotaTeq<sup>®</sup> vakcinában megtalálható G2, G3 és G4 törzsek azonos génjeivel. A G1 törzseknél észlelt vakcina törzsszel való szorosabb genetikai kapcsolatot egyik törzs esetében sem találtunk. A vizsgált közösségi G4 törzsek esetében egy nukleotid triplet inszercióját azonosítottunk a vakcina törzs szekvenciájához képest, amely a kódolt fehérje aminosav sorrendjében egy aszparaginsav beépüléséhez vezetett a 76-os aminosav pozícióban. Összességében a G2 törzseknél 10, a G3 törzseknél 13, a G4 törzsek estén pedig további 5 olyan nukleotidszubsztitúciót azonosítottunk a gének szekvenciáiban a vakcina törzs szekvenciájához képest, amelyek a kódolt fehérjében aminosavcseréhez vezettek. A változások egy része érinti a variábilis régiókat, és a beépített aminosavak fizikokémiai tulajdonságait is.



**15. ábra:** A G2, G3 és G4 genotípusú törzsek VP7 génjének részleges szekvenciameghatározása alapján készült filogenetikai törzsfá

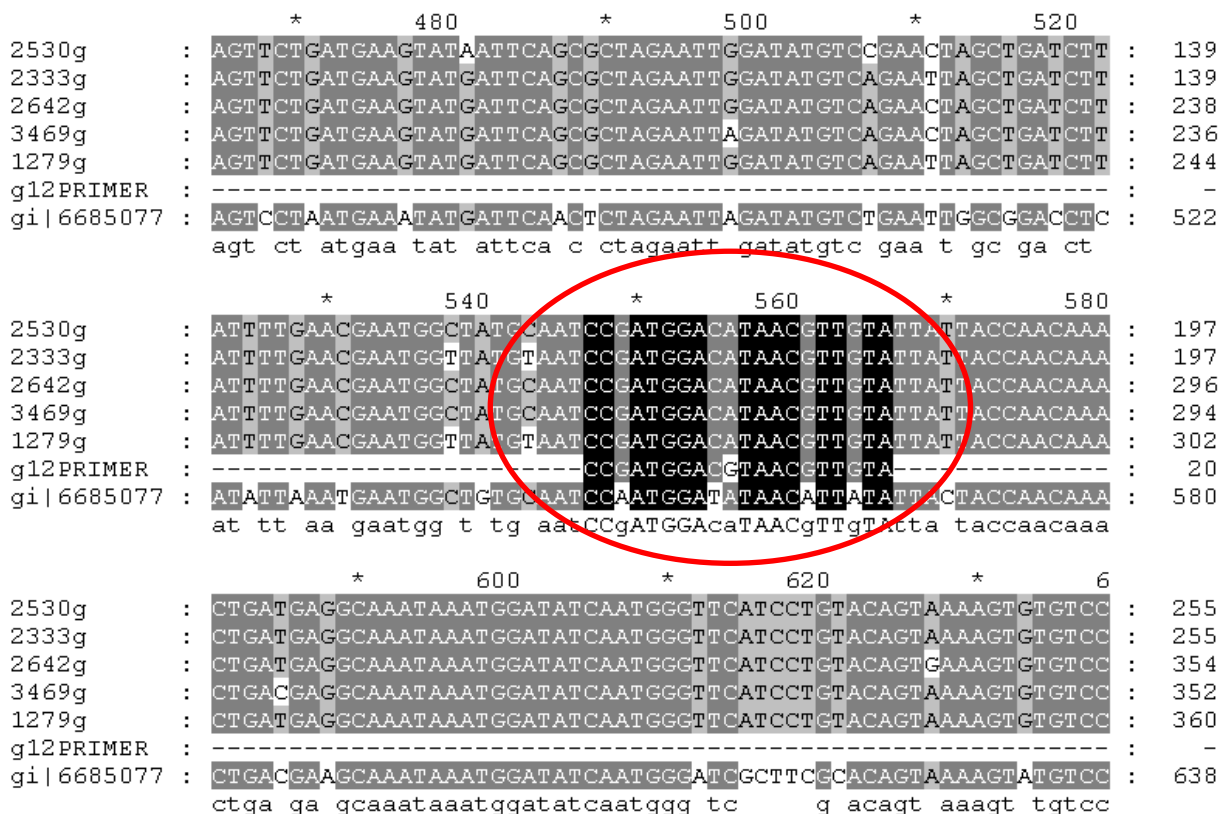
Outgroup-ként az L26 (G12P[4]) törzs szerepel. Az alacsony mintaszám miatt a genotípusokon belüli filogenetikai vonalakat nem vizsgáltuk.

### Metodikai megfontolások

A multiplex PCR módszerrel azonosított ritka genotípus-kombinációk esetében VP4 és/vagy VP7 gének részleges szekvenciaelemzését végeztük azért, hogy eredményeinket megerősítsük. A szekvenálások sok esetben alátámasztották a PCR módszerrel kapott eredményeket, néhány törzsnél azonban a szekvenciaelemzés a PCR-től eltérő eredményt mutatott.

Az egyik ilyen különbségre akkor bukkantunk rá, amikor öt, a PCR alapján G12P[9] genotípusként azonosított törzsek szekvenciaelemzését végeztük. A szekvenálás alapján a vizsgált törzsek valódi genotípusa G6P[9] specificitásúnak bizonyult. A VP4 gén esetében tehát a PCR és a szekvenálás eredménye összhangban állt egymással, a VP7 gén esetében

azonban kíváncsiak voltunk a hibás PCR tipizálás okára. Részletesen megvizsgálva a G6 törzsek VP7 génjének részleges szekvenciáját kiderült, hogy a multiplex genotipizáló rendszerünkben alkalmazott G12 specificitású primer a G12 törzsek VP7 szekvenciájának megfelelő primerkötő helyen szinte pontosan illeszkedik az általunk talált G6 törzsek szekvenciájára is. A primer és a G6 törzsekben a primerkötő hely szekvenciájának középső régiójában (a 20 bp hosszúságú primerben az 5'-végtől a 10-es nukleotid pozícióban) találtunk csupán egy guanin→adenin (G→A) nukleotidcserét a két szekvencia között, ami nem akadályozta a primer annellációját a PCR során (**16. ábra**).



**16. ábra:** A 2007-2011 között azonosított magyarországi G6 törzsek, egy G6 referencia törzs (MG6.01) és a G12 specifikus tipizáló primer szekvencia homológiája.

Az ábrán a bekarikázott régióban látható, hogy a G6 törzsek és a G12 primer szekvenciája között csupán egy nukleotid eltérés van, amely hibás PCR tipizáláshoz vezetett.

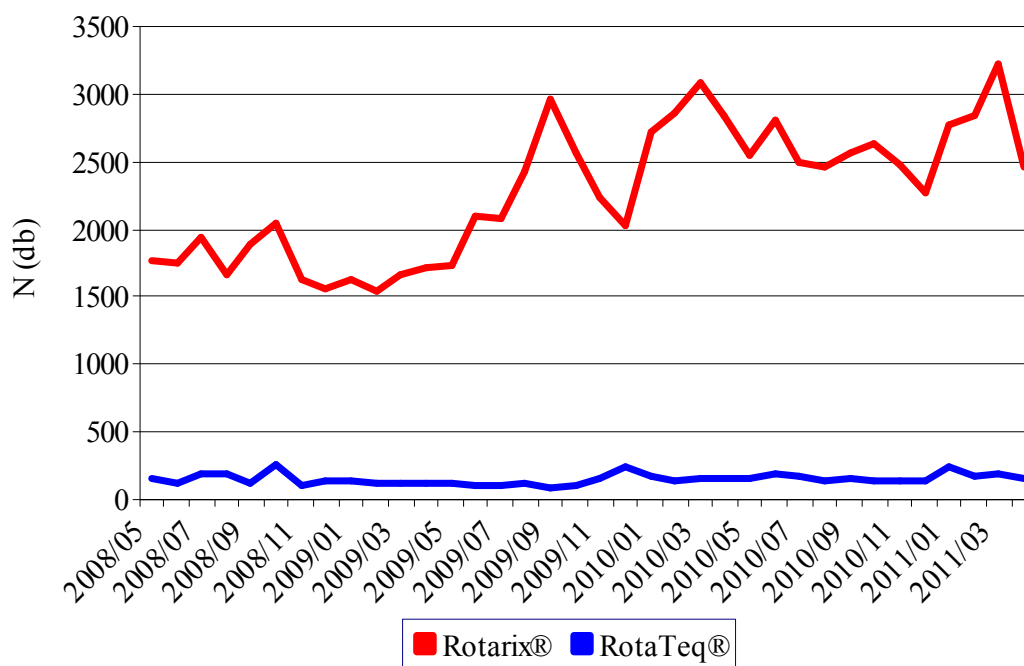
Újabb két esetben, egy G2P[6] és egy G4P[6] törzs genotípusának szekvenálással történő megerősítése során derült ki, hogy mindkét mintában G12P[6] genotípusú rotavírus található. A részletes szekvenációelemzés ugyan nem tárt fel olyan figyelemre méltó szekvenációhomológiát a G2 és G4 specificitású tipizáló primerek és a célszekvenciák között, mint a G6 típusú törzseknél, néhány nukleotidazonosságot azért találtunk. A 20 bp hosszú G2 primer és a primerkötő helye, valamint a 18 bp hosszúságú G4 primer és a primerkötő helye

között a G12 törzsek szekvenciájában egyaránt 9-9 nukleotid egyezést találtunk. Bár a primerek 3'-vége és a G12 törzsek szekvenciája között nem volt nukleotidegyezés, a PCR során mégis megtörténhetett a hibás primerannelláció.

Végül egy G8P[8] törzs genotípusa a szekvenálás során G4P[8] típusúnak bizonyult. A szekvenálás során nyert adatok nem magyarázták a PCR tipizálási hibát, a 21 bp hosszúságú G8 tipizáló primer és a célszekvencia primerkötő helye között 10 nukleotid egyezést találtunk.

## A rotavírus elleni vakcináció helyzete Magyarországon

A rotavírus vakcinák eladási statisztikái és a vizsgált időszakban a Központi Statisztikai Hivatal (KSH) által nyilvántartott élvészületések száma alapján megpróbáltuk felmérni az ország különböző területein a rotavírus elleni átoltottság mértékét. Az oltóanyag eladási adatok a magyarországi kistérségek szerinti havi bontásban 2008 májusától 2011 áprilisáig állnak rendelkezésünkre. Az éves vakcina eladási adatok alapján hazánkban a célcsoport átoltottsága 2007 és 2010 közötti időszakban 4%-ról 18%-ra nőtt. Az eladott dózisok számából az is kiderült, hogy a két oltóanyag közül a monovalens Rotarix® iránti kereslet sokkal nagyobb (közel 94%-os relatív gyakoriság) a pentavalens, reasszortáns RotaTeq® vakcinával szemben (17. ábra).



**17. ábra:** A rotavírus oltóanyagok eladási adataiból készített grafikon 2008/05 és 2011/03 közötti időszakban Magyarországon

A célcsoport átoltottsága országos átlagban évről-évre nő, de még mindig elég alacsony. Magyarországon a rotavírus elleni vakcina nem része a gyermekkori rutin immunizációs programnak, és a vakcinálással járó magas költségeket a szülőknek kell megfizetniük. Részben ez is oka lehet annak, hogy a szülők elsősorban a monovalens oltóanyagot keresik, amelyből csak két dózist kell kapnia a gyermeknek, szemben a pentavalens vakcina három előírt dózisával. Az adatainkat kistérségi bontásban vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az ország legtöbb területi egységén az átoltottság jóval 20% alatt marad. A fővárosban valamint néhány közép-magyarországi és nyugat-magyarországi kistérségben tapasztaltunk 20-40% közötti lefedettséget, és csupán néhány fővárosi kerületben és a budaörsi kistérségben sikerült elérni kiemelkedő átoltottságot (43-93%).

## MEGBESZÉLÉS

A humán A-csoportú rotavírus-fertőzések világszerte komoly közegészségügyi jelentőséggel bírnak. Éppen ezért felfedezésük után nem sokkal, már az 1980-as évektől kezdve a világ számos országában folytattak a törzsdiverzitás feltárására irányuló molekuláris epidemiológiai vizsgálatokat (*Gentsch, 1996; Parashar, 1998; Estes és Kapikian, 2007*). A hazánkban végzett rotavírus törzs surveillance tevékenység is egészen erre az időszakra nyúlik vissza.

A korai vizsgálatok a leggyakoribb típusok (G1–G4) hazai előfordulását igazolták (*Szűcs, 1995, 1999, 2005*). Ebben az időszakban a törzsek azonosítása elsősorban monoklonális ellenanyagokra épülő szerológiai tesztek (MAb-EIA) segítségével történt, melyek a leggyakoribb humán típusok kimutatását célozták. A rotavírusok szerológiai azonosításakor azonban gyakoriak voltak a rokon törzsek közötti keresztreakciók, és a törzsek egy részének a szerotípusa az alkalmazott ellenanyagok segítségével nem volt meghatározható (*Szűcs, 1995*). A későbbiekben, ahogy a nagyobb fajlagosságú és érzékenyebb génszekvencia-alapú molekuláris biológiai technikák elterjedtek, a gyakori humán törzsek mellett más, ritka genotípus-kombinációkat, újonnan felbukkanó és epidemiológiailag fontossá váló törzseket is sikerült azonosítani. Ezzel párhuzamosan csökkent a nem tipizálható törzsek aránya is. A rotavírus vakcinák megjelenése előtti időszakban a törzsdiverzitásra vonatkozó magyarországi adatok két sentinel régióból (Budapest és Baranya-megye) származtak. A prevakcinációs időszak mintegy 22 éves időszaka alatt közel 7000 rotavírus törzs szero- és genotipizálása történt meg (*Bányai, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2004c, 2004d, 2005a, 2005b, 2009a, 2009c, 2010*). Az EuroRotaNet-hez történő csatlakozáskor célul tűztük ki a vizsgálati terület kiterjesztését, hogy az ország nagy részét lefedő, átfogóbb és pontosabb epidemiológiai adatokhoz jussunk. A posztvakcinációs rotavírus surveillance 2007-2011 közötti időszakában több mint 2400, az ország nyolc különböző régiójából érkező rotavírus törzs feldolgozását végeztük el molekuláris genetikai módszerekkel, az EuroRotaNet által javasolt tipizálási protokoll alapján. A mintabeküldés területi egyenlőtlenségei ellenére a hazánkban cirkuláló rotavírusok epidemiológiájáról releváns adatok gyűltek össze.

A rotavírus-fertőzések életkor szerinti eloszlását vizsgálva a várakozásainknak megfelelő eredményeket kaptuk. Jól ismert, hogy az első tünetekkel kísért rotavírus-infekció jellemzően a 6-24 hónapos kor között jelentkezik, de 5 éves kor előtt biztosan bekövetkezik (*Parashar, 1998; Estes és Kapikian, 2007*). Ennek megfelelően a betegeink csaknem 80%-a

5 évesnél fiatalabb volt. Az életkor előrehaladtával a korábbi fertőzések során termelődött szerotípus-specifikus és keresztreakáló antitesteknek köszönhetően részben védetté válunk a rotavírus okozta megbetegedéssel szemben, így az újabb infekciók enyhe tünetekkel vagy tünetmentesen zajlanak. A jelenlegi vakcinációs stratégiák is arra épülnek, hogy lehetőleg még a betegségre fogékony életkor elérése előtt történjen meg a védettség kialakítása. Ennek megfelelően legkésőbb 26 hetes korra ajánlott befejezni a rotavírus elleni vakcinálást.

A 2380 rotavírus törzs molekuláris vizsgálata a G1P[8], G2P[4] és G4P[8] genotípusok nagyobb gyakoriságát mutatták országszerte. Emellett az általános törzsek között számon tartott G3P[8] vírusok hazánkban kisebb jelentőségűnek bizonyultak, relatív gyakoriságuk az öt év összesített adatai alapján nem érte el az 1%-ot. Összességében a negyedik leggyakoribb genotípusként azonosítottuk a G9P[8] törzseket. Ezek a törzsek az 1990-es évek közepén jelentek meg és terjedtek el világszerte, aminek következtében ma már az ötödik leggyakoribb, klinikailag fontos törzsként tartjuk számon (*Ramachandran, 2000; Armah, 2003; Samajdar, 2008; Martinez-Laso, 2009*). Magyarországon első alkalommal 1998-ban került azonosításra ez az antigénkombináció, és néhány év alatt a G1P[8] törzsek mellett a második leggyakoribb genotípusként lehetett azonosítani (*Bányai, 2004a, 2005a*). A posztvakcinációs időszakban e törzsek jelentősége némileg visszaszorult, de minden vizsgálati évben, és Szabolcs valamint Vas megyék kivételével mindegyik régióból kerültek elő ilyen genotípusú vírusok. Az említett két megyéből csak szórványosan és korlátozott számban érkeztek hozzánk a rotavírus pozitív székletminták, így feltételezhetően ez lehetett az oka annak, hogy ezeken a területeken nem tudtunk G9 törzseket kimutatni.

A legújabb, gyors globális terjedést mutató genotípus, a G12, első alkalommal 2005-ben került itthon azonosításra (*Bányai, 2007b, 2009a*). A 2000-es évek elején a világ számos országából jelentették ennek a törzsnek a megjelenését és növekvő gyakoriságát. A G12 típus elsősorban P[6] és P[8] antigén specificitással kombinációban fordul elő (*Rahman, 2007; Sharma, 2008; Uchida, 2006*). Hazánkban elsősorban G12P[8] törzsek kerültek azonosításra, és ezidáig ezek a törzsek nem tettek szert komolyabb jelentőségre nálunk. Figyelemre méltó azonban, hogy a G12P[6] és G12P[8] törzsek relatív gyakorisága a vizsgált időszakban meghaladja a G3P[8] törzsekét, a G12P[6] törzsek előfordulása pedig 2009 és 2010-ben is felülmúlta a G12P[8] törzsek gyakoriságát. Adataink alapján a G12 törzsek 2009-ben a harmadik, 2010-ben pedig a negyedik leggyakoribb genotípusként cirkuláltak hazánkban. Növekvő előfordulásuk miatt ezek a törzsek a jövőben nagyobb figyelmet érdemelnek.

Az általánosan elterjedt törzsek mellett számos egyéb, ritka antigénkombinációt is találtunk a vizsgálat öt éve alatt, ezek összesített relatív gyakorisága még a fent említett G12

törzseket beleértve is alig valamivel haladja meg a 4%-ot. A ritka kombinációk közül kiemelném a 2007 év elején azonosított G9P[6] törzseket, melyek megjelenése az adott minták részletesebb vizsgálatára ösztönzött minket. Szekvencia- és filogenetikai elemzéseink során egyértelműen kiderült, hogy az azonos helyen, azonos időben detektált négy eset összefügg egymással, és erős a gyanúnk, hogy ez a törzs Indiából került behurcolásra. A G9P[6] genotípus kombináció India egyes területein elterjedtnek mondható, azonban a világ számos más részén, így Európában és Magyarországon is, ez a genotípus-kombináció nem jellemző okozója a rotavírus gastroenteritiseknek (*Gentsch, 2005; Santos és Hoshino, 2005; Bányai, 2012*). Adott földrajzi területen megjelenő szokatlan genotípusú rotavírusok ellen a populáció nagy része esetleg nem rendelkezik protektív ellenanyagokkal, így ezek a törzsek nem csak az 5 évesnél fiatalabbak körében, de az idősebb korosztályokban is képesek tünetekkel kísért rotavírus-fertőzést okozni (*Cubitt, 2000; Widdowson, 2000; Estes és Kapikian, 2007*). Így volt ez a jelenlegi esetben is, ahol a szülők is a rotavírus-fertőzés tüneteit produkálták a gyermekek betegségét megelőzően. A rotavírussal fertőzött ember, legyen az tünetekkel kísért vagy tünetmentes infekció, székletével üríti a kórokozót. Az egzotikus országokból hazatérő, és ritka genotípusú törzsszel fertőzött, akár tünetmentes utazók így hozzájárulhatnak a különböző rotavírus törzsek terjesztéséhez, így növelve a lokális törzsdiverzitást. A hazánkban szokatlan genotípus-kombináció előfordulását a későbbiekben nem tudtuk kimutatni, ami arra utal, hogy az adott törzsnek nem volt meg a kellő potenciálja ahhoz, hogy elterjedjen a fogékony populációban.

A beküldött minták postai irányítószáma alapján meghatározott regionális törzsgyakorisági adatokat elemezve jelentős területi különbségeket észleltünk az egyes törzsek földrajzi megoszlásában. A hazánkban leggyakoribb genotípus-kombinációk relatív gyakorisága évről évre és ugyanabban a rotavírus szezonban földrajzi területenként is változott. A világszerte dokumentált, törzsgyakoriságokban megfigyelhető fluktuáció nem meglepő, ha arra gondolunk, hogy néhány egymást követő rotavírus szezonban domináns törzs ellen a fogékony populáció már rendelkezik ellenanyagokkal, így egy következő évben egy másik genotípusú rotavírus törzs eredményesebben fertőzheti a gyermekeket (*Santos és Hoshino, 2005; Parra, 2009*). Ugyanakkor egy közösségben megjelenő és fertőző rotavírus törzs az alacsony fertőző dózissal és a könnyű átvitelnek köszönhetően lokálisan viszonylag gyorsan elterjedhet, így könnyen az adott genotípus válik uralkodóvá az adott földrajzi területen. Ezt a képet természetesen tovább árnyalja, hogy a legtöbb vizsgálati területen számos törzs cirkulált egyidejűleg.

A világ számos országában elérhető Rotarix<sup>®</sup> és RotaTeq<sup>®</sup> élő, attenuált rotavírus vakcinák a leggyakoribb humán kórokozó G1-G4 VP7 és P[8] VP4 genotípusokat tartalmazzák. A vakcináknak az általános törzsek mellett cirkuláló, de a vakcinákból hiányzó, például a világszerte terjedő G9 és G12 genotípusok elleni hatékonyságát nem ismerjük pontosan. A vakcinák széleskörű hatékonysági vizsgálatai során nyert adatok azt mutatták, hogy a szerológiailag rokon törzsek ellen is számíthatunk védelem kialakulására. A monovalens G1P[8] Rotarix<sup>®</sup> oltóanyaggal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a vakcina az azonos VP4 gént hordozó és nagyrészt azonos vagy hasonló genetikai összetételű (Wa genocsoportú) G3P[8], G4P[8] és G9P[8] ellen is hatékony védelmet biztosított, az eltérő genomösszetételű (DS-1 genocsoport) G2P[4] törzsek elleni hatékonysága azonban szignifikánsan alacsonyabb volt. A RotaTeq<sup>®</sup> vakcina hatékony védelmet biztosított nemcsak a G1-G4 és P[8], de a G9 genotípusú rotavírusok ellen is, habár ez utóbbi genotípus nincs reprezentálva a pentavalens oltóanyagban (*Ward, 2008; Greenberg és Estes, 2009*). Az oltáshatékonysági vizsgálatok során ugyan mindkét vakcina esetében a G9P[8] törzsek elleni keresztvédelem kialakulását figyelték meg, néhány tanulmány oltott gyermekek G9 rotavírussal történő tünetekkel kísért újrafertőződéséről számol be. Egy másik tanulmányban G12 törzsszel történő fertőzés utáni keresztvédelem kialakulását figyelték meg a Wa-genocsoportba tartozó G1 és G9 törzsek ellen, ami azt sugallja, hogy a G12 törzsek elleni részleges védelem kialakulása remélhető egy Wa genom összetételű törzset tartalmazó vakcinától (*Madhi, 2010; Sharma, 2010; Steele, 2012*). A pentavalens vakcina alapját képező WC3 törzs egy szarvasmarha eredetű rotavírus, így elképzelhető, hogy ez a vakcina képes legalább részleges védelmet biztosítani azokkal a rotavírus törzsekkel történő találkozások során is, amelyek valamilyen szarvasmarha eredetű génszegmenst hordoznak. Erre vonatkozó adataink azonban egyelőre nem állnak rendelkezésre, mint ahogyan nem tudjuk azt sem, hogy a vakcina törzsektől esetleg teljesen különböző neutralizációs antigéneket hordozó állati-humán reassortáns törzsek és megjelenő új genotípusok ellen várhatunk-e védelmet.

A 2006-2007-ben bevezetett két rotavírus vakcina Magyarországon is elérhető, azonban nem része a kötelező oltási programnak. A vakcina eladási adatokat és az adott időszakban regisztrált élve születések számát összevetve kiszámítottuk, hogy 2007-2010 között országos átlagban 4%-ról 18%-ra nőtt a célpopuláció átoltottsága. Ez az alacsony átoltottsági arány sajnos nem elegendő egy közösségi immunitás kialakulásához, és ahhoz sem, hogy a rotavírus elleni vakcináció hatását Magyarországon érdemben tapasztaljuk. Azokban az országokban, ahol már bevezették valamelyik vakcinát a nemzeti oltási programba, egyes genotípusok gyakoribb előfordulását észlelték. Néhány tanulmány arról számol be, hogy a Rotarix<sup>®</sup>

oltóanyagot alkalmazó országokban a G2P[4] törzsek megemelkedett jelenlétét tapasztalták, míg ott, ahol elsősorban a RotaTeq<sup>®</sup>-el vakcinálnak, a G3P[8] genotípusú vírusok kerültek előtérbe. Tekintve, hogy a vakcinák bevezetése óta csupán néhány év telt el, nem egyértelmű, hogy a genotípusok relatív gyakoriságában megfigyelhető változások ténylegesen a vakcinák hatásának tulajdoníthatók-e, vagy csupán az egyes törzsek gyakoriságában megfigyelhető természetes idő- és térbeli fluktuációról van szó (*Gurgel, 2007; Carvalho-Costa, 2009; Borges, 2011; Hull, 2011; Kirkwood, 2011*). Ilyen jellegű következtetéseket tehát hazánkkal kapcsolatban sem tehetünk.

A vizsgálataink során feldolgozott székletmintákkal kapcsolatban sajnos egyetlen esetben sem kaptunk a betegek rotavírus elleni oltottsági állapotára vonatkozó információkat, így nem tudtuk azt sem értékelni, hogy a vakcinálás ellenére zajlott-e súlyosabb, kórházi ápolást igénylő rotavírus-fertőzés a vizsgált területeken és időben. A vakcinák tényleges hatásának megítélését tovább nehezíti az a tény is, hogy hazánkban a laboratóriumi vizsgálatokkal is igazolt rotavírus-gastroenteritisek egyedi jelentése az Országos Epidemiológiai Központba csupán 2012 áprilisától valósul meg, a fertőző betegségek és a járványok megelőzése érdekében szükséges járványügyi intézkedésekről szóló 18/1998. (VI. 3.) NM rendelet módosítása alapján. Ezt megelőzően a rotavírus-gastroenteritisek sokszor beleolvadtak az „enteritis infectiosa néven nyilvántartott, nem bakteriális etiológiájú illetve – kisebb számban – ilyen irányban nem vizsgált, valamint önálló néven nem jelentendő gastroenteritis megbetegedések” számába (*OEK, Epiinfo, 2012 (16)*). Az OEK Magyarország járványügyi helyzetét bemutató éves beszámolója alapján országosan 2007-ben 2878, 2008-ban 4078, 2009-ben 3740, 2010-ben 3896 és 2011-ben 4835 laboratóriumi vizsgálattal bizonyított vagy epidemiológiai összefüggések alapján rotavírus gastroenteritisnek minősített esetet regisztráltak (*OEK, Epiinfo, 2011 (2,3,7,26-27), 2012 (25)*). A rotavírus etiológiájú gastroenteritisek területenkénti tényleges számának alakulását, a járó- és fekvőbeteg esetszámokat a vizsgált időszakban nem tudtuk nyomon követni. A rotavírus-fertőzések egy része csupán otthoni ápolást igénylő – vélhetően inkább az 5 évesnél idősebb korosztályokban – enyhe tünetekkel zajló esetek, amelyek nem kerülnek a kezelőorvos elé, így ezek száma szintén rejtve marad szemünk előtt.

Az alacsony átoltottsági arány és a betegek vakcináltsági státuszára vonatkozó adatok hiányában úgy gondoltuk, hogy az egyetlen módja annak, hogy megvizsgáljuk, van-e a rotavírus elleni vakcináknak valamilyen hatása a közösségben cirkuláló törzsek összetételére, az lehet, ha megvizsgáljuk és összehasonlítjuk a közösségi törzsek és a vakcina törzsek genetikai összetételét. G1, G2, G3, G4 és P[8] genotípusú, a vizsgálati időszakban a

különböző földrajzi régiókban azonosított rotavírus törzseket választottunk ki és végeztük el a VP4 és VP7 génjeik részleges szekvencia és filogenetikai elemzését összevetve a vakcina törzsek azonos szekvenciáival. Mivel hazánkban közel 94%-os relatív gyakorisággal a Rotarix<sup>®</sup> oltóanyag használata terjedt el, ezért genetikai vizsgálataink során elsősorban a G1P[8] genotípusú törzsek elemzésére koncentráltunk, de kisebb számban a G2, G3 és G4 törzsek VP7 génjét is megvizsgáltuk. A G1P[8] törzsek elemzése során mindkét gén esetében két törzsfajlódási vonalat tudtunk azonosítani a magyarországi vírusok között. A vizsgált törzsek nagy része a neutralizációs antigéneket kódoló génjeik alapján nem mutatott szorosabb genetikai kapcsolatot a vakcinákban megtalálható G1 és P[8] génekkel. Kivételt képezett ez alól négy olyan törzs, amely a Rotarix<sup>®</sup> vakcina törzs VP7 génjével magasabb, mintegy 97,9%-os szekvenciaazonosságot mutatott, további 51 törzs esetében pedig a szekvenciaelemzés 98,5%-os nukleotidhomológiát tárt fel a közösségben cirkuláló törzsek és a Rotarix<sup>®</sup> törzs VP4 génjei között. Az 55 törzs között azonban egy olyat sem találtunk, amely egyszerre hordozta volna a vakcina törzshöz nagyon hasonló VP4 és VP7 géneket, és az eltérő pozíciókban található különböző nukleotidcserék miatt sem valószínűsítjük, hogy ezek a vírusok a vakcina törzs szóródásával jutottak volna a közösségbe. A G2, G3 és G4 törzsek esetében a vizsgált gének egyértelműen elkülönültek a pentavalens vakcinában található rotavírusok génjeitől. Tekintettel arra, hogy ezekben a törzsekben több olyan nukleotidcserét is sikerült azonosítanunk, amelyek a felszíni fehérjék antigéntulajdonságait meghatározó variábilis régiókban aminosavcserékhez vezettek, felmerül a kérdés, hogy vajon milyen hatékonysággal tudja kivédeni a vakcina a súlyosabb betegség kialakulását egy ilyen törzssel történő találkozás alkalmával.

Irodalmi adatokból ismert, hogy az adott genotípuson belül eltérő törzsfajlódási vonalhoz tartozó rotavírusok neutralizációs antigénjei által kiváltott ellenanyag termelődés között is van különbség, ilyen értelemben nem csak genotípus-specifikus, de ún. lineage-specifikus immunitás is létezik (*Jin, 1996; Hoshino, 2004; Bányai, 2009c*). A különböző leszármazási vonalhoz tartozó azonos genotípusú törzsek VP4 és VP7 génjeiben a variábilis régiókban található nukleotidcserék meghatározott aminosavcserékhez vezetnek a fehérjeszintézis során, amik befolyásolják az ellenanyagválasz hatékonyságát is. A rendkívül nagyfokú genotípuson belüli változatosság tette lehetővé egy hazai tanulmányban vizsgált 16 év alatt, és feltehetően azt követően is, a G1P[8] törzsek figyelemre méltó folyamatos jelenlétét és dominanciáját a hazai törzsállományban (*Bányai, 2009c*). A genotípuson belüli leszármazási vonalak közötti genetikai különbségek így érthető módon meghatározzák, illetve befolyásolják a vakcinációk sikerességét is. Emellett a természetes intragenotípusos diverzitás

mellett a vakcinák is olyan nyomást gyakorolhatnak a közösségben cirkuláló rotavírusokra, amely az ellenanyag választ kikerülni képes mutáns törzsek szelektálódása felé hajthatja a rotavírusok evolúcióját.

Vizsgálataink öt éve alatt összesen 17 különböző genotípus kombinációt sikerült kimutatnunk, és figyelembe véve a prevakcinációs időszak eredményeit is, a hazánkban ez ideig kimutatott antigénkombinációk száma meghaladja a 20-at (*Szűcs, 1995, 1999, 2005; Bányai, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2004c, 2004d, 2005a, 2005b, 2009a, 2009c, 2010*). A rotavírusok nagyfokú diverzitásához, új antigénkombinációk megjelenéséhez a lokálisan elterjedt törzsek közötti reasszortáció, más területről történő behurcolása, illetve állati rotavírusok humán populációban való megjelenése egyaránt hozzájárul (*Gentsch, 2005; Ghosh, 2011b*). A posztvakcinációs törzsmonitorozás első öt évében azonosított rotavírus törzsek esetében mindhárom lehetőség felmerül. Az állati eredetű géneket hordozó reasszortáns vírusok olyan neutralizációs antigéneket hordozhatnak, amelyek ellen a populációnak nincsenek protektív ellenanyagai. Feltételezések szerint a populáció ellenálló-képessége hiányának jelentős szerepe lehetett a sertés eredetűnek vélt G9 típusú törzsek globális elterjedésében és ugyanez szerepet játszhat a szintén sertés eredetűnek tartott G12 törzsek növekvő előfordulásában is (*Ramachandran, 2000; Gentsch, 2005; Rahman, 2007*). Az általunk azonosított genotípusok közül a G6, P[6] és P[9] típusok esetében merül fel a lehetséges állati eredet. Az említett törzsek genotípusát megerősítő szekvenálás mellett a vírusgenom teljes vagy részleges szekvencia- és filogenetikai elemzése segíthet tisztázni ezeknek a törzseknek a pontos eredetét.

A nemrég kidolgozott új rotavírus klasszifikáció mind a 11 génszegmens szekvencia és következetes genotípus-meghatározásán alapul. A teljes rotavírus genom vagy legalább a gének kódoló régiójának szekvencia és filogenetikai elemzése értékes információkat szolgáltat a különböző rotavírus törzsek közötti genetikai kapcsolatról, a törzsek közötti reasszortációkról (*Matthijssens, 2008a, 2011*). A teljes genom szekvenálás segítségével feltárhatjuk a ritka genotípusok pontos eredetét és méginkább betekintést nyerhetünk a rotavírusok evolúciójába. A szekvenálás továbbá csökkentik a nem tipizálható törzsek arányát és felismerésre kerülnek olyan szokatlan genotípusok is, amelyek kimutatására specifikus primerek nincsenek az általunk alkalmazott multiplex PCR rendszerben. A törzsek szekvenciaelemzése felhívhatja továbbá a figyelmet a tipizáló primerek téves bekötődése miatti PCR tipizálási hibákra is.

Az EuroRotaNet által a rendelkezésünkre bocsátott genotipizálási protokoll a leggyakoribb hat P és nyolc G típusra specifikus oligonukleotid primereket tartalmazza. A

hazánkban cirkuláló törzsek nagy része beletartozik e genotípusok valamelyikébe. Kivételt képeznek ez alól a G6 genotípusú törzsek, amelyek jelenléte Magyarországon endemikusnak mondható (Bányai, 2003a, 2003b). Ezeket a törzseket néhány PCR módszerrel nem tipizálható, valamint tévesen G12 genotípusként azonosított mintában szekvenálás segítségével azonosítottuk. További három esetben is történt téves PCR tipizálás. A szekvenálással két G12, egy esetben pedig G4 genotípusú törzset hibásan azonosított a PCR, noha az adott genotípusra specifikus tipizáló primerek jelen voltak a PCR reakcióelegyekben. A törzsmonitorozások során fontos feladat a jelenleg alkalmazott tipizáló rendszerek pontosságának és megbízhatóságának folyamatos ellenőrzése is, hiszen a rotavírusok genetikai változatossága és változása idővel szükségessé teheti újabb tipizáló primerek tervezését és használatát. A több ezer genotipizált mintánk közül kiválasztott általános és a ritka törzsek szekvenciaelemzéséből kapott eredményeink azt mutatják, hogy az egységes multiplex PCR tipizáló protokoll többségében megbízhatóan működik. A néhány esetben tapasztalt PCR és szekvencia eredmények közötti ellentmondások azonban felhívják a figyelmünket arra, hogy amennyiben szokatlan genotípus-kombinációra bukkanunk, eredményünk valóságát mindenképpen érdemes és szükséges szekvenciameghatározással is megerősíteni.

Az újgenerációs rotavírus vakcinákat a világ számos országában, köztük az USA-ban, Brazíliában, Ausztráliában, Finnországban, Belgiumban és Ausztriában is bevezették a nemzeti vagy regionális immunizációs programokba. Ezek közül jónéhány országban jelentős, átlagosan mintegy 72-97% közötti átoltottsági arányt sikerült elérni a célcsoportban. A vakcinák bevezetése utáni időszakban szignifikánsan csökkent (60-96%) a kórházi ápolást igénylő, súlyos rotavírus gastroenteritisek előfordulása az öt év alatti korosztályban. Belgiumban jelentős csökkenést tapasztaltak (>80%) továbbá a rotavírus-fertőzések számában az egy évesnél fiatalabbak körében a vakcinációt követő második rotavírus szezonban. Csökkent a betegség miatt kezeléssel, illetve kórházban töltött idő is, és jelentősen (~87%) visszaszorult a kórházi rotavírus-infekciók aránya is. Ezen felül enyhébb és rövidebb járványos időszakokról valamint a rotavírus szezon többhetes (4-6 hét) késéséről számolnak be a témát feldolgozó tanulmányok (O’Ryan, 2011; Giaquinto, 2012; Usonis, 2012).

Az ország nyolc régiójára kiterjesztett multicentrikus rotavírus surveillance a hazánkban cirkuláló rotavírus törzsek nagyfokú diverzitását tárta fel. A Magyarországon leggyakrabban előforduló, járványtani szempontból legjelentősebb rotavírus törzsek részleges vagy teljes átfedést mutatnak a vakcinákban is megtalálható antigéntípusokkal. A ma már Magyarországon is elérhető rotavírus vakcinákban képviselt genotípusok (G1 és P[8] a

Rotarix<sup>®</sup>-ben; G1, G2, G3, G4, G6, P[8] és P[5] a RotaTeq<sup>®</sup>-ben) a hazai törzsek közel 90%-ának mindkét vagy legalább egyik neutralizációs antigénjével típusazonosságot mutatnak. A rotavírus vakcinákkal végzett oltáshatékonysági vizsgálatok és a nemzetközi tapasztalatok tükrében, a rotavírus elleni vakcináció szélesebb körben történő magyarországi használatától joggal várjuk, hogy mérsékelje a rotavírus-fertőzések okozta szociális és gazdasági terheket.

A jelenleg alacsony hazai rotavírus elleni vakcinálás miatt még nem tapasztaltuk a forgalomban lévő vakcináknak a fertőzések számára és azok súlyosságára, a törzsdinamikára és a vírusok evolúciójára gyakorolt hatását. Bízunk benne, hogy a vakcinák fokozottabb hazai elterjedésével párhuzamosan a rotavírus törzsek epidemiológiai monitorozásának folytatása a jövőben segít megállapítani a vakcina törzsdiverzitásra gyakorolt lehetséges szelekciós hatását, és idővel választ kaphatunk a ma még nyitott kérdésekre is.

A hazai posztvakcinációs törzsmonitorozás során nyert adatainkról és eredményeinkről éves beszámolókat küldtünk az EuroRotaNet központi laboratóriumába (Health Protection Agency, London), hogy az európai adatokat összesítve azok a vakcinagyártó cégek számára is elérhetőek legyenek. Így ezek az adatok fontos információval szolgálnak a vakcinák hatékonyságának felmérése szempontjából, a klinikai szempontból fontos törzsek nyomon követése pedig segít megválaszolni azt a kérdést, hogy a jövőben szükség lesz-e a rotavírus vakcinák összetételének módosítására. Az EuroRotaNet munkájának köszönhetően a vakcinagyártókkal együttműködve lehetőségünk van arra, hogy a rotavírus törzsek összetételében bekövetkező változásokat időben felismerjük és képesek legyünk azokra minél gyorsabban és hatékonyabban reagálni.

## **Néhány szó a jövőről**

2012-től a genotipizálásokkal kapcsolatos laboratóriumi munka átkerült a Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont, Állatorvos-tudományi Intézetébe, ahol a jövőben is folytatódnak tovább a hazai rotavírus törzsdiverzitási vizsgálatok. A genotipizálásban azonban egyre nagyobb hangsúlyt kap a nukleinsav-szekvenálással történő azonosítás, hogy az esetleges hibákat elkerüljük, továbbá lehetőségünk nyílik részletesebb filogenetikai elemzések elvégzésére is. Jövőbeni terveink között szerepel, hogy a lehetséges állati eredetű törzsek genetikai összetételét mélyrehatóbban megvizsgáljuk és feltárjuk a törzsek pontos eredetét. Szeretnénk részletesebb adatokat gyűjteni az egyes földrajzi

régiókból a rotavírus-fertőzések gyakoriságának és súlyosságának alakulásáról, hogy ezekkel az adatokkal is árnyaljuk a vakcináció hatásáról kialakított képet azokon a területeken, ahol magasabb az átoltottsági arány a gyermekek körében.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az A-csoportú rotavírusok okozta gyermekkori akut gastroenteritisek megelőzésében a vakcináció játssza a főszerepet. Az új generációs Rotarix<sup>®</sup> és RotaTeq<sup>®</sup> rotavírus vakcinák 2006-os bevezetése óta a törzsmonitorozás világszerte még fontosabbá vált. Ezért 2007-ben Magyarország részvételével megalakult az Európai Rotavírus-törzs-figyelő Hálózat (EuroRotaNet), melynek célja, hogy a konzorcium tagországaiban összehangolt posztvakcinációs törzsmonitorozást végezzen. A hálózat tagjaként a mi munkánk célja a Magyarországon cirkuláló rotavírus törzsek relatív gyakoriságának, térbeli és időbeli változásának és a vakcinák törzsgyakoriságokra gyakorolt hatásának felmérése volt.

Vizsgálatainkhoz akut gastroenteritises, többségében 5 éven aluli betegektől származó rotavírus pozitív székletmintákat gyűjtöttünk az ország 8 régiójából 2007-2011 között. Genotipizálási vizsgálatainkat a vírus G és P felszíni antigénjeire specifikus multiplex reverz-transzkripció nested-PCR segítségével végeztük. A törzsek közötti genetikai kapcsolatok megállapításához szekvencia- és filogenetikai elemzéseket is végeztünk.

Munkánk során 2380 rotavírus törzs felszíni antigénjeinek genotipizálását végeztük el. A vizsgált időszakban összesen 17 különböző antigénkombinációt írtunk le, amelyek között a leggyakoribbak a globális elterjedést mutató G1P[8] 44,9%; G4P[8] 23,4%; G2P[4] 14,8% és G9P[8] 6,8% voltak. Az egyébként világszerte gyakori G3P[8] törzs előfordulása hazánkban nem érte el az 1%-ot. Az általános törzsek mellett kisebb számban ritka antigénkombinációkat is azonosítottunk: G1P[4], G1P[6], G2P[6], G2P[8], G3P[4], G3P[9], G4P[6], G6P[9], G9P[4], G9P[6], G12P[6] és G12P[8]. Ezek együttes előfordulása azonban alig haladta meg a 4%-ot. A leggyakoribb genotípusok relatív gyakorisága évről évre és földrajzi területenként is változott. Szekvencia- és filogenetikai elemzéseinkből kiderült, hogy a 2007-ben azonosított G9P[6] genotípusú törzsek Indiából kerültek behurcolásra, és fény derült néhány PCR tipizálási hibára is (pl. G6 és G12 törzsek esetében). A közösségi törzsek és a vakcinatörzsek VP4 és VP7 génjeinek szekvencia összehasonlítása nem tárt fel közvetlen genetikai kapcsolatot a két csoport között, habár találtunk a Rotarix<sup>®</sup> törzshöz hasonló G1 és P[8] típusú vírusokat. Magyarországon a Rotarix<sup>®</sup> vakcina használata terjedt el elsősorban, de a célpopuláció átoltottsága alacsony (~18%).

A Magyarországon cirkuláló, járványtani szempontból fontos rotavírus törzsek a vizsgálat adatai szerint szinte teljes átfedést mutatnak a vakcinákban is megtalálható antigéntípusokkal, így a rotavírus elleni vakcináció szélesebb körben történő hazai elterjedése segíthet mérsékelni a rotavírus-fertőzések okozta szociális és gazdasági terheket.

## SUMMARY

Vaccination is the main strategy to control severe dehydrating gastroenteritis caused by rotaviruses in early childhood. The introduction of new generation rotavirus vaccines, Rotarix<sup>®</sup> and RotaTeq<sup>®</sup>, has resulted in an intensification of strain surveillance worldwide to monitor strain prevalence across countries. An international strain surveillance network (EuroRotaNet) was launched in 2007 in Europe with the participation of Hungary. In the present study, the geographical and temporal distribution of human rotavirus G and P types and the impact of vaccine use on strain prevalence and diversity in Hungary is reported.

Rotavirus positive stool samples were collected from patients, mostly children <5 years of age with gastroenteritis in 8 geographic areas of Hungary between 2007-2011. Viral RNA was amplified by multiplex genotyping RT-PCR assay, targeting the medically most important G and P types. Sequencing of the VP4 and VP7 genes was performed to monitor the genetic relatedness of rotavirus strains.

In total, 2380 strains were genotyped. During the five-year surveillance 17 different antigen combinations were identified with the dominating prevalence of genotype G1P[8] (44,9%) strains, followed by G4P[8] (23,4%), G2P[4] (14,8%) and G9P[8] (6,8%). The prevalence of common G3P[8] strain remained below 1% in our country. Additional rare genotypes were identified in a low percentage of samples (4.12%): G1P[4], G1P[6], G2P[6], G2P[8], G3P[4], G3P[9], G4P[6], G6P[9], G9P[4], G9P[6], G12P[6] és G12P[8]. The prevalence of common strains fluctuated both in the consecutive years and between geographical regions in the same rotavirus season. Sequence and phylogenetic analyses revealed evidence for the imported G9P[6] strains from India and some primer mistyping in our PCR assay (G6 and G12 strains). The sequence determination and comparison of VP4 and VP7 genes of selected field strains and vaccine strains did not prove direct genetic relatedness between them. However, G1 and P[8] types closely related but not identical with Rotarix<sup>®</sup> parental strain were determined, their vaccine origin was unlikely. Rotarix<sup>®</sup> was purchased more often, but the nationwide vaccine coverage among infants remained low (~ 18%).

Our data indicates that the antigen specificities of medically important rotavirus strains identified in our country are represented in the vaccines available in the pharmaceutical private market in Hungary. The intensification of vaccine use in the forthcoming years may help to decrease the socio-economic burden of rotavirus infections.

## IRODALOMJEGYZÉK

Altschul SF, Gish W, Miller W et al: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, 215: 403-10.

Alvarez Vega M, Guzmán Tirado MG, Más Lago P: [Comparison of latex agglutination technics and polyacrylamide gel electrophoresis for the rotavirus diagnosis. Habana City, 1986]. *Rev Cubana Med Trop*, 1989, 41: 385-97.

Anderson EJ, Weber SG: Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4: 91-9.

Armah GE, Steele AD, Binka FN et al: Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human rotavirus G9 as a major cause of diarrhea in children. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 2317-22.

Bányai K, Gentsch JR, Griffin DD et al: Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: Identification of a novel lineage isolated in Hungary. *J Med Virol*, 2003a, 71: 124-34.

Bányai K, Gentsch JR, Glass RI, Szücs G: Detection of human rotavirus serotype G6 in Hungary. *Epidemiol Infect*, 2003b, 130: 107-12.

Bányai K, Gentsch JR, Schipp R et al: Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *J Med Microbiol*, 2004a, 53: 791-801.

Bányai K, Gentsch JR, Glass RI et al: Eight-year survey of human rotavirus strains demonstrates circulation of unusual G and P types in Hungary. *J Clin Microbiol*, 2004b, 42: 393-97.

Bányai K, Martella V, Jakab F et al: Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. *J Clin Microbiol*, 2004c, 42: 4338-43.

Bányai K, Sas Y, Varga L, Szücs G: Survey of rotavirus infection in a Hungarian paediatric hospital. A short communication. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2004d: 51: 431-5.

Bányai K, Gentsch JR, Schipp R et al: Dominating prevalence of P[8], G1 and P[8], G9 rotavirus strains among children admitted the hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *J Med Virol*, 2005a, 76: 414-23.

- Bányai K, Szűcs Gy: Indokok és kérdések a rotavírusvakcina hazai bevezetésével kapcsolatban. *Gyermekgyógyászat*, 2005b, 56: 196-208.
- Bányai K, Bogdán Á, Szűcs G: Rotavírus vakcináció és invagináció. *Gyermekgyógyászat*, 2006a, 57: 373-83.
- Bányai K, Bogdán Á, Szűcs Gy: A rotavírus-fertőzések járványtana és jelentősége. *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle*, 2006b, december: 3-7.
- Bányai K, Deák J, Gray J et al: Hazai részvétellel megalakul az Európai Rotavírus-törzsfigyelő Hálózat (EuroRotaNet). *Orvosi Hetilap*, 2007a, 148: 2043-45.
- Bányai K, Bogdán A, Kisfali P et al: Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. *Emerg Infect Dis*, 2007b, 13: 916-19.
- Bányai K, Bogdán A, Domonkos G et al: Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. *J Med Virol*, 2009a, 81: 362-70.
- Bányai K, Esona MD, Mijatovic S et al: Zoonotic bovine rotavirus strain in a diarrheic child, Nicaragua. *J Clin Virol*, 2009b, 46: 391-3.
- Bányai K, Gentsch JR, Martella V et al: Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: a hungarian study. *J Infect Dis*, 2009c, 200 (Suppl 1): 222-7.
- Bányai K, Papp H, Dandár E et al: Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain. *Infect Genet Evol*, 2010, 10: 1140-4.
- Bányai K: Reoviridae. *Klinikai és járványügyi virológia*, Takács Mária (szerk.), Vox Medica Kiadói Kft., 2011. pp. 467-73.
- Bányai K, László B, Duque J et al: Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, 2012, 30 (Suppl 1): A122-33.
- Bernstein DI, Ward RL: Rotarix<sup>®</sup>: development of a live attenuated monovalent human rotavirus vaccine. *Pediatr Ann*, 2006, 35: 38-43.
- Bhan MK, Lew JF, Sazawal S et al: Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis*, 1993, 168: 282-87.
- Bishop RF, Hewstone AS, Davidson GP et al: An epidemic of diarrhoea in human neonates involving a reovirus-like agent and 'enteropathogenic' serotypes of *Escherichia coli*. *J Clin Pathol*, 1976, 29: 46-9.

Bishop R: Discovery of rotavirus: Implications for child health. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24 (Suppl 3): 81-5.

Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V et al: Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet*, 2003, 362: 1445-9.

Borges AM, Dias e Souza M, Fiaccadori FS, Cardoso DD: Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix™ vaccine in Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011, 106: 499-501.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM et al. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 95-7.

Chudzio T, Kasatiya S, Irvine N, Sankar-Mistry P: Rapid screening test for the diagnosis of rotavirus infection. *J Clin Microbiol*, 1989, 27: 2394-6.

Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS: Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ*, 1990, 68:171-7.

Cook N, Bridger J, Kendall K et al: The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect*, 2004, 48: 289-302.

Cubitt WD, Steele AD, Iturriza M: Characterisation of rotaviruses from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9P2A[6] and G3P2A[6]. *J Med Virol*, 2000, 61: 150-4.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG et al: Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 1820-22.

Dennehy PH: Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21: 198-208.

Dolan KT, Twist EM, Horton-Slight P et al: Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. *J Clin Microbiol*, 1985, 21: 753-58.

Esona MD, Steele D, Kerin T et al: Determination of the G and P types of previously nontypeable rotavirus strains from the African Rotavirus Network, 1996-2004: Identification of unusual G types. *J Infect Dis*, 2010, 202 (Suppl 1): 49-54.

Estes MK, Kapikian AZ: Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields virology*, 5th edition. Philadelphia PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2007, p. 1917-74.

Fischer TK, Gentsch JR: Rotavirus typing methods and algorithms. *Rev Med Virol*, 2004, 4:71-82.

Franco MA, Greenberg HB: Rotaviruses. *Clinical Virology*, 2nd edition. ASM Press, Washington D. C., 2002, 743-62.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P et al: Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 1365-73.

Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M et al: Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis*, 1996, 174 (Suppl 1): 30-6.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B et al: Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*, 2005, 192: 146-59.

Gentsch JR, Hull JJ, Teel EN et al: G and P types of circulating rotavirus strains in the United States during 1996-2005: nine years of prevaccine data. *J Infect Dis*, 2009, 200 (Suppl 1): 99-105.

Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J et al: Full genomic analysis of a G8P[1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an antiodactyl-to-human interspecies transmission event. *J Med Virol*, 2011a, 83: 367-76.

Ghosh S, Kobayashi N: Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. *Future Microbiol*, 2011b, 6: 1049-65.

Giaquinto C, Jackson AE, Vesikari T: Report of the second European expert meeting on rotavirus vaccination. *Vaccine*, 2012, 30: 2237-44.

Gorrell RJ, Bishop RF: Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. *J Med Virol*, 1999, 57: 204-11.

Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, Chanock RM: Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7155-9.

Gouvea V, Glass RI, Woods P et al: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 1990, 28: 276-82.

Green KY, James HD Jr, Kapikian AZ: Evaluation of three panels of monoclonal antibodies for the identification of human rotavirus VP7 serotype by ELISA. *Bull World Health Organ*, 1990, 68: 601-10.

Greenberg HB, Estes MK: Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 2009, 136: 1939-51.

Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC et al: Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13: 1571-3.

Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 1999, 41: 95-8.

Heiman EM, McDonald SM, Barro M et al: Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol*, 2008, 82: 11106-16.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK et al: Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*, 1982, 16: 473-7.

Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K et al: Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 8701-4.

Hoshino Y, Kapikian AZ: Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr*, 2000, 18: 5-14.

Hoshino Y, Jones RW, Ross J et al: Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3. *J Virol*, 2004, 78: 7795-802.

Hoshino Y, Honma S, Jones RW et al: A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology*, 2005, 332: 177-88.

Hull JJ, Teel EN, Kerin TK et al: United States rotavirus strain surveillance from 2005 to 2008: genotype prevalence before and after vaccine introduction. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30 (Suppl 1): 42-7.

Ibrahim OS, Sunderland D, Hart CA: Comparison of four methods for detection of rotavirus in faeces. *Trop Doct*, 1990, 20: 30-2.

Iturriza-Gómara M, Green J, Brown DWG et al: Molecular epidemiology of human group A rotavirus infection in United Kingdom between 1995 and 1998. *J Clin Microbiol*, 2000a, 12: 4394-401.

Iturriza-Gómara M, Green J, Brown DW et al: Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J Clin Microbiol*, 2000b, 38: 898-901.

Iturriza-Gómara M, Cubitt D, Desselberger U et al: Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *J Clin Microbiol*, 2001a, 39: 3796-8.

Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U et al: Reassortment in vivo: Driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol*, 2001b, 75: 3696-705.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S et al: Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol*, 2002, 76: 6596-601.

Iturriza-Gómara M, Kang G, Mammen A et al: Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 2541-7.

Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K et al: Rotavirus surveillance in Europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J Infect Dis*, 2009, 200 (Suppl 1): 215-21.

Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K et al: Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect*, 2011, 139: 895-909.

Jin Q, Ward RL, Knowlton DR et al: Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch Virol*, 1996, 141: 2057-76.

Kirkwood CD, Boniface K, Barnes GL, Bishop RF: Distribution of rotavirus genotypes after introduction of rotavirus vaccines, Rotarix<sup>®</sup> and RotaTeq<sup>®</sup>, into the National Immunization Program of Australia. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30 (Suppl 1): 48-53.

De Leener K, Rahman M, Matthijnssens J et al: Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology*, 2004, 325: 11-7.

Levy K, Hubbard AE, Eisenberg JN: Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*, 2009, 38: 1487-96.

Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D et al: Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med*, 2010, 362: 289-98.

Martella V, Ciarlet M, Bányai K et al: Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology*, 2006a, 346: 301-11.

Martella V, Bányai K, Ciarlet M et al: Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology*, 2006b, 344: 509-19.

Martella V, Bányai K, Matthijnssens J et al: Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*, 2010, 140: 246-55.

Martinez-Laso J, Román A, Head J et al: Phylogeny of G9 rotavirus genotype: a possible explanation of its origin and evolution. *J Clin Virol*, 2009, 44: 52-7.

Matthijnssens J, Rahman M, Martella V et al: Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J Virol*, 2006, 80: 3801-10.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M et al: Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*, 2008a, 153:1621-9.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E et al: Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*, 2008b, 82: 3204-19.

Matthijnssens J, Blicke J, Ciarlet M et al: Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol*, 2009, 4: 1303-16.

Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M et al: Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol*, 2010, 27: 2431-6.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM et al: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*, 2011, 156: 1397-413.

Matthijnssens J, Van Ranst M: Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol*, 2012, 2: 426-33.

Midgley SE, Bányai K, Buesa J et al: Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol*, 2012a, 156: 238-45.

Midgley SE, Hjulsgaard CK, Larsen LE et al: Suspected zoonotic transmission of rotavirus group A in Danish adults. *Epidemiol Infect*, 2012b, 140: 1013-7.

Mukherjee A, Nayak MK, Roy T et al: Detection of human G10 rotavirus strains with similarity to bovine and bovine-like equine strains from untypable samples. *Infect Genet Evol*, 2012, 12: 467-70.

Nakagomi O, Oyamada H, Nakagomi T: Experience with serotyping rotavirus strains by reverse transcription and two-step polymerase chain reaction with generic and type-specific primers. *Mol Cell Probes*, 1991, 5: 285-9.

Nelson EA, Bresee JS, Parashar UD et al: Asian Rotavirus Surveillance Network. Rotavirus epidemiology: the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Vaccine*, 2008, 26: 3192-6.

Nicholas KB, Nicholas HB: GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. 1997 Distributed by the authors.

Offit PA, Clark HF: RotaTeq<sup>®</sup>: a pentavalent bovine-human reassortant rotavirus vaccine. *Pediatr Ann*, 2006, 35: 29-34.

Országos Epidemiológiai Központ. Magyarország 2007. évi járványügyi helyzete. *Epinfo* 2011; 2. különszám.

Országos Epidemiológiai Központ. Magyarország 2008. évi járványügyi helyzete. *Epinfo* 2011; 3. különszám.

Országos Epidemiológiai Központ. Magyarország 2009. évi járványügyi helyzete. *Epinfo* 2011; 7. különszám.

Országos Epidemiológiai Központ. Az OEK előzetes jelentése a 2010. évben bejelentett fertőző megbetegedésekről. *Epinfo* 2011; 26-27: 289-308.

Országos Epidemiológiai Központ. A járványügyi tevékenységet érintő jogszabályok változása. *Epinfo* 2012; 16: 186-199.

Országos Epidemiológiai Központ. Az OEK előzetes jelentése a 2011. évben bejelentett fertőző megbetegedésekről. *Epinfo* 2012; 25: 289-304.

O'Ryan M, Lucero Y, Linhares AC: Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10:1645-59.

Palombo EA: Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes*, 2002, 24: 11-20.

Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI: Rotavirus. *Emerg Infect Dis*, 1998, 4: 561-70.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS et al: Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9: 565-72.

Parra GI: Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. *J Med Virol*, 2009, 81: 568-71.

Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect Genet Evol*, 2007, 7: 656-63.

Rahman M, Matthijnssens J, Yang X et al: Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol*, 2007, 81: 2382-90.

Ramachandran M, Kirkwood CD, Unicomb L et al: Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. *Virology*, 2000, 278: 436-44.

Roberton DM, Harrison M, Hosking CS et al: Rapid diagnosis of rotavirus infection: comparison of electron microscopy and enzyme linked immunosorbent assay (Elisa). *Aust Paediatr J*, 1979, 15: 229-32.

Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR et al: Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, 2006, 354: 11-22.

Samajdar S, Ghosh S, Chawla-Sarkar M et al: Increase in prevalence of human group A rotavirus G9 strains as an important VP7 genotype among children in eastern India. *J Clin Virol*, 2008, 43: 334-9.

Santos N, Hoshino Y: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*, 2005, 15: 29-56.

Sharma S, Ray P, Gentsch JR, Glass RI, Kalra V, Bhan MK: Emergence of G12 rotavirus strains in Delhi, India, in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 1343-8.

Sharma S, Nakagomi T, Nakagomi O et al: Convalescent phase sera from children infected with G12 rotavirus cross-neutralize rotavirus strains belonging to the Wa genogroup. *J Gen Virol*, 2010, 91: 1794-9.

Simmonds MK, Armah G, Asmah R et al: New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J Clin Virol*, 2008, 42: 368-73.

Steele AD, Neuzil KM, Cunliffe NA et al: Human rotavirus vaccine Rotarix™ provides protection against diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. *BMC Infect Dis*, 2012, 12: 213.

Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Barlic-Maganja D, Marin J: Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol*, 2008, 89: 1690-8.

Szűcs Gy, Matson DO, Új M et al: Group A rotavirus G type prevalence in two regions of Hungary. *Arch Virol*, 1995, 140: 1693-703.

Szűcs Gy, Új M, Mihály I, Deák J: Burden of human rotavirus –associated hospitalisations in three geographic regions of Hungary. *Acta Pediat*, 1999, 88 (Suppl 426): 61-5.

Szűcs Gy, Bányai K, Reuter G, Jakab F: Gasztroenteritist okozó vírusok. Berencsi Gy. (szerk.) *Orvosi molekuláris virológia*. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2005.

Tamura K, Peterson D, Peterson N et al: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 2731-9.

Thapar N, Sanderson IR: Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *Lancet*, 2004, 363: 641-53.

Tsugawa T, Hoshino Y: Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*, 2008, 380: 344-53.

Uchida R, Pandey BD, Sherchand JB et al: Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children and adults in Nepal: detection of G12 strains with P[6] or P[8] and a G11P[25] strain. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 3499-505.

Usonis V, Ivaskeviciene I, Desselberger U et al: The unpredictable diversity of co-circulating rotavirus types in Europe and the possible impact of universal mass vaccination programmes on rotavirus genotype incidence. *Vaccine*, 2012, 30: 4596-605.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ et al: Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*, 1996, 335: 1022-8.

Vesikari T, Matson DO, Dennehy P et al: Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*, 2006, 354: 23-33.

Ward RL, McNeal MM, Steele AD: Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther Clin Risk Manag*, 2008, 4: 49-63.

Widdowson MA, van Doornum GJ, van der Poel WH et al: Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *Lancet*, 2000, 356: 1161-2.

Widdowson MA, van Doornum GJJ, van der Poel WH et al: An outbreak of diarrhea in a neonatal medium care unit caused by a novel strain of rotavirus: investigation using both epidemiologic and microbiological methods. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2002, 23: 665-70.

Yuan L, Honma S, Kim I et al: Resistance to rotavirus infection in adult volunteers challenged with a virulent G1P1A[8] virus correlated with serum immunoglobulin G antibodies to homotypic viral proteins 7 and 4. *J Infect Dis*, 2009, 200:1443-51.

Zeller M, Heylen E, De Coster S et al: Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infect Genet Evol*, 2012, 12:1492-500.

Iktatószám: DEENKÉTK/7/2013.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Antalné László Brigitta

Neptun kód: DRS8UM

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **László, B.**, Kónya, J., Dandár, E., Deák, J., Farkas, Á., Gray, J., Grósz, G., Iturriza-Gomara, M., Jakab, F., Juhász, Á., Kisfali, P., Kovács, J., Lengyel, G., Martella, V., Melegh, B., Mészáros, J., Molnár, P., Nyúl, Z., Papp, H., Pátri, L., Puskás, E., Sántha, I., Schneider, F., Szomor, K., Tóth, A., Tóth, E., Szűcs, G., Bányai, K.: Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: Exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains.  
*J. Clin. Virol.* 55 (2), 140-146, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2012.06.016>  
IF:3.969 (2011)
2. **László, B.**, Nyúl, Z., Kisfali, P., Deák, J., Kovács, J., Kónya, J., Mészner, Z., Molnár, P., Pátri, L., Schneider, F., Tóth, A., Melegh, B., Iturriza-Gomara, M., Gray, J., Martella, V., Szűcs, G., Bányai, K.: First detection of P[6],G9 rotaviruses in Hungary: An imported strain from India?  
*J. Travel Med.* 16 (2), 141-143, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1708-8305.2008.00293.x>  
IF:1.503
3. **László B.**, Czellár E., Deák J., Juhász Á., Kovács J., Kónya J., Mészáros J., Mészner Z., Mihály I., Molnár P., Nyúl Z., Pátri L., Puskás E., Schneider F., Siffel C., Tóth A., Tóth E., Szűcs G., Bányai K.: Posztvakcinációs rotavírus-surveillance Magyarországon, 2007.  
*Orv. Hetil.* 150 (31), 1443-1450, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28690>.



### További Közlemények

4. Bányai, K., **László, B.**, Duque, J., Steele, A.D., Nelson, E.A.S., Gentsch, J.R., Parashar, U.D.:  
Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs.  
*Vaccine*. 30 (Suppl. 1), 122-130, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.111>  
IF:3.766 (2011)
5. Iturriza-Gomara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Koopmans, M., Korsun, N., Koukou, D., Kroneman, A., **László, B.**, Lappalainen, M., Maunula, L., Marques, A.M., Matthinjssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., Nawaz, S., Poljsak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., Sanchez-Fauquier, A., Steyer, A., Sidaraviciute-Ivaskeviciene, I., Syriopoulou, V., Tran, A.N., Usonis, V., van Ranst, M., de Rougemont, A., Gray, J.: Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network.  
*Epidemiol. Infect.* 139 (6), 895-909, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268810001810>  
IF:2.843
6. Iturriza-Gomara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Korsun, N., Kroneman, A., Lappalainen, M., **László, B.**, Maunula, L., Matthinjssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., Poljsak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., Sanchez-Fauquier, A., Schreier, E., Steyer, A., Sidaraviciute-Ivaskeviciene, I., Tran, A.N., Usonis, V., van Ranst, M., de Rougemont, A., Gray, J.: Rotavirus surveillance in europe, 2005-2008: Web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data.  
*J. Infect. Dis.* 200 (Suppl.1), S215-S221, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/605049>  
IF:5.865
7. Szalmás, A., Bánáti, F., Koroknai, A., **László, B.**, Fehér, E., Salamon, D., Gergely, L., Minárovits, J., Kónya, J.: Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in cervical cancer cells.  
*Eur. J. Cancer*. 44 (7), 1030-1038, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.02.046>  
IF:4.475



8. Bányai K., Deák J., Gray J., Iturriza-Gomara M., Kovács J., Kónya J., **László B.**, Martella V., Mészner Z., Mihály I., Molnár P., Nyúl Z., Pátri L., Schneider F., Tóth A., Szűcs G.: Hazai részvétellel megalakult az Európai Rotavírus-törzs-figyelő Hálózat (EuroRotaNet).  
*Orv. Hetil.* 148 (43), 2043-2045, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2007.28159>

**Összesített impakt faktor: 22.421**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5.472**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.01.10



## **TÁRGYSZAVAK**

rotavírus, gastroenteritis, genotipizálás, G-típus, P-típus, vakcináció, surveillance, EuroRotaNet

## **KEYWORDS**

rotavirus, gastroenteritis genotyping, G-type, P-type, vaccination, surveillance, EuroRotaNet

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Tisztelettel és szeretettel mondok köszönetet témavezetőimnek, Dr. Bányai Krisztián tudományos főmunkatársnak, a hazai rotavírus surveillance koordinátorának és Dr. Kónya József egyetemi docensnek, a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet vezetőjének. Elméleti és gyakorlati útmutatásaik, kritikus észrevételeik mindig hasznosnak bizonyultak. Köszönet illeti őket azért is, mert nemcsak szakmai, de személyes problémáimmal is mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Köszönettel tartozom Gergely Lajos professzor úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet korábbi vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra az intézetben való munkavégzést, amikor még szakdolgozóként jelentkeztem, és aki tanácsaival, észrevételeivel azóta is folyamatosan támogatta munkámat.

Köszönöm a rotavírus pozitív székletminták és a klinikai adatok szolgáltatását együttműködő partnereinknek és összes munkatársuknak. Az ő áldozatos munkájuk nélkül ez a kutatás nem valósulhatott volna meg.

Köszönöm kollégáimnak, egyben barátaimnak, Dr. Csoma Eszternek, Dr. Csomor Péternek, Dandár Eszternek, Dr. Fehér Enikőnek, Ferenczi Annamáriának, Kis Andreának, Mészáros Beátának, Oraveczné Gyöngyösi Eszternek, Papp Hajnalkának, Szalmás Anitának valamint az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden dolgozójának a szakmai és baráti segítséget. A hosszú beszélgetések, kedves szavaik, biztatásuk és támogatásuk mindig átlendített a nehézségeken.

Hálás vagyok szüleimnek, akik tisztességre, kitartásra és a tanulás szeretetére neveltek és mindig biztosították nekem a szerető, biztos családi háttérrel. Tanulmányaim és szakmai tevékenységem során mindvégig mellettem álltak, osztoztak velem a nehézségekben és a boldog pillanatokban egyaránt. Támogatásuk, biztatásuk sokszor eloszlatta kétségeimet és a kudarctól való félelmemet.

Külön köszönet illeti meg férjemet, aki nagy türelemmel, megértéssel és szeretettel támogatott mindvégig. Szakmai észrevételeivel, tehermentesítő segítségével és figyelmességével nagyban hozzájárult szakmai sikereimhez.

A Sanofi-Aventis/Chinoin Zrt. doktori ösztöndíjjal támogatta tanulmányaimat. Az EuroRotaNet konzorcium munkáját a GlaxoSmithKline Biologicals (GSK) és a Sanofi Pasteur-MSD (SPMSD) egyenlő arányban támogatja. További támogatást a K100727 és a T049020 számú OTKA-pályázatok biztosítottak.

# **FÜGGELÉK**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye