

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

**POSZTVAKCINÁCIÓS ROTAVÍRUS SURVEILLANCE MAGYARORSZÁGON,
2007-2011**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta:

Antalné László Brigitta

okleveles molekuláris biológus (mikrobiológus)

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
Mikrobiológia programja keretében

Témavezetők: Dr. Bányai Krisztián és Dr. Kónya József

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Dr. Minárovits János, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

2013. április 10. 11 óra, DE OEC Infektológiai és Gyermekimmunológiai tanszék

Az értekezés bírálói:

Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Takács Mária, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Dr. Minárovits János, az MTA doktora
Dr. Takács Mária, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2013. április 10., 15 óra, DE OEC Belgyógyászati Intézet A épület tanterme

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. 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. 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. A rotavírus-fertőzés komoly közegészségügyi és járványtani jelentőségére való tekintettel a rotavírusok okozta gyermekkori gastroenteritisek megelőzésében a vakcináció kapott főszerepet.

A vírus szegmentált, dupla szálú 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 e két felszíni antigénnek kitüntetett szerepe van a rotavírus-infekció során kialakuló protektív immunválasz kialakulásában, mivel a szervezetben neutralizáló ellenanyagok termelődését indukálják. Ezért ezek az antigének a vakcina fejlesztések legfőbb célpontjaivá váltak. A több mint húsz éve elkezdődött vakcina fejlesztési kísérletek eredményeképpen 2006-ban két élő, attenuált orális rotavírus vakcina került a piacra világszerte és vált elérhetővé Magyarországon is. Az egyik forgalomban lévő vakcina a monovalens G1P[8] genotípusú törzset tartalmazó Rotarix[®] (GlaxoSmithKline). A másik az állati-humán reasszortáns, pentavalens RotaTeq[®] (Merck), amelyben a leggyakoribb humán G1, G2, G3, G4 és P[8] típusú törzsek találhatók meg. 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 oltáshatékonysági 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 konzorcium jött létre, köztük az Európai Rotavírus-törzs-figyelő Hálózatot (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.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Morfológiájuk és replikációs stratégiájuk alapján a rotavírusokat a *Reoviridae* család *Rotavirus* genusába soroljuk. Az ikozaéderez szimmetriájú, többrétegű, burok nélküli víruskapszidban található a 11 génszegmensből álló, lineáris duplaszálú RNS (dsRNS) genom, amely hat strukturális (VP1- VP4, VP6, VP7) és hat nem-strukturális (NSP1- NSP6) proteint kódol. A víruspartikula belső kapszidrétegét felépítő VP6 fehérje a csoport-specifitást 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 megbetegedésekben leggyakrabban az A csoportba tartozó vírusokat azonosítjuk. A D-G csoportba tartozó törzseket eddig állatokból sikerült kimutatni. A jelenlegi taxonómia a rotavírusokat már specieszekbe 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. 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 tűskeszerű nyúlványokat képez a virion felszínén. Ez a fehérje a P (Proteáz érzékeny antigén) típus meghatározásáért felelős antigén. A két felszíni fehérje antigén tulajdonságai, illetve az őket kódoló gének genetikai sajátosságai alapján az A-csoportú rotavírusokon belül különböző szeró- illetve genotípusokat különböztetünk meg. A természetes rotavírus-fertőzés során a víruskapszid felszíni fehérjei specifikus neutralizáló ellenanyagok termelődését indukálják a fertőzött szervezetben, így érthető, hogy a protektív immunválasz kialakulása szempontjából kiemelkedő jelentőséggel bírnak. 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-/genotípusát: pl. G1P[8], G2P[4], G4P[6] stb.). 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 szekvenciameghatározásán alapul.

Az 1980-as évektől zajló epidemiológiai felmérések azt mutatták, hogy a világszerte cirkuláló, klinikailag releváns törzsek 80-90%-át a G1P[8], G2P[4], G3P[8] és G4P[8] törzsek alkotják. Az 1990-es években a nukleinsav-alapú vizsgálati módszerek megjelenése és elterjedése hozzájárult újabb, addig nem ismert genotípusok és antigénkombinációk azonosításához. Az azóta humán megbetegedésekből is detektált G9 törzseket (G9P[8] és G9P[6]) ma már a G1-G4 genotípusok mellett az ötödik leggyakoribb típusként tartjuk számon és a G12 törzsek felbukkanását és hasonlóan gyors terjedését is világszerte dokumentálták. Az egyes törzsek előfordulása és gyakorisága nemcsak a különböző földrajzi területek között, de ugyanabban a régióban évről-évre is változik, és az általános törzsek mellett ismerünk adott földrajzi területen elterjedt, lokálisan fontos törzseket is. A mai napig mintegy 27 G és 35 P típust azonosítottak, és több mint 120 különféle G-P kombinációt ismerünk. Ezek közül 12 G és 15 P típust és több mint 70 különböző antigénkombinációt izoláltak emberekből.

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. A klinikai tünetek 12-48 órás inkubációs időszak után jelennek meg, a betegséget leggyakrabban a napokig tartó hányás és hasmenés jellemzi. Emellett jellemző még a láz, hasi fájdalom, levertség és étvágytalanság. A fertőzés súlyossága a tünetmentes állapottól egészen a halálos kimenetelű megbetegedésig terjedhet. A hányás és a több napig tartó vizes hasmenés nagy mennyiségű folyadék- és elektrolit veszteséget okoz, amely megfelelő folyadékpótlás nélkül akár az életet is veszélyeztetheti. A legfontosabb a beteg só-és víz háztartásának rendezése orális vagy intravénás rehidrációs terápiával. A rotavírus-infekció felnőttekben általában tünetmentesen vagy nagyon enyhe tünetekkel zajlik.

Újszülött és csecsemőkorban a rotavírus-fertőzés elleni védelemben a terhesség alatt transzplacentárisan illetve az anyatejes táplálással megszerzett anyai ellenanyagok játsszák a

főszerepet, melyek életünk első 3-6 hónapja alatt részleges védelmet biztosítanak a rotavírus-infekcióval szemben. Az első, tünetekkel kísért rotavírus-fertőzés 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 idősebb gyermekek és a felnőttek körében már az újabb rotavírus-infekciók általában enyhébb tünetekkel vagy tünetmentesen zajlanak. Az idős korral vagy egyes krónikus betegségekkel együtt járó immunszupresszált állapot ismét növeli a súlyosabb tünetekkel kísért rotavírus-fertőzés lehetőségét.

A rotavírus-fertőzés során az immunrendszernek mind a celluláris, mind a humorális komponensei szerephez jutnak, bár a celluláris immunválasz részleteit még kevésbé ismerjük. A víruskapszid VP4 és VP7 antigénjei ellen termelődő szekretoros ellenanyagok neutralizálják a vírust, és kitüntetett szerepük van a további rotavírus-fertőzések és súlyosabb megbetegedések elleni védelemben. A rotavírus-fertőzés során típus-specifikus és keresztreakáló ellenanyagok egyaránt termelődnek.

A rotavírusok változékonyságára, diverzitására, valamint a morbiditási és mortalitási mutatókra és a specifikus terápia hiányára tekintettel a súlyos rotavírusos gastroenteritis megelőzésében a vakcináció kapott főszerepet. 2006-ban két élő, attenuált orális rotavírus vakcina került a piacra a világ számos országában és vált elérhetővé Magyarországon is. Az egyik forgalomban lévő vakcina a monovalens G1P[8] genotípusú törzset tartalmazó Rotarix[®] (GlaxoSmithKline). A másik az állati-humán reassortáns, pentavalens RotaTeq[®] (Merck), amelyben a leggyakoribb humán G1, G2, G3, G4 és P[8] típusú törzsek találhatók meg.

Az újgenerációs rotavírus vakcinák 2006-os bevezetésével párhuzamosan a rotavírus elleni vakcinálás eredményeinek nyomon követése céljából világszerte posztvakcinációs surveillance programok alakultak. 2007 januárjában létrejött az Európai Rotavírus-törzsfigyelő Hálózat, melybe Magyarországot is meghívták tagnak. Az EuroRotaNet vezető laboratóriuma az angliai Egészségvédelmi Ügynökség (Health Protection Agency; HPA), a konzorcium ma 18 tagországot számlál. 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.

CÉLKITŰZÉSEINK

- A korábbi prevakcinációs rotavírus surveillance terület kiterjesztése, további földrajzi régiók (kelet-magyarországi és nyugati megyék) poszt-vakcinációs 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 vagy immunkromatográfiás 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.

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 virális nukleinsav extrakciója és tisztítása

A székletmintákhoz 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) puffert hozzáadva 10-20 %-os székletsuszpenziót készítettünk. A virális RNS extrakcióját a székletsuszpenziók felülúszójából TriReagent vagy kereskedelmi forgalomban kapható Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A székletmintákból nyert RNS-t nukleázmentes vízben vagy dietil pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízben oldottuk be.

Ahol arra szükség volt, a mintákban esetlegesen még jelen lévő, a PCR-t gátló komponenseket további tisztítással távolítottuk el. Ehhez a nukleázmentes vízben oldott RNS-t 6M guanidin-izotiocianát jelenlétében silica-mátrix felszínére adszorbeáltattuk. A

tisztítás után az RNS-t nukleázmentes vízzel oldottuk le a silica-mátrix felszínéről és további felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

Genotipizáló multiplex nested PCR

Reverz-transzkripció és multiplex nested PCR

A cDNS-szintézishez mintánként 5 µl tisztított virális RNS-t használtunk. A reverz transzkripciót AMV reverz-transzkriptáz enzim segítségével végeztük 42 °C-on 60 percig, 30 µl végtérfogatban random hexamer vagy a vírus VP4 és VP7 génjére specifikus VP4-F/con3 és VP7-F konszenzus primerek jelenlétében.

A cDNS amplifikációja és genotipizálása multiplex nested PCR rendszerben történt. A nested PCR első körében 5 µl cDNS-t használtunk templátként, melyben a vírus VP4 és VP7 génjeinek meghatározott régióját az arra specifikus konszenzus primerek (VP4-F+VP4-R/con2+con3 és VP7-F+VP7-R) segítségével amplifikáltuk. A reakcióhoz Taq DNS-polimeráz enzimet használtunk.

A nested PCR második körében történt az amplifikált DNS szakaszok genotipizálása, melyet a vírus VP4 és VP7 génjeinek variábilis régióira 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).

Agaróz gélelektroforézis

A multiplex PCR második körében nyert, az egyes rotavírus genotípusokra jellemző, de egymástól különböző méretű PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével választottuk el (1,5 v/w %-os agaróz TBE [Tris-bórsav-EDTA] pH 8,3 pufferben; ethidium-bromid festés), majd UV-átvilágítás mellett BioRad GelDoc géldokumentációs 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. Amennyiben a VP6-specifikus reakció is negatív eredményt hozott, úgy az adott mintát rotavírus RNS-negatívnak tekintettük és kizártuk a további vizsgálatokból.

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], G2, G3 és G4 törzsek egy válogatott, reprezentatív alcsoportjának szekvenciameghatározását is. A szekvenáláshoz a multiplex nested PCR első körében nyert, con2+con3 és VP7-F+VP7-R konszenzus primerpárokkal amplifikált PCR termékeket használtuk fel. Az első körös amplikonokat preaparatív agaróz gélelektroforézissel választottuk el (1 v/w %-os preparatív agaróz TBE pufferben; ethidium-bromid festés). A megfelelő méretű DNS szakaszokat a gélből Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 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 segítségével végeztünk el a gyártó utasításait követve. A DNS szakaszok direkt szekvenálása a VP4 és VP7 génekre specifikus reverz PCR primerekkel (con2 és VP7-R) történt. A szekvenáló PCR után a termékeket etanol-Na-acetát keverékével (96 v/v %-os etanol + 3M, pH 5,2 Na-acetát) tisztítottuk.

Szekvencia- és filogenetikai elemzés

A jelölt PCR termékek kapilláris elektroforézise és a szekvenciaadatok gyűjtése automata szekvenciaanalizáló ABI Prism 3100 Avant vagy ABI3500 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 program segítségével ellenőriztük és tisztítottuk, majd a génbankban (GenBank) elérhető rotavírus szekvenciákhoz hasonlítottuk a Blast program segítségével. A szekvenciák manuális illesztését a GeneDoc programcsomag segítségével végeztük. A filogenetikai analízishez a MEGA5 programban a neighbor-joining algoritmust és a *p*-distance modelt használtuk. 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 vonzáskörzetéből származtak. 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.

Adataink alapján a minták 84%-a (N=1859) fekvőbetegektől származott, míg a páciensek 16%-a (N=354) járóbeteg ellátásban részesült. 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).

A rotavírus pozitív székletminták mintavételi időpontjai alapján megvizsgáltuk a rotavírus-fertőzések időbeli eloszlását az egyes években. A rotavírus-fertőzések jellegzetes szezonalitást mutatnak. 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.

Rotavírus antigénkombinációk előfordulása Magyarországon

A 2380 feldolgozásra került mintából 2297 (96,5%) esetében sikerült mindkét felszíni antigén genotípusát meghatározni, a részlegesen tipizált minták aránya 3,5% maradt. A vizsgált időszakban 17 különböző antigénkombináció előfordulását detektáltuk. 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%. Az általános elterjedést mutató törzseken kívül ritkábban előforduló törzseket is ki tudtunk 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 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%). 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 magyarországi gyakori törzsek földrajzi és időbeli dinamikája

Az egyes antigénkombinációk megjelenése és relatív gyakorisága nemcsak évről évre változott, de ugyanabban az évben a különböző földrajzi területek között is eltéréseket mutatott. 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-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 szekvencia vizsgálatával pedig választ kerestünk arra, hogy a hazánkban is forgalomban lévő oltóanyagok hogyan befolyásolják a cirkuláló törzsek genetikai összetételét.

2007 év elején, a pécsi kórházból származó négy székletmintából G9P[6] genotípusú vírustörzset tudtunk kimutatni. A G9P[6] törzsek kimutatása a genotípus első hazai dokumentációját jelentette, és felkeltette a figyelmünket a fertőzések területi és időbeli egybeesése is. 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. 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 között, így megerősítette az első és a második eset közötti epidemiológiai összefüggést. A G9P[6] törzsek VP4 és VP7 génjének szekvencia- és filogenetikai elemzése szorosabb genetikai rokonságot tárt fel Dél-Ázsiából származó rotavírus törzsek és a magyarországi G9P[6] törzsek között, mint a korábban azonosított hazai G9 és P[6] specificitású vírusokkal, amely alapján a G9P[6] törzsek Dél-Ázsiából történő behurcolását feltételezzük.

A vakcina eladási adatok alapján hazánkban elsősorban a monovalens, G1P[8] specificitású törzset tartalmazó Rotarix[®] vakcina használata terjedt el, de a kisebb számban alkalmazott pentavalens RotaTeq[®] 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. 2007-2011 között gyűjtött, különböző földrajzi területekről származó G1P[8] törzsek VP4 és VP7 génjeinek részleges szekvenálását és a vakcina törzsekkel való összehasonlítását végeztük el. A 318 sikeresen szekvenált törzs filogenetikai elemzése során a vizsgált G1P[8] törzsek mindkét gén esetében egyértelműen elkülönültek a RotaTeq[®] vakcinában található G1 VP7 és P[8] VP4 génektől. Ezzel szemben négy közösségi törzs esetében a VP7 gén szorosabb kapcsolatot mutatott a Rotarix[®] oltóanyagban található 89-12 vakcina törzs G1 génjével, további 51 törzs VP4 génje pedig azonos filogenetikai vonalba tartozott a Rotarix[®] eredetű VP4 génnel. 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.

Összesen 36 darab G2, G3 és G4 genotípusú törzs VP7 génjének részleges nukleinsav-sorrendjét határoztuk meg és hasonlítottuk össze a RotaTeq[®] 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[®] vakcina törzsek valamelyikétől származhat. A nukleinsav szekvenciák összehasonlításakor a surveillance során azonosított törzsek mindhárom genotípus esetén egyértelműen elkülönültek a vakcina törzsektől. A G1 törzseknél észlelt vakcina törzsszel való szorosabb genetikai kapcsolatot egyik törzs esetében sem találtunk.

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. Részletes vizsgálat során 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, csupán egy nukleotid eltérést találtunk a két szekvencia között.

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. Végül egy G8P[8] törzs genotípusa a szekvenálás során G4P[8] típusúnak bizonyult. A részletes szekvenciaelemzés ugyan nem tárt fel olyan figyelemre méltó szekvenciahomológiát a tipizáló primerek és a célszekvenciák között, mint a G6 típusú törzseknél, csupán néhány nukleotid azonosságot találtunk.

A rotavírus elleni vakcináció helyzete Magyarországon

A rotavírus vakcinák eladási statisztikái és a vizsgált időszakban a Központi Statisztikai Hivatal (KSH) által nyilvántartott élveszületések száma alapján hazánkban a célcsoport áttoltottsága 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. Az adatainkat kistérségi bontásban vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az ország legtöbb területi egységén az áttoltottság 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 áttoltottságot (43-93%). A vizsgálataink során feldolgozott széketmintákkal 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.

MEGBESZÉLÉS

A hazánkban végzett rotavírus törzs surveillance tevékenység az 1980-as évekre nyúlik vissza. Ebben az időszakban a vizsgálatok a leggyakoribb genotípusok (G1–G4) hazai előfordulását igazolták. A rotavírus vakcinák megjelenése előtti időszakban adataink két sentinel régióból (Budapest és Baranya megye) érkező rotavírus pozitív minták vizsgálatából származtak. A prevakcinációs időszak mintegy 22 éves időszaka alatt közel 7000 rotavírus törzs szero-és genotipizálása történt meg. 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 minta beküldés területi egyenlőtlenségei ellenére a hazánkban cirkuláló rotavírusok epidemiológiájáról releváns adatok gyűltek össze.

2380 rotavírus törzs sikeres genotipizálása a G1P[8], G2P[4] és G4P[8] genotípusú törzsek országszerte leggyakoribb elterjedését mutatta. 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. 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. A posztvakcinációs időszakban e törzsek jelentősége némileg visszaszorult, de minden vizsgálati évben és szinte mindegyik régióból kerültek elő ilyen genotípusú vírusok.

A legújabb, gyors globális terjedést mutató genotípus, a G12, első alkalommal 2005-ben került itthon azonosításra. A 2000-es évek elején a világ számos országából jelentették ennek a törzsnek a megjelenését és növekvő gyakoriságát. 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 általános 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. 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 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 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[®] oltóanyagot alkalmazó országokban a G2P[4] törzsek megemelkedett jelenlétét tapasztalták, míg ott, ahol elsősorban a RotaTeq[®]-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 a törzsgyakoriságokban megfigyelhető természetes idő-és térbeli fluktuációkról van. Ilyen jellegű következtetéseket tehát hazánkkal kapcsolatban sem tehetünk. A hozzánk beérkezett széletmintákkal kapcsolatban sajnos nem kaptunk arról információt, hogy a beteg kapott-e korábban rotavírus elleni oltást. Ezért 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[®] 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 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[®] vakcina törzs VP7 génjével magasabb, mintegy 97,9%-os szekvenciaazonosságot mutatott, további 51 törzs esetében pedig a szekvenciaelemzés 98,5%-os nukleotid homológiát tárt fel a közösségben cirkuláló törzsek és a Rotarix[®] törzsVP4 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 nukleotid cserék 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.

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. 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. 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-képességének hiánya jelentős szerepet játszhatott a sertés eredetűnek vélt G9 típusú törzsek globális elterjedésében és ugyanez szerepet játszhat a szintén sertés eredetűnek tartott G12 törzsek növekvő előfordulásában is. 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 szekvenálások mellett a vírusgenom teljes vagy részleges szekvencia- és filogenetikai elemzése segíthet tisztázni ezeknek a törzseknek a pontos eredetét.

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. 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 valódiságát mindenképpen érdemes és szükséges szekvenciameghatározással is megerősíteni.

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[®]-ben; G1, G2, G3, G4, G6, P[8] és P[5] a RotaTeq[®]-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 vakcinák 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.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az A-csoportú rotavírusok okozta gyermekkori akut gastroenteritisek megelőzésében a vakcináció játssza a főszerepet. Az újgenerációs Rotarix® és RotaTeq® 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® törzshöz hasonló G1 és P[8] típusú vírusokat. Magyarországon a Rotarix® vakcina használata terjedt el elsősorban, de a célpopuláció áttoltottsága 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.

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-
Priatelj, 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-Priatelj, 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 Rotavírusörzs-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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.01.10



AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Brigitta László, Judit Deák, Jim Gray, Miren Iturriza-Gomara, Julianna Kovács, József Kónya, Vito Martella, Zsófia Mészner, Molnár, Zoltán Nyúl, László Pátri, Ferenc Schneider, András Tóth, György Szűcs, Krisztián Bányai: Prevalence of Rotavirus strains in Hungary, 2007.

Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 15-17, 2008, Keszthely, Hungary

Brigitta László, Judit Deák, Jim Gray, Miren Iturriza-Gomara, Ágnes Juhász, Julianna Kovács, József Kónya, Vito Martella, Júlia Mészáros, Zsófia Mészner, Ilona Mihály, Péter Molnár, Zoltán Nyúl, László Pátri, Erzsébet Puskás, Ferenc Schneider, András Tóth, Erzsébet Tóth, György Szűcs, Krisztián Bányai: Occurrence of unusual and vaccine targeted rotavirus strains in a multicentric survey in Hungary.

Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 13-15, 2010, Keszthely, Hungary

Brigitta László, József Kónya, Judit Deák, Ferenc Jakab, Ágnes Juhász, Ildikó Sántha, Krisztián Bányai and the Hungarian Rotavirus Surveillance Network: Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary.

Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 24-26, 2012, Keszthely, Hungary

Papp Hajnalka, **László Brigitta**, Bányai Krisztián: Rotavírus eredetű zoonózisok. OEK Virologiai Napok, 2012. Budapest

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK LISTÁJA

Bányai K, Bogdán Á, **László B**, Domonkos G, Molnár P, Mihály I, Kónya J, Martella V, Szűcs Gy.: The last 3 years of national rotavirus strain surveillance activity in the prevaccine era (2003-2006): first detection of serotype G8 and G12 rotaviruses in Hungary.

15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, July 18-20, 2007, Budapest, Hungary

László B, Deák J, Gray J, Iturriza-Gomara M, Kovács J, Kónya J, Martella V, Mészner Z, Molnár P, Nyúl Z, Pátri L, Schneider F, Tóth A, Szűcs Gy, Bányai K.: First year of the post-vaccination rotavirus surveillance in Hungary.

8th International Rotavirus Symposium, 2008, Istanbul, Turkey

László B, Czellár E, Deák J, Gray J, Iturriza-Gomara M, Juhász Á, Kovács J, Kónya J, Martella V, Mészáros J, Mészner Zs, Mihály I, Molnár P, Nyúl Z, Pátri L, Puskás E, Schneider F, Tóth A, Tóth E, Szűcs Gy, Bányai K.: Rotavirus strains in Hungary, 2007-2008.

2nd Central European Forum for Microbiology, October 7-9, 2009, Keszthely, Hungary

Brigitta László, Hajnalka Papp, Eszter Dandár, Judit Deák, Jim Gray, Miren Iturriza-Gomara, Ferenc Jakab, Ágnes Juhász, Julianna Kovács, József Kónya, György Lengyel, Vito Martella, Júlia Mészáros, Zsófia Mészner, Ilona Mihály, Péter Molnár, Zoltán Nyúl, László Pátri, Erzsébet Puskás, Ferenc Schneider, András Tóth, Erzsébet Tóth, György Szűcs, Krisztián Bányai: Prevalence of human rotavirus strains in Hungary, 2006-2011.

Fourth European Rotavirus Biology Meeting, October 2-5, 2011, Altafiumara - Santa Trada Di Cannitello, Villa San Giovanni (RC) – Italy

Brigitta László, Hajnalka Papp, Eszter Dandár, Judit Deák, Jim Gray, Miren Iturriza-Gomara, Ferenc Jakab, Ágnes Juhász, Julianna Kovács, József Kónya, György Lengyel, Vito Martella, Júlia Mészáros, Zsófia Mészner, Ilona Mihály, Péter Molnár, Zoltán Nyúl, László Pátri, Erzsébet Puskás, Ferenc Schneider, András Tóth, Erzsébet Tóth, György Szűcs, Krisztián Bányai: Emerging human rotavirus strains, 2006-2010, Hungary. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna, Austria • February 4–7, 2011

László Brigitta, Deák Judit, Jim Gray, Miren Iturriza-Gomara, Juhász Ágnes, Kovács Julianna, Kónya József, Vito Martella, Mészáros Júlia, Mészner Zsófia, Mihály Ilona, Molnár Péter, Nyúl Zoltán, Pátri László, Puskás Erzsébet, Schneider Ferenc, Tóth András, Tóth Erzsébet, Szűcs György, Bányai Krisztián: Rotavírus-törzsek molekuláris epidemiológiája a poszt-vakcinációs időszakban Magyarországon. A Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 38. Kongresszusa, Debrecen, 2010. szeptember 30. - október 2.