

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Humán rotavírusok cirkulációjának vizsgálata
Magyarországon**

Írta: **Dr. Szűcs György**

Pécs, 1997.

Készült a POTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézetének
a "Fertőző betegségek molekuláris pathogenezise" programja
keretében. Programvezető: Prof. Emőd Levente

1. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK - CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt közel két évtized alatt, a rotavírusok emberi betegséggel kapcsolatos első, valamint újszülöttek és fiatal gyermekek hasmenéseinek fő etiológiai okaként való azonosítása óta, jelentős haladás következett be a vírus megismerésében, molekuláris biológiájának feltárásában, az általa okozott betegség pontosabb leírásában. A vírus capsid-strukturájára, genom-felépítésére és szaporodási stratégiájára nézve sok hasonlóságot mutat az emlős rotavírusokkal, és ezért a Reoviridae családon belül önálló genusként lett klasszifikálva.

A rotavírusok a vékonybélben szaporodnak. Szegmentált genommal rendelkeznek, és felszínükön két fontos fehérje van, amelyek mind a klasszifikáció, mind a fertőzött szervezet immunválasza szempontjából igen fontosak. A rotavírusok különböző típusai/csoportjai, altípusai cirkulálnak egy közösségben azonos időben, és felszíni fehérjéik időre változáson is mennek keresztül. Ráadásul az állatoknak is vannak rotavírusaik, és így az állatok valószínűleg fontos rezervoárt jelentenek az ember számára újként megjelenő rotavírusok számára.

A rotavírusok a hagyományos szövettenyésztési módszerekkel nem szaporíthatók. A víruspartikulákat először elektronmikroszkóppal figyelték meg, majd a víruskimutatási technikák fejlődésével az egyszerű latex-agglutinációs próbától a polimeráz láncreakcióig szinte minden módszert sikerült kimutatásukra alkalmazni. A rotavírusok csoport és típus változatosságára viszont ma is megkívánja, hogy több vizsgálati módszert alkalmazzunk.

A rotavírusok jelentik szerte a világon a fiatal gyermekek súlyos dehidrációval járó hasmenéseinek fő okát, megfertőzve közel minden egyes gyermeket életük első éveiben. Mivel a betegség egyformán érinti az iparilag fejlett és a fejlődő országokat, a higiénés és egészségügyi körülmények javításának csak limitált hatása van a betegség lefolyására. A rotavírus fertőzés ugyan kezelhető rehidrációs terápiával, de a legjobb stratégiának kezdettől a betegség megelőzésének immunizálással történő biztosítása látszik.

Napjainkra már elkészült több élő orális vakcina, melyek úgynevezett "reassortant" vírust tartalmaznak. Az új vakcina jól illeszthető a WHO EPI (Expanded Programme on Immunization) rendszerébe. Hamarosan az USA-ban meg is kezdik az oltásokat, és valószínű, hogy - kellő előkészítés után - Európában is bevezetésre kerül majd ez az új oltóanyag.

Hazánkban először az állatorvosok figyelték fel a rotavírusokra (*Köves és mtsai, 1977, 1979; Moesári, 1982; Nagy, 1986*), majd humán anyagon is, a vizsgálati lehetőségek adta korlátok mellett, a Szegei Orvostudományi Egyetem Központi Klinikai Laboratóriumában végeztek gyermekkek között rotavírus kimutatást (*Földes, 1982; Deák, 1983*), és írtak le egy rotavírus járványt Hévízmezővársárhelyről (*Kovács és mtsai, 1984*). Egy, a Fővárosi László Kórházban 1982 év tavaszán előfordult rotavírus járványról is vannak adataink (*Lakos és mtsai, 1985*). Az elektronmikroszkóppal és immunológiai alapú tesztekkel végzett vizsgálatok több olyan korlattal rendelkeztek, amit csak a vírus genomjának kimutatására kidolgozott módszerek tudtak kiküszöbölni.

1981-82 években módomb volt a houstoni (Texas) Baylor Egyetem Virologiai és Epidemiológiai Intézetében meg tanulni a rotavírusok RNS-genomjának székleiből történő közvetlen kimutatását Dr. M.K. Estes munkacsoportjában. Hazatértem után célul tűztem ki, hogy az ország különböző területeiről gyűjtött, gastroenterális infekcióban szenvedő gyermekek székleimintáit, egy több évre tervezett, longitudinális, prospektív vizsgálat keretében fogom megvizsgálni a rotavírusok kimutatása és jellemzése céljából.

Célm volt:

- 1./ a rotavírus 11 szegmentből álló RNS genomjának székleiből történő közvetlen kimutatásának hazai bevezetése, mivel csak ez a módszer adott lehetőséget, hogy a célok közé kerülhessen;
- 2./ a nem az A csoportba tartozó humán rotavírusok kimutatása,
- 3./ a rotavírusok molekuláris szintű epidemiológiai vizsgálata (domináns törzsek - elektroterotípusok évi és évenkénti változásának követése),
- 4./ nosocomialis infekciók felismerése,
- 5./ több rotavírussal történő együttes fertőzés lehetőségének igazolása,

6./ szerotípusra jellemző elektroterotípus megjelenésének felismerése,

7./ állapotok között fellépő rotavírus fertőzések epidemiológiai összefüggéseinek kimutatása.

II./ Monoklonális ellenanyagokkal, általam összeállított ELISA rendszerben vizsgálni kívántam, hogy

1./ az A csoportba tartozó rotavírusok hogyan oszlanak meg a legfontosabbnak tartott négy szerotípus (G típus) szerint,

2./ kimutatható-e különbözőség a szerotípusok évenkénti megjelenésében,

3./ észlelhető-e Magyarországon belül a rotavírus szezonokban a szerotípusoknál földrajzi megoszlási eltérés,

4./ vannak-e "kevert", több szerotípussal történt fertőzések, és

5./ találni-e "nem tipizálható", feltehetőleg más, a négy leggyakoribb szerotípusba nem tartozó törzseket; ha igen, mi ezek gyakorisága.

III./ Szövetenyészetben meg akartam kísérni a

1./ humán rotavírus kienyészítését, és az izolátum(ok) elektroterotípusának és szerotípusának meghatározását,

2./ igazolni akartam, hogy rotavírus-pozitív székleimintákból a rotavírus tenyésztésére kidolgozott technika alkalmazásával nyert izolátumok elektroterotípus vizsgálata fontos a Reoviridae családba tartozó más vírusok kizárására.

IV./ Longitudinális vizsgálattal epidemiológiai adatokat kívántam gyűjteni a

1./ rotavírus fertőzések magyarországi szezonálitásáról,

2./ vírusűrítő gyermekek kormegoszlásáról,

3./ felnőttek között klinikai tünetekkel járó megbetegedések előfordulásáról,

4./ rotavírus infekció hazai nagyságrendjéről, jelentőségéről.

V./ Célm volt hazai és nemzetközi kooperáció kiépítése, ami lehetővé teszi a

1./ hazai adatok felhasználását a rotavírus vakcina esetleges itthoni bevezetésének távlati tervezéséhez,

2./ legújabb vizsgálati eljárásokhoz való hozzájutást (pl. PCR) nemzetközi kooperáció keretében,

3./ laboratórium hazai referens és jegyzett európai vizsgálóhelyé válását a rotavírusok vizsgálatára.

Természetesen ahhoz, hogy e célkitűzéseket megvalósíthassam, rengeteg segítséget kellett kapnom közvetlen munkatársaimtól, a már említett hazai intézetekben dolgozó kollégáimtól, és nem utolsósorban, a rotavírus kutatás élvonalában dolgozó külföldi kutatóhársaimtól és barátaimtól.

2. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Székletminták.

Az 1982-1996 időszak alatt közel 13.000, 86 %-ban öt éves kor alatti gastrointestinális tünetekkel (BNO kód: 008.6, 008.8, 009.0 - 009.3 és 558.9) észlelt gyermek székletmintájának vizsgálatára került sor. A székletmintákat Baranya és Csongrád megyéből kaptuk, de a legtöbb székletminta a Fővárosi Szent László Kórház Vírus Laboratóriumával való együttműködés keretében jutott hozzánk.

Állati rotavírusok kimutatására az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézetéből és az AKK-HYB Kft.-től kaptam borjú- illetve malacelsárt.

2. Rotavírus kimutatása latex agglutinációs (LA) teszttel.

A kereskedelemben beszerezhető kittel (Rotalex® kit, Orion Diagnosztika, Espoo, Finland) és a kihez mellékelt leírás alapján végeztem a vizsgálatokat.

3. Rotavírus kimutatása ELISA módszerrel.

Vizsgálataim egy részében kereskedelmi forgalomban lévő, az A csoportú rotavírusok kimutatására kifejlesztett ELISA kitéket használtam a gyártó vizsgálati útmutatásának betartásával (Dakopatts, Glostrup, Dánia). Az esetek többségében a kit komponenseit megvásárolva, azokkal magam készítettem el a vizsgálati rendszert.

4. Rotavírus G-szerotípusok meghatározása monoklonális savókkal ELISA vizsgálati rendszerben.

100%-os székletszuszpenziókat monoklonális savókkal vizsgáltam. A lemezek érzékenyítésére a KU-4 (G1), S2-2G10 (G2), YO-1E2 (G3), és az ST-2G7 (G4) G-típus-specifikus monoklonális savókat használtam, a VP6 és VP7 csoport-specifikus deteminánsokra pedig a 631-7-54 és a 60-F2D4 monoklonális savókat alkalmaztam.

5. Rotavírusok RNS genomjának székletből történő közvetlen kimutatása: elektroferotípirizálás.

Székletmintákból PBS-sel 10%-os szuszpenziókat készítettem, azokat Genetronnal extraháltam. A vires fázisban lévő vírusból 1% SDS segítségével az RNS-t kiszabadítottam, a jelen lévő fehérjéket pedig fenol-kloroform-izooamilalkohol keverékkel extraháltam. Az RNS-t abszolút alkohollal kicsaptam, majd mintapufferben feloldottam, és poliakrilamid lapgéleken futtattam. Ethidium bromiddal történt festés és UV fényvel (254 nm) való megvilágítás mellett értékeltem és fényképeztem az RNS szegmensek elhelyezkedését. Az 1980-as évek közepétől az ultraérzékeny ezüstfestést használtam. A későbbi években pedig két módosított RNS extrakciós eljárással izoláltam a virális RNS-t.

6. Elektronmikroszkópos vizsgálatok.

Egyrészt az agar-pseudoreprika módszert alkalmaztam, más esetekben a vizsgálati anyagban közvetlenül negatív festéssel tettem láthatóvá a vírusokat.

7. Rotavírus tenyésztése szövettényeszében.

Tripszin-kezelést követően, rotavírusra permisszív szövettényeszében (MA-104), forgódobos inkubálással kíséreltem meg a vírusok szaporítását.

8. Rotavírus antigének kimutatása indirekt immunofluoreszcens módszerrel.

Standard immunofluoreszcens módszert alkalmaztam. Az immunofluoreszcens vizsgálathoz anti-rotavírus nyúlászót és FITC-jelölt anti-nyúlászót használtam.

9. Kórházi- és betegadatok.

A rutin vizsgálati beküldőpapírokon kapott adatok mellett a kooperáló kollégák szolgáltatottak információit. A számtípusos nyilvántartásokból mód volt célzott lekérdezésre a BNO kódok alkalmazásával.

10. Statisztikai analízis.

A statisztikai vizsgálatokat az Epi Info statisztikai programcsomag segítségével végeztem.

3. MEGBESZÉLÉS, ÚJ EREDMÉNYEK

A rotavírusok molekuláris vizsgálatának magyarországi bevezetése lehetővé tette, hogy a közép-kelet-európai régióból adatokat kapjunk, és kiegészítsük a nemzetközi megfigyeléseket, epidemiológiai adatokat. Ezekkel a longitudinális vizsgálatokkal először szolgáltattunk olyan megfigyeléseket ebből a térségből, melyek a nyugat-európai vizsgálatok többségét felülmúlták.

A kapott eredmények alátámasztották a mérsekelt égővön végzett vizsgálatok konklúzióit. Hazánkból pedig az alábbi új eredményeket szolgáltatottak a vizsgálatok:

1. A humán rotavírusok RNS genom-szegmenjeinek székletről történő közvetlen kimutatása először Magyarországon e vizsgálatok keretében történt meg.
2. A virális RNS-szegmentek analízisével, az elektroferotipizálás bevezetésével sikerült molekuláris epidemiológiai vizsgálatokat végezni. Meg lehetett határozni a rotavírus törzsek heterogenitását, egyes törzsek időszakokra jellemző túlsúlyát.
3. Először sikerült kimutatni nem-A csoportba tartozó rotavírusokat.
4. Nosocomialis infekciókat lehetett igazolni gyermekek és felnőttek között a kimutatott rotavírusok elektroferotipusainak vizsgálatával.
5. Először sikerült kimutatni több eltérő elektroferotipusú vírussal egyszerre fennálló fertőzést ugyanazon betegen.
6. Sikerült itthon is igazolni, hogy a "short" elektroferotipus leggyakrabban 2-es szerotipusnak felel meg.
7. Először végeztünk Magyarországon bovin és sertés bélsárból közvetlen rotavírus RNS-analízist, és igazoltunk epidemiológiai összefüggéseket ezzel a módszerrel sertésállományokban.
8. A korábban még hazánkban soha nem végzett szerotípus (G típus) meghatározás alapján először igazoltuk mind négy leggyakoribb szerotípus hazai előfordulását.
9. Szerotípusok megjelenésében földrajzi különbséget tudtunk fel tárni egy rotavírus szezonon belül.
10. Több szerotípussal történt fertőzéseket sikerült igazolnunk.

11. Valószínűsíteni sikerült, hogy a legismertebb G1-4 szerotípuson felül más szerotípusok jelenlétével is számolni kell a rotavírus infekciókban.

12. Először sikerült szövettényészetben kitenyészteni humán rotavírust hazai székletmintákból.

13. Reovírusok kimutatását és azonosítását genom-vizsgálattal mi végeztünk először hazánkban.

14. A rotavírus fertőzések szezonális megjelenéséről először szolgáltattunk több évre kiterjedő vizsgálatok alapján adatokat.

15. Nagyszámú anyagon először elemeztük az egyes korcsoportok érintettségét a klinikai tünetekkel járó rotavírus fertőzésekben.

16. Először igazoltunk felnőttek között klinikai tünetekkel járó rotavírus infekciót.

17. Az első hazai elemzést mi végeztük a rotavírus fertőzés következtében szükségessé váló kórházi kezelésekre számára és a költségkihatásra vonatkozóan.

Az eredmények részbeni publikálása hozzájárult ahhoz, hogy a magyarországi rotavírus cirkulációra vonatkozó adatok nemzetközi figyelmet kaptak. Ez egyrészt a laboratórium európai rotavírus surveillance vizsgálatokba való meghívását jelentette, másrészt a virológia "Bibliájának" számító Fields' Virology-ban való idézettségét hozta magával.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK ÉS ELHANGZOTT ELŐADÁSOK

1. Szücs Gy, Kende M, Új M. Rotavírus-fertőzés igazolása a vírus-RNS székletről történő kimutatásával. Orvosi Hetilap 125: 2177-2179 (1984).
2. Szücs Gy, Kende M, Új M, Deák J, Koller M, Szarka E, Csik J. Different electrophoretotypes of human rotaviruses in Hungary. Acta Virol 31: 369-373 (1987).
3. Szücs Gy, Kende M, Új M. Atypical human rotaviruses in Hungary. Ann Inst Pasteur/Virol 138: 391-395 (1987).
4. Szücs Gy, Kende M, Új M, Varga L, Rajkai I. "Kever" rotavírus-fertőzések kimutatása vírus-RNS vizsgálattal. Orvosi Hetilap 128: 255-257 (1987).

5. Szücs Gy, Kende M, Új M. Shift in genomic molecular patterns of human rotaviruses over an eighteen-month period in Hungary. *Intervirology* 28: 110-113 (1987).
6. Szücs G, Matson DO, Új M, Kukán E, Mihály I, Jelenik Z, Estes MK. Group A rotavirus G type prevalence in two regions of Hungary. *Arch Virol* 140: 1693-1703 (1995).
7. Szücs G, Új M, Mihály I, Deák J. Burden of human rotavirus-associated cases in three geographic regions of Hungary. *Acta Paediatr Suppl* (felkért közleményként benyújtva; 1997)
8. Szücs Gy, Kende M, Új M, Deák J, Koller M. Humán rotavírus-RNS kimutatása széklemtinktákból. (*Abstract*). Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Nyíregyháza, 1984. Összefoglalók, 94. old.
9. Szücs Gy, Káta A, Kende M, Új M, Ványai É, Szöllősy E. Reovírusok izolálása rotavírus-pozitív széklemtinktákból. (*Abstract*). Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Eger, 1989. Összefoglalók, 106. old.
10. Szücs Gy, Új M, Kende M. Humán rotavírusok különböző szerotípusainak előfordulása és a szerotípus vizsgálat jelentősége. Magyar Gyermekorvos Társaság Dél-Dunántúli Szakcsoportjának tudományos ülése, Dombóvár, 1989. Szept. 29-30.
11. Szücs Gy, Új M. Eltérés igazolása a humán rotavírusok szerotípusainak évenkénti és területi előfordulásában. (*Abstract*). Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Sopron, 1990. Összefoglalók, 110. old.
12. Szücs Gy, Matson DO, Új M, Kukán E, Mihály I, Jelenik Zs, Estes MK. Prevalence of rotavirus G serotypes in two regions of Hungary. (*Abstract*). *Ann. Mag. of the Hung. Soc. Microbiol.*, Győr, 1993. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 41: 330 (1994).
13. Szücs Gy, Új M, Mihály I, Deák J, Tóth I, Káta A. Gastroenteritisek virális kórokozói: hazai vizsgálatok, diagnosztikai lehetőségek. (*Abstract*). Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Szolnok, 1994. Összefoglalók, 83. old.

Dr. Szücs György
osztályvezető főorvos

ÁNTSZ Baranya Megyei Intézete
Vírus Laboratórium
7623 Pécs, Szabadság út 7.

(Tel.: 72-212-155, Fax: 72-212-476,
E-mail: gszucs@main.antszbar.hu)