

**A humán calicivírusok molekuláris epidemiológiája
Magyarországon**

Doktori (Ph.D.) - értekezés

Dr. Reuter Gábor

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Pécs

2002

Doktori (Ph.D.) - értekezés

**A humán calicivírusok molekuláris epidemiológiája
Magyarországon**

Dr. Reuter Gábor

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szolcsányi János

Programvezető: Prof. Dr. Emőd Levente

Témavezető: Dr. Szűcs György egyetemi magántanár

Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

ÁNTSZ Baranya Megyei Intézete, Regionális Virologiai Laboratórium

Pécs, 2002

Szüleimnek és családomnak

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	4
BEVEZETÉS	5
A mikrobás gastroenteritis megbetegedések epidemiológiája Magyarországon	6
A humán calicivírusok	7
CÉLKITŰZÉSEK	14
ANYAG ÉS MÓDSZER	16
EREDMÉNYEK	22
ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉS	37
ÚJ EREDMÉNYEK	46
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS, TÁMOGATÁSOK	47
TOVÁBBI CÉLOK	48
MELLÉKLETEK	49
IRODALOM	54
A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	65

RÖVIDÍTÉSEK

AnCV	állati calicivírus
ÁNTSZ	Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat
bp	bázispár
CaCV	canine calicivirus
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleozid-trifoszfát
EBHSV	European brown hare syndrome virus
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FCV	feline calicivirus
HuCVs	humán calicivírusok
G	genocsoport
kDa	kiloDalton
M-MLV-RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLVs	Norwalk-szerű vírusok
nm	nanométer
OD	optikai denzitás
ORF	open reading frame
PBS	foszfát puffer sóoldat
rEIA	rekombináns enzim-immunoassay
RHDV	rabbit haemorrhagic disease virus
RIA	radioimmuno-assay
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Bilthoven)
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripció-polimeráz láncreakció
SLVs	Sapporo-szerű vírusok
SMSV	San Miguel sea lion virus
UPGMA	unweighted pair group method of arithmetic
VESV	vesicular exanthema of swine virus

VLPs

WHO

vírus-szerű partikulák

World Health Organization

BEVEZETÉS

A fertőző ágensek (vírusok, baktériumok, gombák, élősködők) által okozott hasmenéses kórképek (gastroenteritisek) a mai napig világszerte vezető közegészségügyi és járványügyi jelentőségűek (Bern és mtsa., 1994.), és számos, részben új problémát jelentenek. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint csak a nyilvántartott esetek száma évente több mint 4 milliárd a Föld lakossága körében, melyek közül 3-4 millió fertőzés halállal végződik (Cleason és mtsa., 1990.; Bern és mtsai., 1992.). A valódi nagyságrendekről csak becslések vannak. Különösen jelentősek a bélrendszeri fertőzések a gyermekkori megbetegedés (morbidity) és halálozás (mortality) tekintetében. Az Egyesült Államokban évente 250-350 millió gastroenteritises epizód miatt (átlagosan 1 epizód/fő/év) 450 ezer felnőtt és 160 ezer 5 évesnél fiatalabb gyermek, átlagosan 4,5 napot igénylő kórházi ellátásban részesül (Lew és mtsai., 1991.; Jin és mtsai., 1996.; Mounts és mtsai., 1999.). A gastroenteritisek ellátása során felmerülő költségek a 80-as évek végén meghaladták az 1 milliárd dollárt (Ho és mtsai., 1988.a; CDC., 1990.; Mead és mtsai., 1999.; Glass és mtsai., 2000.). Ennek ellenére a megbetegedések évente, még az Amerikai Egyesült Államokban is 3000 felnőtt (elsősorban időskorú) és 200-500 gyermek halálát okozzák (Ho és mtsai., 1988.b; Mounts és mtsai., 1999.). Amíg a fejlődő országokban a szegényes higiénia, a tiszta (tisztított) víz hiánya, a nem megfelelő kezelés miatt a fertőzések nagy száma és végzetes kimenetele érhető ugyan (de nem elfogadható!), addig az iparilag fejlett országokban ezek javítása csak csökkentette a fertőzések számát, de nem tudta azokat megszüntetni. Sőt, ma már látható, hogy a fertőzési feltételek egyes alapelemei erősödtek, és új utakat is megnyitottak a kórokozók számára (immunhiányos és immunszuppresszált állapotok, nosocomialis fertőzések, higiénés fegyelem lazulása, az élelmiszerek világkereskedelme, környezetszennyezés stb.), illetve a végleges megoldást jelentő aktív immunizálások továbbra sem megoldottak. Az iparilag fejlett országok igazán nagy eredménye az, hogy a megfelelő orvosi ellátás (pl.: rehidrációs kezelés) eredményeként a halálozások csökkentek (Duggan és mtsai., 1992.).

John Zahorsky 1929-ben „winter vomiting disease” (hyperemesis hiemis) néven írt először az ismeretlen eredetű, nem bakteriális járványos gastroenteritisről (Zahorsky, 1929.). Ugyanakkor csak az 1940-50-es években, az ismert kórokozó nélküli baktérium- és toxinmentesített széklepszűrletek szájon keresztüli adásával mesterségesen kiváltott emberi megbetegedések és fertőzési kísérletek, illetve a nagyszámú nem bakteriális esetek hívták fel a

figyelmet a gastroenteritisekben a baktériumoknál kisebb mikroorganizmusok lehetséges szerepére („transmissible agents”, átvihető ágensek) (Reiman és mtsai., 1945.; Gordon és mtsai., 1947.). A kísérletek végül csak 1972-ben vezettek eredményre. Ekkor Kapikian az Egyesült államokbeli Norwalk (Ohio állam) városban, 1969-ben lezajlott iskolai gastroenteritis járványból származó székletminták immunelektronmikroszkópos vizsgálatával leírta a Norwalk ágent (Adler és mtsa., 1969.; Kapikian és mtsai., 1972.), mely ma a *Caliciviridae* család tagja, és amely az első bizonyíték volt arra, hogy vírus is lehet kóroki tényező – és nemcsak „csendes átutató” - az emberi gyomor-bélrendszerben.

Az elmúlt 30 év erőfeszítései következtében jelentősen megnőtt az elektronmikroszkóppal igazolt és leírt, az emberi gyomor-bélrendszerhez adaptálódott és gastroenterális megbetegedést okozó vírusok száma (Blacklow és mtsa., 1991.; Glass és mtsai., 2000.). Megkezdődött, és napjainkban is tart jelentőségük, epidemiológiai szerepük és a klinikai jellegzetességeik feltérképezése az emberi megbetegedésekben. A vizsgálatoknak igazi lökést azonban – mivel ezek a vírusok nem, vagy csak nagyon nehezen szaporíthatók laboratóriumi körülmények között - csak a molekuláris biológiai módszerek megjelenése és alkalmazása adott. Ma több mint 12, emberi székletből kimutatott, genetikailag elkülönített vírust ismerünk, és egyre nyilvánvalóbb, hogy a mikroorganizmusok által okozott heveny gastroenteritisek többsége virális eredetű (de Wit és mtsai., 2001.). E vírusok közül is kiemelkedő epidemiológiai és közegészségügyi jelentőségűek a humán calicivírusok (Deneen és mtsai., 2000.; de Wit és mtsai., 2001.).

A mikrobás gastroenteritis megbetegedések epidemiológiája Magyarországon

A magyarországi fertőzőbeteg nyilvántartás adatai szerint 1998, 1999, 2000 és 2001 évek sorrendjében a nyilvántartott bélrendszeri fertőző megbetegedések 67; 49; 37 és 37 %-át baktériumok, 0,4; 0,2; 0,1 és 0,2 %-át élősködők okozták, az esetek további 33; 51; 63 és 63 %-ában a fertőző megbetegedés oka ismeretlen maradt (Epinfo, 2000.; Epinfo, 2001.; Krisztalovics - személyes közlés). Hazánkban a virális kórereditű heveny gastroenteritis járványok és szórványos esetek előfordulási gyakoriságáról a diagnosztikai hiányosságok miatt nincs adatunk. Így csak feltételezhető, hogy más ismert emberi vírusokkal együtt (rotavírus, astrovírus, enterális adenovírus, stb.) a humán calicivírusok az ismeretlen kórokú, 1998. január 1.-től „enteritis infectiosa” néven kötelezően bejelentendő és folyamatosan emelkedő számú esetek között lehetnek. Az ebben a betegségcsoportban bejelentett megbetegedettek száma 1998-ban 13879, 1999-ben 25629, 2000-ben 35080, 2001-ben 33850 fő volt. 2002. első 17

hetében ugyanakkor 40%-kal több ilyen megbetegedést jelentettek, mint 2001. hasonló időszakában (Epinfo, 2000.; Einfo, 2001.; Krisztalovics - személyes közlés). A 100 ezer lakosra jutó átlagos morbiditás 254 és 349 fő volt 1999 és 2000-ben, nagy megyei eltérésekkel (90-991/100 ezer lakos; Epinfo, 2000.; Epinfo, 2001.). A bejelentett betegek közül 2000.-ben 10 fő halt meg (Epinfo, 2001.). A Norwalk-szerű vírusok hazai kóroki szerepére az 1992/1993-ban végzett szerológiai vizsgálatok is utalnak. Kimutatják, hogy már a 10 éves korosztály 70-90%-a rendelkezik ellenanyagokkal a Norwalk-szerű vírusok I-es és II-es genocsoportjába tartozó Norwalk, illetve Mexico vírusokkal szemben (Szűcs és mtsai., 1995.).

Magyarországról eddig egy esetben számoltak be calicivírusok közvetlen kimutatásáról, állatorvosi gyakorlatból. Nagy és mtsai. az 1990-es évek közepén elektronmikroszkóppal, morfológiai jellegzetességek alapján mutattak ki 5 esetben, közelebből meg nem nevezett calicivírus-szerű víruspartikulákat sertések bélsármintáiból (Nagy és mtsai., 1996.). A hazai állatorvosi diagnosztikában egyes állati calicivírusok (RHDV, EBHSV, lsd. alább) kórjelzésére a haemagglutináció, a haemagglutináció gátlás és az enzim-immunoassay módszereket alkalmazzák (Pálfi V., személyes közlés). Hazánkban Szűcs és mtsa. hívta fel a figyelmet az irodalmi adatok alapján a calicivírusok jelentőségére (Szűcs és mtsa., 1998.).

A humán calicivírusok

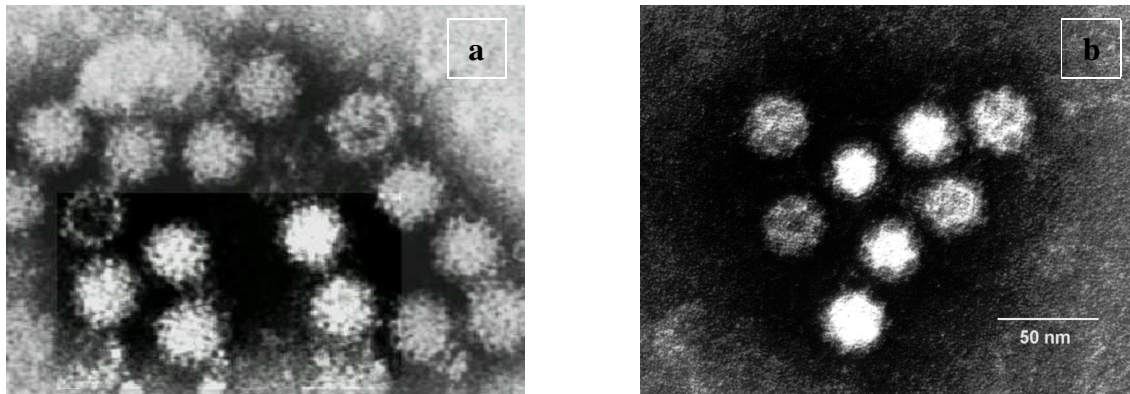
Történeti áttekintés, taxonómiai osztályozás

Kapikian felfedezését követően a Norwalk, illetve Norwalk-szerű vírusokat (korábbi néven SRSV = kis kerek-struktúrált vírusok) az 1976-ban felfedezett - kehelyre, kupára (= calix, calices; latin) emlékeztető felszíni morfológiát mutató - „klasszikus” humán calicivírusoktól (Madeley és mtsa., 1978.; Chiba és mtsai., 1979.) eltérő elektronmikroszkópos jellegzetességeik miatt külön kezelték (Caul és mtsa., 1982.) (1. kép).

1978-ban kiemelték őket a *Picornaviridae* családból (Cooper és mtsai., 1978.), majd az 1990-es években, emberi és állati vírusokkal végzett molekuláris szintű vizsgálatokat követően (Jiang és mtsai., 1990.; Meyers és mtsai., 1991.; Carter és mtsai., 1992.; Lambden és mtsai., 1993.; Liu és mtsai., 1995.) 1998 óta a ma meglévő formában külön családba, a *Caliciviridae* családba egyesítették őket (Pringle, 1998.; Green és mtsai., 2000.).

A *Caliciviridae* családnak ma négy - két állati és két humán - nemzetsége van: a „Vesivírusok” és „Lagovírusok” nemzetségébe veszélyes állati kórokozók tartoznak. A „Vesivírusok” tagja a San Miguel sea lion virus (SMSV), a sertések vesiculáris exantéma vírusa

(vesicular exanthema of swine virus; VESV), a macska calicivírus (feline calicivirus; FCV) és a kutya calicivírus (canine calicivirus; CaCV, Roerink és mtsai., 1999.). A „Lagovírusok” közé a nyulak vérzéses megbetegedését okozó vírusát (rabbit haemorrhagic disease virus; RHDV) és az európai barna vadnyúl szindróma vírusát (European brown hare syndrome virus; EBHSV) sorolják (Green és mtsai., 2000.).



1. kép. Humán calicivírusok elektronmikroszkópos képe. (a) „Norwalk-szerű vírusok” (kis kerek-struktúrált vírusok) és (b) „Sapporo-szerű vírusok” („Dávid csillagra” emlékeztető felszínű, „tipikus” vagy „klasszikus” calicivírusok). (forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>)

A „Norwalk-szerű vírusok” (NLVs; új javasolt név: *Norovirus*) és a „Sapporo-szerű vírusok” (SLVs, „klasszikus” vagy „tipikus” calicivírusok; új javasolt név: *Sapovirus*) – az emberi gastroenteritiseket okozó calicivírusok (HuCVs) (Berke és mtsai., 1997.; Ando és mtsai., 2000.; Green és mtsai., 2000.). A „Norwalk-szerű vírusok”-nak két genocsoportja (GI és GII) van. Mindkét nemzetségbe ugyanakkor számtalan genetikai klaszter is tartozik (NLVs: 14; SLVs: 4 ismert, illetve feltételezett klaszter). A klaszterek a felfedezésük földrajzi helyéről kapták(-ják) a neveiket (pl.: NLVs genocsoport I: Norwalk, Southampton, Desert Shield; NLVs genocsoport II: Snow Mountain, Hawaii, Lordsdale, Mexico stb.; SLVs: Sapporo, Houston, London, Stockholm) - Calicivírus genetikai klaszterről akkor beszélünk, ha több mint 80% nukleinsav azonosság van a kapszid régióban (open reading frame 2) és legalább két vagy több izolátum szekvenciája ismert (Jiang és mtsai., 1997.; Vinjé és mtsai., 2000.a; Vinjé és mtsai., 2000.c). Újabban egy természetes rekombináns - eltérő polimeráz és kapszid régióval rendelkező (lásd később) - „Norwalk-szerű vírus”-t is leírtak (Jiang és mtsai., 1999.a). A humán calicivírusok osztályozása ma is változik, és a két vezető kutatóközpont (RIVM - Hollandia és

CDC – Amerikai Egyesült Államok) közötti nevezéktani eltérések is sok nehézséget adnak (Vinjé, 1999.). Terjedőben van – az influenza vírusok jelöléséhez hasonló - egyezményes jelölési rendszer. Ez rögzíti a gazdaszervezetet / a calicivírus nemzetséget / a calicivírus fajt / a vírustörzs számát, jelzését / a kimutatás idejét / és a kimutatás helyét. Ennek alapján a Norwalk vírus prototípusának elnevezése: Hu/NLV/NV/8FIIa/1968/US.

A korábban a *Caliciviridae* családba tartozó hepatitis E vírust 1998-ban „bizonytalan besorolási hely” névvel kiemelték a családból (Berke és mtsa., 2000. Green és mtsai., 2000.).

Morfológia és genomszerkezet

A „calicivírusok” kis méretű (27-40 nm), burok nélküli, pozitív, 7,3-7,7 kilobázis hosszúságú, egyszálú örökítő anyagú RNS vírusok (Lambden és mtsa., 1995.). Ma már ismert, hogy a „Sapporo-szerű vírusok”-nak a „Norwalk-szerű vírusok”-tól való alaki eltérésük az antigenitásban és a genetikai állományuk szerveződésében is megnyilvánul (Clarke és mtsa., 2000.). Ez utóbbival magyarázható a „Sapporo-szerű vírusok”-nak az állati calicivírusokhoz való közelebbi rokonsága is (Matson és mtsai., 1995.). A „Norwalk-szerű vírusok” 3 open reading frame (ORF) régióval rendelkeznek. Az 5' végén elhelyezkedő ORF1 a nem szerkezeti fehérjéket (sorrendben: helikáz, cisztein-proteáz, RNS-függő RNS polimeráz) kódolja. A poliprotein Norwalk vírus esetén 1789 aminosav hosszúságú, és felépítésében hasonlóságot mutat a picornavírusok 2C helikáz, 3C proteáz és 3D polimeráz régióihoz (Jiang és mtsai., 1993.). Az ORF2 egy 56-60 kDa nagyságú kapszid fehérjét kódol (Jiang és mtsai., 1993.), mely a kapszidot 180 kópiából építi fel dimer formában (Prasad és mtsai., 1999.). Az ORF3 pedig egy kis szerkezeti fehérje (22,5 kDa) kifejeződéséért felelős (Glass és mtsai., 1999.).

A „Norwalk-szerű vírusok” és a „Sapporo-szerű vírusok” jelenleg nem szaporíthatók sejtenyészeten és in vitro körülmények között sem (Blacklow és mtsai., 1972.; Dolin és mtsai., 1972.). Replikációs stratégiájuk ismeretlen, feltételezések szerint az állati calicivírusok mintájára szubgenomikus RNS átíródás történik (Jiang és mtsai., 1993.). Antigen típusaik (szerotípus) kevésbé ismertek, szerológiai tesztek kereskedelmi forgalomban nincsenek.

Epidemiológia

A humán calicivírusok – elsősorban a „Norwalk-szerű vírusok” - a ritkán felismert szórványos, heveny gastroenterális megbetegedések mellett az Egyesült Államokban (Fankhauser és mtsai., 1998.), Angliában (Dedman és mtsai., 1998.; Maguire és mtsai., 1999.),

Hollandiában (Vinjé és mtsa., 1996.; Vinjé és mtsai., 1997.) és Japánban (Inouye és mtsai., 2000.) kiemelkedő szerepet játszanak a nem bakteriális járványos gastroenteritis fertőzésekben. A szórványos kisgyermekkorú bélfertőzések 20%-át (Pang és mtsai., 2000.), a gastroenteritis járványoknak pedig akár a 70-90%-át is okozhatják. Mead és mtsai 1999-ben 23 millió főre becsülték csak az élelmiszer eredetű humán calicivírus megbetegedések számát az Egyesült Államokban (Mead és mtsai., 1999.). A gyakrabban felismert, és így jelenleg epidemiológiai szempontból előtérben lévő epidémiák leggyakrabban időlegesen zárt vagy félig zárt emberi közösségekben fordulnak elő (kórház, egészségügyi és szociális intézmény, öregek otthonai, óvoda, iskola, gyermektábor, kollégium, laktanya, szálloda, étterem, kirándulóhajó, hadihajó stb.) (Fankhauser és mtsai., 1998.; Parashar és mtsa., 2001.). A megbetegedések szezonja a mérsékelt égövön kífokú téli-tavaszi halmozódást („winter vomiting disease”) mutat (Mounts és mtsai., 2000.). A „Norwalk-szerű vírusok” életkortól függetlenül, gyermekek és felnőttek és idősek körében egyaránt képesek megbetegedést kiváltani.

A „Sapporo-szerű vírusok” epidemiológiája nem ismert. Járványok okozójaként a Norwalk-szerű vírusokhoz képest rendkívül ritkán mutatták ki őket (Noel és mtsai., 1997a.), és csak kisebb mértékben tartják felelősnek a szórványos gastroenteritisek okaként is. Egyes korábbi, elektronmikroszkópos tanulmányok szerint a gyermekkorú gastroenteritisek 0,9%-6,6%-át okozhatják (Cubitt és mtsai., 1981.; Payne és mtsai., 1986., Caul, 1996.). Pang és mtsai. 1999-ben a gyermekkorú, kórházi ellátást igénylő diarrhoeák 9,2%-ban mutattak ki RT-PCR módszerrel Sapporo-szerű vírusokat (Pang és mtsai., 2000.). Eddig 100-nál kevesebb - szekvenálással is megerősített - Sapporo-szerű vírust ismerünk. Tünetekkel járó fertőzéseket elsősorban csecsemő és kisgyermekkorban (0,6-2 év), valamint idősek (>60 év) körében írtak le velük kapcsolatban (Vinjé és mtsai., 2000b.).

Patogenezis

Kevés információval rendelkezünk arról, hogy miként alakulnak ki a jellemző, de nem patogénomikus átmeneti hisztopatológiai elváltozások az emberi calicivírus fertőzés során a célszervnek tekintett vékonybélben. Ugyancsak kérdéses a hasmenés mechanizmusa is. A hatás a vékonybél (elsősorban a jejunum) felső, tunica mucosa rétegét érinti a lamina propria mucosae-ig (Greenberg és mtsai., 1990.). A fénymikroszkóppal végzett megfigyelések feltárták, hogy a kiváltott gyulladás a bolyhok/villusok kiszélesedésével és megrövidülésével, kriptasejt hipertrofiával, emelkedett mitózissal, valamint a hámsejtek citoplazmájának vakuolizációjával jár. Gyulladásos sejtek, neutrofil granulocyták és monocyták bevándorlása észlelhető.

Elektronmikroszkóppal vizsgálva a mikrovillusok is rövidebbek. A vékonybél kefeszegély-enzimek közül a trehaláz és az alkalikus foszfatáz szintje csökken a fertőzés alatt, laktóz és zsír malabsorpció is jelentkezhet. Az elváltozások a fertőzést követően még 5-6 napig láthatók, illetve kimutathatók még a felnőtt önkéntesek tünetmentes fertőzéseiben is. Két hét után a vékonybél a normális szövettani és működési képét mutatja. Csökken a gyomor motoros aktivitása is, melynek a gyakori hányásban lehet szerepe (Greenberg és mtsai., 1990.). A fertőzésre leginkább fogékony gyermek és idős életkorú populációkban a patológiai elváltozások nem ismertek.

Átvitel és klinikai tünetek

A fertőzés forrása az ember, bár újabban felmerült egyes állatok szerepe is (Sugieda és mtsai., 1998.; Dastjerdi és mtsai., 1999.; Liu és mtsai., 1999.). Fekális-orális úton, közvetlen és közvetett kapcsolattal, széklettel szennyeződött vagy szennyezett élelmiszerrel (pl.: gyümölcs, zöldség, saláta, kagyló stb.), vízzel (pl.: közkút, vezetékes víz, ásványvíz, jég), valamint a hányás során szóródó aeroszol segítségével terjedhetnek (Caul, 1996.; Chadwick és mtsai., 1994.a, Chadwick és mtsai., 1994.b, Beller és mtsai., 1997.; Kukkula és mtsai., 1999.; Marks és mtsai., 2000.; Daniels és mtsai., 2000.; Becker és mtsai., 2000.). Az inkubációs időben és a reconvalescentia során, bár az érintett személyek még, illetve már tünetmentesek, 2-3 napig (reconvalescentia esetén ritkán 2 hétig is!) a fertőzések további kiinduló forrásai lehetnek (Cliver, 1997.). A burok nélküli humán calicivírusok környezeti hatásoknak viszonylag jól ellenállnak (10 mg/l klorid koncentrációjú ivóvízben akár 30 percig is fertőzőképesek maradhatnak (Keswick és mtsai., 1985.), a savas hányadékból is kimutathatók, a 60°C-os hőt is jól tűrik (McDonnell és mtsai., 1997.), és már alacsony partikulaszámban (10-100 vírus) is megbetegedést tudnak okozni (McAnulty és mtsai., 1993.; Caul, 1996.).

A megbetegedést jól körülhatárolható - genocsoporttól független - jellegzetes tünetek kísérik, melyek többnyire enyhe-középsúlyos gastroenteritis formájában zajlanak le. A vezető tünetek a hányinger-hányás (>50%!), a nem véres hasmenés, a hasi fájdalom, görcs vagy diszkomfortérzés és a hőemelkedés. Kórházi ellátásra, parenterális folyadékpótlásra is szükség lehet. A fertőzések további jellegzetességei, melyek elsősorban a járványok klinikai differenciál diagnosztikájában bizonyulnak hasznosnak, a rövid, 24-48 órás inkubációs idő (melyet befolyásol a fertőző dózis nagysága), és az ugyancsak rövid, 12-60 órás lefolyási időtartam, valamint a laboratóriumi vizsgálattal kizárható bakteriális és parazita fertőzés hiánya (Kaplan

és mtsai., 1982.; Blacklow és mtsa., 1988.). A Norwalk-szerű vírusfertőzésre jellemző továbbá a nagyon gyakori (>50%) másodlagos fertőződés (Estes és mtsai., 1997.).

Immunválasz, immunitás

A szerológiai módszerek különbözőségét is figyelembe véve a vizsgálatok azt mutatják, hogy 10 éves életkorra a mind a fejlett, mind a fejlődő országokban a populáció 60-100%-ának van kimutatható ellenanyaga a „Norwalk-szerű vírusok” közé tartozó vírusokkal (GII/Mexico>GII/Hawaii>GI/Norwalk) szemben (Jiang és mtsai., 2000.; Lopman és mtsai., 2002). Ugyanakkor a vizsgálatokban az antigén keresztreakciók mértéke nem ismert. Amíg a „Norwalk-szerű vírusok” a fejlett országokban elsősorban a késő gyermekkorban okoznak megbetegedést, főleg epidémiák formájában, addig a fejlődő országokban a gyermekek már 4 éves kor alatt endémiás környezetben átesnek a fertőzésen (Glass és mtsai., 2000.). Az immunitás azonban kevésbé ismert és ellentmondásos (Kapikian és mtsai., 1996.). Például a „Norwalk-szerű vírusok” kiváltotta járványok a felnőttek körében is magas morbiditással járnak. Egy rövid (6-14 hét) és egy hosszabb (9-15 hónap) idejű immunitást feltételeznek. Önkéntesek második, 27-42 hónappal később Norwalk vírussal ismételt mesterséges fertőzésekor immunitást a megbetegedéssel szemben nem tapasztaltak (Parrino és mtsai., 1977.). Kísérletes fertőzésben a rövid távú immunitás szerotípus specifikus és korrelál a kezdeti ellenanyagszintekkel, a hosszabb távú immunitás viszont nem. Sőt egyes mesterséges fertőzési kísérletekben - paradox módon – a kisebb kezdeti szérum (és jejunális) ellenanyagszint nagyobb hosszabb távú védő hatással párosult (Greenberg és mtsai., 1981.; Johnson és mtsai., 1990.). Az utóbbi két évben felvetődött a gazdaszervezet genetikai szerepe (specifikus receptorok jelenléte illetve hiánya révén) a fogékonyságban (Tamura és mtsai., 2000.; Marionneau és mtsai., 2002.), mely részben magyarázatot adhat az ellentmondásokra.

Szerológiai vizsgálatok szerint 12 éves korra a populáció nagyobbik fele (90%) fertőződik „Sapporo-szerű vírusok”-kal (Cubitt, 1989.), elsősorban az első 5 életéven belül (Cubitt, 1994.). Egy csecsemők körében végzett vizsgálat szerint a nagyobb kezdeti szérum ellenanyagszint nagyobb rövid távú védő hatással párosult a későbbi megbetegedéssel szemben (Nakata és mtsai., 1985.).

A kulcskérdés azonban továbbra is nyitott: in vitro neutralizációs teszt hiányában, valamint az antigéntípusok ismerete nélkül az immunitás (messzebb tekintve: a vakcináció) kérdései nem megoldhatók.

Laboratóriumi diagnózis

A vírusok az egyik legnehezebben kimutatható ágensek a mikroorganizmusok körében. A humán calicivírusok pedig hagyományos virológiai módszerekkel (tenyésztés, állatoltás) sem vizsgálhatók. A Norwalk vírus felfedezése után, az 1970-80-as években a számos korláttal rendelkező elektronmikroszkópos vizsgálat volt az egyedüli lehetőség a calicivírusok kimutatására. A vírusok ürítése azonban sok esetben rövid ideig tart, és az ürített vírusok száma nem éri el az elektronmikroszkópos vizsgálatok érzékenységi küszöbét ($\sim 10^6$ partikula/g széklet). Közel 20 évig önkéntesek ismert vírustartalmú székletszűrletekkel történt fertőzése során nyert savópárokából és székletmintákból indultak ki a szerológiai tesztek (RIA, Biotin-Avidin immunoassay, EIA). Egységes módszerek hiányában, és az antigének ismerete nélkül a különböző laboratóriumokban használt sokféle szerológiai reagens a vírusok összehasonlítását nagyon megnehezítette, mely a már említett nevezéktanban is tükröződött. A molekuláris módszerek megjelenése viszont igazi áttörést hozott e vírusok diagnosztikájában. A Norwalk vírus klónozásával és teljes genomjának meghatározásával (Jiang és mtsai., 1990., 1993.) a molekuláris módszerek (RT-PCR, southern blot hybridizáció, szekvenálás), a Norwalk vírus kapszid fehérje expressziójával (Jiang és mtsai., 1992.) a virális antigént kimutató (rekombináns EIA) és szerológiai diagnosztikus módszerek tárháza nyílt meg és nyit utat a széleskörű molekuláris és szeroepidemiológiai vizsgálatoknak.

Terápia, megelőzés

Az emberi calicivírus fertőzés néhány nap alatt lezajló, enyhe-középsúlyos lefolyású megbetegedés. Különleges kezelése nincs. Súlyosabb só- és folyadékveszteség esetén kórházi ellátás, orális vagy intravénás rehydrációs kezelés is szükségessé válhat. (Ennek gyakorisága a kórházi gyakorlatban azonban nem ismert.)

A fertőzés jellegzetességeiből következően a megelőzésben a hangsúly a klasszikus népegészségügyi és higiénés rendszabályok betartásán, betartatásán van. Számos érdekes vakcinafejlesztést megalapozó kísérlet folyik (Ball és mtsai., 1999.; Tacket és mtsai., 2000.; Estes és mtsai., 2000.), de oltóanyag jelenleg nem áll rendelkezésre. Egy hatásos vakcina a calicivírus fertőzés expozíciójának fokozottabban kitétek, másrészt a vírusra fogékonyabb

személyek számára lehetne fontos (gyermek, öregek otthonainak lakói, katonák, utazók, veleszületett és szerzett immunkárosodottak, stb.) (Estes és mtsai., 2000.)

CÉLKITŰZÉSEK

A tanulmány fő célja, hogy a vizsgálati időszakban molekuláris biológiai, és részben a virális antigének kimutatására képes módszerek alkalmazásával átfogó, országos képet kapjunk a Magyarországon eddig még nem vizsgált és kimutatott, a *Caliciviridae* családba tartozó humán calicivírusok epidemiológiai jelentőségéről és a fertőzések klinikai jellegzetességeiről a heveny, nem bakteriális eredetű gastroenteritis járványokban, és részben a szórványos esetekben is.

Másrészt cél volt a cirkuláló vírusok közvetlen kimutatását követően ezek genetikai szintű jellemzése, és a vírustörzsek összehasonlító filogenetikai elemzése a már ismert humán calicivírus genotípusokkal (genetikai klaszterekkel) és vírusokkal, molekuláris epidemiológiai szempontból.

A célkitűzések konkrétan a következő pontokban foglalhatók össze:

1. Az RT-PCR technika bevezetése és a módszer adaptálása a humán calicivírusok magyarországi molekuláris diagnosztikájának megteremtése érdekében.
2. A humán calicivírusok és járványokban játszott szerepük megismertetése – kezdetben az irodalmi adatok alapján - a hazai szakemberekkel, epidemiológusokkal és klinikus kollégákkal tudományos fórumokon tartott előadásokon és közleményeken keresztül a folyamatos mintabiztosítás és célzott vizsgálatok érdekében.
3. Az RT-PCR módszer alkalmazása a nem bakteriális eredetű, hazánkban 1998. óta „enteritis infectiosa” néven kötelezően bejelentendő ismeretlen eredetű, heveny gastroenteritis járványok kivizsgálásában az ország egész területét érintően.
4. A humán calicivírusok okozta hazai, heveny gastroenteritis járványok részletes epidemiológiai és klinikai jellegzetességeinek megismerése, és ezek összehasonlítása az

irodalmi adatokkal. Epidemiológiai adatgyűjtő kérdőív elkészítése és használata e cél teljesíthetősége érdekében.

5. A nem bakteriális, ismeretlen eredetű szórványos gastroenteritisekben a humán calicivírusok szerepének keresése, területileg elsősorban Baranya megyei beteganyagban.
6. Az RT-PCR módszerrel kimutatott vírusok genetikai jellemzése az RNS-függő RNS polimeráz régió szekvencia-, és filogenetikai elemzése segítségével. A jellegzetes hazai, illetve a különleges vírusszekvenciák elhelyezése és bejegyzése a világháló adatbázisába (GenBank, NCBI).
7. Újonnan kidolgozott, vírusantigént kimutató módszer (rekombináns EIA, 9 antigenitásban eltérő Norwalk-szerű vírus kapszid antigén elleni ellenanyagokkal; Jiang és mtsai., 2001.) kipróbálása és kiegészítő alkalmazása a „Norwalk-szerű vírusok” kimutatására.
8. Tevékeny részvétel a humán calicivírusok elterjedtségét és határokon átívelő cirkulációját figyelő európai adatbázis és észlelő rendszer kiépítésében és működtetésében, különös tekintettel az élelmiszer eredetű járványokra.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Széketminták

Járványok. 1998. november és 2002. április között az ország mind a 19 megyéjéből, 133 „enteritis infectiosa” néven országosan nyilvántartott, heveny, nem bakteriális (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*), ismeretlen kórereditű gastroenteritis járványból 907 székletminta érkezett humán calicivírus fertőzésre gyanús epidemiológiai (rövid lefolyási idő) és jellemző klinikai háttérrel (hányás) laboratóriumunkba. 59 megvizsgált járvány székletmintáiból vírust/vírusantigént közvetlenül kimutató módszerekkel rotavírust, és 31 megvizsgált járványból adenovírust sem lehetett kimutatni (latex agglutináció; Rotalex, Adenolex, ORION Diagnostica, Espoo, Finnország). 1999. novembere előtt a calicivírus vizsgálatok retrospektív, azt követően prospektív módon történtek. 1998-ból 3, 1999-ből 7, 2000-ből 11, 2001-ből 50, illetve 2002-ben április 30.-áig 62 járvány vizsgálatára került sor. Egy-egy járványból 1-77 (átlag: 7) székletminta állt rendelkezésünkre, melyeket a járvány helye szerinti illetékes városi, megyei járványügyi hatóság (Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat) biztosított.

Szórványos esetek. 1997. október és 2000. december között 154 nem bakteriális, ismeretlen eredetű hasmenéses székletmintát vizsgáltunk (6; 1; 20; 127 minta 1997-től évenként) RT-PCR módszerrel Csongrád (2 minta), Heves (11 minta) megyékből, illetve Budapestről (6 minta), de elsősorban Baranya megyei beteganyagból (135 minta), melyek 15 felnőttből és 139, 12 év alatti gyermektől származtak. Szisztematikus vizsgálatot 2000. október és december hónapok között Baranya megyében végeztünk.

Baranya megyéből 2001. január és május között 205, 12 év alatti életkorú, kórházi felvételre került, illetve járóbeteg szakrendelésen megjelent gyermekektől származó hasmenéses székletmintát is megvizsgáltunk vírust/vírusantigént kimutató direkt módszerrel (rEIA).

A virális nukleinsav kivonása a mintákból

Az eljárások során különös gondot fordítottunk a keresztszennyeződések megakadályozására és a ribonukleáz-mentes eszközök, vegyszerek és környezet biztosítására.

Egyszer-használható, autoklávozott eszközöket, védőkesztyűt, védőruházatot használtunk, és a különböző munkafolyamatokat térben elkülönítve és „egyirányba” végeztük.

A PBS-sel 10-50%-ra hígított 300-400 µl mennyiségű székeltszuszpenziókat egyszer, egyenlő mennyiségű Genetronnal (1,1,2-trikloro-1,2,2-trifluoroetán, Freon-113, Serva) tisztítottuk és szobahőmérsékleten centrifugáltuk (5 perc, 10 000 X g, Jouan CR3i centrifuga). A felülúszóból a virális RNS kinyerése Trizol módszer alapján történt a gyártó ajánlása szerint (Gibco BRL, Gaithersburg, Madison, USA). A részlegesen tisztított felülúszóból (vizes fázis) 150 µl-t 500 µl TRIzol® Reagenssel (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, USA) és 100 µl kloroformmal (Reanal, Budapest) 5 percig inkubáltuk, majd 15 percig 10 000 X g-vel centrifugáltuk 4°C-on. A 300 µl felülúszóból az RNS precipitálását egyenlő mennyiségű izopropanollal (Sigma, Saint Louis, USA) végeztük. A precipitátumot 10 percig 10 000 X g-vel 4°C-on üleptettük. A kicsapott RNS-t egyszer 75%-os etanollal mostuk. A kinyert RNS-t szárítás után 20 µl nukleáz-mentes vízben (Promega, Madison, USA) oldottuk fel, majd felhasználásig –80°C-on tároltuk.

Primerek

A szűrővizsgálatra használt (p289: 5'- TGACAATGTAATCATCACCAT sense; p290: 5'- GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC és a 2 nukleotidban módosított 290A antisense) primereket Jiang és mtsai tervezték 1999-ben a Norwalk-szerű vírusok és a Sapporo-szerű vírusok RNS-függő RNS polimerázt kódoló gén (open reading frame 1) konzervatív szakaszára (elhelyezkedés a Norwalk vírus genomában: p289: 4865-4886; p290: 4568-4590) (Jiang és mtsai., 1999.b). A termék „Norwalk-szerű vírusok” esetén 319, „Sapporo-szerű vírusok” esetén pedig 331 bázispár nagyságú, mely magába foglalja a calicivírusok polimeráz régiójára jellemző GLPSG aminosav motívumot (Bruenn, 1991.). A primerpár az egyetlen ismert oligonukleotid-pár, mely egyszerre képes mindkét humán nemzetségbe tartozó, illetve egyes állati calicivírusok fenti polimeráz régiójának kimutatására (Guo és mtsai., 2001.). A vírusok RNS polimeráz régiójának felerősítésére a JV12/JV13 (NLVs, Vinjé és mtsai, 1996.) és a SR80/JV33 (SLVs, Vinjé és mtsai, 2000.b) primerpárokat is alkalmaztuk. Az oligonukleotidokat az Integrated DNA Technologies Inc.-nél (Coralville, USA) szintetizáltattuk.

Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az RT-keverék 50µl-e a következő alkotórészeket tartalmazta: 10 X PCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH: 8,3); 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 0,01% gelatin; Sigma, Saint Louis, USA), 25 mM MgCl₂ (Zenon Biotechnológia Kft., Szeged), 10 mM dNTP (Promega, Madison, USA), 40 U/µl RNasin (Promega, Madison, USA), 10 U/µl M-MLV-RT (Promega, Madison, USA), 0,1µg/µl primer 289 és 3µl RNS. A reverz transzkripció 42°C-on 60 percig zajlott (PTC-100™, Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc., Watertown, Maryland, USA). Negatív kontrollként 3µl nukleáz mentes vizet használtunk.

A reverz transzkripció után a reakciós csövekbe 50µl PCR-elegyet adtunk (teljes volumen: 100µl), mely a következő anyagokat tartalmazta: 10 X PCR buffer, 25 mM MgCl₂, 5 U/µl Dupl-A-Taq™ DNS Polimeráz (Zenon Biotechnológia Kft., Szeged) és 0,1µg/µl primer 290. A PCR készülékben a denaturáció 94°C-on (3 perc) zajlott, majd 40 ciklusból álló láncreakciót végeztünk 94°C-os 1 perces, 49°C-os 1,5 perces, és 72°C-os 1 perces lépésekkel. A végső extenzió 72°C-on 10 percig tartott.

Gélelektroforézis

A termékeket 1,5-3%-os agaróz gélben (NuSieve^R 3:1 Agarose, FMC^R BioProducts, USA), 90-110V állandó feszültséggel választottuk el 35-50 percig Tris-Borát-EDTA pufferben (pH: 8,0; Sambrook és mtsai, 1989a.). A géleket etidium-bromiddal (Sigma, St. Louis, USA) festettük, 320 nm hullámhosszúságú ultraviola fénnel világítottuk át, és DS 34 Polaroid kamerával Polaroid 660 típusú fekete-fehér filmmel archiváltuk. A termékek méretét 100 bp DNS markerrel (Promega, Madison, USA) és BioCapt (Version 97.05s for Windows, 1997) valamint Alpha Digidoc 1000™ Géldokumentációs (Alpha Innotech Corp., San Leonardo, California, USA) számítógépes programok segítségével határoztuk meg.

Klónozás és szekvenálás

2000. decembere előtt, minden járványból 2-3, illetve minden szórványos mintából a megfelelő méretű terméket vektorba klónoztunk a gyártó leírása szerint (pGEM-T vector system II, Promega, Madison, Wisconsin, USA), majd JM109 *Escherichia coli* (Promega, Madison, Wisconsin, USA) sejtekbe transzformáltuk. A transzformált sejteket éjszakán át 37°C-on inkubáltuk ampicillin (1 µg/ml) tartalmú táptalajon (LB Agar, Lennox, DIFCO, Sparks,

Madison, USA). A klónok tesztelése után a megfelelő méretű génszakaszt tartalmazó klónt ampicillint (1 µg/ml) tartalmazó médiumban (LB Broth, Lennox, Fischer Scientific, Fair Lawn, USA) egy éjszakán keresztül 37°C-on növesztettük. Minden mintából 2 tisztított klónt (Sambrook és mtasi., 1989.) M13 „forward” és „reverse” primerekkel fluorescens festékekkel jelölt nukleotidokkal (SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™, Epicenter Technologies, Madison, Wisconsin, USA) szekvenáltunk lánc terminációs módszerrel, majd a termékeket automata szekvenátoron futtattuk (Pharmacia Biotech ALFexpress™ DNA Sequencer, Uppsala, Svédország).

A 2001. évi RT-PCR módszerrel kiszűrt humán calicivírus járványokból 2-8 vírustartalmú székletmintát küldtünk a hollandiai nemzeti közegészségügyi és környezetvédelmi laboratóriumba (RIVM, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Hollandia), ahol a mintákból RNS izolálást követően ugyancsak az RNS polimeráz régióra tervezett JV12/JV13 primerpárokkal kapott 145 bp nagyságú termékek direkt szekvenálását végezték el.

Szekvencia- és filogenetikai elemzés

A szekvencia-elemzés a GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) adatbázisát felhasználva OMIGA programcsomag (OMIGA 2.0, Oxford Molecular Ltd., Oxford, Egyesült Királyság) és GeneDoc program (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>, Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility v.2.6.001, 2000) segítségével történt. A filogenetikai elemzéshez PHYLIP version 3.52c (Felsenstein, 1993., <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) illetve MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v. 2.1; Kumar és mtsai, 2001.) programokat használtunk. A PHYLIP elemzéseket „maximum likelihood” (DNAML) algoritmussal futtattuk, és az ágrajzokat TreeView program (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) segítségével jelenítettük meg. Az ágrajzokat a MEGA programmal UPGMA módszerrel szerkesztettük meg a Jukes–Cantor korrekciós ráta (Jukes és mtsa., 1969.) figyelembe vételével. Az elemzéshez a következő vírusok RNS polimeráz szekvenciáit használtuk fel a GenBank adatbázisából (zárójelben: rövidítés, azonosító szám):

„Norwalk-szerű vírusok”

I. genocsoport

Norwalk/68/US (NV, M87661)
Desert Shield/90/Saudi Arabia (DSV, U04469)
Southampton/91/UK (SOV, L07418)

II. genocsoport

Hawaii/71/US (HV, U07611)
Snow Mountain/76/US (SMV, U70059)
Mexico/89/MX (MX, U22498)
TI-96-J (**Hillingdon/90/UK-like**, AB020558)
Lordsdale/93/UK (LV, X86557)
Melksham/94/UK (X81879)
12C/92/UK (L25111)
Khs1-1997-JP (AB019268)
Tak1-1999-JP (AB046335)
Hu/NV/SN88JN/88/JP (AF218947)

„Sapporo-szerű vírusok”

Sapporo/82/JP (SAPP, S77903)
Houston/90/UK (U95644)
London/92/UK (U95645)

„Vesivírus”

primate PAN-1/AnCV/Pan-1/78/US (PAN-1, U52086)

A NLV/**Leeds/90/UK** RNS-polimeráz régióját H. Vennema (RIVM, Bilthoven, Hollandia) szívességéből kaptuk meg. A genetikai klasztereket vastag betűvel jelöltük.

Rekombináns enzim-immunoassay (rEIA)

Nyúlban („capture” antitest), illetve tengerimalacban („detector” antitest) termelt típus-specifikus, hyperimmun ellenanyagokat tartalmazó enzim-immunoassayt állítottunk össze. Az ellenanyagok előállításához 3 GI [Norwalk vírus (NC_001959), VA98115 (AY038598), C59 (AF435807)], és 6 GII [MX vírus (U22498), HV vírus (U07611), VA97207 (AY038599), VA98387 (AY038600), Grimsby vírus (AJ004864) és MOH/99/HUN (AF397156)] genocsoportú, reprezentatív, rekombináns módon, baculovírusban kifejezett „Norwalk-szerű vírus” klaszter kapszid antigént (VLPs, vírus-szerű partikulák) használtunk (Jiang és mtsai, 2001.). Pozitívnak tekintettük a reakciót, ha a 450 nm hullámhosszúságú fényrel mért optikai denzitás (OD₄₅₀) a hyperimmun savóval nagyobb volt, mint 0,2 és a „hyperimmun/preimmun” hányados több mint 5,0 volt (Jiang és mtsai., 2001.). - A „Sapporo-szerű vírusok” kimutatására ez a teszt nem alkalmas.

Epidemiológiai adatfeldolgozás, statisztikai elemzés

A járványok igazolását követően minden egyes esetben a CDC (Center for Disease Control and Prevention, 1990.) ajánlásait figyelembe vevő, általunk összeállított, 13 pontból álló szabványos epidemiológiai és klinikai kérdéssort küldtünk az érintett járványügyi szolgálatnak (1. Melléklet). Az így gyűjtött adatok adták vizsgálataink statisztikai alapját. A statisztikai elemzésekhez Chi-négyzet próbát alkalmaztunk (Epi Info version 6.0; CDC, USA). A P érték $< 0,05$ esetén tartottuk az eredményeket szignifikánsnak.

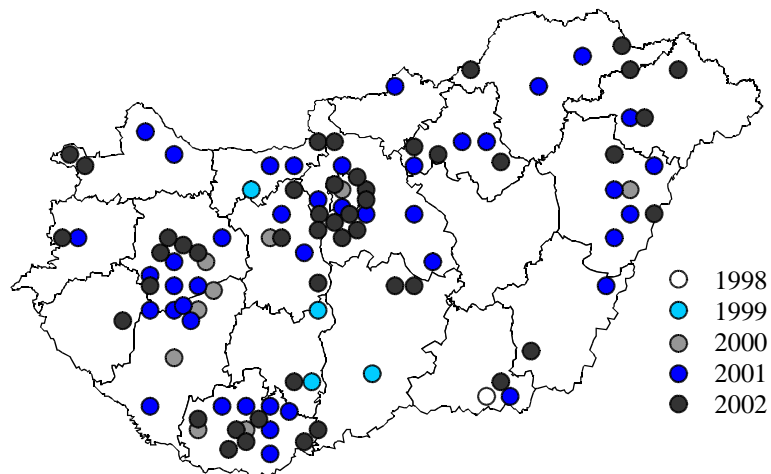
EREDMÉNYEK

1. Jiang és mtsai. közleményei és közvetlen segítségükkel is (részben a hatékony, specifikus primerek közlés előtti átengedésével), a standardizált, nemzetközileg elfogadott molekuláris eljárások és módszerek felállításával és alkalmazásával - reprodukálható módon - megteremtettük a humán calicivírusok közvetlen kimutatásának diagnosztikai hátterét Magyarországon.

2. Hat magyar nyelvű közlemény, előadások (lisd.: publikációs jegyzék), valamint közvetlen tájékoztatás segítségével hívtuk fel a hazai szakemberek figyelmét a humán calicivírusok epidemiológiai szerepére a közvetlen kapcsolatfelvétel kiépítése és a vizsgálatokhoz szükséges folyamatos mintabiztosítás érdekében.

3. Ennek eredményeként, közvetlen értesítést követően 1999. év végétől a nem bakteriális, ismeretlen eredetű járványos gastroenteritisek RT-PCR vizsgálatát az ország egész területét lefedően prospektív módon tudtuk végezni. 1998. november és 2002. április között összesen 133 „enteritis infectiosa” jelzést kapott gastroenteritis járványból 102 (77%) esetben (1. ábra), 907 székletmintából 317 (35%) esetében kaptunk a humán calicivírusok jelenlétét igazoló terméket. 1998-ban 1/3 (33%), 1999-ben 4/7 (57%), 2000-ben 9/11 (82%), 2001-ben 42/50 (84%), 2002. áprilisig 46/62 (74%) ilyen járványból lehetett humán calicivírust RT-PCR módszerrel kimutatni. A termékek minden esetben a „Norwalk-szerű vírusok”-ra jellemző méretűek voltak. Más vizsgálati mintából (5 ételmiszer, 4 hányadék minta) calicivírust nem sikerült azonosítani. A vizsgálati eredményekről telefonon és írásos formában minden esetben tájékoztattuk az illetékes járványügyi szolgálatot. A gastroenteritis járványok szelekciós sémája a 2. számú mellékletben látható.

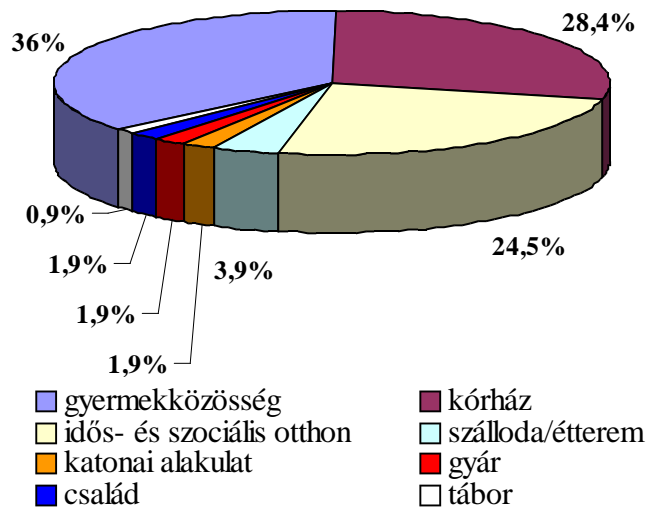
4. A CDC ajánlásait figyelembe vevő, általunk szerkesztett kérdőívre adott válaszok alapján tisztáztuk a hazai humán calicivírus járványoknak - az irodalmi adatokkal is összehasonlítható - epidemiológiai (*földrajzi hely* – megye, település; *helyszín* – a közösség típusa; *időpont* – napszak, nap, hónap, év; a *fertőzés forrása és terjedés módja, inkubációs és lefolyási idő, megbetegedési számok és arányok, életkori sajátosságok*) és klinikai (*tünetek, tünetkombinációk* és ezek *gyakorisága, kimenetel, kezelési gyakorlat, kórházi ellátás gyakorisága*) jellegzetességeit.



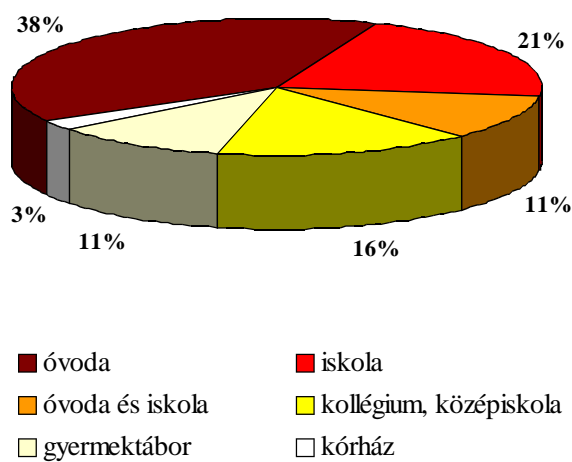
1. ábra. Az RT-PCR módszerrel igazolt humán calicivírus járványok (N=102) 1998. november és 2002. április között földrajzi hely és évek szerint jelölve Magyarországon.

Mind a 19 megyéből érkezett „enteritis infectiosa” néven nyilvántartott járványból székletminta (N=133). A Dunántúlról 71, a Dunától keltre 38, Pest megyéből (és Budapestről) 24 járványt vizsgáltunk. A 102 RT-PCR módszerrel igazolt „Norwalk-szerű vírus” járvány 18 megye 87 településén zajlott le (1. ábra). A legtöbb calicivírus járványt megyénkből (Baranya 15/19; 79%), Pest megyéből és Budapestről (19/24; 79%) és a Balatont határoló megyékből (Veszprém, Somogy) mutattuk ki.

A 102 járvány 28,4%-a kórházi osztályon (N=29), 24,5%-a idős, illetve szociális otthonban (N=25), 14,7%-a óvodai (N=15), 7,8%-a iskolai (N=8), 5,8% kollégiumi, gimnáziumi (N=6) közösségben, 4,9%-a táborban/gyermektáborban (N=5), 3,9%-a szállodában/étteremben (N=4), 3,9%-a óvodában és iskolában (N=4), 1,9%-a katonai alakulatnál (N=2), 1,9%-a gyárban (N=2), 1,9%-a családban (N=2) zajlott le (2.a és 2.b ábrák). A járványok 38%-a (N=39) 18 éven aluli gyermekek, fiatal felnőttek körében alakult ki (2.b ábra).



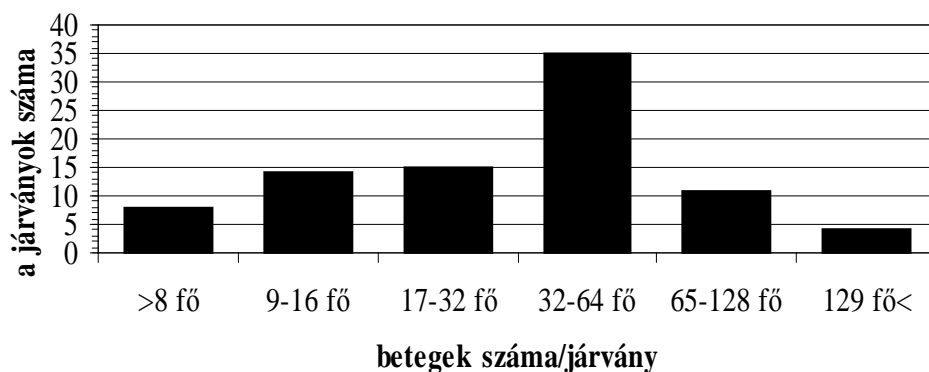
2.a ábra. Az RT-PCR módszerrel igazolt humán calicivírus járványok (N=102) helyszínek szerinti osztályozása. (gyermekközösség: óvoda, iskola, óvoda és iskola, gyermektábor, kollégium és középiskola)



2.b ábra. A gyermekközösségekből RT-PCR módszerrel igazolt humán calicivírus járványok (N=39) helyszínei. (kórház: csecsemő és gyermekosztály)

Az ismertté vált fertőzési források és terjedési módok a gyakoriságuk sorrendjében a következők voltak: a közvetlen (beteg ember; pl.: közösségbe bevitt beteg gyermek) és közvetett kontaktus (N=44), szennyezett élelmiszer (N=21; pl.: közétkeztetés) ritkábban a

hányadék és a víz. Számos esetben a terjedési módok egyszerre több fajtáját is tetten lehetett érni (pl. élelmiszer, majd közvetlen kontaktus). Gyakori volt a másodlagos terjedés (óvodás gyermek a szülőket, majd a szülők az iskolás gyermekeiket fertőzték meg az inkubációs időnek megfelelő eltolódásban; vagy a hányadék eltávolítását végző takarító személyzet betegedett meg). Egy élelmiszer (közétkeztetés) eredetű járvány járt a legnagyobb megbetegedési számmal (N=1015 beteg), mely a főváros több kerületét (13 óvodát és 3 iskolát) valamint Pest megyei településeket érintett (5 óvoda, 3 iskola, szociális otthon). A kórházi járványok nosocomiális eredetűek voltak. Az inkubációs idő rövid 24-60 óra, az átlagos lefolyási idő 2-3 nap (szélső érték: 1-7 nap) volt (1. táblázat). A járványok hossza átlagosan 6,5 nap (2-53 nap), a gyermekközösségekben 5 nap (2-14) volt. Hatvankilenc járvány ismert adatai alapján az átlagos megbetegedési arány az epidémiákban 21% (3,1-92%) volt (3959 beteg/19018 exponált személy). A járványokban az ismert megbetegedettek száma összesen több mint 4731, az exponált személyek száma több mint 19018 fő volt. Átlagosan egy járványban 51 (2-1015) személy mutatott tüneteket. A legtöbb járványban 32-64 fő között volt a betegek száma (3. ábra).



3. ábra. Az RT-PCR pozitív járványok (N=87) mérete a megbetegedettek száma szerint.

Az egyes klinikai tünetek gyakoriságát eltérő számú járvány adatai alapján határoztuk meg (hányás: 64 járvány (32 gyermek és 32 felnőtt közösség); hasmenés: 63 járvány (30 gyermek és 33 felnőtt közösség); hasi fájdalom: 49 járvány (25 gyermek és 24 felnőtt közösség); hőemelkedés: 49 járvány (26 gyermek és 23 felnőtt közösség); hányinger: 43 járvány (22 gyermek és 21 felnőtt közösség); láz: 42 járvány (21 gyermek és 21 felnőtt közösség). Egy korábban közölt, időben az első 12 calicivírus járványból származó statisztikai

elemzés eredményeit az 1. táblázatban zárójelbe tettük. A vezető tünetek a hányás és a hasmenés voltak, és átlagosan a betegek 70%-ánál jelentkeztek (1. táblázat). Szignifikánsan gyakrabban fordult elő hányás gyermekek ($\chi^2=27$ (11); $P<0,001$), illetve hasmenés felnőttek körében ($\chi^2=67$ (28); $P<0,001$). Hasi fájdalom átlagosan 52%-ban jelentkezett. A hőemelkedés illetve láz ($\geq 37,5^\circ\text{C}$) közel egyenlő gyakorisággal fordult elő a betegek ötöd részénél. A leggyakoribb tünetkombináció a hányás és a hasmenés, illetve a hányás-hasmenés-testhőmérséklet emelkedés volt. Észlelhető volt még gyengeség, fáradtság, levertség, fejfájás, étvágytalanság és rossz közérzet is.

Gyakoriság %*

Tünetek	Gyermekek	Felnőttek	Összesen	
	Átlag	Átlag	Átlag	Szélső érték
Hasmenés	49 (35)	84 (91)	69 (75)	16-100
Hányás	78 (85)	56 (51)	67 (68)	47-100
Hányinger	-	-	45 (60)	8,6-95
Hasi fájdalom	52 (61)	52 (45)	52 (52)	20-85
Láz ($\geq 37,5^\circ\text{C}$)	19 (26)	16 (21)	17 (24)	3-55
Hőemelkedés ($< 37,5^\circ\text{C}$)	19 (20)	22 (19)	20 (20)	2-50
Morbiditás (%)	-	-	21 (23)	3-92
Inkubációs idő	-	-	24-60 óra	1-3 nap
Lefolyási idő	-	-	2-3 nap	1-7 nap
Kórházi ellátás	1-7%	1-4%	-	-

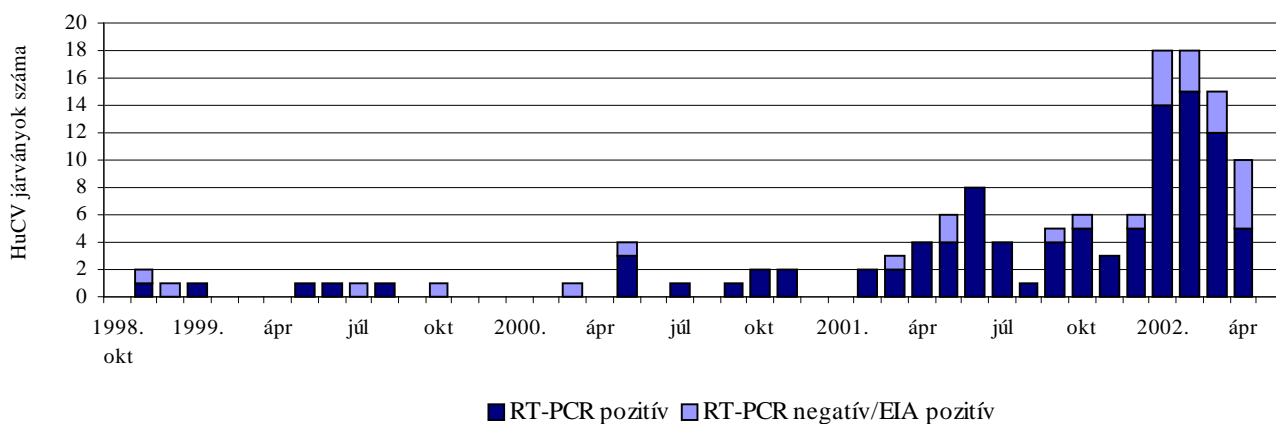
(70 év felett)

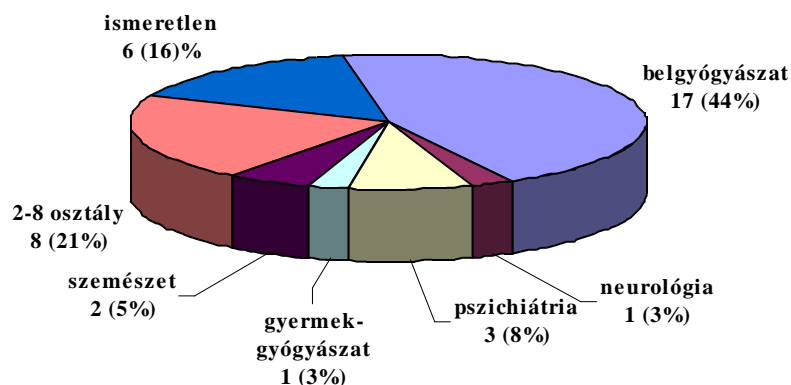
1. táblázat. Klinikai jellegzetességek a “Norwalk-szerű vírus” járványokban.

* A klinikai tünetek gyakoriságát 42-64 járvány, illetve a korábban közölt 12 járvány (zárójelben) adatai alapján határoztuk meg. Gyermekeknél a hányás ($\chi^2=27$ (11); $P<0,001$), felnőtteknél a hasmenés ($\chi^2=67$ (28); $P<0,001$) volt szignifikánsan gyakoribb.

Közvetlenül humán calicivírus fertőzés miatti halálózásról nincs tudomásunk. Kórházi ellátásra (orális, parenterális folyadékpótlásra) azonban 1-7%-ban volt szükség gyermekek, és 1-4%-ban 60 évnél idősebbek körében. Gyakori volt - néhány esetben nem a szakma szabályai szerint – az elrendelt tüneti kezelés (orális-parenterális só és folyadékpótlás, lázcsillapítás, diéta, B6, Magne-B6®, Kalmopyrin®, Daedalonetta® kúp, Normolyt® por, Smecta®, NoSpa®, Algopyrin®, széntabletta, Reasec®, antibiotikum).

A járványok többek által a mérsékelt égövön megfigyelt téli halmozódásával szemben, mi jelentős számban tapasztaltunk járványokat 2001. április-június és szeptember-október hónapok között. Ugyanakkor 2002. első 4 hónapjában kiemelkedő számú humán calicivírus járványt azonosítottunk (4. ábra).





5. ábra. A nosocomiális humán calicivírus járványok (N=38) kórházi osztályok szerint feltüntetve. Az ábra tartalmazza az RT-PCR módszerrel (N=29) és az rEIA (N=9) módszerrel igazolt kórházi calicivírus járványokat is. *belgyógyászat*: kardiológia, pulmonológia, hematológia; *2-8 osztály*: belgyógyászat, neurológia, pszichiátria, mozgás rehabilitáció, geriátria, ortopédia, sebészet, traumatológia, radiológia

Az évente exponenciálisan emelkedő kimutatási arányok alapján a „Norwalk-szerű vírusok” 1999-től a 2001. évre a hazai gastroenteritis járványok kóroki tényezői között az első helyre kerültek, egyezően a négy, jelenleg ilyen – országon belüli - regionális adatokkal rendelkező államban (Japán, Amerikai Egyesült Államok, Egyesült Királyság, Hollandia) megfigyelt helyzettel.

5. Az ismeretlen eredetű járványok vizsgálatán túl az RT-PCR módszert alkalmaztuk a humán calicivírusok kimutatására a nem bakteriális eredetű szórványos gastroenteritisek esetében is, területileg elsősorban Baranya megyei (továbbá Csongrád, Heves megyei és budapesti) járó és fekvő betegek (elsősorban 12 év alatti gyermekek) körében. 1997 és 2000. december között 154 szórványos esetből kapott székletmintából 19 (12%) esetben sikerült humán calicivírust kimutatni (3. Melléklet), melyek közül 12 (63%) a „Norwalk-szerű vírusok”, 7 (37%) a „Sapporo-szerű vírusok” közé tartozott a termékek mérete alapján. A 19 szórványos, calicivírus okozta gastroenteritis epidemiológiai adatait és laboratóriumi eredményeit a 3. számú melléklet tartalmazza.

A 7 (9,7%) Sapporo-szerű vírust 72 ismeretlen eredetű gastroenteritisben szenvedő Baranya megyei (1 esetben Baranya megyével közvetlenül határos Somogy megyei településen élő) beteg gyermekek székletmintáiból mutattuk ki. 2000. októberben 14 mintából 0 (0%),

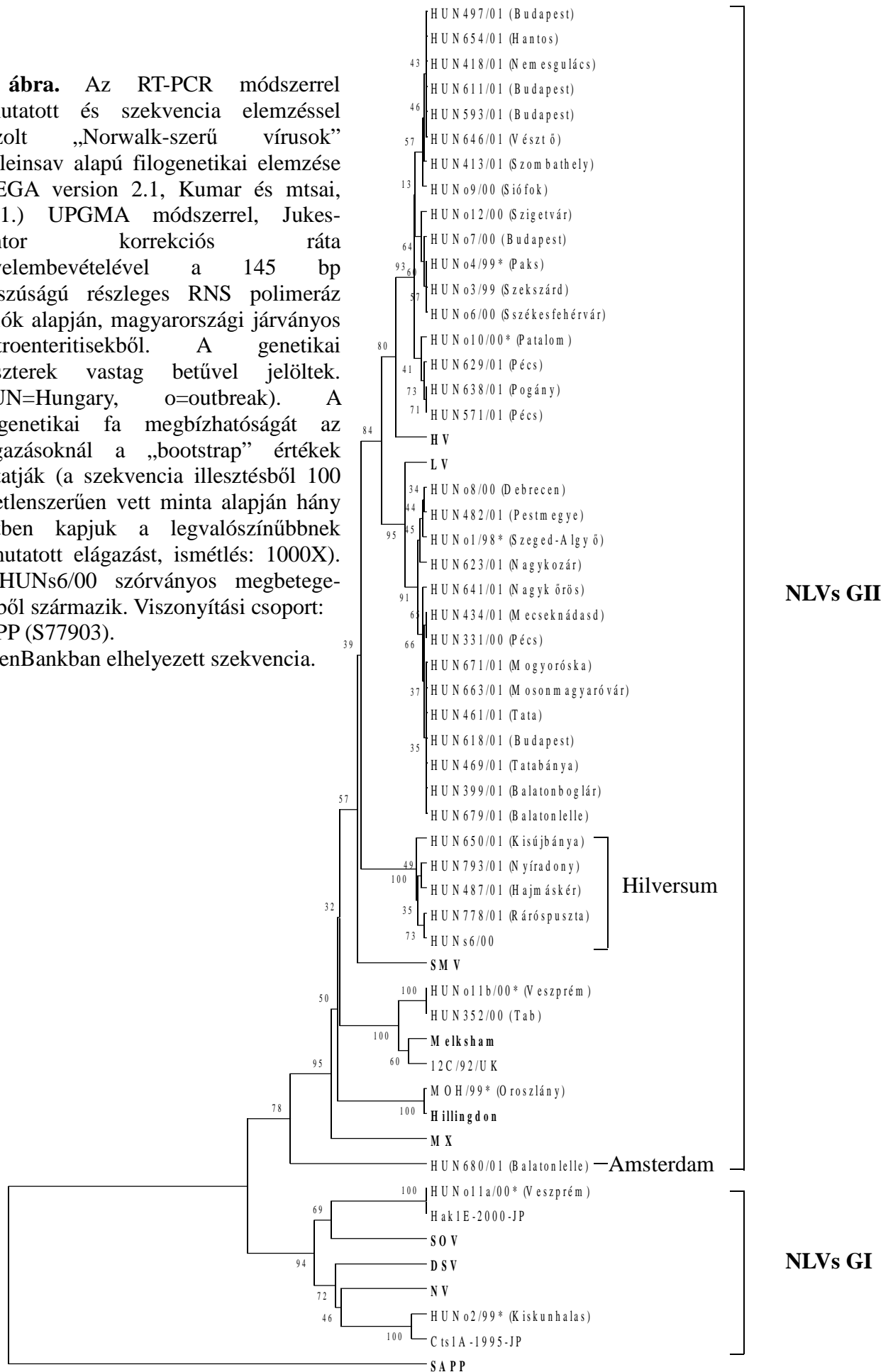
novemberben 37 mintából 3 (8,1%) decemberben 24 mintából 4 (16%) esetben. (Ugyanebben a 3 hónapban összehasonlításként csak további 6 (7,7%) esetben mutattunk ki rotavírust latex agglutinációs módszerrel). A Sapporo-szerű vírusfertőzésben 2,5 hét és 4 év 7 hónap közötti csecsemők és kisgyermekek, 6 fiú és 1 leány betegedett meg. Az átlagos életkoruk 1 év 8,5 hónap volt. Öt esetben járó, 2 esetben fekvő betegként kezelték őket. A vezető tünetek a hányás és hasmenés (híg széklet) volt, egy esetben, a legfiatalabb 2,5 hetes újszülöttnél dyspepsia volt a diagnózis.

6. Mintáinkból az RT-PCR módszerrel 2001. augusztus végéig kimutatott calicivírusokat minden esetben szekvenálással is megerősítettük. Szekvenancia- és filogenetikai elemzéssel a *Caliciviridae* családba tartozó calicivírusok mindkét humán nemzetségébe („Norwalk-” és „Sapporo-szerű vírusok”) és a Norwalk-szerű vírusok két genocsoportjába tartozó vírusokat egyaránt sikerült kimutatni és besorolni molekuláris epidemiológiai szempontból. E vírusok összesen 10 különböző genetikai klaszterbe (NLVs/GI: Southampton/91/UK (1 járványból), Desert Shield/90/Saudi Arabia (1 járványból); NLVs/GII: Hawaii/71/US (18 járványból, 1 szórványos esetből), Lordsdale/93/UK (14 járványból, 5 szórványos esetből), Hilversum/2001/NET (4 járványból és 3 szórványos esetből), Melksham/94/UK (2 járványból), Hillingdon/94/UK (1 járványból), Leeds/90/UK (3 szórványos esetből), Amsterdam/98/NET (1 járványból); SLVs: London/92/UK (7 szórványos esetből) sorolhatók, melyek e vírusok hazai genetikai sokszínűségére utalnak. Három járványból egyidejűleg két eltérő Norwalk-szerű vírus klasztert (GI/Southampton/91/UK - GII/Melksham/94/UK; GII/Hawaii/71/US - GII/Lordsdale/93/UK; GII/Lordsdale/93/UK - GII/Amsterdam/98/NET) is azonosítottunk. A járványokat minden esetben a „Norwalk-szerű vírusok” okozták; a kimutatott vírusok 95%-a (N=37) a II-es, 5%-a (N=2) a „Norwalk-szerű vírusok” I-es genocsoportjába tartozott. A szórványos megbetegedésekből GI-es genocsoportú „Norwalk-szerű vírusokat” nem tudtunk kimutatni, ugyanakkor az azonosított vírusok 63%-a (N=12) a „Norwalk-szerű vírusok” GII, 37%-a (N=7) a „Sapporo-szerű vírusok” közé tartozott. Az 1999-2000-ben a járványokból - ellentétben az irodalmi adatokkal - a Hawaii-szerű vírusok (50%), 2000 végén a Baranya megyei szórványos esetekben pedig a London/92/UK klaszter (70%) dominanciája volt megfigyelhető. A Hilversum/2001/NET klaszter 2000/2001-ben, mint új rekombináns genetikai klaszter jelent meg Európában; az Amsterdam/98/NET - eddig feltételezett - klaszterbe pedig egy újabb vírusszekvenciát azonosítottunk. A járványokból és a szórványos megbetegedésekből szekvenálással meghatározott humán calicivírusok részleges RNS-polimeráz régióknak nukleinsav alapú filogenetikai ágrajzai a 6. és 7. ábrán láthatók. Az 8. ábrán a humán

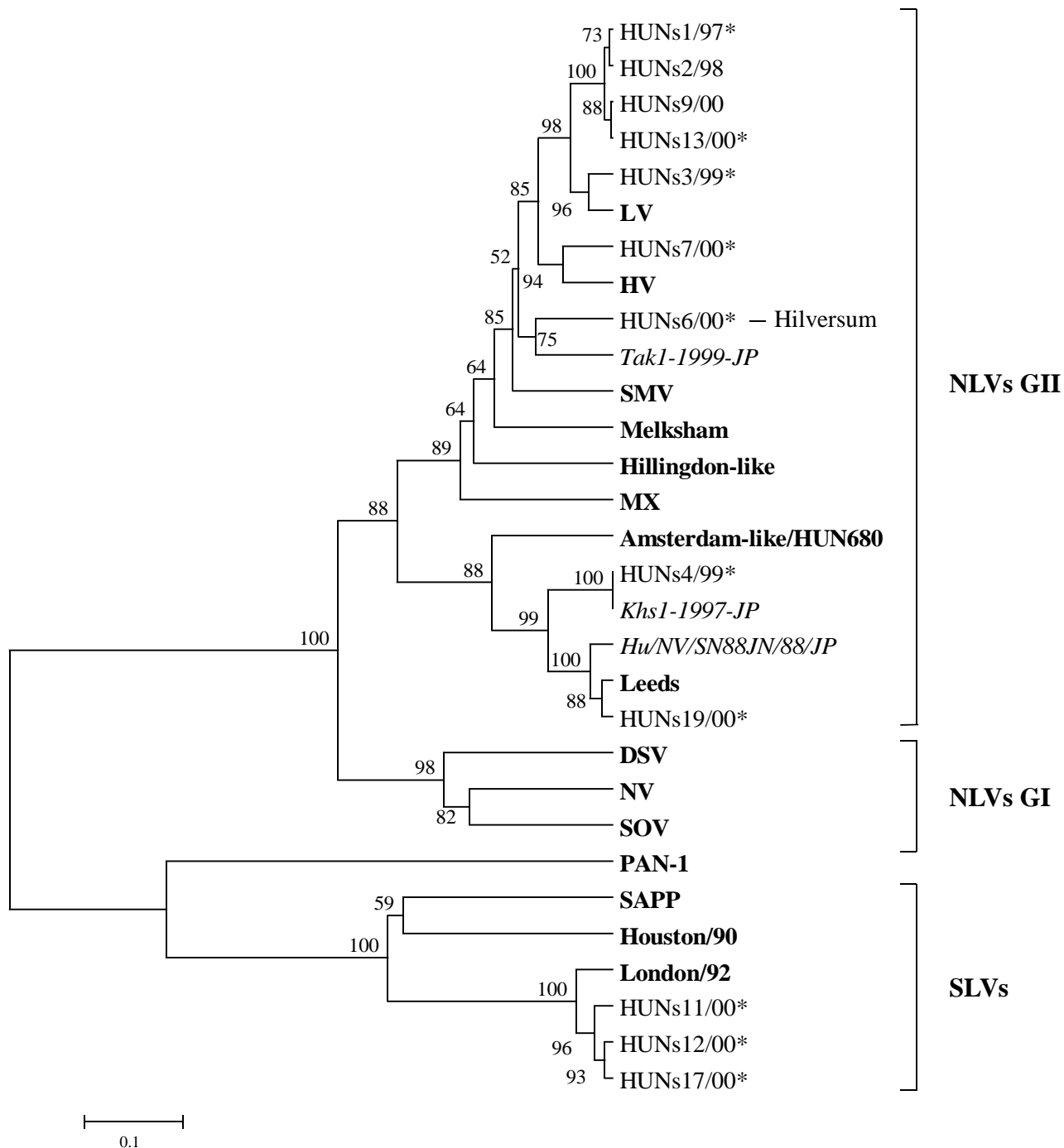
calicivírusok genotípusainak a polimeráz régió alapján készített filogenetikai ágrajza látható, mely tartalmazza a hazai legjellegzetesebb vírusszekvenciák egy-egy képviselőjét a szórványos és a járványos esetekből. Az ágrajz jól mutatja a genotípusok egymáshoz való viszonyát, valamint a Hawaii-szerű, a Lordsdale-szerű és a Hilversum-szerű vírusok minimum 3-3, a Leeds-szerű és a London-szerű vírusok 2-2 eltérő genetikai vonalát hazánkban. Viszonyítási pontként az ábra egy állati calicivírus (PAN-1; „Vesivírus”) filogenetikai helyzetét és a „Sapporo-szerű vírusok”-hoz való közelebbi rokonságát is érzékelteti.

6. ábra. Az RT-PCR módszerrel kimutatott és szekvencia elemzéssel igazolt „Norwalk-szerű vírusok” nukleinsav alapú filogenetikai elemzése (MEGA version 2.1, Kumar és mtsai, 2001.) UPGMA módszerrel, Jukes-Cantor korrekciós ráta figyelembevételével a 145 bp hosszúságú részleges RNS polimeráz régiók alapján, magyarországi járványos gastroenteritisekből. A genetikai klaszterek vastag betűvel jelöltek. (HUN=Hungary, o=outbreak). A filogenetikai fa megbízhatóságát az elágazásoknál a „bootstrap” értékek mutatják (a szekvencia illesztésből 100 véletlenszerűen vett minta alapján hány esetben kapjuk a legvalószínűbbnek bemutatott elágazást, ismétlés: 1000X). A HUNs6/00 szórványos megbetegedésből származik. Viszonyítási csoport: SAPP (S77903).

* GenBankban elhelyezett szekvencia.



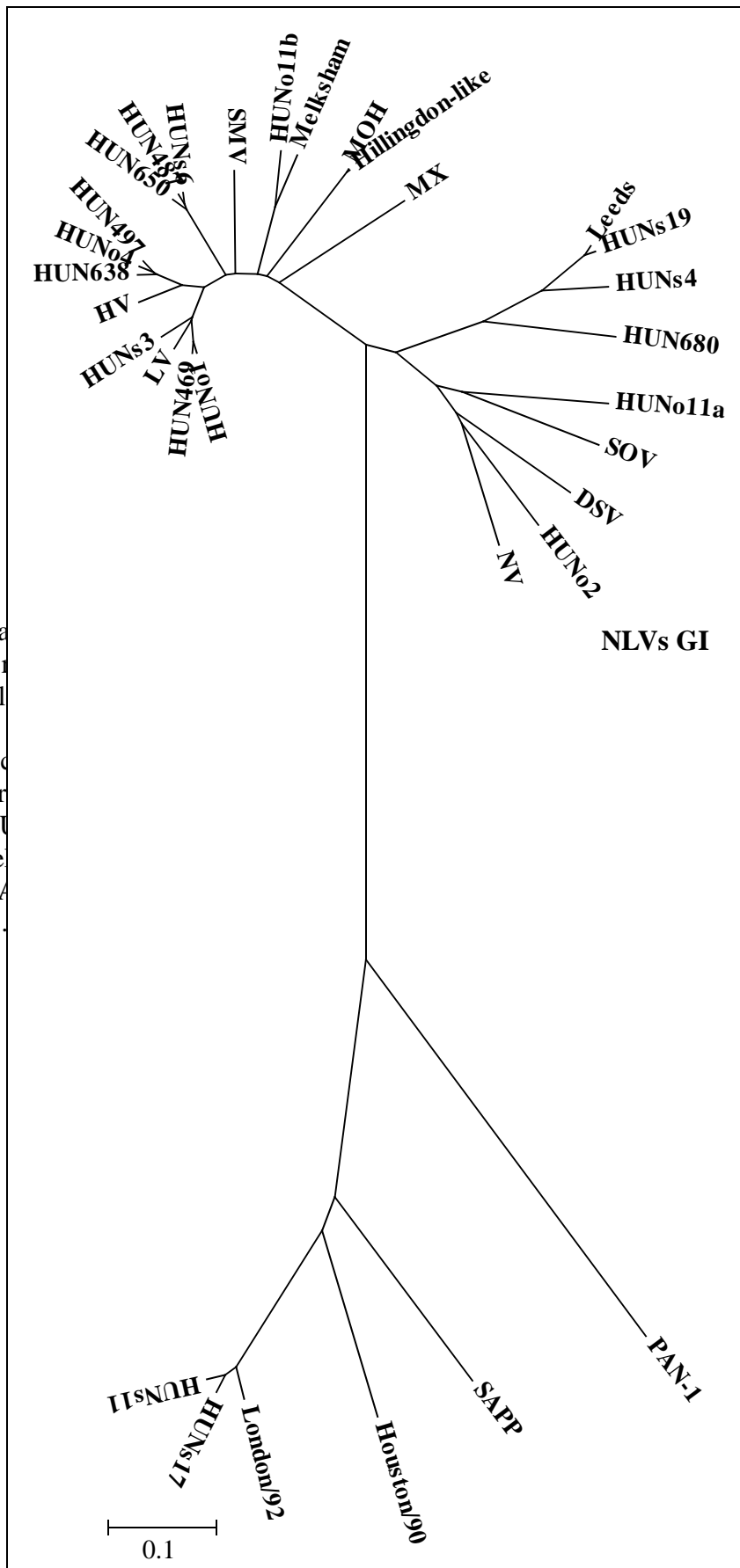
0.1



7. ábra. Az RT-PCR módszerrel kimutatott és szekvencia elemzéssel igazolt Norwalk- és Sapporo-szerű vírusok nukleinsav alapú (hasonlóság < 98%) filogenetikai elemzése (MEGA version 2.1, Kumar és mtsai, 2001.). UPGMA módszerrel, Jukes-Cantor korrekciós ráta figyelembevételével a 274 bp hosszúságú részleges RNS polimeráz régiók alapján, magyarországi szórványos gastroenteritis megbetegedésekből. A genetikai klaszterek vastag betűvel jelöltek. (HUN=Hungary, s=sporadic) A filogenetikai fa megbízhatóságát az elágazásoknál a „bootstrap” értékek mutatják (ismétlés: 1000X). Viszonyítási csoport: PAN-1 (U52086).

* GenBankban elhelyezett szekvencia.

8. ábra.
 genotípusainak
 polimeráz
 távolsági fil
 tartalmazza
 vírusszekvenc
 mind a szór
 esetekből. (C
 Cantor korre
 lével, MEGA
 mtsai, 2001.).



A vizsgált humán calicivírusok aszerint, hogy a 274 bp (p289/p290 primerpár) vagy a rövidebb 145 bp (JV12/JV13 primerpár) hosszúságú polimeráz régióikat vizsgáltuk, általában konzekvens filogenetikai elhelyezkedést vettek fel. Kivételt képeztek a Leeds-szerű és az Amsterdam-szerű vírusok csoportjai, melyek a hosszabb nukleotid szakasz alapján a „Norwalk-szerű vírusok” GII, a rövidebb, 145 bp hosszúságú szakasz alapján a „Norwalk-szerű vírusok” GI genocsoportjához állnak közelebb (7. és 8. ábra).

A GenBankban eddig 16 humán calicivírus (13 NLVs, 3 SLVs) részleges RNS polimeráz régiójának nukleinsav (NLVs: 274 bp, SLVs: 286 bp) és aminosav (NLVs: 91 aminosav, SLVs: 95 aminosav) szekvenciáját helyeztük el:

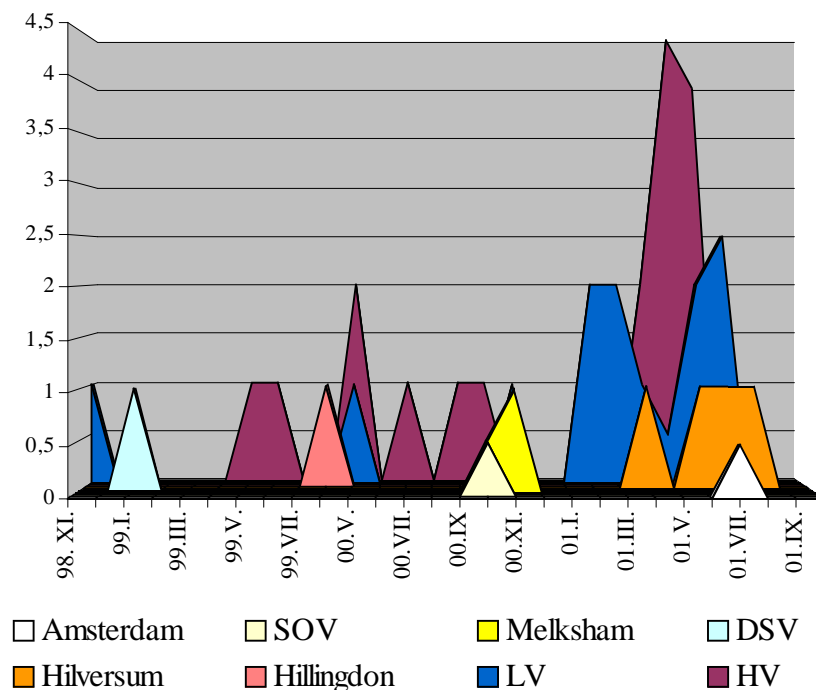
járványokból származó vírusok

<u>GenBank</u>	<u>név</u>	<u>genotípus/klaszter</u>
AF397156	NLV/MOH/1999/HUN	Hillingdon
AF472566	NLV/Szeged-Algyő/HUNo1/1998/HUN	Lordsdale
AF472567	NLV/Paks/HUNo4/1999/HUN	Hawaii
AF472568	NLV/Patalom/HUNo10/2000/HUN	Hawaii
AF472569	NLV/Veszprém/HUNo11b/2000/HUN	Melksham
AF472570	NLV/Veszprém/HUNo11a/2000/HUN	Southampton
AF472571	NLV/Kiskunhalas/HUNo2/1999/HUN	Desert Shield

szórványos esetekből kimutatott vírusok

<u>GenBank</u>	<u>név</u>	<u>genotípus/klaszter</u>
AF468660	NLV/Eger/HUNs6/2000/HUN	Hilversum
AF488713	NLV/Budapest/HUNs1/1997/HUN	Lordsdale
AF488714	NLV/Patapkösi/HUNs3/1999/HUN	Lordsdale
AF488715	NLV/Pécs/HUNs4/1999/HUN	Leeds
AF488716	NLV/Szigetvár/HUNs7/2000/HUN	Hawaii
AF488717	SLV/Görcsöny/HUNs11/2000/HUN	London
AF488718	SLV/Görögál/HUNs12/2000/HUN	London
AF488719	NLV/Szava/HUNs13/2000/HUN	Lordsdale
AF488720	SLV/Pécs/HUNs17/2000/HUN	London
AF488721	NLV/Eger/HUNs19/2000/HUN	Leeds

A vizsgált időszakban a járványokat okozó vírusok genetikai klaszterenként jelölve, havi bontásban a 9. ábrán láthatók. 1999. év közepétől 2000. októberig a járványokból leggyakrabban kimutatott vírusok a Hawaii-szerű vírusok voltak hazánkban. 2001. január és augusztus között - rövid időn belül - feltehetően egy Lordsdale-Hawaii-Lordsdale genotípus váltás zajlott le. Ebben az időszakban jelentkeztek az első, a rekombináns Hilversum genotípusú vírusok okozta járványos gastroenteritisek is (Hajmáskér, Kisújbánya, Nyíradony, Rárópuszta). (Ugyanakkor a Hilversum genotípusba tartozó vírusokat 3, kórházban kezelt Heves megyei betegből (szórványos esetek) már 2000. utolsó 3 hónapjában sikerült kimutatnunk.)



9. ábra. A járványokat okozó „Norwalk-szerű vírusok” (N=39) genetikai klaszterenként besorolva, havi bontásban 1998. november és 2001. augusztus között Magyarországon. Ha egy járványból egyidejűleg két genetikai klasztert mutattunk ki a szerepüket megfeleztük. (SOV: Southampton, DSV: Desert Shield, LV: Lordsdale, HV: Hawaii klaszter)

7. Az RT-PCR módszerrel továbbra is negatívnak bizonyult 31 járvány székletmintáiból rEIA módszer segítségével további 27 (87%) járványban, illetve 88 székletmintából 54-ben (61,4%) lehetett bizonyítani a „Norwalk-szerű vírusok” jelenlétét, kóroki szerepét (4. ábra).

A 2001. január és május hónapok között rEIA módszerrel megvizsgált 205 ismeretlen eredetű Baranya megyei szórványos mintából 48 (23,4%) esetben lehetett Norwalk-szerű vírust kimutatni nagyobb számban a téli, illetve május hónapokban (január: 32% (20/63), február: 23% (12/52), március: 13% (5/39), április: 7% (2/28), május: 39% (9/23).

Sikerült egy új, PCR módszerünkkel kimutatható, de antigenitásban minden bizonnyal eltérő, az alkalmazott rEIA rendszerben nem reagáló, „Norwalk-szerű vírus” (Hilversum) azonosítása (HUNs6/2000, AF468660).

Az RT-PCR és rEIA módszerek megbízhatóságát szórványos esetekből származó székletmintákkal vizsgáltuk. rEIA módszerrel 18 RT-PCR módszerrel kimutatott és szekvenálással is megerősített humán calicivírus (12 NLVs és 6 SLVs) tartalmú és 12 RT-PCR módszerrel aspecifikus termék(-eket) adó székletmintát néztünk meg. A 18 RT-PCR pozitív mintából 11 (10 NLVs és 1 SLVs) esetben kaptunk, a 12 aspecifikus terméket adó mintából ugyanakkor 11 (92%) esetben nem kaptunk rEIA-val reakciót ($P < 0,001$). A két rEIA-val negatív NLV tartalmú székletminta az új, rekombináns Hilversum genetikai klasztert tartalmazta. Az rEIA-val reakciót adó SLV tartalmú székletminta feltételezésünk szerint Norwalk-szerű vírust is tartalmazhatott, esetleg nagyobb számú üres kapsziddal.

8. Az Európai Unió „Quality of Life and Management of Living Resources” (QLK1-1999-CT-00594 extension with NAS2002) programja keretében (2002. februárjától) - a csatlakozó államok közül elsőként - bekapcsolódtunk a humán calicivírusok európai, nemzetek közötti cirkulációját megfigyelő munkacsoport zárt számítógépes rendszerébe („Rapid detection of transnational food-borne viral infections and elucidation of transmission routes through molecular tracing and development of a common database”). Az együttműködés biztosítja a határokon átívelő fertőzések időbeni felismerését, folyamatos nyomon követését a fertőzések csökkentése és megelőzésének érdekében. Ennek egyik eredményeként 2000/2001 évben sikerült egy új, főleg élelmiszer által terjesztett rekombináns „Norwalk-szerű vírus” (Hilversum) megjelenését - és Európa több országával egyidőben - hazai előfordulását kimutatni, valamint 2001-ben, a feltételezett Amsterdam/98/NET klaszterbe egy újabb vírust azonosítanunk, amivel ennek a genetikai klaszternek a létjogosultságát megerősítettük.

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉS

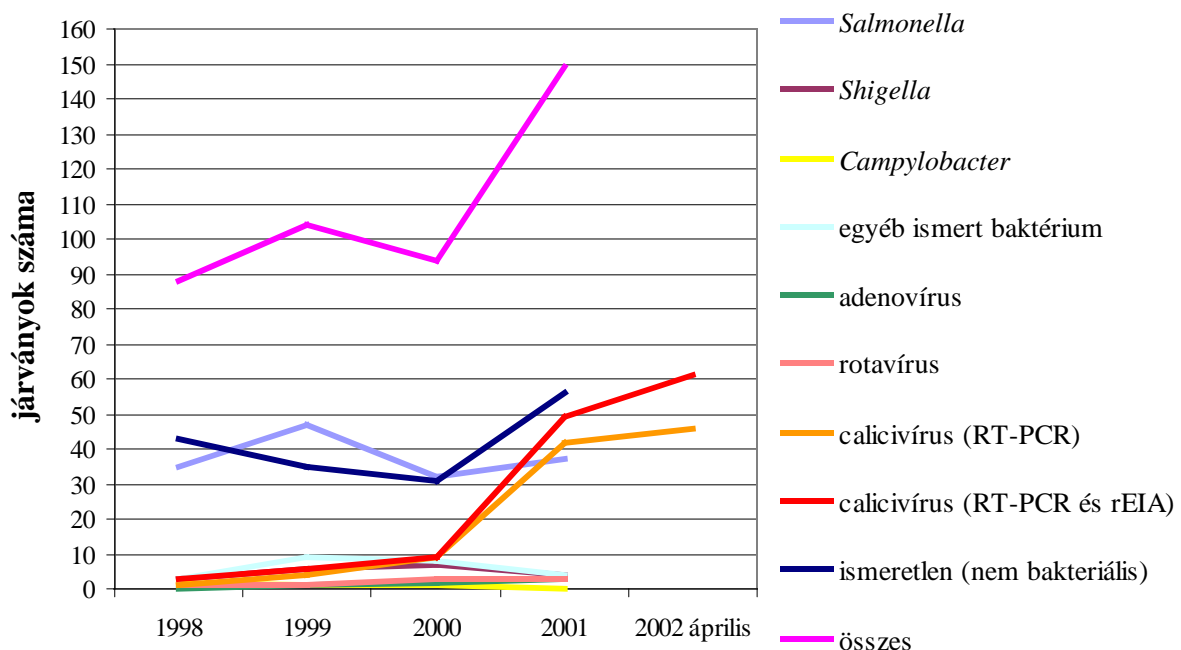
Magyarországon a hányással-hasmenéssel járó gastroenteritis járványok és szórványos esetek csak 1998. január óta kötelezően bejelentendők, de már jelenleg is vezető helyet foglalnak el a fertőző betegségek morbiditási statisztikájában. Megnevezhető etiológiai ágens (elsősorban baktrériumokat) a megbetegedéseknek csak kisebb részéből sikerül kimutatni, az esetek nagyobb részét ismeretlen eredetűként, „enteritis infectiosa” néven jelentik be. A vírusok kóroki, epidemiológiai szerepe és jelentősége – a rotavírusokat kivéve - a gastroenteritisek körében hazánkban eddig nem volt ismert.

Vizsgálatainkkal először sikerült hazánkban és a közép-kelet európai régióban a heveny, nem bakteriális gastroenteritis járványokból és szórványos megbetegedésekből humán calicivírusokat közvetlenül, molekuláris és rEIA módszerekkel kimutatni, kóroki szerepüket bizonyítani, és epidemiológiai jelentőségüket meghatározni. A humán calicivírusok mindkét humán nemzetségébe („Norwalk-szerű vírusok” és „Sapporo-szerű vírusok”) és a Norwalk-szerű vírusok két genocsoportjába (GI és GII) tartozó vírusokat egyaránt találtunk, melyek jelenlétét a virális örökítőanyag szekvenálásával is megerősítettünk.

Magyarországon, országosan, 1998. november és 2002. április között az RT-PCR módszerrel megvizsgált 133 ismeretlen eredetű, nem bakteriális gastroenteritis járványból 102 (77%) esetben sikerült - minden esetben - a „Norwalk-szerű vírusok” nemzetségébe tartozó vírusokat RT-PCR módszerrel azonosítani. A továbbra is ismeretlen eredetű járványok (N=31) rEIA vizsgálatával még további 27 (87%) esetben lehetett a Norwalk-szerű vírusok kapszid antigénjének jelenlétét kimutatni. Összességében a két módszer együttes alkalmazásával a megvizsgált járványok 97%-ában (129/133) volt bizonyítható a „Norwalk-szerű vírusok” kóroki szerepe, illetve megnevezhető a kórokozó.

Így hazánkban (a közép-kelet európai régióból először), az eddig ismeretlen eredetű „enteritis infectiosa” néven bejelentett, jelentős közegészségügyi és járványügyi nehézséget okozó járványok körében végzett vizsgálatainkkal bizonyítottuk a humán calicivírusok – „Norwalk-szerű vírusok” - kiemelkedő kóroki szerepét (10. ábra). A 2001. évben az összes bejelentett fertőzőes eredetű gastroenteritis járványok száma 50%-kal nőtt a megelőző 3 év éves adataihoz viszonyítva, melynek valószínű oka - a változatlan számú bakteriális eredetű járványok mellett - az ismeretlen eredetű „enteritis infectiosa” járványok bejelentési fegyelmének javulása. Az „enteritis infectiosa” járványok körében 1998. és 2001. között a

célirányos RT-PCR vizsgálati szám emelkedésével nőtt a csoporton belül a humán calicivírusok kimutatási aránya (2,2% (1/44); 10,3% (4/39); 22,5% (9/40); 42,9% (42/98). Ha ugyanezeket az adatokat az összes bejelentett járványos gastroenteritisek számával hasonlítjuk össze, - melyekbe az ismeretlen és a bakteriális eredetű járványok is beletartoznak! - hazánkban 1998-ban 1,1%-os (1/88), 1999-ben 3,8% (4/104), 2000-ben 9,6% (9/93) volt a calicivírusok kimutatási aránya. Sőt, a 2001. évben a bejelentett 149 gastroenteritis járványból a leggyakrabban azonosított kórokozók az RT-PCR módszerrel kimutatott „Norwalk-szerű vírusok” voltak (N=42; 28,2%) (RT-PCR és rEIA módszerrel együtt N=49; 32,8%) és csak ezt követték a Salmonellák (N=37; 24,8%) (10. ábra).



10. ábra. 1998. és 2002. április között nyilvántartott járványos bélfertőzések számának változása kórokozók szerint Magyarországon.

Hasonlóképpen 2001-ben, az ismertté vált és emelkedő számban bejelentett nosocomiális, kórházi enterális járványok leggyakoribb (7/31; 22,5%) kimutatott kórokozója a calicivírusok („Norwalk-szerű vírusok”) voltak (2. táblázat). A Norwalk-szerű vírusok jelentősége ugyanakkor még mindig alábecsült, hiszen 2002-ben áprilisig mindkét módszerrel vizsgált 62 „enteritis infectiosa” járványból már 61 (98,4%) esetben sikerült „Norwalk-szerű

vírusok”-at kimutatni (10. ábra). Minimálisan a bejelentett nosocomiális, kórházi gastroenteritis járványok 66%-át (25/38) ezek a vírusok okozták (2. táblázat).

	1998	1999	2000	2001	2002*
összes nosocomiális járvány	-	-	29	60	-
enterális járványok	-	-	13	31	38
ismeretlen eredetű	-	-	7	17	10
calicivírus RT-PCR+ (rEIA+)	0 (1)	1	4	7	17 (8)
adenovírus	-	-	0	2	0
rotavírus	-	-	0	2	2
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	2	3	1
egyéb baktérium	-	-	1	3	0

2. táblázat. A nyilvántartott összes és enterális nosocomiális járvány etiológia szerint 1998 és 2002. április között Magyarországon (Epinfo, 2000., 2001., 2002b.). * 2002. január-április

A 2001-ben megemelkedett bejelentési szám ellenére kb. 50-60 járvány esetében azonban továbbra is csak bakteriológiai vizsgálatok történtek, ahol kórokozót kimutatni nem sikerült. Ezek többségének háttérében a vírusok kóroki szerepét joggal valószínűsíthetjük. A calicivírus járványok gyakoribb kimutatását a Baranya megyében a laboratóriumunk földrajzi elhelyezkedésével magyarázzuk (eljutottak hozzánk a minták), a Pest megyei (budapesti) kimutatási arányt a lakossági arányokkal, a Balaton parti sikeresebb víruskimutatási eredményeket elsősorban a jó járványügyi nyomozó munkának tulajdonítjuk. Utóbbi térség adatai alapján felmerül az erőteljes turista forgalom szerepe (gyermektáborozások), valamint a vízparti környezet fertőzést elősegítő körülményei is a járványok kialakulásában. A rendelkezésünkre álló Baranya megyei 2 éves adatokat országosan kivetítve a számításaink szerint minimálisan évente 220-240 felismert, jelentős, 10 főnél több megbetegedéssel járó, de nem bejelentett gastroenteritis járvány esetében merülhet fel a humán calicivírusok szerepe az országban. A gastroenteritisek hazai bejelentésének alacsony számát az is bizonyítja, hogy Hollandiában egy 1 éves populációs vizsgálat eredményei szerint a gastroenteritisek morbiditása 28300/100 ezer személy/év (de Wit és mtsai., 2001.), mely a magyarországi nyilvántartott adatok 51-szerese! Számítások szerint Hollandiában és az Egyesült Királyságban a házi orvosi gyakorlatban a „Norwalk-szerű vírusok” okozta gastroenteritisek a betegforgalom 5%-, illetve 6,5%-át adhatják (Koopmans és mtsai., 2000.; Tompkins és mtsai., 1999.). Az esetek többségében a rövid időtartamú és enyhe tünetek miatt a megbetegedések feltehetően jóval gyakrabban fordulnak elő, mint ahány beteg akárcsak a házi orvoshoz is fordul. Ma már

bízzást állítható, vizsgálatainkkal és eredményeinkkel bizonyítható, hogy a hányással-hasmenéssel járó gastroenteritis járványok elsődleges kórokozói - a bakteriális ágensek előtt - a vírusok, ezen belül is kiemelkedő jelentőségűek a humán calicivírusok („Norwalk-szerű vírusok”) Magyarországon is. Ez szemléletváltozást indított el hazánkban az egyoldalú, sokszor eredménytelen, elsősorban a bakteriális kóreredetet („Salmonella”) szem előtt tartó járványügyi diagnosztikai vizsgálati sorrendben is.

Kiemelhető hogy ilyen, több éven keresztül tartó, egy teljes országra kiterjedő folyamatos járványügyi diagnosztikai munka, molekuláris epidemiológiai vizsgálat a humán calicivírusok kimutatására az irodalomban nem ismert. A humán calicivírusok vizsgálata még nem általános, és csak néhány, felszerelt, kutatással foglalkozó laboratóriumban folyik.

Sajnos e vírusok élelmiszerből való kimutatása és így a fertőzés forrásának közvetlen bizonyítása számos ok miatt nehézségbe ütközik. Ha megnevezhető az élelmiszer, akkor is kicsi és egyenetlen eloszlású a víruspartikulaszám benne; a humán calicivírusok in vitro nem szaporíthatók, - a mintákban mindig csökken a vírusok száma, és még további nehézséget okoz a PCR módszer érzékenységi határa, az élelmiszerekben előforduló inhibítorok jelenléte, stb. Eddig egy sikeres kimutatást közölték a vírusok élelmiszerből való közvetlen kimutatásáról 2000-ben (Daniels és mtsai., 2000.). Ugyanakkor a jövőben, megfelelő és érzékeny metodikai leírások kidolgozásával a bakteriális indikátorok mellett a humán calicivírusok, mint virális indikátorok, valószínűleg majd tökéletesebb fekális (biológiai) szennyezettségi mutatóként szerepelhetnek. Jelenleg elsősorban az epidemiológiai módszerek alkalmasak az emberi calicivírus fertőzés forrásának meghatározásához.

A „Norwalk-szerű vírusok” okozta megbetegedések a téli, kora tavaszi hónapokban mutatnak halmozódást a mérsékelt égövön, az északi féltekén (Ausztráliában éppen a „nyári” hónapokban emelkedik meg a betegek száma) (Mounts és mtsai., 2000.). A calicivírus járványok Magyarországon tapasztalt szezonálitását [2001-ben április és szeptember között a calicivírus járványok 58% zajlott le, júniusi csúccsal (N=8)] több tényező befolyásolhatta. Egyrészt a kezdetben a diagnosztikai lehetőség szélesebb körben nem volt ismert hazánkban, a vizsgálatok az 1998. és 2000. év vége között alkalomszerűen történtek. 2001. évben, a vizsgált járványok száma már növekedett, de nőtt az ismeretlen „enteritis infectiosa” epidémiák száma is. A 2002. évből meglévő adatok a téli jelentkezést támasztják alá. Szerepe lehet a szezonálításban a fertőzés átvitel eltérő típusainak (O’Ryan és mtsai., 1998.), illetve ezek eltérő súlyának is (lásd alább, a kagyló fogyasztás szerepét). Valószínűleg hosszabb idejű, folyamatos nyomkövetéssel, nagyobb esetszámok birtokában nyerhetünk majd megbízhatóbb képet a szezonálításról (ha egyáltalán van). Mindenesetre adataink azt jelzik, hogy „Norwalk-szerű

vírus” járványok hazánkban bármely évszakban jelentkezhettek, illetve Magyarországon a járványok kitörésének tavaszi, nyári eltolódása és halmozódása is előfordulhat.

Vizsgálataink során 27%-kal több „Norwalk-szerű vírus” járványt azonosítottunk rEIA módszerrel, mint RT-PCR-rel. Hasonló eredményre (30%) jutottak Huang és mtsai., az új rekombináns EIA teszt első kipróbálásakor (Huang és mtsai., 2001.). A molekuláris módszer kisebb érzékenysége több okra vezethető vissza, melyek közül - elméletileg - legfontosabbak a következők lehetnek: 1. az alkalmazott primerpár nem fedi le a genotípusokat, 2. inhibitorok jelenléte a mintákban, 3. kevés, vagy a minta szállítása, tárolás, preparálása során elveszett virális RNS. Az antigének, antigéntípusok pontos megismeréséig és a kereskedelmi forgalomban használható EIA tesztek megjelenéséig jelenleg a kísérleti rekombináns EIA teszt (tesztek) hasznos kiegészítő módszerek a diagnosztikában.

Bár az irodalomban a „Norwalk-szerű vírusok” GII genocsoportjába tartozó vírusok meghatározó szerepe a járványos fertőzésekben jól ismert (Green és mtsai., 1995.; Vinjé és mtsai., 1996.; Noel és mtsai., 1997.; Vinjé és mtsai., 1997., Fankhauser és mtsai., 1998.; Wright és mtsai., 1998.), a vizsgált időszakban a hazánkban tapasztalt Hawaii-szerű vírusok (GII) túlsúlya a járványos fertőzésekben az irodalmi adatoktól eltérő megfigyelés. Az 1990-es évek közepétől a Lordsdale-szerű vírusok okozta járványok száma messze meghaladta a más humán calicivírus klaszterbe tartozó vírusok okozta epidémiák számát azokban az országokban, ahol ezt vizsgálni tudták, mint például az Egyesült Államokban (Fankhauser és mtsai., 1998.) Hollandiában (Vinjé és mtsai., 1996; Vinjé és mtsai., 1997.), Angliában (Maguire és mtsai., 1999.) és Új Zealandon (Greening és mtsai., 2001.) is. Sőt egy genetikailag jól meghatározott Lordsdale-szerű vírust („95/96-US subset”) 1995-1996-ban egy világméretű járvány (pandémia) okozójaként is azonosítottak 5 kontinensen, 7 országban (Noel és mtsai., 1999.). A sajátos hazai regionális eltérés oka (-i), a fertőzések közös kapcsolatai nem ismertek. Számos magyarázat született, hogy miért okozhatnak gyakrabban járványokat a GII, mint a GI genocsoportú „Norwalk-szerű vírusok”. Felmerült az eltérő átviteli mód [állati rezervoár? szarvasmarhák bélsármintáiból kimutatott vírusok a „Norwalk-szerű vírusok” GI, a sertésekből kimutatott vírusok a GII genocsoporthoz állnak közelebb (van der Poel és mtsai., 2000.)], az eltérő virulencia, vagy a GI genocsoportú vírusok környezeti hatásoknak esetleg kevésbé állnának ellent (Vinjé, Thesis 1999.). Véleményünk szerint azonban figyelembe kell venni, hogy ellenanyagokat a GI és GII genocsoportú vírusok ellen hasonló nagyságrendben lehet kimutatni a populációban, illetve, hogy a jelenleg használt primereknek nem ismert és jelenleg nem határozható meg a kimutatási spektruma. Az utóbbi időben éppen a Hollandiában (és Nyugat-Európában) a „Norwalk-szerű vírusok” szűrővizsgálatára alkalmazott primerpárról

bizonyosodott be, hogy fals negatív eredményt adhat a GI genocsoportú vírusok vizsgálatakor (Johansson és mtsai., 2002.).

Miközben a tengerekkel és óceánokkal határos országokban (Egyesült Államok, Japán) az étkezéssel elfogyasztott szennyezett kagylók („tenger gyümölcsei”) a humán calicivírusok egyik gyakori és külön nyilvántartott fertőzési forrásai, és befolyásolják a járványok téli szezonális jelentkezését is (Shieh és mtsai., 2000.; Berg és mtsai., 2000.), addig hazánkban a kagylófogyasztás elhanyagolható jelentősége miatt ezzel a fertőzési forrással nem kell számolni. A hazai fertőzések egyéb okokra, így a higiénés fegyelem (élelmiszerek fekális szennyezése, „piszkos kezek”) hiányosságaira vezethetők vissza.

A humán calicivírusok genetikai klasztereinek, illetve a biológiai meghatározottságukat adó szerotípusoknak a száma nem ismert. Más RNS vírusokhoz hasonlóan (pl. poliovírus, hepatitis C vírus) valószínűleg nagy mutációs rátával jellemezhetőek ($1,44-3 \times 10^{-3}$ bázis csere/év) (Ward és mtsai., 1988; Okamoto és mtsai., 1992.). Ebből következően a calicivírusok azok közé a vírusok közé tartoznak, melyek az extrém nagy genetikai heterogenitás miatt a „kvázispecies”-ek populációját alkotják (Holland és mtsai., 1992.). Számos pozitív szálú RNS vírus esetén egy genotípusba sorolják a polimeráz régióban (hepatitis E vírus; Arankalle és mtsai., 1999.) vagy a VP1/2A régióban (poliovírus, hepatitis A vírus; Robertson és mtsai., 1992.) 85%-nál nagyobb nukleotid hasonlóságot mutató vírusokat. Ehhez hasonlóan a humán calicivírusok esetén egy genotípusba sorolják a polimeráz régióban is (a kapszid régióhoz hasonlóan) a 80%-nál nagyobb nukleotid azonosságot mutató vírusokat. Munkánk során 10 különböző genetikai klaszterbe tartozó humán calicivírust azonosítottunk molekuláris szinten. Ez a genetikai sokszínűség a vírusok széleskörű elterjedtségét és a populáció fertőzésre való fogékonyságát bizonyítja hazánkban is. A kimutatott klaszterek között egy új rekombináns (polimeráz-kapszid régió) genetikai klaszter (Hilversum-HUNs6/00) (szerotípus?) azonosításában, és egy eddig csak feltételezett Norwalk-szerű vírus genetikai klaszter (Amsterdam – HUN680/01) létjogosultságának megerősítésében játszottunk szerepet. Az új Hilversum klaszter nyugat-európai kimutatásával egyidőben történt hazai (közép-kelet európai) azonosítása alátámasztja a humán calicivírusok rendkívül gyors terjedését, illetve másik oldalról azt, hogy a különböző genotípusok/szerotípusok (részben „megújulva”) időszakosan, illetve folyamatosan is képesek a populációban cirkulálni.

A vizsgálatok azt mutatják, hogy a humán calicivírusok különböző ORF régiói (polimeráz, kapszid, ORF3) következetesen az adott klaszterre jellemző filogenetikai jellegzetességgel rendelkeznek (Vinjé és mtsai., 2000a.). Néhány esetben azonban eltérést lehet tapasztalni. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy az adott minta egynél több calicivírus

genotípust is tartalmazhat; a másik felvethető gondolat, a természetes rekombináció lehetősége (Jiang és mtsai., 1999a.). A Leeds-szerű vírusok eltérő hosszúságú polimeráz régióinak filogenetikai elemzése során tapasztalt „helyváltotatást” a „Norwalk-szerű vírusok” két genocsoportja között mások is megfigyelték. Egyesek a GI (Gonin és mtsai., 2000.), mások a GII (Ohyama és mtsai., 1999.) genocsoportba sorolják őket, de van, aki intermedier (Vinjé és mtsai., 2000a.) filogenetikai helyzetűnek írja le ezeket a vírusokat attól függően, hogy hosszabb vagy rövidebb polimeráz régiókat vizsgált. Ugyanakkor a kapszid régió alapján ezek a vírusok egyértelműen a GII genocsoportba tartoznak (Vinjé és mtsai., 2000a.). A humán calicivírusok rövid polimeráz régióinak vizsgálata ugyan rendkívül hasznos molekuláris epidemiológiai szempontból (a polimeráz régió konzervatívabb, mint a kapszid régió), de a vírusok leírása és jellemzése a 3 ORF régió, illetve valószínűleg az elsődleges biológiai meghatározottságukat adó kapszid régió ismeretében lehet csak teljes.

Vizsgálataink és eredményeink egyik legfontosabb gyakorlati következményének tartjuk, hogy hazánkban megváltozott a járványügyi szakemberek szemlélete és gyakorlata a gastroenterális tünetekkel járó esethalmozódások kivizsgálásában és a járványügyi intézkedések elrendelése terén. Különösen a calicivírusoknak a kórházi enterális járványok körében betöltött szerepe keltette fel a kórházi epidemiológusok figyelmét (Epinfo, 2002, 2002a.). Az egészségügyi intézményekben adataink alapján átlagosan 2-4-szer hosszabb ideig tartanak a járványok, több osztályt érintenek és nosocomiális eredetűek. Az intézmények zárt körülményei, az ápolott betegek alapbetegségükből is adódó higiénés magatartása és nagyobb fogékonysága, az ápoló- és a takarítószemélyzet hiánya, illetve esetleges megbetegedése miatti létszámcsökkenés, és a beteget ápoló egészségügyi személyzet nem megfelelő, a kórházhigiénés előírásokat megszegő munkavégzése is elősegíti a fertőzések elhúzódó lefolyását, illetve fellángolását. Úgy látszik, hogy a hazai körülmények között a természetes barrierként működő pavilonrendszer sem állítja meg a kórokozók terjedését. A calicivírusok tulajdonságai, valamint a sajátos hazai kórházi körülmények miatt a fertőzések megakadályozását célzó járványügyi intézkedések (pl.: felvételi zárlat, elkülönítés, osztályok közötti átjárhatóság megszüntetése, a beteg egészségügyi dolgozó szabadságolása, higiénés szabályok betartása) többször nehezen voltak megvalósíthatók. - Vizsgálataink ráirányították a figyelmet a Norwalk-szerű vírusfertőzések során felmerülő jelentős költségekre is. Számítások szerint egy magyarországi kórház több osztályát érintő, 2 hétig elhúzódó nosocomiális járvány esetén a költségek, illetve a kórházi felvételi zárlat miatt elmaradt haszon 2002-ben meghaladta a 16 millió forintot (Pál A., személyes közlés).

Jelentős számban sikerült humán calicivírusokat szórványos gastroenteritis megbetegedésekből is azonosítanunk. 2001. január és május hónapokban a Baranya megyéből laboratóriumunkba érkezett baktériumot, rota- és adenovírust nem tartalmazó gastroenteritises székletmintákból átlagosan 23,4%-ban tudtunk Norwalk-szerű vírusokat kimutatni rEIA módszerrel. Ugyanakkor jelentősnek mondható az RT-PCR módszerrel azonosított „Sapporo-szerű vírusok” aránya a „Norwalk-szerű vírusok” számarányához képest a szórványos humán calicivírus fertőzések között is. Ennek oka részben az általunk alkalmazott primer tulajdonságainak (egyidőben képes a Norwalk- és a Sapporo-szerű vírusok kimutatására), illetve annak köszönhető, hogy - az irodalmi adatoktól eltérően - mi nemcsak a kórházi kezelést igénylő szelektált, hanem ambulánsan ellátott gastroenteritis megbetegedéseket is vizsgáltuk. A „Sapporo-szerű vírusok” a „Norwalk-szerű vírusok”-hoz képest ugyanis enyhébb klinikai tüneteket okoznak (Pang és mtsai., 2000.; Sakai és mtsai., 2001.). Hazánkhoz földrajzilag legközelebb Hollandiából származnak adatok molekuláris módszerekkel azonosított Sapporo-szerű vírusokról, melyek angliai és svédországi mintákon alapuló eredményeket is tartalmaznak. Az 1988-1998 között elektronmikroszkóppal azonosított, majd RT-PCR módszerrel megerősített 55 Sapporo-szerű vírusból, melyek kórházban kezelt személyektől származtak 28 (51%) a Sapporo/82/JP, 21 (38%) a London/92/UK, 3 (5,5%) a Houston/90/UK és 3 (5,5%) az újonnan azonosított Stockholm/97/SE klaszterbe tartozott (Vinjé és mtsai., 2000.). Az is megfigyelhető volt, hogy a London/92/UK klaszterbe tartozó vírusokat szórványos, közösségben szerzett, a Sapporo/82/JP klaszterbe sorolhatóakat viszont járványos esetekből mutatták ki. Ugyanakkor az angliai Leeds környékén 3 klaszter (Sapporo/82/JP, Houston/90/UK és London/92/UK) egyidejű cirkulációját lehetett közösségben megfigyelni. A calicivírusok változó rendszertanát jelzi, hogy a London/92/UK klasztert egy új genocsoportba (GIV) javasolják elkülöníteni (Jiang és mtsai., 1997.).

Ma már egyértelműen felismerhető, hogy a humán calicivírusok kiemelkedő közegészségügyi problémát jelentenek. A „Norwalk-szerű vírusok” a leggyakoribb kóroki tényezők a gastroenteritis járványokban, a leggyakoribb virális ágensek az élelmiszerrel terjedő fertőzésekben, és a második legfontosabb virális kórokozók - a rotavírusok mellett - a súlyos lefolyású gyermekkori gastroenteritisekben. Jelentőségük négy tényezőre vezethető vissza: az alacsony fertőzési dózisa, a környezeti hatásokkal szembeni viszonylag nagy ellenálló képességükre, a vírusok sokszínűségére, és a hosszú távú immunitás hiányára. Az evolúció során ezek a vírusok rendkívül jól alkalmazkodtak a környezetükhöz („életképesek”). Számos tulajdonságuk miatt „modellvírusnak” is javasolhatók az ember és környezete kölcsönhatásának vizsgálatára.

A humán calicivírusok szerepének megismerése olyan új és jelentős kihívást jelent a fejlett világban is, ami arra vezetett, hogy az Európai Unió immár évek óta külön és kiemelten támogatja e vírusok hatékonyabb kutatására és a fertőzések - főleg élelmiszerekkel történő átvitelének - visszaszorítására tett erőfeszítéseket az európai nemzetek közötti együttműködés keretében (beleértve laboratóriumunk csatlakozási lehetőségét is ehhez az Uniós programhoz).

ÚJ EREDMÉNYEK

A humán calicivírusok diagnosztikai feltételeinek megteremtése Magyarországon.

A „Norwalk-szerű vírusok” első sikeres kimutatása hazánkban (Közép-Kelet-Európában).

A „Sapporo-szerű vírusok” első sikeres kimutatása Magyarországon (Közép-Kelet-Európában).

A „Norwalk-szerű vírusok” vezető kóroki szerepének bizonyítása a gastroenteritis járványokban Magyarországon (Közép-Kelet- Európában).

A „Norwalk-szerű vírusok” okozta gastroenteritis járványok klinikai és epidemiológiai jellegzetességeinek feltárása közel 3 éves, folyamatos járványügyi munkával hazánkban (Közép-Kelet- Európában).

A „Norwalk-szerű vírusok” vezető kóroki szerepének bizonyítása és epidemiológiai jellegzetességeinek leírása a kórházi (nosocomiális) gastroenteritis járványokban Magyarországon.

A humán calicivírusok örökítőanyagának, genetikai diverzitásának vizsgálata a részleges polimeráz régiók alapján. A Magyarországon kimutatott humán calicivírusok első filogenetikai elemzése.

A „Norwalk-szerű vírusok” közvetlen kimutatása járványos és szórványos gastroenteritisekben direkt vírust/vírusantigént kimutató módszerrel. A „Norwalk-szerű vírusok” e módszerrel történt első vizsgálata szórványos gastroenteritisekben Magyarországon.

Új, rekombináns „Norwalk-szerű vírus” azonosítása a nyugat-európai kimutatással egyidőben.

(Az eddig végzett vizsgálatok, eredmények és a már meglévő együttműködés alapján pályázati csatlakozási ajánlat az EU „6th Framework Programme 2002-2006” -ra beadandó, 12 ország együttműködésével megvalósuló pályázathoz. /Expression of Interest to Submit an Integrated Project Proposal. Prepared by: Marion PG Koopmans, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands, 2002.

Tematic priority area 1.1.5 , Food quality and Safety/)

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS, TÁMOGATÁSOK

Elsősorban, és a lehető legnagyobb köszönettel tartozom Dr. Szűcs György egyetemi magántanár, osztályvezető főorvos úrnak, témavezetőmnek, aki az egyetemi TDK 3 éve után, immár hatodik éve áll mindenben mögöttem, támogat, biztosítja a kutatáshoz szükséges háttérrel és igyekszik botlásaim számát csökkenteni.

Köszönettel tartozom David O. Matson MD PhD, Jiang Xi PhD, Berke Tamás MD MSc, Farkas Tibor DVM PhD (Center for Pediatric Research, Children's Hospital of The King's Daughters and Eastern Virginia Medical School, Norfolk, Virginia, Amerikai Egyesült Államok) segítségéért, hogy lehetővé tették tanulmányutamat és támogatták munkám kibontakozását. (Jiang Xi PhD és Farkas Tibor DVM PhD jelenlegi munkahelye: Cincinnati Children's, Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, Amerikai Egyesült Államok)

Köszönetemet fejezem ki Marion PG Koopmans DVM PhD és Harry Vennema PhD (National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Hollandia) segítségéért, hogy lehetőséget adtak (adnak) az együttműködésre, és vállalták a vírusok örökítő anyagának szekvenálását 2001-ben.

Köszönöm Németh Andrea és Belák Gergely TDK hallgatóim segítségét.

Köszönettel tartozom továbbá a vizsgálati mintákért, az epidemiológiai adatok összegyűjtéséért és rendelkezésünkre bocsátásáért az ÁNTSZ megyei és városi intézeteiben dolgozó közel 100 járványügyi és mikrobiológus szakembernek az országban.

A virológiai vizsgálatok pénzügyi forrását túlnyomórészt az Egészségügyi Minisztérium ETT (T-08) 118/2000. és állami ösztöndíjas doktori keretem, illetve az U. S. Public Health Service AI37093 és HD13021, illetve a QLK1-1999-CT-00594 (Európai Unió) pályázatai nyújtották.

TOVÁBBI CÉLOK

Az ismeretlen eredetű, nem bakteriális „enteritis infectiosa” járványok további, folyamatos, molekuláris és epidemiológiai vizsgálata („surveillance”) Magyarországon.

1. A humán calicivírusok („Norwalk-szerű vírusok” és „Sapporo-szerű vírusok”) molekuláris vizsgálata a kórházi felvételt igénylő gastroenteritisek körében Magyarországon (együtműködés: Szegedi Tudományegyetem, Gyermekklinika, Klinikai Mikrobiológiai Intézet, Szeged).
2. Az RT-PCR módszerrel azonosított vírusok szekvencia és filogenetikai elemzése. A 2001. évi járványokból kimutatott vírusok szekvenálása folyamatban van a hollandiai közegészségügyi központban (együtműködés: RIVM, Bilthoven, Hollandia), ugyanakkor a 2002. évi minták hazai, direkt szekvenálását tervezzük.
3. Tevékeny részvétel az Európai Unió „calicivírus” munkacsoportjában a zárt számítógépes adatbázis kiépítésében és működtetésében, az Európában cirkuláló vírusok folyamatos nyomon követésére és jelzésére.
4. Elősegíteni az antigenitásban eltérő, így a jelenleg kutatási szinten rendelkezésre álló EIA tesztekkel nem kimutatható vírusok RT-PCR módszerrel való kiszűrését. Hozzájárulni egy a vírusok szélesebb körét lefedő (megbízhatóbb) vírust/vírus antigént kimutató teszt összeállításáért (együtműködés: Cincinnati Children’s, Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, Amerikai Egyesült Államok).
5. Állati eredetű székletminták RT-PCR vizsgálata állati calicivírusok keresésére Magyarországon, illetve egyes humán calicivírusok feltételezett állati rezervoárjának keresése (együtműködés: MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest).
6. A humán calicivírus fertőzések pathomechanizmusának vizsgálata.
7. A humán calicivírusok tenyésztésének kísérlete.

A vizsgálatok további folytatását, a fenti tervek megvalósítását hazai és nemzetközi pályázati források (Európai Unió, Fogarty) elnyerésével szeretnénk megalapozni.

MELLÉKLETEK

1. Melléklet

Kérdésgyűjtemény és szempontok igazolt humán calicivírus (HuCV) fertőzés/esethalmozódás/járvány epidemiológiai háttérének kivizsgálásához

Az aktuális esemény jellegzetességeinek megfelelően, értelemszerűen kérjük kitölteni!

1. A járvány helyszíne:.....
Mikor történt az első megbetegedés? év: 200 ...hónap:... nap:.....napszak:
Ki volt az első beteg járványügyi szempontból (óvodás, iskolás, alkalmazott, stb.)?: ...
.....

2. Mi lehetett a fertőzés forrása? (*aláhúzás és kiegészítés*)

élelmiszer (gyanúsított menü –(ük), étel-(ek)).....
víz (uszoda, tó, csapvíz, vezetékes víz, jég, egyéb):
beteg ember (ápolat, gondozott, dolgozó (konyhai, egészségügyi...),
egyéb):
hányadék, aerosol, egyéb:

- Milyen úton, utakon terjedt-(hetett) a fertőzés? (*aláhúzás*)

élelmiszer
víz
közvetlen kontaktus
környezet, eszközök kontaminációja (névszerint:)
aerosol

Volt-e 1-3 nappal az esethalmozódás/ járvány előtt a megbetegedettek környezetében valakinek hasmenése, hányása? *igen / nem*. Ha igen, kinek:

Összefüggésbe lehetett-e a jelen megbetegedésekkel? *igen / nem*

Felmerül-e a nosocomialis fertőzés lehetősége ? *igen / nem*. Ha igen, miért:

.....
.....

3. Hány beteg volt összesen: Hány exponált volt összesen?.....

A megbetegedések száma naponkénti bontásban: 1. nap:.....2. nap:3. nap:.....4. nap:.....

5.nap:.....6.nap:.....7.nap:.....

Kórházi fertőzés esetén osztályonként:,
emeletenként....., kórtermekként.....

.....
a megbetegedett dolgozók száma:?

4. Az egyes betegek életkora, neme, volt-e köztük egészségügyi dolgozó, takarítónő, konyhai alkalmazott? (x)

No.	Életkor (év)	Nem f/n	Eü. dolg.	Takarító	Konyhai alk.	HuCV vizsgálatra székletminta elküldve / dátum /	No.	Életkor (év)	Nem f/n	Eü. dolg.	Takarító	Konyhai alk.	HuCV vizsgálatra székletminta elküldve / dátum /
1.							15.						
2.							16.						
3.							17.						
4.							18.						
5.							19.						
6.							20.						
7.							21.						
8.							22.						
9.							23.						
10.							24.						
11.							25.						
12.							26.						
13.							27.						
14.							28.						

Mennyi volt a betegek és külön a nem betegek, exponáltak átlagos életkora?

Betegek: Exponáltak:

5. Milyen hosszú (-ak) lehetett (-ek) az inkubációs idő (-k)? (Figyelembe véve a 24-48 (4-77) óras átlagos irodalmi inkubációs időt.)

Lehet-e napszakhoz kötni a tünetek megjelenését: *reggel, nappal, este, éjszaka*

6. Milyen tünetekkel járt a fertőzés, hány betegnél fordult elő, milyen %-ban?

Tünet	hány betegnél fordult elő	%
hányinger: %
hányás: %
hasi fájdalom: %
hasmenés: %
hőemelkedés (<37,5°C): %
láz (>=37,5°C): %
fejfájás: %
izomfájdalom: %
esetleg véres széklet: %
egyéb:..... %.

hányás+hasmenés:

hányás+hőemelkedés/láz:

hőemelkedés+hasmenés:

hányás+hasmenés+hőemelkedés:

7. Volt-e súlyosabb kimenetelű megbetegedés? *nem / igen* ; ha igen: hány:
kimenetel:

Alkalmaztak-e valamilyen terápiát a fertőzés során? *nem / igen*;

ha igen mit: hány embernél:

Kellett-e a megbetegedettek közül valakit kórházba szállítani? *nem/ igen*; ha igen hányat:.....
Milyen kezelésben részesült (-ek)?

8. Milyen volt a betegség átlagos lefolyási ideje?nap. Szélső értékek?.....

9. Ha vége van a fertőzésnek/járványnak, mikor volt az utolsó megbetegedés?

200.... Hónap:..... Nap:.....

10. Milyen járványügyi intézkedések történtek?

11. Milyen (*bakt., é.bakt., parazit., virol. egyéb:.....*) és hány (...) mikrobiológiai vizsgálat történt?

Mi volt a bakteriológiai (*neg / pos:*),

Élelmiszerbakteriológiai (*neg / pos:*),

Parazitológiai (*neg / pos:*),

Viológiai (*neg/pos:*).....,

egyéb (mi?) vizsgálatok eredménye?

12. Voltak-e az érintett intézményen (kórház, nevelési-oktatási, stb.) kívül is hasonló tünetekkel megbetegedések? *Igen / nem.* Ha igen, hány:..... Mikor:

A településen (város, falu)? *Igen / nem,* és/ vagy környékén? *Igen / nem*

Esetleges megjegyzés:

13. További megjegyzések, a megbetegedések egyéb szembetűnő vonásai:

A kérdőív kitöltésében segítettek, névszerint:

A válaszadást és munkájukat köszönjük!

Tisztelettel:

Dr. Reuter Gábor

Ph.D. hallgató

Dr. Szűcs György

egyetemi magántanár
osztályvezető főorvos

Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat
Baranya Megyei Intézete, Regionális Virologiai Laboratórium, Pécs

7623 Pécs, Szabadság út 7., Pf.: 47

Tel.: (72) 514-999 / 300 m., 514-970 (közvetlen)

Fax.: (72) 514-949

e-mail: gszucs@main.antszbar.hu

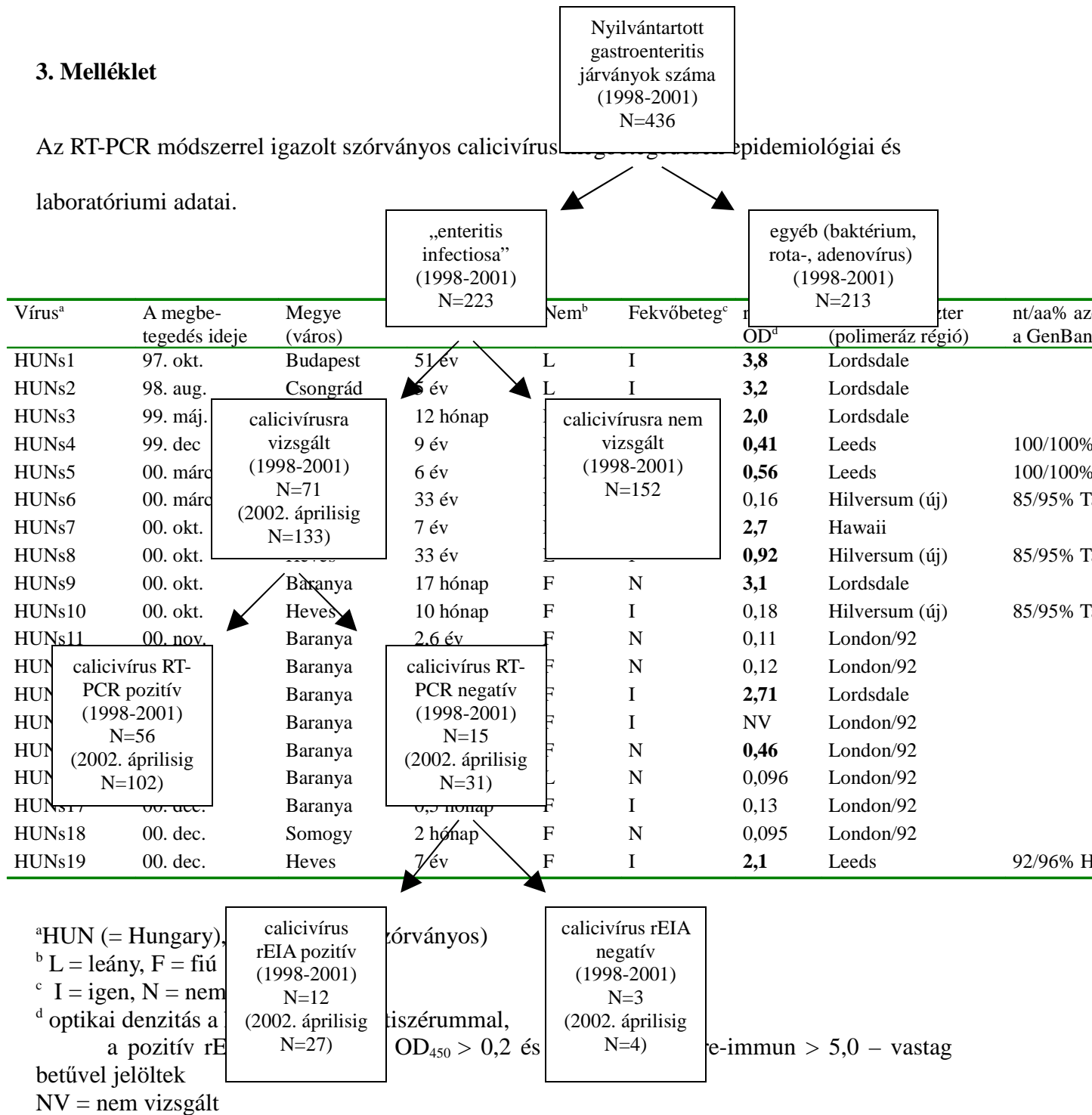
virilab@main.antszbar.hu

2. Melléklet

A Magyarországon nyilvántartott gastroenteritis járványok (1998-2001) szelekciós vizsgálati sémája.

3. Melléklet

Az RT-PCR módszerrel igazolt szórványos calicivírus epidemiológiai és laboratóriumi adatai.



IRODALOM

- Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969; 119:668-673.
- Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Inf Dis* 2000; 181:S336-348.
- Arankalle VA, Parajape S, Emurson SU, Purcell RH, Walimbe AM. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). *J Gen Virol* 1999; 80:1691-1700.
- Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA, Estes MK. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology* 1999; 117:40-48.
- Becker KM, Moe CL, Southwick KL, MacCormack JN. Transmission of Norwalk virus during a football game. *N Engl J Med* 2000; 343:1223-1227.
- Beller M, Ellis A, Lee SH, Drebot MA, Jenkerson SA, Funk E, Sobsey MD, Simmons OD III, Monroe SS, Ando T, Noel J, Petric M, Middaugh JP, Spika JS. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. *JAMA* 1997; 278:563-568.
- Berg DE, Kohn MA, Farley TA, McFarland LM. Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. *J Infect Dis* 2000; 181:S381-386.
- Berke T, Golding B, Jiang X, Cubitt WD, Wolfaardt M, Smith AW, Matson DO. Phylogenetic analysis of caliciviruses. *J Med Virol* 1997; 52:419-424.
- Berke T, Matson DO. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 2000; 145:1421-1436.
- Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. *Bull WHO* 1992; 70:705-714.
- Bern C, Glass RI. Impact of diarrheal diseases worldwide. *Viral infections of the gastrointestinal tract*, 2. kiadás. Marcel Dekker, New York, 1994; 1-26.
- Blacklow NR, Dolin R, Fedson DS, DuPont H, Northrup RS, Hornick RB, Chanock RM. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. A combined clinical staff conference at the Clinical Center of National Institutes of Health. *Ann Intern Med* 1972; 76:993-1008.
- Blacklow NR, Herrmann JE. Norwalk virus. *Proceedings of the ninth BSG SK&F International Workshop*; Windsor, UK Welwyn garden City, Smith Klin and French. 1988; 65-69.
- Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. *N Eng J Med* 1991; 325:252-264.

- Bruenn JA. Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1991; 25:217-226.
- Carter MJ, Milton ID, Turner PC, Meanger J, Bennett M, Gaskell RM. Identification and sequence determination of a feline calicivirus. *Virology* 1992; 190:443-448.
- Caul EO, Appleton H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: An interim scheme for classification. *J Med Virol* 1982; 9:257-265.
- Caul EO. Viral gastroenteritis: small round-structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part II. The epidemiological perspective. *J Clin Pathol* 1996; 49:959-964.
- Centers for Disease Control. Viral agents of gastroenteritis: public health importance and outbreak management. *MMWR* 1990; 39(RR-5):16-17.
- Chadwick PR, McCann R. Transmission of a small round-structure virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Hosp Infect* 1994a; 26:251-259.
- Chadwick PR, Walker M, Rees AE. Airborne transmission of a small round structured virus. *Lancet* 1994b; 2:1292.
- Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Nakao T, Fukui S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* 1979; 4:249-254.
- Clarke IN, Lambden PR. Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis* 2000; 181:S309-316.
- Claeson M, Merson MH. Global progress in the control of diarrheal disease. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9:345-355.
- Cliver DO. Virus transmission via food. *World Health Stat Q* 1997; 50:90-101.
- Cooper PD, Agol VI, Bachrach HL és mtsai. Picornaviridae: second report. *Intervirology* 1978; 10:165-180.
- Cubitt WD, McSwiggan DA. Calicivirus gastroenteritis in north west London. *Lancet* 1981; ii:975-977.
- Cubitt WD. Diagnosis, occurrence and clinical significance of human 'candidate' caliciviruses. *Prog Med Virol* 1989; 36:103-119.
- Cubitt WD. Caliciviruses. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. 2. kiadás, Marcel Dekker, New York 549-568.
- Daniels NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ, Hendricks KA, Reddy S, Rowe SM, Fankhauser RL, Monroe SS, Atmar RL, Glass RI, Mead P. A food-borne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis* 2000; 181:1467-1470.

- Dastjerdi AM, Green J, Gallimore CI, Brown DWG, Bridger JC. The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* 1999; 254:1-5.
- Dedman D, Laurichesse H, Caul EO, Wall PG. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-5. *Epidemiol Infect* 1998; 121:139-149.
- Deneen VC, Hunt JM, Paule CR, James RI, Johnson RG, Raymund MJ, Hedberg CW. The impact of foodborne calicivirus disease: the Minnesota experience. *J Infect Dis* 2000; 181:S281-283.
- de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinjé J, van Leusden F, Bartelds AI, van Duynhoven YT. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001; 154:666-674.
- Dolin R, Blacklow NR, Dupont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140:578-583.
- Duggan S, Santosham M, Glass RI. The management of acute diarrhea in children: Oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. *MMWR* 1992; 41(RR-16):1-20.
- Epinfo, Epidemiológiai Információs Hetilap, Országos Epidemiológiai Központ. Magyarország 1999. évi járványügyi helyzete. 2000; 7:S3:5-11.
- Epinfo, Epidemiológiai Információs Hetilap, Országos Epidemiológiai Központ. Magyarország 2000. évi járványügyi helyzete. 2001; 8:377-380.
- Epinfo, Epidemiológiai Információs Hetilap, Országos Epidemiológiai Központ. A 2001. évi nosocomiális járványok értékelése. 2002a; 9:77-82.
- Epinfo, Epidemiológiai Információs Hetilap, Országos Epidemiológiai Központ. Nosocomiális gastroenteritis járványok tapasztalatai – 2002b. 2002; 9:201-205.
- Estes MK, Atmar RL, Hardy ME. Norwalk and related diarrhea viruses: *Clinical Virology*. Richman and Douglas, 1997; 1073-1095.
- Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS, Graham DY. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 2000; 181:S367-373.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 1998; 178:571-578.
- Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Department of Genetics, University of Washington Seattle 1993.

- Gordon I, Ingraham HS, Korns RF. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exp Med* 1947; 86:409-422.
- Glass PJ, White LJ, Ball JM, LeParc-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. The Norwalk virus ORF3 encodes a minor structural protein. abstract: P21-1. American Society for Virology, 18th Annual Meeting, Univ. of Massachusetts, 1999.
- Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181:S254-261.
- Gonin P, Couillard M, d'Halewyn M-A. Genetic diversity and molecular epidemiology of Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000; 182:691-697.
- Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis DC, Brown DWG. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 1995; 47:392-398.
- Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel H-J. Taxonomy of the Caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181:S322-330.
- Greenberg HB, Wyatt RG, Kalica AR és mtsai. New insight in viral gastroenteritis. Perspective in virology. Vol XI. Alan Liss, New York 1981; 163-187.
- Greenberg HB, Skaar M, Monroe SS. The 22 to 30 nm gastroenteritis agents of man. *Vir Diarr Man Anim* 1990; 7:137-159.
- Greening GE, Mirams M, Berke T. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" associated with gastroenteritis outbreaks in New Zealand. *J Med Virol* 2001; 64:58-66.
- Guo M, Evermann JF, Saif LJ. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch Virol* 2001; 146:479-493.
- Ho M, Glass RI, Pinsky PF, Anderson L. Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. *J Infect Dis* 1988a; 158:1112-1116.
- Ho M, Glass RI, Pinsky PF, Young-Okoh NC, Sappenfield WM, Buehler JW, Gunter N, Anderson LJ. Diarrheal deaths in American children: are they preventable? *JAMA* 1988b; 260:3281-3285.
- Holland JJ, De la Torre JC, Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. *Current topics in Microbiology and Immunology* 1992; 176:1-16.
- Huang PW, Wilton N, Farkas T, Barrett E, Jiang X. Antigenic detection and typing of Norwalk-like viruses by enzyme immune assays in outbreaks of acute gastroenteritis in Virginia

- in 1996-1999. [abstract]. Scientific program and abstracts of the 20th Annual Meeting of American Society for Virology, Madison, Wisconsin 2001.
- Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, Yoshikawa M, Kata N, Okabe N. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis* 2000; 181:S270-274.
- Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990; 250:1580-1583.
- Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992; 66:6527-6532.
- Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993; 195:51-61.
- Jiang X, Cubitt WD, Berke T, Zhong W, Dai X, Nakata S, Pickering LK, Matson DO. Sapporo-like human calicivirus are genetically and antigenetically diverse. *Arch Virol* 1997; 142:1813-1827.
- Jiang X, Espul C, Zhong WM, Cuello H, Matson DO. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol* 1999a; 144:2377-2387.
- Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Meth* 1999b; 83:145-154.
- Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barrett E, Guerrero M, Ruiz-Palacios G, Green KY, Green J, Hale AD, Estes MK, Pickering LK, Matson DO. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassay. *J Infect Dis* 2000; 181:S349-359.
- Jiang X, Huang PW, Goudar R, Farkas T, Zhong WM, Green KY, Estes MK, Matson DO. Development of a polyvalent enzyme immune assay using hyperimmune antisera against nine strains of Norwalk-like viruses [abstract]. Scientific program and abstracts of the 20th Annual Meeting of American Society for Virology, Madison, Wisconsin 2001.
- Jin S, Kilgore PE, Holman RC, Clarke MJ, Gangarosa EJ, Glass RI. Trends in hospitalizations for diarrhea in United States children from 1979-1992: estimates of the morbidity associated with rotavirus. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15:397-404.
- Johansson HPJ, Torvén M, Hammalund A-C, Björne U, Hedlund K-O, Svensson L. Food-borne outbreak of gastroenteritis associated with genogroup I calicivirus. *J Clin Microbiol* 2002; 40:794-798.

- Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Occurrence of Norwalk virus infections among adults in Mexico. *J Infect Dis* 1990; 162:389-393.
- Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, US. pp 21-132.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10:1075-1081.
- Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM. Norwalk group of viruses. *Fields Virology*, 3. kiadás, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, Vol. 1, 783-810.
- Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schronberger LB, Feldman R, Greenberg HB. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. 1982; 96:756-761.
- Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC és mtsai. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50:261-264.
- Koopmans MPG, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, van der Poel W, van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human caliciviruses in The Netherlands. *J Infect Dis* 2000; 181:S262-269.
- Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff C-H. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses *J Infect Dis* 1999; 180:1771-1776.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001.
- Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993; 259:516-519.
- Lambden PR, Clarke IN. Genome organization in the Caliciviridae. *Trends Microbiol.* 1995; 3:261-265.
- Lew JF, Glass RI, Gangros RE, Cohen IP, Bern C. Diarrheal deaths in the United States, 1979-1987: a special problem for the elderly. *JAMA* 1991; 265:3280-3284.
- Liu BL, Clarke IN, Caul EO, Lambden PR. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 1995; 140:1345-1356.
- Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 1999; 73:819-825.

- Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. *J Clin Virol* 2002; 24:137-160.
- Madeley CR, Cosgrove BP. Caliciviruses in man. *Lancet* 1976; 1:199-200.
- Maguire AJ, Green J, Brown DWG, Desselberger U, Gray JJ. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round-structured viruses in East Anglia, United Kingdom, during the 1996-1997 season. *J Clin Microbiol* 1999; 37:81-89.
- Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterol* 2002; 122:1967-1977.
- Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence of airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 2000; 124:481-487.
- Matson DO, Zhong WM, Nakata S, Numata K, Jiang X, Pickering LK, Chiba S, Estes MK. Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses. *J Med Virol* 1995; 45:215-222.
- McDonnell S, Kirkland KB, Hlady WG, Aristeguieta C, Hopkins RS, Monroe SS, Glass RI. Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis. *Arch Intern Med* 1997; 157:111-116.
- McAnulty JM, Rubin GL, Carvan TC, Huntley EJ, Grohman G, Hunter R. An outbreak of Norwalk-like gastroenteritis associated with contaminated drinking water at a caravan park. *Australian J Publ Health* 1993; 17:36-41.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:607-625.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Rabbit hemorrhagic disease virus – molecular cloning and nucleotide sequence of a calicivirus genome. *Virology* 1991; 184:664-676.
- Mounts AW, Holman RC, Clarke MJ, Bresee JS, Glass RI. Trends in hospitalizations associated with gastroenteritis among adults in the United States, 1979-1995. *Epidemiol Infect* 1999; 123:1-8.
- Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000; 181:S284-287.

- Nagy B, Nagy Gy, Meder M, Mocsári E. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. *Acta Vet Hung* 1996; 44:9-19.
- Nakata S, Chiba S, Terahima H, Nakao T. Prevalence of antibody to human calicivirus in Japan and Southeast Asia determined by radioimmunoassay. *J Clin Microbiol* 1985; 22:519-521.
- Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe SS, Glass RI. Correlation of patient immune response with genetically characterized Small Round-Structured Viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990-1995. *J Med Virol* 1997; 53:372-383.
- Noel JS, Liu BL, Humphrey CD, Rodriguez EM, Lambden PR, Clarke IN, Dwyer DM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J Med Virol* 1997a; 52:173-178.
- Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of “Norwalk-like viruses” having a global distribution. *J Infect Dis* 1999; 179:334-344.
- Ohshima T, Yoshizumi S, Sawada H, Uchiyama Y, Katoh Y, Hamaoka N, Utagawa E. Detection and nucleotide sequence analysis of human caliciviruses (HuCVs) from samples in non-bacterial gastroenteritis outbreaks in Hokkaido, Japan. *Microbiol Immunol* 1999; 43:543-550.
- Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore EE, Petersen DE, Ito Y, Mishiro S. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190:894-899.
- O’Ryan ML, Vial P, Mamani N, Jiang X, Estes MK, Ferrecio C, Lakkis HD, Matson DO. Assessment of independent risk factors for antibody acquisition to Norwalk and MX caliciviruses in Chilean individuals. *Clin Infect Dis* 1998;27:789-795.
- Pang X-L, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 2000; S288-294.
- Parashar UD, Monroe SS. “Norwalk-like viruses” as a cause of foodborne disease outbreaks. *Rev Med Virol* 2001; 11:243-252.
- Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977; 297:86-89.

- Payne CM, Rav CG, Bordiun V, Minnich LL, Lebowitz MD. An eight-year study of the viral agents of acute gastroenteritis in humans: ultrastructural observations and seasonal distribution with a major emphasis on coronavirus-like particles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986; 5:39-54.
- Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999; 286:287-290.
- Pringle CR. Virus taxonomy – San Diego 1998. *Arch Virol* 1998; 143:1449-1459.
- Reiman HA, Price AH, Hodges JH. The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (viral dysentery?) *Proc Soc Exp Biol Med* 1945; 59:8-9.
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Seigl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S Ito K, Ishizu T, Moritsugu, Lemon SM. Genetic relatedness of hepatitis A strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992; 73:1365-1377.
- Roerink F, Hashimoto M, Tohya Y, Mochizuki M. Organization of the canine calicivirus genome from the RNA polymerase gene to the poly(A) tail. *J Gen Virol* 1999; 80:929-935.
- Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kimoshita K, Chiba S. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:849-853.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Small-scale preparations of plasmid DNA. *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2. kiadás, 1989; 1.25-1.28.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Electrophoresis buffers. *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2. kiadás, 1989a; B.23.
- Shieh Y-SC, Monroe SS, Fankhauser RL, Langlois GW, Burkhardt III W, Baric RS. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J Infect Dis* 2000; 181:S360-366.
- Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 1998; 143:1215-1221.
- Szűcs Gy, Új M, Mihály I, Deák J, Tóth A, Jiang X, Estes MK. Prevalence of antibody to recombinant Norwalk virus antigen (rNV) in the Hungarian population [abstract PB/112]. *Progress in Clinical Virology Prague, Czech Republic*. 1995.
- Szűcs Gy, Új M. Calicivírusok bennünk és körülöttünk. *Magyar Állatorvosok Lapja* 1998; 120:659-662.

- Tackett CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 2000; 182:302-305.
- Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N. Interaction of recombinant Norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. *J Virol* 2000; 74:11589-11597.
- Tompkins DS, Hudson MJ, Smith HR, Eglin RP, Wheeler JG, Brett MM, Owen RJ, Brazier JS, Cumberland P, King V, Cook PE. A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun Dis Public Health* 1999; 2:108-113.
- Van der Poel WHM, Vinjé J, van der Heide R, Herrera M-I, Vivo A, Koopmans MPG. Presence of “Norwalk-like viruses” in faeces of farm animals. *Emerg Infect Dis* 2000; 6:36-41.
- Vinjé J, Koopmans MPG. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174:610-615.
- Vinjé J, Altena SA, Koopmans MPG. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1997; 176:1374-1378.
- Vinjé J. Molecular detection and epidemiology of human caliciviruses. Thesis, RIVM, Bilthoven, The Netherlands, 1999.
- Vinjé J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DWG, Koopmans MPG. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of “Norwalk-like viruses”. *Arch Virol* 2000a; 145:223-241.
- Vinjé J, Deijl H, van der Heide R, Lewis D, Hedlund K-O, Svensson L, Koopmans MPG. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *J Clin Microbiol* 2000b; 38:530-536.
- Vinjé J, Koopmans MPG. Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000c; 38:2595-2601.
- Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB. Direct measurements of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol* 1988; 62:588-562.
- Wright PJ, Gunsekere IC, Doultree JC, Marshall JA. Small Round-Structured (Norwalk-like) Viruses and classical human caliciviruses in southeastern Australia, 1980-1996. *J Med Virol* 1998; 55:312-320.

Zahorsky J. Hyperemesis hiemis or winter vomiting disease. Arch Pediatr 1929; 46:391.

A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Közlemények

Reuter, G., Kátai, A., Kálmán, M., Szűcs, Gy.:

Humán calicivírus fertőzés első magyarországi igazolása

Orvosi Hetilap 2000; 38:2071-2074.

Reuter, G., Szűcs, Gy.:

Humán calicivírusok – az akut virális gastroenteritisek megbetegedések és járványok gyakori kórokozói

Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2000; 3-4:93-99.

Reuter, G., Kucsera, S., Somogyi, Gy., Lencsés, Gy., Szűcs, Gy.:

Humán calicivírus járvány kórházi osztályon

Orvosi Hetilap 2001; 9:459-463.

Reuter, G., Farkas T., Berke, T., Jiang, X., Matson, D.O., Szűcs, Gy.:

Sapporo-szerű vírusok ismeretlen kórereditű, szórványos gastroenteritisekben

Orvosi Hetilap 2002; 7:351-354.

Szűcs, Gy., Reuter, G.:

Mit kell tudni a humán calicivírusokról

Magyar Orvos 2002; 2:49-50.

Farkas, T., Berke, T., Reuter, G., Szűcs, Gy., Matson, D.O., Jiang, X.:

Molecular detection and sequence analysis of human caliciviruses from acute gastroenteritis outbreaks in Hungary

Journal of Medical Virology 2002; 67:567-573.

Reuter, G., Szűcs, Gy.:

Humán calicivírusok („Norwalk-szerű vírusok”) okozta gastroenteritis járványok gyermekközösségekben Magyarországon, 1998-2001.

Gyermekgyógyászat 2002; 53: 4. szám

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Jiang, X., Matson, D.O., Szűcs, Gy.:

Molecular epidemiology of human calicivirus gastroenteritis outbreaks in Hungary, 1998 to 2000.

Journal of Medical Virology 2002. (nyomtatásban)

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Jiang, X., Matson, D.O., Szűcs, Gy.:

Detection and genetic analysis of Norwalk- and Sapporo-like viruses from sporadic gastroenteritis infections in Hungary (előkészületben)

Reuter, G., Jiang, X., Szűcs, Gy.:

A „Norwalk-szerű vírusok” vezető kóroki szerepe a kórházi (nosocomiális) gastroenteritis járványokban Magyarországon (előkészületben)

Folyóiratban közölt, idézhető előadás-kivonatok

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Bányai, K., Jiang, X., Matson, D.O., Szűcs, Gy.:

Humán calicivírus fertőzések kimutatása hazánkban

Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2000. Suppl. 1 S11.

Szűcs, Gy., **Reuter, G.,** Bányai, K., Új, M.:

A molekuláris vizsgálatok eredményei megváltoztatták a humán calicivírusok klinikai jelentőségét és rendszertanát

Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2000. Suppl. 1 S11.

Szűcs, Gy., **Reuter, G.,** Bányai, K., Jakab, F., Új, M.:

Importance, detection, and taxonomic classification of human caliciviruses

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2001; 48:209-210.

Reuter, G., Kátai, A., Kálmán, M., Farkas, T., Berke, T., Bányai, K., Jiang, X., Matson, D.O., Szűcs, Gy.:

First detection of human calicivirus in a food-borne outbreak in Hungary

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2001; 48:266-267.

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Jiang, X., Szűcs, Gy., Matson, D.O.:

Molecular epidemiology of human calicivirus gastroenteritis outbreaks in Hungary,
1998/2000

Journal of Clinical Virology 2001; 22:170.

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., X. Jiang, Szűcs, Gy., D. O. Matson:

Genetic diversity of human caliciviruses detected in Hungary between 1998 and 2000
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2002; (nyomtatásban)

Reuter, G., Szűcs, Gy.: A „Norwalk-szerű vírusok” vezető kóroki szerepe a kórházi

(nosocomiális) gastroenteritis járványokban Magyarországon

Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2002; (nyomtatásban)

Konferencia, előadás és poszter demonstráció

Farkas, T., Berke, T., **Reuter, G.,** Jiang, X., Matson, D.O., Szűcs, Gy.:

Molecular detection and sequence analysis of four human calicivirus (HuCV) isolates
from acute gastroenteritis (GE) outbreaks in Hungary.

19th Annual Meeting of the American Society of Virology, Fort Collins, Colorado, USA,
2000.

Reuter, G., Kátai, A., Kálmán, M., Farkas, T., Berke, T., Bányai, K., Jiang, X., Matson, D.O.:

Humán calicivírus fertőzés első igazolása étel-miszer – járványból Magyarországon

First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society
for Microbiology, Keszthely, 2000.

Szűcs, Gy., **Reuter, G.,** Bányai, K., Jakab, F., Új, M.:

A humán calicivírusok jelentősége, kimutatásuk és taxonomiai osztályozásuk

First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society
for Microbiology, Keszthely, 2000.

Reuter, G., Kucsera, S., Somogyi, Gy., Lencsés, Gy., Bányai, K., Szűcs, Gy.:

Humán calicivírus járvány kórházi osztályon

Magyar Higiénikus Társaság Nemzeti Kongresszusa, Debrecen, 2000.

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Bányai, K., Jiang, X., Matson, D.O., Szűcs, Gy.:

Humán calicivírus fertőzések kimutatása hazánkban

Magyar Infektológiai Társaság 28. Kongresszusa, Budapest, 2000.

Szűcs, Gy., **Reuter, G.**, Bányai, K., Új, M.:

A molekuláris vizsgálatok eredményei megváltoztatták a humán calicivírusok klinikai jelentőségét és rendszertanát

Magyar Infektológiai Társaság 28. Kongresszusa, Budapest, 2000.

Szűcs, Gy., **Reuter, G.**:

Calicivírusok molekuláris diagnosztikája.

Johan Béla Epidemiológiai Központ, Budapest, 2001.

Szűcs, Gy., **Reuter, G.**:

Virális gastroenteritisek.

Johan Béla Epidemiológiai Központ, Budapest, 2001.

Maszárovics, Z., **Reuter, G.**, Szűcs, Gy., Kissík, I., Enyedi, J.:

Humán calicivírusok jelentősége és jelenléte Heves megyében.

Magyar Gyermekorvosok Társasága, Észak-Kelet Magyarországi Szakosztályának Tudományos Ülése, Eger, 2001.

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Jiang, X., Szűcs, Gy., Matson, D.O.:

Molecular epidemiology of human calicivirus gastroenteritis outbreaks in Hungary, 1998-2000.

5th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Lahti, Finnország, 2001.

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Jiang, X., Matson, D.O., Szűcs, Gy.:

Magyarországon izolált humán calicivírusok genetikai diverzitása, 1998/2000.

Magyar Mikrobiológiai Társaság 50. Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001.

Maszárovics, Z., **Reuter, G.**, Kissík, I., Enyedi, J., Szűcs, Gy.:

Humán calicivírusok (HuCV) detektálása Heves megyében.

XX. Heves Megyei Orvos- Gyógyszerész és V. Szakdolgozói Napok, Gyöngyös, 2001.

Szűcs, Gy., **Reuter, G.**, Krisztalovics, K.:

A humán calicivírus járványok gyakorlati diagnosztikai tapasztalatai.

Országos Bakteriológiai Értekezlet, Hévíz, 2002.

Reuter, G., Szűcs, Gy.: A „Norwalk-szerű vírusok” vezető kóroki szerepe és epidemiológiája az akut gastroenteritis járványokban, Magyarországon. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2002.

Reuter, G., Szűcs Gy.: A „Norwalk-szerű vírusok” vezető kóroki szerepe a kórházi (nosocomiális) gastroenteritis járványokban, Magyarországon. Magyar Infektológiai Társaság 30. Kongresszusa, Szekszárd, 2002.