

**Rotavírus surveillance Magyarországon a prevakcinációs
időszakban**

Ph.D. tézis

Bányai Krisztián

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

2005

**Rotavírus surveillance Magyarországon a prevakcinációs
időszakban**

Ph.D. tézis

Bányai Krisztián

Programvezető: Prof. Dr. Emőd Levente
(Bakteriális fertőzések molekuláris pathogenezeise)

Témavezető: Dr. Szűcs György
(Virális gasztroenteritiszek molekuláris epidemiológiai vizsgálata)

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

2005

Bevezetés

A rotavírusokat a kapszid struktúrában, a genom szerkezetben és a replikációs stratégiában mutatkozó hasonlóságok alapján a *Reoviridae* családba sorolják, amelyen belül önálló nemzetséget (*Rotavirus* genus) alkotnak. A genuson belüli klasszifikáció alapjául az antigén-szerkezetben, a génszekvenciában, valamint a genom-mintázatban mutatkozó különbségek szolgálnak. Szerocsoportokat (röviden csoportokat), alcsoportokat, szerotípusokat és genotípusokat, valamint elektroferotípusokat különítünk el. A csoport- és alcsoport-determináns antigén a VP6 fehérje. Hét csoportot ismerünk (A-G), közülük az A, B és C csoportú rotavírusok okoznak emberi megbetegedéseket. Az A csoportú rotavírusokon belül alcsoportokat különítünk el, melyek azonosítására – az angol subgroup (sg) elnevezés alapján – a sgI, sgII, sgI+II és sg nonI-nonII jelöléseket használjuk. A szerotípus- és genotípus-specifitást a két felszíni antigén (VP7 és VP4) hordozza. A VP7 a G (Glikoprotein antigén) szerotípust/genotípust, a VP4 a P (Proteáz érzékeny antigén) szerotípust/genotípust határozza meg. A szerotípus és genotípus terminusokat aszerint alkalmazzuk, hogy antigéntipizálással (pl., monoklonális antitest alapú enzyme-linked immunosorbent assay (MAb-ELISA) vagy kereszt-neutralizáció) vagy nukleinsav-alapú módszerrel történt-e a meghatározás (pl., nukleinsav szekvencia vizsgálat, reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR), nukleinsav hibridizáció). Jelenleg 15 G és 27 P típust ismerünk; ezek közül 11 G és 12 P típust emberi székletmintákból is azonosítottak. Mindkét felszíni antigén ellen specifikus ellenanyag válasz jön létre. E felismerés miatt ma a rotavírus törzsek az influenza A vírusokéhoz hasonló kettős jelölést kapnak, ahol a P típus specificitást vesszővel elválasztva követi a G típus specificitás (pl. P[9],G3). A rotavírus törzsek genom-mintázatának (más néven RNS profil, elektroferotípus, E-típus) két alapváltozata van, melyeket „hosszú” és „rövid” mintázatnak neveznek és a 10. és 11. génszegment poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) kimutatható relatív vándorlási sebessége alapján különíthetők el. Mindkét alaptípuson belül nagyfokú változatosság figyelhető meg.

Az első, rotavírus okozta emberi fertőzéseket alig három évtizede, 1973-ban írták le. Részben a gyorsdiagnosztikai tesztek elterjedésének

köszönhetően azóta kiderült, hogy ezek a kórokozók, azon belül is az A csoportú rotavírusok a gyermekkori hasmenéses megbetegedések legfőbb okai. A minden évben világszerte előforduló 130-140 millió epizódból 400-500 ezer végződik halállal; az esetek túlnyomó többsége az 5 évesnél fiatalabb gyermekek között fordul elő. A halálos kimenetelű fertőzések száma az elmúlt 20 évben ugyan a felére csökkent, de még így is ezek a vírusok felelnek a gyermekkori, hasmenéssel járó fertőzések okozta halálesetek negyedéért. Noha a rotavírus fertőzések jól kezelhetők orális illetve intravénás elektrolit- és folyadékpótlással, az orvosi ellátás területi egyenlőtlenségei és a rotavírus-fertőzések okozta gazdasági és szociális kihatások miatt a WHO a rotavírus elleni küzdelemben a vakcina fejlesztésnek adott prioritást. Az 1980-as években megformálódó egyik vezető vakcina fejlesztési irányvonalat két megfigyelés határozta meg: (i) az állati törzsek többsége természeténél fogva attenuált az ember számára, valamint (ii) a szerotípus-specifikus immunitás fontos a soron következő fertőzések súlyos tüneteinek kivédésében. Így születtek meg a multivalens állati-emberi reasszortáns vakcinák, melyek humán VP7, esetenként VP4 szerotípusok keverékét (G1 – G4, P[8]) tartalmazzák. E vakcina törzsek mindegyikénél a 11 génszegmentből 10 állati (majom vagy szarvasmarha) rotavírus eredetű egy pedig (a VP7-et és/vagy VP4-et kódoló gén) emberi rotavírus eredetű. A majom rotavírus alapú tetraavalens vakcina (rhesus-human reassortant tetravalent vaccine, RRV-TV) RotaShieldTM néven az USA-ban került forgalomba 1998 nyarán, de alig kilenc hónap múlva a vakcinálás mellékhatásának tulajdonított súlyos kimenetelű bélbetüremkedési (intussusceptio, invaginatio) esetek miatt visszavonták a piacról. Napjainkban egy szarvasmarha alapú pentavalens reasszortáns vakcina (RotaTeqTM, Merck) és egy attenuált humán törzset tartalmazó monovalens, szintén orális vakcina (RotaRixTM, GlaxoSmithKline Biologicals) vár licenszre számos országban, így az Európai Unió országaiban is.

Az 1990-es évek közepétől a küszöbön álló lehetséges vakcinációs programokkal kapcsolatosan számos ország végzett - és végez ma is - felméréseket a rotavírus okozta fertőzések valódi szerepéről és indított nemzeti rotavírus törzsfelügyelő (surveillance) programot. A vakcinációs stratégiákkal összefüggésben a surveillance a két felszíni antigén (VP7 és VP4) szero- és genotípusainak elemzésére irányul. Magyarországon, egyetlen tanulmánytól eltekintve nem folytak olyan átfogó szerotipizáló

vizsgálatok, melyek szisztematikusan elemezték volna a hazánkban keringő humán rotavírusok antigén variánsait. Az az igény, hogy átfogóbb és részletesebb adatokat nyerjünk a hazai rotavírus törzsek epidemiológiai sajátosságairól, alapvetően meghatározta célkitűzéseinket.

Célkitűzések

Céljaink között szerepelt, hogy:

- a gasztroenteritisszel kórházi ápolásban részesülő gyermekek között a rotavírus fertőzések relatív jelentőségéről képet kapjunk más, elsősorban bakteriális fertőzésekkel való összehasonlításban;
- a MAb-ELISA és PAGE módszerek rutinszerű alkalmazásával nagyszámú minta elemzését végezhessük el;
- az RT-PCR módszert meghonosítsuk a rotavírusok epidemiológiai vizsgálatában;
- a fő felszíni antigén (szero)típusainak földrajzi és időbeli megoszlásáról képet kapjunk;
- a kisebb felszíni antigén VP4 (geno)típusainak változatosságát felmérhessük;
- az RNS mintázat, alcsoport, és a felszíni antigének típusainak együttes vizsgálatával feltérképezhessük a leggyakoribb és a kevésbé gyakori allél-kombinációkat, amivel lehetővé válhat reasszortáns törzsek azonosítása;
- a ritka rotavírus törzseket szekvencia- és filogenetikai elemzéssel összehasonlítsuk állatokból izolált törzsekkel, valamint;
- tenyészük őket további szerológiai és genom vizsgálatokhoz;
- reagenseket készítsünk és alkalmazzunk a hazai surveillance-hez;
- adatokat szolgáltatassunk az egészségügy döntéshozóinak a hazai rotavírus törzsek cirkulációjáról, heterogenitásáról, ami egy jövőbeli rotavírus vakcina bevezetését indokoltá teheti.

Anyagok és módszerek

Minták: a rotavírus pozitív székletmintákat hasmenéses gyermekektől gyűjtöttük két földrajzi régióból (Baranya megye és Budapest) 1992 és 2003 között. A diagnosztikai vizsgálatok helyben (az ÁNTSZ Baranya Megyei Intézete, Regionális Virologiai Laboratóriumában és a Fővárosi Szent László Kórház Vírusdiagnosztikai Laboratóriumában) készültek.

Rotavírusok azonosítása: a rutindiagnosztikai vizsgálatok kereskedelemben kapható latex-agglutinációs teszttel (Rotalex, Orion Diagnostica) és immunkromatográfiás módszerrel (Rota Uni-Strip, Coris BioConcept) készültek a gyártó által javasoltak szerint, valamint 'házi' ELISA segítségével. Részben konfirmációs céllal a rotavírus genom-mintázatát PAGE módszerrel vizsgáltuk. Kísérleti jelleggel néhány ritka törzs szövettenyészetben történő izolálását is elvégeztük.

Molekuláris epidemiológiai vizsgálatok: a PAGE-t az egyes törzsek közti eltérések vizsgálatára, kevert fertőzések igazolására, a törzsek dominanciájának földrajzi és időbeli változásainak nyomon követésére is használtuk. Alcsoport (subgroup) meghatározást végeztünk alcsoport-specifikus MAb-ELISA segítségével. A felszíni antigének variánsainak (szerotípusainak ill. genotípusainak) vizsgálatára szerotípus-specifikus MAb-ELISA illetve multiplex RT-PCR módszereket alkalmaztunk, a finomabb eltérések vizsgálatához pedig szekvencia meghatározást és filogenetikai analízist végeztünk.

Számítógépes analízis: A filogenetikai elemzéshez a nyers szekvenciákat a GeneDoc programmal szerkesztettük. Az így kapott szekvenciákból és az adatbázisokban (GenBank/EMBL/DDJB) elérhető szekvenciákból a ClustalX illetve a DAMBE programok segítségével készítettük az illesztéseket. A filogenetikai vizsgálatokat a PHYLIP és a TreeView, valamint a MEGA2 programok segítségével végeztük a 'maximum-likelihood' és 'neighbor-joining' algoritmusokat alkalmazva, statisztikai megerősítéssel ('bootstrap' teszt).

Eredmények

Humán rotavírusok azonosítása gasztroenteritiszes beteganyagban. Csak hozzávetőleges információnk volt arra nézve, hogy mennyi a rotavírus pozitív esetek aránya a vizsgált gasztroenteritiszes beteganyagban. Így például a Szent László Kórházban a hasmenéssel felvett gyermekek körében a rotavírusok aránya évente átlagosan 20-40% volt [Mihály I., szóbeli közlés]. A Kerpel-Fronius Ödön Gyermekkorház Fertőző Osztályával kiépült széleskörű együttműködésnek köszönhetően viszonylag megbízható adatokhoz jutottunk a saját diagnosztikai

tevékenységünkkel összefüggésben Baranya megyére vonatkozóan. Egy 1996 és 2000 között, célzottan gyűjtött adatok alapján összeállított tanulmányunk szerint a rotavírus pozitív esetek aránya a vizsgált időszakban hozzávetőlegesen 21% volt (tartomány: 15-29%). Az éves esetszámok összehasonlításával kimutattuk azt is, hogy a csecsemők és kisgyermekesek körében a rotavírussal fertőzöttek aránya magasabb, mint a bakteriális fertőzéssel felvett gyermekek aránya, és öt éves korig a rotavírus fertőzéssel kapcsolatos kórházi felvétel kumulatív kockázata kétszer, háromszor és negyvenszer nagyobb, mint a *Salmonella*, *Campylobacter* és *Shigella* fertőzésekkel kapcsolatos rizikó. Ezek az adatok a rotavírusok vezető szerepét mutatták a gyermekkori fertőzőes eredetű hasmenéses megbetegedésekben.

Humán rotavírus törzsek azonosítása genom mintázat elemzéssel. A rotavírusok 11 szegmentből álló duplafonalú RNS genomjának gélelektroforetikus vizsgálatát részben a diagnosztikában kiegészítő módszerként, részben a molekuláris epidemiológiai vizsgálatainkkal összefüggésben, prospektív módon végeztük. Így, az 1992 és 2003 között gyűjtött 6936 minta közül a biztosan elemezhető törzsek aránya együttesen 80% volt. A többi minta egy részénél a 11 gén-szegmentből csak néhány (általában 7-9 szegment) volt látható, más részük pedig egyáltalán nem mutatta a jellegzetes genom mintázatot. A két alaptípus, a 'hosszú' (H) és 'rövid' (R) E-típusok relatív megoszlása 94% (H) és 6% (R) volt. A két alaptípuson belül minden évben legalább 7-10 eltérő fő mintázatot lehetett azonosítani, és legalább ugyanennyi, apróbb eltéréseket mutató változatot. A vizsgált 13 esztendő alatt az uralkodó E-típus minden járványos évben, sőt mindkét területen (Budapest és Baranya) más volt. Többnyire a 'hosszú' E-típusú törzsek uralkodtak, kivéve az 1996/1997-es budapesti szezon, amikor a 'rövid' genom mintázatú törzsek domináltak.

Humán rotavírusok G szerotípusainak előfordulása hazánkban. Összesen 3537, 1992 és 2003 között gyűjtött minta G szerotípusát próbáltuk meghatározni MAb-ELISA és RT-PCR módszerrel. A vizsgálathoz elegendő mennyiségben rendelkezésre álló minták arányától függően az összes, laboratóriumunkba érkező minta 15% - 82%-át (átlagosan ~51%-át) vizsgáltuk a VP7 szerotípusra. Összesen 2563 törzset vizsgáltunk meg ELISA-val, és ebből 1971-nél (77%) tudtuk sikeresen meghatározni a szerotípust, RT-PCR-rel pedig 1604-et elemeztünk (köztük 530 MAb-

ELISA-val nem tipizálható mintát), melyek közül 1556 (97%) volt tipizálható. A 3537 feldolgozásra került mintából az ELISA és az RT-PCR módszerekkel együttesen így 3270 mintában (93%) tudtuk sikeresen meghatározni a rotavírus törzsek G típusát.

Ezek között hat különböző G típust mutattunk ki (G1, G2, G3, G4, G6, és G9). A hat G típus megoszlásának vizsgálata a G1 (58%) szerotípusú törzsek relatív túlsúlyát mutatta. A második leggyakoribb törzs a G9 (16%) volt annak ellenére, hogy az első G9 típusú törzset csak 1998-ban azonosítottuk hazánkban és járványos méretekben csak 2000-ben terjedt el. A világszerte közönséges előfordulásának mondható G2 (8%), G3 (1,5%), és G4 (6%) szerotípusú törzsek adták az összes tipizált minta 15,5%-át, vagyis összesen nagyjából annyit, mint a viszonylag újonnan azonosított G9 szerotípusú törzsek. A vizsgált minták között a legkisebb százalékban a G6 (~1%) típusú törzset lehetett azonosítani.

Az itt felvázolt általános kép azonban változatos szezonális mintázatot takart, ahol az egyes szerotípusok előfordulása évről évre változott és voltak olyan évek, amikor bizonyos szerotípusok cirkulációját nem is lehetett kimutatni. A hat azonosított szerotípus közül a G1 szerotípusú törzsek a Baranya megyei nyolc vizsgált szezonból hétben domináltak, a budapesti 11 szezonból pedig kilencben. Ezzel együtt a G1 törzsek relatív gyakorisága évről évre jelentős ingadozást mutatott (23% - 100%), amivel összefüggésben bizonyos rotavírus szezonokban szerotípus váltást tapasztaltunk a cirkuláló törzsek között: egy-egy szezonban a G2 (42%; Budapest, 1996/1997), G4 (43%; Baranya megye, 1999/2000), és G9 (51%; Budapest, 2002/2003) szerotípusú törzsek relatív dominanciája volt megfigyelhető. Egy érdekes megfigyelés volt, hogy az 1999/2000-es szezonban, Baranya megyében a szerotípus váltást a rotavírussal kapcsolatba hozható kórházi esetek számának emelkedése kísérte.

Humán rotavírus P típusok előfordulása hazánkban. A cirkuláló rotavírusok P típusait multiplex RT-PCR módszerrel azonosítottuk. Mintegy 1457 törzs VP4 génjét próbáltuk genotipizálni, ebből 1413 (97%) törzs P típusát sikeresen határoztuk meg.

A viszonylag magas számú tipizált minta ellenére a mintafeldolgozás egyenlőtlen ütemezésben és eltérő algoritmus szerint zajlott. Míg 1992 és 2000 között mindössze 284 mintát elemeztünk, addig 2000 és 2003 között összesen 1173-at. Ez a fajta,

mintaszelekcióban tanúsított "részrehajlás" ugyan elősegítette a különböző, köztük a ritka P típusok azonosítását, de a teljes vizsgálati időszakra vonatkozó relatív gyakoriságuk kiértékelését korlátozta.

Összesen öt P típust mutattunk ki (P[4], P[6], P[8], P[9], és P[14]), melyek közül - az egyetlen P[14] genotípusú törzs kivételével - mindegyik cirkulált csaknem minden esztendőben és mindkét vizsgált régióban.

A P típusok relatív gyakoriságáról csak a 2000 és 2003 közötti időszakra tudtunk megbízható adatokat szolgáltatni. Ekkor a budapesti régióban a P[8] genotípusú törzsek relatív dominanciáját figyeltük meg (89%); a P[4] (3%), P[6] (~1%), és P[9] (~2%) genotípusú törzsek aránya viszont valamivel kevesebb, mint 6% volt.

Gyakori és ritka genom-mintázatok és antigén kombinációk. Hogy feltárjuk a vizsgált területeken cirkuláló törzsek genetikai sokféleségét és megértsük a reasszortáció jelentőségét a vírus evolúciójában, összevontuk az E-, G- és P tipizálásból származó adatokat. Ehhez csatoltuk az al csoport specificitásról szerzett információkat, bár megfelelő adatok az al csoport-specifikus antitestek korlátozott mennyisége miatt csak alig több, mint kétszáz törzs esetén álltak rendelkezésre. A genom mintázat és a különböző antigén specificitások (VP6, VP7 és VP4) együttállásának tanulmányozásával a világszerte elterjedt gyakori gén kombinációkon (P[8],G1 sgII H; P[4],G2 sgI R; P[8],G3 sgII H; P[8],G4 sgII H; P[8],G9 sgII H) túlmenően számos ritka kombinációt is azonosítottunk (P[4],G2 sgI H; P[6],G4 sgII H; P[8],G9 sgI H; P[9],G6 sgI H; P[9],G3 sgI H; P[14],G6 sgI H; P[4],G1 R).

Ritka és újonnan felbukkanó törzsek felszíni antigénjeinek szekvencia és filogenetikai elemzése. Jellemeztük az emberben ritka G6 szerotípusú törzsek és az újonnan egyre szélesebb körben terjedő G9 szerotípusú törzsek felszíni antigénjeit, valamint néhány, hazánkban viszonylag ritka P[6] genotípusú törzs VP4 génjét is.

P[9],G6 és P[14],G6 törzsek molekuláris elemzése. A G6 VP7 génnek három filogenetikai vonalát azonosítottuk. A filogenetikai elemzések szerint a leírt törzsek közül az egyik kecske, a másik szarvasmarha, a harmadik szintén szarvasmarha, illetve bivaly eredetű rotavírus törzsekkel mutat szoros rokonságot.

Az egyetlen nem P tipizálható G6 szerotípusú törzs esetében a szekvencia- és filogenetikai elemzés P[14] genotípusú VP4 specificitást tárt fel, a P[9] genotípusú törzsek VP4 génjei pedig két genetikai vonalat képviseltek.

P[8],G9 törzsek molekuláris elemzése. Hazánkban először 1998-ból származó minták között azonosítottunk G9 szerotípusú törzset. A 2002-2003 évi budapesti rotavírus járvány során a G9 szerotípusú törzsek dominanciáját állapítottuk meg.

A számítógépes elemzés eredményei szerint a magyarországi G9 törzsek VP7 génje megegyezik azzal az újonnan felbukkant filogenetikai vonallal, amelynek képviselői világszerte (Egyesült Államok, India, Ausztrália, Malawi, Anglia, Hollandia, Olaszország, Albánia, Dél-Afrikai Köztársaság, Thaiföld, Japán, Belgium, Szlovénia, Svédország) elterjedtek az elmúlt évtizedben; ezek a törzsek tisztán elkülönülnek az 1980-as években azonosított indiai, japán és egyesült államokbeli variánsoktól. E globálisan elterjedt törzsek feltételezett őseit sertésekben találták meg.

P[6],G4 törzsek VP4 génjének molekuláris elemzése. A hazai viszonylatban ritkának mondható P[6] genotípusú törzsek között két genetikai vonalat azonosítottunk, melyek egyike sem volt ismert korábbi tanulmányokból. Később, olasz munkatársainkkal együttműködve, kb. egy tucatnyi, dél-európai eredetű sertés P[6] genotípusú rotavírus részleges szekvencia elemzésével derült fény e törzsek lehetséges eredetére. A sertés törzseket is magába foglaló filogenetikai elemzésünk már azt mutatta, hogy legalább egy, általunk leírt humán törzs azonos leszármazási vonalba tartozik a Dél-Európában azonosított sertés törzsek néhány képviselőjével.

Saját szekvencia- és filogenetikai elemzéseink és a mások által publikált eredmények azt mutatják, hogy akárcsak a párosujjú patásokból eredeztethető G6 szerotípusú törzsek esetében, a sertés eredetű G9 VP7 gén és P[6] VP4 gén is több, egymástól független transzmissziós esemény során kerülhetett át az emberbe.

Összefoglalás; az új eredmények bemutatása

Az 1990-es évek közepétől, a rotavírusok elleni vakcinációs törekvésekkel összhangban számos országban indítottak surveillance programot a betegség kihatásainak megismerése és a cirkuláló törzsek antigén változatainak felmérése érdekében.

A betegség szociális és gazdasági hatásainak feltárása fontos támpontot nyújt az egészségügy döntéshozói számára arra vonatkozóan, hogy hol, milyen hatást várhatunk a vakcinától (csökkentheti-e a halálozások számát és/vagy mérsékelheti-e az ápolási költségeket), és egyáltalán érdemes-e foglalkozni a vakcina bevezetésének gondolatával egy adott területen. Hazánkban eddig egyetlen ilyen irányú vizsgálat folyt, melynek eredményeit Szűcs és mtsai 1999-ben az Acta Paediatrica különszámában jelentették meg. Eszerint, hazánkban a legmagasabbak között van a rotavírus fertőzéssel kórházi ápolásra felvett beteg gyermekek aránya Európa-szerte, és a kórházi ápolás költségei átlagosan évente 5 millió US\$-nak megfelelő összeget tesznek ki.

A cirkuláló törzsek szerotípusainak, genotípusainak jobb megismerésére vonatkozó igény akkor fogalmazódott meg, amikor felismerték a szerotípus-specifikus (homotípusos) védelem jelentőségét. Ez a megfigyelés vezetett az 1980-as évek közepén a polivalens vakcinák kifejlesztésének irányába, és ez adott új lendületet az ezirányú epidemiológiai vizsgálatoknak egy évtizeddel később, amikor az első polivalens, reasszortáns vakcina, az RRV-TV (RotaShieldTM) bevezetéséhez a világ karnyújtásnyi távolságba került. Jelen tanulmány a surveillance aktivitás e területének hazai meghonosítása céljából készült.

Ezek a vizsgálatok gyakorlatilag mindenütt a világon a felszíni antigének variánsainak felmérésére irányulnak. Ugyanakkor a törzsek szóródásának nyomon követésére, kevert fertőzések igazolására, új(szerű) törzsek azonosítására más módszerekre is szükség lehet (pl. alcsoport meghatározás, elektroferotipizálás, nukleinsav szekvencia meghatározás). A nemzetközi gyakorlat szerint mind a szerotípus-specifikus MAb-ELISA, mind a genotípus-specifikus oligonukleotid keverékekre épülő multiplex RT-PCR rendszerek elfogadottak. Vizsgálatainkban mindkét módszert alkalmaztuk a G-típus meghatározásra. A P típus meghatározásra – mivel megbízható típus-specifikus monoklonális antitesteket eddig még nem sikerült előállítani – csak a multiplex RT-PCR módszert alkalmaztuk. Konfirmációs

eszközként esetenként a nukleinsav szekvencia meghatározást és filogenetikai elemzést választottuk.

E módszertani arzenál kombinált alkalmazásával a célkitűzéseink tükrében az alábbi új(szerű) felismeréseket tettük:

- A gastroenteritisz miatt kórházi ápolásban részesülő gyermekek között a rotavírus fertőzéssel ápoltak száma magasabb, mint az enterális baktérium (*Salmonella*, *Shigella* és *Campylobacter*) fertőzéssel ápoltaké.
- A PAGE módszer rutinszerű alkalmazásával a laborunkba érkező minták nagy része (~80%-a) esetében lehetővé vált a molekuláris epidemiológiai vizsgálatok elindítása; a vizsgálatot szűrő módszerként használtunk a gyakori és ritka törzsek elkülönítésére.
- A szerotipizáló MAb-ELISA technikával nagyszámú minta elemzését tudtuk elvégezni.
- A genotipizáló, multiplex RT-PCR módszert meghonosítottuk a rotavírusok epidemiológiai vizsgálatában. (Ez nagy áttörést jelentett az érzékenység és a fajlagosság fokozásában is.) Számos, MAb-ELISA módszerrel nem tipizálható törzs genotípusát RT-PCR-rel meg tudtuk határozni.
- A MAb-ELISA és RT-PCR módszerek eredményeinek összefésülésével átfogó képet kaptunk a fő felszíni antigén (szero)típusainak földrajzi és időbeli megoszlásáról.
- Az azonosított törzsek között először igazoltuk a pandémiás G9 szerotípusú törzsek hazai előfordulását, első alkalommal 1998-ban, majd az 1999/2000-es rotavírus szezontól folyamatosan. Szekvencia és filogenetikai elemzéssel igazoltuk, hogy a hazánkban 1998 és 2001 között cirkuláló G9 rotavírusok a domináns genetikai vonalhoz tartoznak és jól elkülöníthetők mind az 1980-as évek törzseitől, mind a napjainkban “egzotikus” tájakon felbukkanó törzsektől.
- A kisebb felszíni antigén, a VP4 (geno)típusainak vizsgálatával sikerült azonosítanunk öt P genotípus hazai előfordulását, bár a G típustól eltérően, ezek földrajzi és időbeli változásait nem sikerült teljes egészében feltárnunk.
- Az RNS mintázat, al csoport, és a felszíni antigének típusainak együttes vizsgálatával feltérképeztük a leggyakoribb és a kevésbé gyakori génekombinációkat, és ezzel lehetővé vált a közönséges előfordulású törzsekhez képest ritka, reasszortáns törzsek

azonosítása is. A vizsgált időszakban (1992 és 2003 között), részben a molekuláris technikák bevezetésének köszönhetően Magyarországon korábban nem azonosított törzsek kerültek elő (pl. P[9],G3; P[9],G6; P[14],G6; P[6],G4; P[4],G1).

- A ritka rotavírus törzsek (P[14],G6; P[9],G6 és P[6],G4) közül néhánynak a felszíni antigénjeit szekvencia- és filogenetikai elemzésnek vetettük alá. E törzsek egy része állati, főleg sertés- és bivaly/szarvasmarha-eredetű törzsekkel mutatott közelebbi rokonságot, ami az egyes rotavírus törzsek zoonózisos eredetére vonatkozó elképzeléseket támasztja alá. Több, általunk kimutatott törzs sehol másutt a világon emberben nem került azonosításra, ugyanakkor lehetséges állati őseiket már megtalálták.
- Világviszonylatban is egyedülálló az a megfigyelésünk, hogy a G6 szerotípusú törzsek, noha alacsony gyakorisággal (~1%), de 1995-től kezdve folyamatosan kimutathatóak voltak egészen az utolsó vizsgált esztendőig, 2003-ig. A felszíni antigének szekvencia- és filogenetikai elemzésével azt is feltártuk, hogy a G6 VP7 specificitás valószínűleg több, egymástól független zoonózis esemény eredményeként került át az emberbe.
- A ritka magyarországi humán törzsek egy részét sejt kultúrához adaptáltuk és e törzsek ma már az NIH rotavírus törzskollekció részét képezik.
- Saját tapasztalatunk, de a szakirodalomból is jól ismert, hogy a típus meghatározásba vont rotavírus törzsek 5-40%-a nem-típusozható a rendelkezésre álló reagensekkel. Feltételezhető tehát, hogy e minták egy része talán a Magyarországon endémiásnak számító G6 szerotípusba tartozik. Hogy megpróbáljuk segíteni e törzsek epidemiológiai jelentőségének felmérését, típus-specifikus primereket terveztünk, melyeket sikerrel alkalmaztunk nemcsak a hazai, hanem néhány, a világ különböző részein azonosított G6 szerotípusú törzs kimutatásában is.
- Vizsgálatainkról konferencia prezentációkkal, valamint magyar és angol nyelvű ismeretterjesztő és tudományos közleményekkel kívántunk adatokat szolgáltatni az egészségügy döntéshozóinak a hazai rotavírus törzsek cirkulációjáról, heterogenitásáról, amelyek reményeink szerint elegendő epidemiológiai háttér információt nyújtanak ahhoz, hogy kellő időben megfelelő döntés szülessen majd a rotavírus vakcina jövőbeli bevezetéséről.

Publikációs jegyzék

A disszertáció alapját képező közlemények

- *Cikkek:*

1. **Bányai K**, Gentsch JR, Glass RI, Szűcs G. 2003. Detection of human rotavirus serotype G6 in Hungary. *Epidemiology and Infection* 130:107-112 (IF: 1,509)
2. **Bányai K**, Gentsch JR, Griffin DD, Holmes JL, Glass RI, Szűcs G. 2003. Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary. *Journal of Medical Virology* 71:124-134 (IF: 2,371)
3. **Bányai K**, Gentsch JR, Új M, Mihály I, Glass RI, Szűcs G. 2004. Eight-year survey of human rotavirus strains demonstrates circulation of unusual G and P types in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology* 42:393-397 (IF: 3,439)
4. **Bányai K**, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Bene J, Melegh B, Glass RI, Szűcs G. 2004. Molecular epidemiology of P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *Journal of Medical Microbiology* 53:791-801 (IF: 2,484)
5. **Bányai K**, Martella V, Jakab F, Melegh B, Szűcs G. 2004. Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. *Journal of Clinical Microbiology* 42:4338-4343 (IF: 3,439)
6. **Bányai K**, Sas Y, Varga L, Szűcs G. 2004. Survey of rotavirus infections in a Hungarian paediatric hospital. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 51:431-435 (IF: –)
7. **Bányai K**, Szűcs G. 2005. Indokok és kérdések a rotavírusvakcina hazai bevezetésével kapcsolatban. *Gyermekgyógyászat* 56:196-208 (IF: –)
8. **Bányai K**, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Meleg E, Mihály I, Szűcs G. 2005. Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *Journal of Medical Virology* 76:414-423 (IF: 2,331)
9. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, **Bányai K**, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. 2005.

Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *Journal of Infectious Diseases* 192:S146-S159 (IF: 4,943)

• ***Konferencia előadások, poszterek és folyóiratban megjelent kivonataik (Abst):***

1. **Bányai K**, Gentsch J, Holmes J, Griffin D, Glass R, Új M, Reuter G, Szűcs G – Rotavírus törzsek vizsgálata Magyarországon hat egymást követő rotavírus-szezonban (poszter; MMT 2000. évi Nagygyűlése; Keszthely; Abst: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2001, 48(2):224)
2. **Bányai K**, Varga L, Sas Y, Új M, Reuter G, Szűcs G – Rotavírus fertőzések jelentősége a Baranya Megyei Gyermekkorház fertőző osztályának gasztroenterális anyagában négy rotavírus szezonban (1996-2000) (poszter; MHT 2000. évi nemzeti kongresszusa; Debrecen)
3. **Bányai K**, Gentsch J, Glass R, Szűcs G, Reuter G, Jakab F – G6 szerotípusú rotavírusok kimutatása Magyarországon – másodikként Európában (poszter; Magyar Infektológiai Társaság Vándorgyűlése, 2000, Budapest; Abst: *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia*, 2000, Suppl. 1. S26)
4. Gentsch J, Laird A, **Bányai K**, Griffin D, Cunliffe N, Shin G, Sen A, Jiang B, Glass R – Emerging rotavirus serotypes: implications for global vaccination programs (poszter; 12th International Congress of Virology, 2002; Párizs, Franciaország)
5. **Bányai K**, Jakab F, Új M, Szűcs G – G9 szerotípusú humán rotavírusok azonosítása és filogenetikai elemzése (előadás; MMT 2002. Évi Nagygyűlése; Balatonfüred; Abst: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2003, 51(1-2):179)
6. **Bányai K**, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Bene J, Melegh B, Glass RI, Szűcs G – Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001 (poszter; 8th International Symposium on dsRNA Viruses 2003; Castelvechio Pascoli, Olaszország)
7. **Bányai K** – Rotavírus surveillance a vakcinációt megelőző időszakban Magyarországon (előadás; XI. Országos Oltóanyag Konferencia; 2005; Eger)

Egyéb közlemények

• *Könyvfejezetek:*

1. Reuter G, Jakab F, **Bányai K**, Szűcs Gy. Gasztroenteritist okozó vírusok. In: Berencsi Gy (szerk.) Orvosi molekuláris virológia. 22-39. old. 2005
2. **Bányai K**, Szűcs Gy. Acut enteritist okozó vírusinfekciók epidemiológiája, diagnosztikája, klinikuma és megelőzésének lehetőségei. In: Túri S (szerk.) Gyermekgyógyászati továbbképző előadások. Tiszaparti esték 2004-2005 (Nyomtatásban)

• *Cikkek:*

1. **Bányai K**, Angyal M, Körmendi É, Lakatos F, Új M, Szűcs G. 2002. Humán rotavírus járvány felnőtt közösségben. Orvosi Hetilap 143:1347-1352 (IF: –)
2. **Bányai K**, Máté Z, Ádám É, Új M, Nász I, Szűcs G. 2003. Screening adenoviruses in stool samples: evaluation of a genus-specific monoclonal antibody based enzyme immunoassay. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 50:23-32 (IF: –)
3. Palya V, Glávits R, Dobos-Kovács M, Ivanics É, Nagy E, **Bányai K**, Reuter G, Szűcs G, Dán Á, Benkő M. 2003. Reovirus identified as cause of disease in young geese. Avian Pathology 32:129-138 (IF: 1,271)
4. Palya V, Glávits R, Dobos-Kovács M, Ivanics É, Nagy E, **Bányai K**, Reuter G, Szűcs G, Dán Á, Benkő M. 2003. Növendék ludak reovírus okozta betegsége (másodközlés). Magyar Állatorvosok Lapja 125:406-414 (IF: 0,089)
5. **Bányai K**, Jakab F, Reuter G, Bene J, Új M, Melegh B, Szűcs G. 2003. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. Archives of Virology 148:2281-2291 (IF: 1,876)
6. Jakab F, Meleg E, **Bányai K**, Melegh B, Tímár L, Péterfai J, Szűcs G. 2004. One year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary – Occurrence and genetic analysis of astroviruses. Journal of Medical Virology 72:71-77 (IF: 2,331)
7. Martella V, Ciarlet M, Baselga R, Arista S, Elia G, Lorusso E, **Bányai K**, Terio V, Madio A, Ruggeri F, Falcone E, Camero M, Decaro N, Buonavoglia C. 2005. Sequence analysis of the VP7 and

- VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology* 337:111-123 (IF: 3,071)
8. Jakab F, Péterfai J, Meleg E, **Bányai K**, Mitchell DK, Szűcs G. 2005. Clinical characteristics of human astrovirus-associated infections diagnosed in 1997 to 2002 in Hungary. *Acta Paediatrica* 94:667-671 (IF: 1,143)
 9. **Bányai K**, Forgách P, Erdélyi K, Martella V, Bogdán Á, Hocsák E, Havasi V, Melegh B, Szűcs G. 2005. Identification of the novel lapine rotavirus genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry. *Virus Research* 113:73-80 (IF: 2,155)
 10. **Bányai K**, Palya V, Benkő M, Bene J, Havasi V, Melegh B, Szűcs G. 2005. The goose reovirus genome segment encoding the minor outer capsid protein, $\sigma 1/\sigma C$, is bicistronic and shares structural similarities with its counterpart in muscovy duck reovirus. *Virus Genes* 31:285-291 (IF:1,25)
 11. Jakab F, Péterfai J, Verebély T, Meleg E, **Bányai K**, Mitchell DK, Szűcs G. Human astrovirus infection associated with childhood intussusception. *Pediatrics International* (Nyomtatásban; IF: 0,58)
 12. Martella V, **Bányai K**, Ciarlet M, Iturriza-Gomara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, Decaro N, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Lavazza A, Baselga R, Buonavoglia C. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* (Nyomtatásban; IF: 3,071)
 13. Martella V, Ciarlet M, **Bányai K**, Lorusso E, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S, Medici MC, Desario C, Decaro N, Lavazza A, Tempesta M, Buonavoglia C. Identification of a novel VP4 genotype carried by a G5 porcine rotavirus strain. *Virology* (Közlésre elfogadva; IF: 3,071)
 14. PROTECT [**Bányai K**, Desselberger U, Franco E, Giaquinto C, Grimpel E, Huppertz HI, Meurice F, Meszner Z, Mrukowicz J, Rodrigo C, Soriano-Gabarro M, Tatochenko V, Vesikari T, De Vos B, Wolleswinkel-van den Bosch J]. The pediatric burden of rotavirus disease in Europe. *Epidemiology and Infection* (Szerkesztői útmutatásnak megfelelően átdolgozás alatt)
 15. Kowalska-Duplaga K, Mrukowicz JZ, Strus M, Heczko P, Krobicka B, Szűcs G, **Bányai K**, Kurowska-Baran D. LACTOBIF[®], a marketed probiotic product containing *Bifidobacterium*

ruminantium, was not effective in the treatment of acute rotavirus diarrhoea in infants. Pediatrics (Szerkesztői útmutatásnak megfelelően átdolgozás alatt)

• **Konferencia előadások, poszterek és folyóiratban megjelent kivonataik (Abst):**

1. Szűcs G, Reuter G, **Bányai K**, Jakab F, Új M – A humán calicivírusok jelentősége, kimutatásuk és taxonómiai osztályozásuk (előadás; MMT 2000. évi Nagygyűlése; Keszthely; Abst: Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2001, 48(2):209-210)
2. Reuter G, Kátai A, Kálmán M, Farkas T, Berke T, **Bányai K**, Jiang X, Matson DO, Szűcs G – Humán calicivírus fertőzés első igazolása étel-miszer-járványból Magyarországon (előadás; MMT 2000. évi Nagygyűlése; Keszthely; Abst: Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2001, 48(2):266-267)
3. Jakab F, **Bányai K**, Reuter G, Szűcs G – A humán astrovírusok kimutatása tenyésztéssel és molekuláris biológiai módszerekkel (előadás; MHT 2000. évi nemzeti kongresszusa; Debrecen)
4. Reuter G, Kucsera S, Somogyi G, Lencsés G, **Bányai K**, Szikra L, Szűcs G – Humán calicivírus járvány kórházi osztályon (előadás; MHT 2000. évi nemzeti kongresszusa; Debrecen)
5. Szűcs G, Reuter G, **Bányai K**, Jakab F, Új M – A molekuláris vizsgálatok eredményei megváltoztatták a human calicivírusok klinikai jelentőségét és rendszertanát (előadás; MIT 2000. évi vándorgyűlése; Budapest; Abst: Infektológia és Klinikai Mikrobiológia, 2000, Suppl. 1. S11)
6. Reuter G, Farkas T, Berke T, **Bányai K**, Jiang X, Matson DO, Szűcs G – Human calicivírus fertőzések kimutatása hazánkban (előadás; MIT 2000. évi vándorgyűlése; Budapest. Abst: Infektológia és Klinikai Mikrobiológia, 2000, Suppl. 1. S11)
7. **Bányai K**, Reuter G, Új M, Szűcs G – Picobirnavírus kimutatása emberi székletmintából (poszter; MMT 2001. Évi Nagygyűlése, Balatonfüred; Abst: Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2003, 50(2-3):281)
8. Jakab F, Tímár L, **Bányai K**, Szűcs G – A humán astrovírus fertőzések jellemzői és klinikai vonatkozásai (előadás; MMT 2002. Évi Nagygyűlése; Balatonfüred; Abst: Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2003, 51(1-2):178)

9. Martella V, Baselga R, Ciarlet M, Lorusso E, Decaro N, Buonavoglia D, **Bányai K**, Buonavoglia C – Identification of an atypical porcine rotavirus with a VP7 gene resembling human G2 rotaviruses (előadás; European Society for Virology Meeting 2004; Madrid, Spanyolország)
10. Meleg E, Jakab F, Kocsis B, **Bányai K**, Melegh B, Szűcs G – Humán astrovírusok első kimutatása szennyvízmintákból Magyarországon (előadás; PhD Tudományos Napok; 2005; Budapest)
11. Martella V, **Bányai K**, Ciarlet M, Lorusso E, De Grazia S, Camero M, Corrente M, Lavazza A, Ricci D, Buonavoglia C – Analysis of porcine P[6] rotaviruses identifies human-like strains and provides evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events (poszter; 24th Annual Meeting of the American Society for Virology 2005; Penn State University; USA)
12. Meszner Z, **Bányai K**, Pazdiora P, Mrukowicz J, Molnar G, Gorelov AV, Avdicova M, Kraigher A – Retrospective analysis of childhood viral gastroenteritis in seven(six) countries in Central and Eastern Europe (CEE) (előadás; 23rd Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases 2005, Valencia, Spanyolország)
13. Martella V, **Bányai K**, Ciarlet M, Iturriza-Gómara M, Lorusso E, De Grazia S, Ricci D, Medici MC, Tempesta M, Buonavoglia C – Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses (poszter; 1st European Rotavirus Biology Meeting 2005; Párizs, Franciaország)
14. Szűcs Gy, **Bányai K** – A rotavírus fertőzés nagyságrendje és költségkihatásai (előadás; A Magyar Gyermekeorvosok Társasága és a Magyar Gasztroenterológiai Társaság Gyermekgasztroenterológiai Szekciójának XXII. Tudományos Ülése 2005; Eger)

Könyvfejezetek száma: 2

Cikkek száma: 22 (+ 2 átdolgozás alatt)

Konferencia prezentációk száma: 21

Összesített impakt faktor: 40,424

Független idézések száma: 20