dc_704_13

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A BUROK NÉLKÜLI, POZITÍV, EGYSZÁLÚ RNS (+ssRNS) GENOMÚ VÍRUSOK SOKSZÍNŰ VILÁGA

DR. REUTER GÁBOR KAMILLÓ

PÉCS, 2013

dc_704_13

„Látni, amit mindenki lát,
és gondolni, amit még senki nem gondolt."
Szent-Györgyi Albert

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ... 6

BEVEZETÉS ... 8

CÉLKITŰZÉSEK ... 16

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK ... 17

Humán és állati vizsgálati minták ... 17
Epidemiológiai és klinikai adatgyűjtés ... 18
Nukleinsav izolálás ... 18
Hagyományos RT-PCR ... 19
Teljes virális genomok meghatározása 5' és 3' RACE, Long-range PCR és „genome walking" módszerekkel ... 19
Szekvencia, faj, nemzetség és konzervatív génszakaszokra tervezett szűrő, specifikus, „univerzális" és degeneratív primerek ... 20
Agaróz-gélelektroforézis ... 21
Szekvenálás (Sanger) ... 21
Szekvencia-független virális nukleinsav amplifikáció és 454-pyroszekvenálás ... 21
Szekvencia és filogenetikai elemzés ... 22
Az RNS másodlagos szerkezetének elemzése ... 23
Rekombináció elemzés ... 23
Nukleotid összetétel elemzés („Nucleotide Composition Analysis" - NCA) ... 23
Polyprotein vágási helyek elemzése ... 24
Új picornavírus nemzetség definíciója ... 24
Vírustenyésztés ... 25

EREDMÉNYEK ... 26

CALICIVIRIDAE ... 26

Norovírus nemzetség ... 27
Norovírusok emberben ... 27
Norovírus járványok hazánkban ... 27
A norovírusok pandémiás szerepe ... 41
Norovírusok állatokban ... 44
Bovine (szarvasmarha) norovírus ... 44
Porcine (sertés) norovírus ... 47
Sapovírus nemzetség ... 49
Sapovírusok emberben ... 49
Szórványos sapovírus esetek hazánkban ... 49
Sapovírus járvány hazánkban ... 50
Sapovírusok állatokban ... 53
Porcine (sertés) sapovírus ... 53
Nebovírus nemzetség ... 59

PICORNAVIRIDAE ... 61

Enterovírus nemzetség ... 62
Porcine (sertés) enterovírus 14 (EV-G3) és 15 (EV-G4) ... 62
Ovine (juh) enterovírus (EV-G5) ... 65
Humán enterovírus C109 (EV-C109) ... 69
Hepatovírus nemzetség ... 70
Hepatitis A vírus ... 70
Kobuvírus nemzetség ... 79
Porcine (sertés) kobuvírus ... 80
Bovine (szarvasmarha) kobuvírus ... 86
Aichi vírus (kobuvírus emberben) ... 86
Parechovírus nemzetség ... 87
Humán parechovírusok ... 87
Teschovírus nemzetség ... 90
Porcine (sertés) teschovírus vaddisznókban ... 90
Potenciális nemzetségalkotó, új picornavírus fajok ... 91
„Unassigned” nemzetség ... 92
Quail (fürj) picornavírus ... 92
„Gallivírus” nemzetség ... 96
Turkey (pulyka) picornavírus ... 96
„Hunnivírus” nemzetség ... 101
Bovine (szarvasmarha) hungarovírus
és ovine (juh) hungarovírus ... 101

HEPEVIRIDAE ... 108

Hepatitis E vírus emberben és állatokban (sertés, szarvasmarha,
vaddisznó és őz) hazánkban ... 109
A hepatitis E vírus kimutatása és epidemiológiája emberben ... 110
A hepatitis E vírus kimutatása és epidemiológiája állatokban ... 112
Szekvencia és filogenetikai elemzés ... 113
A hepatitis E vírusok molekuláris epidemiológiája Európában –
a gazdaszervezet és a földrajzi eloszlás kapcsolata ... 116

ASTROVIRIDAE ... 117

Humán astrovírus okozta gastroenteritis járvány ... 117
Új, állati eredetű astrovírus fajok ... 117
Porcine (sertés) astrovírus (PAstV4) ... 117
Ovine (juh) astrovírus (OAstV2) ... 121
Wild boar (vaddisznó) astrovírus (WBAstV1) ... 123

Új, dicistronos +ssRNS genomú vírus kimutatása és meghatározása ... 125

MEGBESZÉLÉS ... 131

Calicivírusok (*Caliciviridae*) ... 132
Picornavírusok (*Picornaviridae*) ... 143
Hepatitis E vírus (*Hepeviridae*) ... 163
Astrovírusok (*Astroviridae*) ... 167
Új, +ssRNS genomú vírus a *Picornavirales* rendben ... 169

A +ssRNS genomú vírusok világa az új módszerek fényében 170

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK 176

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS 180

JEGYZÉKEK 182

Irodalomjegyzék 182
Scientometria 199
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények 199
Egyéb közlemények 205
Könyvfejezetek 206

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A, C, G, T/U	adenin, citozin, guanin, timin/uracil nukleotidok
aa	aminosav
Ag	antigén
ALP	alkalikus foszfatáz
ÁNTSZ	Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat
BEV	bovine (szarvasmarha) enterovírus
BHuV	bovine (szarvasmarha) hungarovírus
bp	bázispár
BSL	biosafety level (biobiztonsági szint)
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
CF	canonical factor (általános tényező)
CI	confidence interval (megbízhatósági intervallum)
CMV	cytomegalovírus
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
EBV	Epstein-Barr vírus
E. coli	*Escherichia coli*
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzimhez kötött immunesszé)
EMCV	encephalomyocarditis vírus
EV	enterovírus
EVENT	Enteric Virus Emergence – New Tools
FBVE	Foodborne Viruses in Europe
FMDV	foot-and-mouth disease vírus
G	genocsoport
γGT	gamma-glutamil transzpeptidáz
GOT	glutamát-oxálacetát transzamináz
GPT	glutamát-piruvát transzamináz
HAV	hepatitis A vírus
HBV	hepatitis B vírus
HCV	hepatitis C vírus
HEV	hepatitis E vírus
HPeV	humán parechovírus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság)
IgM	immunglobulin M
IGR	intergenic region (intergenetikus régió)
INR	international normalized ratio (nemzetközi normalizált ráta)
IRES	internal ribosomal entry site (belső riboszóma kötő hely)
IU	international unit (nemzetközi egység)
LDH	laktát-dehidrogenáz
$MgCl_2$	magnézium-klorid
mM	millimól
M-MLV-RT	moloney murine (rágcsáló) leukémia vírus reverz transzkriptáz
NCA	Nucleotide Composition Analysis (nukleotid összetétel elemzés)
nm	nanométer
nt	nukleotid
OAstV	ovine (birka) astrovírus
OEK	Országos Epidemiológiai Központ

OEV	ovine (birka) enterovírus
OHuV	ovine (birka) hungarovírus
OR	odds ratio (esély arány)
ORF	open reading frame (nyílt leolvasó keret)
PAstV	porcine (sertés) astrovírus
PBS	phosphate buffered saline (foszfáttal pufferelt sóoldat)
PCR	polimeráz láncreakció
PEV	porcine (sertés) enterovírus
pmol	picomol
poly(A)	polyadenilát
PTB	p(Y) tract-binding protein (pyrimidin részt kötő fehérje)
PTV	porcine (sertés) teschovírus
QPV	quail (fürj) picornavírus
RACE	rapid amplification of cDNA ends (a cDNS végek gyors amplifikációja)
RdRp	RNS-függő RNS polimeráz
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz-transzkriptáz
RT-PCR	reverz-transzkripció polimeráz láncreakció
seBI	szérum bilirubin
ssRNS	egyszálú (single-stranded) RNS
+ssRNS	pozitív, egyszálú (single-stranded) RNS
Tm	melting temparture (olvadáshő)
TBE	tris-borát-EDTA (tris(hydroxymetil)aminometán-bórsav-etiléndiamin-tetraecetsav)
UTR	untranslated region (nem kódoló régió)
UV	ultraviola
VP	viral protein (vírus fehérje)
VPg	viral protein genome-linked (genomhoz kapcsolt vírus protein)
WBAstV	wild boar (vaddisznó) astrovírus
µl	mikroliter
µM	mikromól

BEVEZETÉS

A vírusok világa szám, méret, forma és összetétel szerint igazi kavalkádot mutat. A virális genom replikációban mutatott természete szerint a jelenleg ismert víruscsaládok 3 csoportba sorolhatók (Flint et al., 2009). Ezek az RNS, az RNS/DNS átmenetet mutató retrovírusok és a DNS genomú vírusok. Mai tudásunk szerint ez a sorrend egyben e nukleinsav formák időbeli megjelenési sorrendjét is mutathatja a Földi élet kialakulása során (Koonin et al., 2006). E felosztáson belül a jelenleg ismert vírusgenomok 7 típusát különböztethetjük meg (három RNS genom típus: 1. pozitív, egyszálú RNS, 2. negatív, egyszálú RNS, 3. kettősszálú RNS; két átmeneti RNS-DNS genom típus reverz transzkriptáz (RT) enzim igénybe vételével: pozitív RNS(RT), kettősszálú DNS(RT); és két DNS genom típus: egyszálú DNS, kettőszálú DNS). Mind a 7 csoport tagjai képesek gerinceseket megfertőzni, de a jelen tudásunk szerint az egyszálú RNS genomú („single-stranded” RNS = ssRNS) vírusok csoportja a legnépesebb (Flint et al., 2009).

A ssRNS genomú vírusokon belül a pozitív, egyszálú RNS (+ssRNS) genomú vírusok - melyek evolúciós szinten prokaryota mRNS molekulákat utánoznak és talán igen ősi vírusok (Koonin et al., 2006; Koonin et al., 2008) – alkotják a legszámosabb csoportot a planétán; 27 családját ismerjük (Flint et al., 2009). Az *Arteriviridae, Astroviridae, Caliciviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Hepeviridae, Nodaviridae, Picornaviridae* és *Togaviridae* családokba olyan vírusok is tartoznak, melyek emlősöket is fertőznek. Az *Astroviridae, Caliciviridae, Hepeviridae* és *Picornaviridae* családokba tartozó +ssRNS vírusok burokkal (peplon) nem rendelkeznek. Észre kell venni, hogy e négy burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS genomú (+ssRNS) víruscsaládnak számtalan közös, rájuk jellemző egyedi jellegzetességük van: kis vírus méret (átmérő: 28-38 nm); ikozahedrális kapszid szimmetria; alacsony fertőző dózis; rövid replikációs idő a gazdasejtben; magas mutációs ráta; extrém nagy genetikai diverzitás („kvázispecies”); heveny fertőzés és csak átmeneti jelenlét a

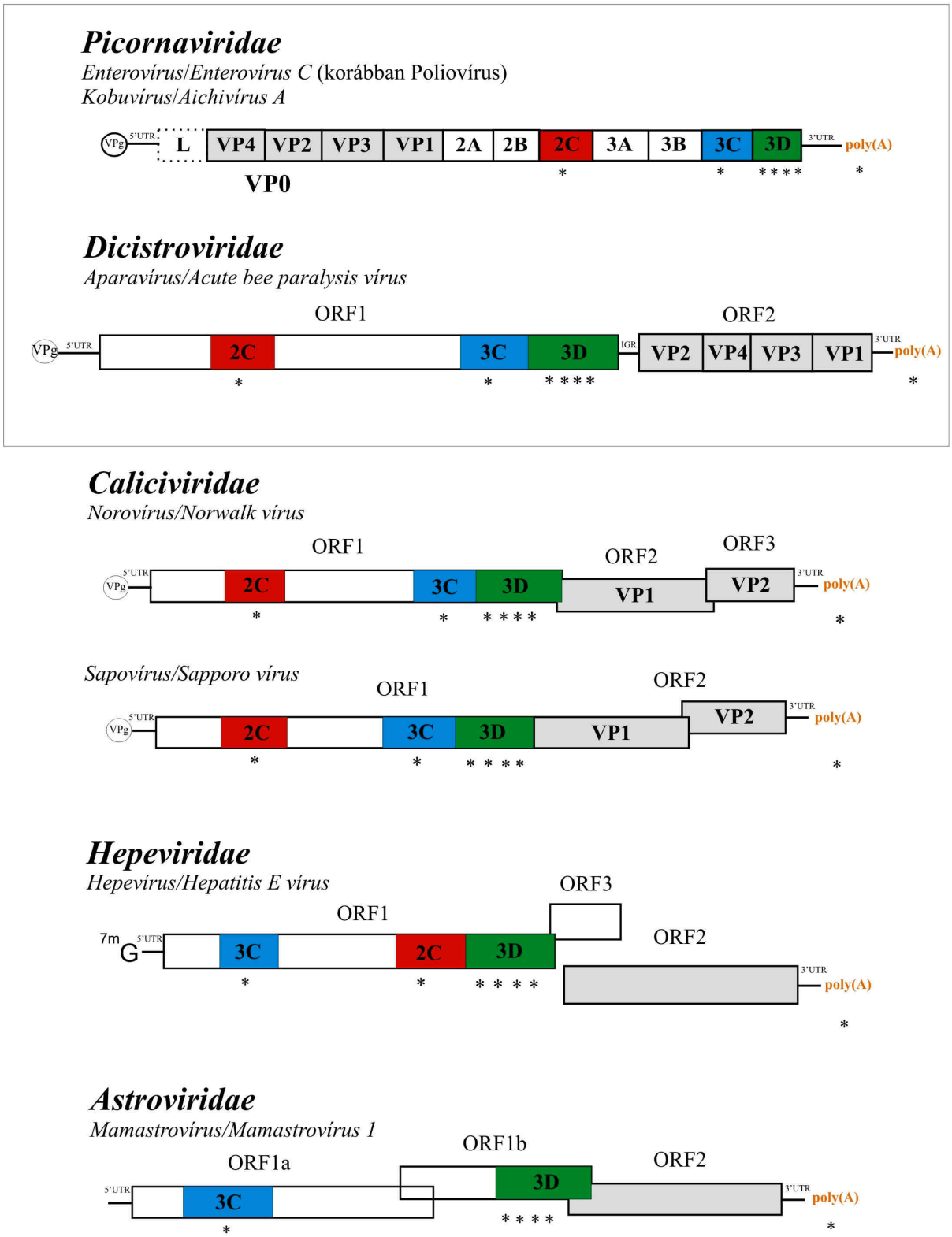
gazdasejtben és a gazdában (azaz a krónikus fertőzés nem jellemző); sokszínű klinikai szindróma (gastroenteritis, hepatitis, nátha, encephalitis, paralysis, carditis stb.) és tünettan; nagy mennyiségű új vírus ürülése a gazdaszervezetből, leggyakrabban a széklettel, részben a légúti váladékokkal. Jellemzi őket még a hosszú idejű várakozás a gazdaszervezeten kívül - a környezetben - a következő fogékony áldozatra; így a nagy ellenálló képesség a környezeti faktorokkal és fertőtlenítő szerekkel szemben; a fogékony gazdaszervezetek, fajok széles spektruma. Számtalan vírus közülük ismert humán pathogén; az általuk okozott fertőzések gyakoriak, és jelentős szerepük van a morbiditásban emberben és állatokban is. (1898-ben, a foot-and-mouth disease vírus (FMDV) volt az első állati vírus (ma *Aphthovirus* nemzetség, *Picornaviridae* család), melyet felfedeztek (Loeffler és Frosch, 1898).)

Az általános jellegzetességek mellett érdemes röviden kitérni az egyes vírusok ismert klinikai spektrumára. A különböző calicivírusok okozta fertőzések emberben gastroenteritissel járnak, egyes állatokban (sertés, fóka) hólyagos, másokban (nyulak) haemorrhágiás megbetegedést okoznak. A különböző picornavírusok (csak emberben jelenleg >202 picornavírus szerotípust tartunk számon) okozta klinikai tünettan rendkívül színes. Okozhatnak légúti, enterális, bőr, központi idegrendszeri, szív, máj elváltozással/gyulladással járó kórképeket emberben és állatokban is. Talán a poliovírusok okozta petyhüdt bénulással járó idegrendszeri fertőzés („járványos gyermekbénulás”) és a hepatitis A vírus (HAV) okozta heveny járványos májgyulladás a legközismertebb példák. A hepatitis E vírus (HEV) májgyulladást okoz, az astrovírusok a gastroenteritisek kóroki tényezői emberben (madaraknál hepatitist is okoznak), bár az utóbbi időben felmerült a szerepük központi idegrendszert érintő fertőzésekben is.

A négy víruscsaládba tartozó vírusok genom szerveződése és szerkezeti felépítése is sok hasonlóságot mutat (1. ábra). Genetikai állományuk rövid, 6,4-9,7 kb hosszúságú. Mindegyik genomra jellemző, hogy a kódoló részek mellett az 5’ és a 3’ végeken nem kódoló

részeket („untranslated region” = UTR) is tartalmaznak és a 3’ végen poly(A) vég található. Ugyancsak jellemző – a jelen tudásunk alapján -, hogy a kódoló régióik egy strukturális (a vírus kapszidot felépítő) és egy nem strukturális (enzim) fehérjéket kódoló részre oszthatók. Ugyancsak egyezik, hogy a nem strukturális régió által kódolt enzimfehérjék egymásnak megfeleltethető funkciójú fehérjéket kódolnak, melyek 5’-3’ irányú elhelyezkedési sorrendje - a hepatitis E vírus kivételével - a génrégiókban állandó (2A-B, 3A-D) (1. ábra). E mellett különbség a víruscsaládok között az, hogy a strukturális és nem strukturális genom régiók sorrendje eltérhet. A picornavírusok kivételével a nem strukturális régió a genom 5’ végéhez közelebb helyezkedik el. Ugyancsak a picornavírusok a kivételek abból a szempontból, hogy itt a kódoló régió folytonos, azaz lényegében egy nyílt leolvasó keret („open reading frame” = ORF) van. Ezzel szemben az astrovírusoknál, calicivírusoknál és a hepatitis E vírusnál a leolvasás 2 vagy 3 ORF-ben történik, és az ORF-ek között triplet leolvasási keret eltolódás („frame shift”) is van. Mindezek a jellegzetességek együttesen adják azt a lehetőséget, hogy a fenti vírusok genetikai állománya modulos felépítésű: 5’UTR/strukturális régió ~ nem-strukturális régió/3’UTR. Ezek után nem meglepő, hogy az RNS vírusokra jellemző nagy átírási hiba, és az ezt javító mechanizmusok hiánya miatt kialakuló folyamatos pontmutációk mellett („kvázispecies” tulajdonság) a rekombináció adta ugrásszerű változás lehetősége is felmerül. Egyre több vírusnál alátámasztható a felvetés; az egyes víruscsaládokon belül a modulok határainál a rekombináció lehetőségével is számolnunk kell.

Picornavirales



1. ábra. Három víruscsalád és a *Picornavirales* rendhez tartozó két víruscsalád genetikai állományának sematikus felépítése. A strukturális régiók szürke színnel, a nem-strukturális régiók fehér, ezen belül a helikáz-proteáz-polimeráz (Hel-Pro-Pol) modul részei piros (2C), kék (3C), és zöld (3D) színekkel vannak jelölve. Az enzimfehérjék működéshez esszenciális, egyes konzervatív aminosav motívumok helyei és a poly(A) farok csillaggal (*) jelöltek.

Ha még közelebb vizsgáljuk a szóban lévő vírusok genomjait és az általuk kódolt fehérjéket, több konzervatív nukleotid, illetve néhány aminosav hosszú vagy kötött elhelyezkedésű aminosav motívumot találunk elsősorban a nem strukturális régiókban (1. ábra). Ezek állandó jelenléte esszenciális fontosságukra utalnak, és többnyire enzimek reakció központjaiként szolgálnak a replikációban, transzlációban. Előfordulnak ilyen konzervatív aminosav szekvenciák a 2C (helikáz), 3C (proteáz) fehérjékben, de a legtöbb ilyen a 3D (RNS-függő RNS polymeráz) régióban található (1. ábra) (Mendéz et al., 2007; Green 2007; Emerson et al., 2007; Racaniello 2007). Ezt felismerve újabban használják a Helikáz-Proteáz-Polimeráz (Hel-Pro-Pol) modul kifejezést is. Máshonnan nézve, éppen ezek a molekuláris ”ujjlenyomatok” segítséget jelenthetnek új, burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS genomú vírusok azonosításában és e konzervatív helyek tudatos felhasználásával újabb, rokon vírusok keresésére is felhasználhatók.

Összességében a 4 víruscsalád, melyeket sokszor a nem taxonómiai értékű „picorna-szerű vírusok” között emlegetnek, közös (szerkezeti, biofizikai, szekvencia, pathogenetikai stb.) jellegzetességei, valószínű evolúciós rokonsága érdemessé teszik őket, hogy a közös tulajdonságaikra építve együtt vizsgáljuk őket. Ne felejtsük el, hogy egészen a legutóbbi időkig voltak a tárgyalt vírusok között olyanok, melyek közös víruscsaládba tartoztak és csak a teljes vírus genomok leírását követően kerültek elkülönítésre. (A hepatitis E vírusokat például a calicivírusok közé sorolták 1998-ig és csak 2004-től alkották meg a számukra a *Hepeviridae* családot (Emerson et al., 2004). Az astrovírusokat és calicivírusokat az elektronmikroszkópos képük alapján évtizedekig együtt kezelték – tévesztették össze.) A közös jellegzetességeket felismerve a Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság („International Committee on Taxonomy of Viruses” = ICTV) 2008-ban lépést tett a „picorna-szerű” vírusok összefoglalására (La Gall et al., 2008). Jelenleg hivatalosan csak a *Picornaviridae* és még további 4 víruscsalád (*Dicistroviridae*, *Marnaviridae*, *Iflaviridae* és *Secoviridae*) tartozik az

újonnan megalkotott *Picornavirales* rendbe (King et al., 2012). Az ICTV döntése értelmében a *Caliciviridae*, *Astroviridae* és *Hepeviridae* családokat a hasonlóságok ellenére egyelőre nem foglalták bele az új rendbe (La Gall et al., 2008; King et al., 2012).

Az új burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS genomú vírusfajok, nemzetségek és családok száma gyorsan növekszik (Kristensen et al., 2009) és a korszerű metagenomikai módszerek (Ronaghi et al., 1998; Delwart, 2007) ezt nagymértékben elősegítik. Jelenleg az

Víruscsalád	Nemzetség	Prototípus vírusfaj
Astroviridae	*Mamastrovírus*	*Mamastrovírus 1*
	Avastrovírus	*Avastrovírus 1*
Caliciviridae	*Lagovírus*	*Rabbit hemorrhagic disease vírus*
	Nebovírus	*Newbury-1 vírus*
	Norovírus	*Norwalk vírus*
	Sapovírus	*Sapporo vírus*
	Vesivírus	*Vesicular exanthema of swine vírus*
Hepeviridae	*Hepevírus*	*Hepatitis E vírus*
	Unassigned	*Avian hepatitis E vírus*
Picornaviridae	*Aphthovírus*	*Foot-and-mouth disease vírus*
	Aquamavírus (új)	*Aquamavírus A*
	Avihepatovírus	*Duck hepatitis A vírus*
	Cardiovírus	*Encephalomyocarditis vírus*
	Cosavírus (új)	*Cosavírus A*
	Dicipivírus (új)	*Cadicivírus A*
	Enterovírus	*Enterovírus C*
	Erbovírus	*Equine rhinitis B vírus*
	Hepatovírus	*Hepatitis A vírus*
	Kobuvírus	*Aichivírus A*
	Megrivírus (új)	*Melegrivírus A*
	Parechovírus	*Humán parechovírus*
	Salivírus (új)	*Salivírus A*
	Sapelovírus	*Porcine sapelovírus*
	Senecavírus	*Seneca Valley vírus*
	Teschovírus	*Porcine teschovírus*
	Tremovírus	*Avian encephalomyelitis vírus*

1. táblázat. Az *Astroviridae*, a *Caliciviridae*, a *Hepeviridae* és a *Picornaviridae* víruscsaládok hivatalos nemzetségei és fajai az ICTV IX. Vírustaxonómiai Riportja (King et al., 2012) és a 2013. évi módosítások (http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1) alapján.

ICTV legutolsó, 2012-es kiadású IX. Vírustaxonómiai Riportja hivatalosan 2 astrovírus, 5 calicivírus, 2 hepevírus és 12 (2013. februártól 17) picornavírus nemzetséget tart nyilván, melyek mindegyike gerincesekben előforduló vírus (1. táblázat) (King et al., 2012). Minden nemzetség számos (köztük új) fajt tartalmaz, (*Astroviridae*: 22 faj; *Caliciviridae*: 7 faj; *Hepeviridae*: 2 faj és *Picornaviridae*: 37 faj) (http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1), melyek többnyire arról a gazdafajról kapták a nevüket, melyekből először kimutatták őket. Az utóbbi idők kutatásai azonban arra is rámutattak, hogy ez a terület is óvatosságot igényel (ezért követendő szabályként az új vírusnevezéktanban a gazdafajra való utalást lehetőleg kerülni kell). Előfordul, hogy nagyon hasonló vírus, egynél több állati gazdafajt képes megfertőzni (hepatitis E vírus sertésben és emberben), illetve az is igazolt, amikor több mint egy, rokon, de különböző vírusfaj mutatható ki ugyanabból a gazdafajból (astrovírus, enterovírus). Ezek a felismerések alapozzák meg – a nevezéktani nehézségeken túl – azt, hogy a vírus-gazda kérdéskörben a fajok közötti vírusátvitel és a zoonózis lehetőségei felmerüljenek, és ennek bizonyítékait immár tudatosan keressük. Ezen elindulva elméletileg minden gazdafajnak (állatfajnak) megvannak az adott vírusnemzetségbe sorolható saját parazita vírusfajai, azaz a lehetséges vírusfajok száma a négy víruscsaládban elérheti az állatfajok számát. Ehhez hozzászámolandó még a gazdafajok közötti vírusátvitel lehetősége is.

A négy RNS víruscsalád közös evolúciós eredete, biokémiai, biofizikai hasonló tulajdonságai, a bemutatott hasonló genom szerveződés, az esszenciális konzervatív gén és aminosav motívumok jelenlétével, - kiegészítve az elméletileg kalkulálható potenciálisan előforduló vírusfajok számával - a különböző gazdafajokban alapozták meg azt, hogy érdemes szisztematikus munkát végezni e vírusok keresésére. Mind a már ismert vírusfajok molekuláris epidemiológiai szerepének feltárása, mind új vírusfajok leírása reális célnak tűnik.

A vizsgálatokat elősegítették, hogy az elmúlt években a bioinformatika látványos fejlődésen ment (és megy) keresztül. Az új molekuláris biológiai módszerek mellett elérhetővé váltak a nagy mennyiségű adat/információ feldolgozására, elemzésére alkalmas eszközök (pl.: szuperszámítógépek) és számítógépes programok (pl.: nukleinsav összetételt elemző programok) a genetika és a molekuláris biológia területén. Ezek a módszerek korábban elképzelhetetlenül nagy adattömeg elemzésére alkalmasak és általuk az „egységnyi kutatóidőre" számított elérhető eredmények megsokszorozódását látjuk a virológiai kutatásokban is, melyek eredménye jelentősen befolyásolja a vírusok világáról eddig alkotott képünket. A szekvencia-független amplifikáció és a szekvenálás (pl.: pyroszekvenálás; Nyrén, 2007) új elveivel dolgozó kereskedelmi forgalomban is megjelent módszerek segítségével, korábban nem ismert vírusok sokaságát lehet azonosítani (virális metagenomika; Djikeng et al., 2008) gyakorlatilag bármilyen kiindulási mintából. Vizsgálatainkban támaszkodtunk a már hagyományosnak számító és a legkorszerűbb, nemzetközi szinten is újdonságnak számító módszerek és eszközök nyújtotta előnyökre is.

CÉLKITŰZÉSEK

A vizsgálatok célja az volt, hogy a burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS (+ssRNS) genomú vírusokról (calicivírusok, picornavírusok, hepatitis E vírus és astrovírusok) szóló virológiai, epidemiológiai, járványügyi és klinikai ismeretek bővüljenek, a korszerű molekuláris epidemiológiai módszerek segítségével komplexebb képet kapjunk róluk. Közvetlen cél volt a humán calicivírusok (norovírusok, sapovírusok), a hepatitis A vírus és a hepatitis E vírus okozta fertőzések, járványok első hazai, prospektív molekuláris epidemiológiai vizsgálata. Általános cél volt, hogy a vizsgálatok kevésbé az orvosi és állatorvosi virológia által húzott mesterséges határokat követve, hanem inkább – az alkalmazott korszerű módszerek lehetőségeiből is adódóan - a vírusok evolúciós szintű hasonlóságaiból és közös jellegzetességeiből kiindulva történjenek, így valóságosabb képet kaphassunk egyes +ssRNS vírusok gyakoriságáról, sokszínűségéről, valósabb gazdaszervezeti spektrumáról és akár a fajok közötti átvitel és a zoonózis/humanózis lehetőségeiről is. Cél volt a horizontális nézőpont (vírusfajok száma, lehetőség szerint új vírusfajok és vírus nemzetségek azonosítása és molekuláris meghatározása, epidemiológia, klinikum, gazdafaj spektrum stb.) szélesítése mellett a vertikális nézőpont elmélyítése is; azaz a vírusok, lehetőleg teljes genomjának meghatározását követően, az alkotó és átíródó molekulák szerkezeti felépítésén, változásán keresztül azok funkcionális/biológia szerepének keresése, megismerése is. E célokat röviden úgy lehetne összefoglalni, hogy a széles látószögű nézőpont a burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS genomú vírusok vizsgálata körében a „molekuláktól az epidemiológiáig” tartott.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán és állati vizsgálati minták

A humán vizsgálatok tárgya elsősorban a beteg ember (gastroenteritis, hepatitis) széklete volt, de a hepatitis A és E vírus esetében a rutin laboratóriumi vizsgálatra küldött szérum mintákkal, az enterovírus C109 (EV-C109) esetében (légúti megbetegedés) garatmosó folyadékokkal is dolgoztunk. A humán parechovírusok esetében archivált szövetfelülúszó folyadékot vizsgálatunk, ahol az eredeti tenyészetett vizsgálati minta a széklet volt. A minták járványokból (norovírus, hepatitis A vírus) és szórványos emberi megbetegedésekből egyaránt származtak, melyeket rutin klinikai vagy járványügyi mikrobiológiai laboratóriumi vizsgálati kéréssel küldtek a Laboratóriumba, adott esetben további referencia laboratóriumi kivizsgálásra, tipizálásra.

Igyekeztünk, minél több állati fajból mintákat, elsősorban bélsár (fécesz) mintát gyűjteni, de vizsgáltunk állati vér és bélmintákat is. A házi állatok közül sertés, szarvasmarha, juh, kecske, nyúl, ló, pulyka és csirke, a vadon élő állatok közül őz, szarvas, vaddisznó, denevér, galamb, fürj, szalakóta és ponty minták szerepeltek a vizsgálatokban. A mintagyűjtésnél elsősorban fiatal életkorú, klinikailag egészséges és tüneteket mutató egyedek mintázására törekedtünk. Mind a házi, mind a vadon elő állatoktól a mintákat az állományt ismerő állatorvos gyűjtötte, ahol erre szükség volt, engedélyezést követően. Az „Eredmények” részben természetesen csak azok az állatok szerepelnek, melyek vizsgálata során új eredményt hozó felismerés született. A mintákat igyekeztünk a Laboratóriumba érkezését követően azonnal feldolgozni, belőlük nukleinsavat izolálni. Az eredeti mintákat -20°C-on tároltuk.

Epidemiológiai és klinikai adatgyűjtés

A járványos emberi megbetegedések esetében a hivatalos járványügyi kivizsgálás (ÁNTSZ, Járványügyi Osztályok) során összegyűjtött adatokra támaszkodtunk, de 1999 és 2006 között egy általunk összeállított – 4 oldalas - kérdőívvel is segítettük a megfelelő mélységű epidemiológiai és klinikai adatok összegyűjtését, például az akkor még kevéssé ismert virális gastroenteritis járványok esetében. Az egyedi megbetegedések epidemiológiai-klinikai hátterének felderítését – az esetek többségében retrospektív módon - a kezelő orvossal, a mintát számunkra továbbküldő laboratórium munkatársával történt konzultációk és a kórrajzok segítették.

A házi és vadon élő állatok esetében minden esetben törekedtünk a mintázott állatállomány egyedszámáról, a mintázott állatok életkoráról és egészségi állapotáról is adatokat gyűjteni a földrajzi helyszín és időpont ismeretén túl. Klinikai szempontból azokat az egyedeket, melyek az állatorvos által betegségre utaló látható jeleket nem mutattak egészségesnek tekintettük. A gyakorlatban a minták egyrészt kifejezetten fiatal (a szezonális ellési időket is figyelembe véve néhány napostól 2-3 hónapos), egészséges állatokat nevelő farmokról származtak. Másrészt – más farmokról - kifejezetten patológiás kórképet mutató, olyan ismeretlen kórokú, beteg vagy elpusztult állategyedektől származó bélsár mintákat is vizsgáltunk, ahol az állategészségügyi rutin (mikroszkópos, parazitológiai, bakteriológiai) laboratóriumi vizsgálatok során kórokozót nem sikerült azonosítani.

Nukleinsav izolálás

A virális ribonukleinsav (RNS) extrakciója minden esetben 0,1M PBS-sel 25-40%-ra hígított széklet-, bélsár-szuszpenzióból történt TRIzol R (Invitrogen, Carlsbad, USA) felhasználásával a gyártó leírása szerint. Szérum és garatmosó folyadék esetén TRIzol LS-t (Invitrogen, Carlsbad, USA) használtunk. Az RNS-t nukleáz-mentes vízben oldva -80°C-on tároltuk.

Hagyományos RT-PCR

A virális RNS genom kimutatására a reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) alapmódszerét használtuk. Az alapprotokoll a következő receptből állt egy mintára vonatkoztatva: a cDNS 50 µl végtérfogatú volt, mely 5 µl 10xPCR buffert (Sigma, St Louis, MI, USA), 1 µl 25 mM-os $MgCl_2$-ot, 2 µl 10 mM-os dNTP-t (Promega, Madison, WI, USA), 2 µl 10 pmol-os antisense (R) primert, 0,25 µl 40U/µl rekombináns ribonukleáz inhibítort (rRNasin, Promega, Madison, WI, USA), 50U M-MLV reverz transzkriptáz enzimet (Promega, Madison, WI, USA) és 5 µl virális RNS-t tartalmazott. A reverz transzkripció (RT) 37-42°C között zajlott egy órán keresztül. A PCR reakció az RT teljes térfogatát felhasználva 100 µl végtérfogatban történt. Ehhez a PCR mix 50 µl-ben 5 µl 10xPCR buffert, 1 µl 25 mM-os $MgCl_2$-ot, 2 µl 10 pmol-os sense (F) primert és 1 µl 2,5U DNS polimerázt (DuplA-Taq, ZenonBio, Szeged, Magyarország) használtunk fel. Az annealing hőmérsékleti érték meghatározásánál alkalmaztuk a primer olvadáspont (Tm)-maximum 5°C szabályt. A PCR ciklus 1 perc 94°C-os elő-denaturációból, 40 ciklusszámú reakcióból (94°C 30 másodperc, primer Tm-maximum 5°C 30 másodperc, 72°C 1 perc) és 10 perc 72°C-os végső elongációból állt. Az egyes reakciók esetében azonban – a körülményektől függően - az alapprotokolltól (ciklusszám, hőmérséklet, Tm hőmérséklet és reakció idők) eltértünk.

Teljes virális genomok meghatározása 5' és 3' RACE, Long-range PCR és „genome walking" módszerekkel

Az RNS vírusok teljes genomjának meghatározása érdekében többféle elméleti háttér módszert alapul vettünk. Ezek gyakorlati kidolgozását/optimalizálását magunknak kellett elvégezni, mert azt tapasztaltuk, hogy az irodalomban korábban leírt módszerek leírását követve azok és úgy „nem működnek". Használtuk a „genome walking" módszert, mely során az adott vírus ismert nukleotid szekvenciáira, vagy ennek ismerete hiányában lehetséges rokon vírusok ismert konzervatív régióira tervezett primerekkel a genom részeket lépésről-

lépésre (<1500 nt-nál rövidebb szakaszokkal) összekötve határoztuk meg az ismeretlen nukleotid sorrendet normál RT-PCR reakciókkal. A nagyobb (>1500 nt-nál hosszabb) genom hiányok áthidalása érdekében a Long-range PCR módszert (Long PCR Enzyme Mix, Fermentas, Vilnius, Litvánia) alkalmaztuk Pfu DNS-polimeráz enzim (Fermentas, Vilnius, Litvánia) segítségével az RNS szál RNAseH enzimmel (Fermentas, Vilnius, Litvánia) történt elbontását követően, mellyel akár 4,7 kilobázis hosszú szakaszt tudtunk átírva felsokszorozni. Ugyancsak meghatározó vizsgálati módszer volt a RACE („rapid amplification of cDNA ends”) módszer a vírusok teljes és/vagy 5’ és 3’ végi nukleotid részeinek meghatározására (5’/3’ RACE kit, Roche, Mannheim, Németország). Röviden: a 3’ vég meghatározása során az RNS-ből a cDNS készítése Oligo dT-anchor primerrel történt (kihasználva azt, hogy a tárgyalt +ssRNS vírusok 3’ végén poly(A)-farok található), majd a PCR reakció során gén-specifikus sense és PCR-anchor primerrel sokszoroztuk fel a kérdéses genom szakaszt. Az 5’ vég (vagy 5’ irányban lévő genomrész) meghatározása során a cDNS-t egy antisense primerrel (R1) készítettük, melyet az ismert szakaszra terveztünk. Ezt követően az RNS láncot RNaseH enzimmel (Fermentas, Vilnius, Litvánia) elbontottuk és a cDNS-t tisztítottuk. A cDNS 3’ végét poliadeniláltuk dATP jelenlétében terminal deoxynucleotidyl transzferáz enzim (Promega, Madison, WI, USA) segítségével. Majd a poliadenylált cDNS-t Pfu DNS polimeráz enzim, Oligo dT-anchor primer és egy 2. antisense (belső) primer (R2) segítségével sokszoroztuk fel.

Szekvencia, faj, nemzetség és konzervatív génszakaszokra tervezett szűrő, specifikus, „univerzális” és degeneratív primerek

A virális RNS kimutatására a szekvencia-specifikus primerek mellett, fajra és nemzetségre (pl.: enterovírus), valamint család(ok)ra jellemző konzervatív genomszakasz-specifikus (pl.: picornavírus-calicivírus) primereket terveztünk és használtunk. Előbbi esetében egy adott vírusfajba, vagy nemzetségbe tartozó vírusokra jellemző nukleotid sorrend

képezte a primerek alapját. Utóbbi esetben a cél az volt, hogy az elméletileg lehetséges nukleotid variációk figyelembe vételével tervezzünk degenaratív primereket esszenciális, ezért konzervatív virális RNS nukleotid motívumokra. A vírusok kimutatásához, hosszabb génszakaszuk, illetve teljes genomjuk meghatározásához összesen több mint 2500 féle primerrel dolgoztunk. Ezek nukleotid szekvenciáinak megadása meghaladja a dolgozat terjedelmi kereteit. Azonban a meglévő ismereteink és a célnak megfelelő primerek megfontolt elméleti tervezése volt vizsgálataink sikerének a kulcsa, és ez vezetett el a nem várt víruskimutatásokhoz, eredményekhez. Ezért a későbbiek során a jelentős eredményre vezető „kulcs-primerek” kiemelésre és megnevezésre kerülnek.

Agaróz-gélelektroforézis

A PCR termékeket 0,7-1,5%-os agaróz gélben (NuSieve 3:1 Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) tris-borát-EDTA (TBE) pufferben választottuk el (90-120V, 0,5-1 óra) és UV-fény alatt ethidium bromiddal (Promega, Madison, WI, USA) tettük láthatóvá.

Szekvenálás (Sanger)

A PCR termékek alkoholos tisztítása vagy agaróz gélből való extrakciója (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Németország) után BigDye Terminator kittel (v. 1.1, PE Applied Biosystems, Warrington, Egyesült Királyság) mindkét irányból direkt szekvenálást végeztünk, amelyet 2005-ig Hollandiában (RIVM, Bilthoven), majd ezt követően Laboratóriumunk automata kapilláris szekvenátorán (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Stafford, USA) futtattunk.

Szekvencia-független virális nukleinsav amplifikáció és 454-pyroszekvenálás

A PBS-ben higított mintákat 0,45 μm-es steril szűrőn (Ultrafree-MC HV 0.45 μm, Millipore) vezettük át, majd centrifugáltuk (6,000 X *g*, 5 min). A filtrátumot nukleázok keverékével (TurboDNase, Appl. Biosystems; Baseline Zero DNase, Epicentre Biotech.; Benzonase nuclease, Novagen; RNase A, Fermentas) kezeltük, hogy a kapsziddal védett

virális nukleinsavakon kívül a mintában lévő minden egyéb nukleinsavtól lehetőleg megszabaduljunk és a virális nukleinsav relatív koncentrációját növeljük (Victoria et al., 2009). A virális nukleinsavat QIAamp Viral RNA Mini Kittel (QIAgen, Hilden, Germany) izoláltuk a gyártó leírás szerint. A virális RNS és DNS könyvtárakat szekvencia-független random primerekkel (képlete: 5'vég - 20 ismert nukleotid+N_8-3'vég) párhuzamosan RT-PCR és PCR amplifikációkkal készítettük a korábban leírtak szerint (Victoria et al., 2009). A 454-pyroszekvenálás a 454 GS FLX Titanium (Roche) technológia felhasználásával a korábbiak szerint történt (Kapoor et al., 2008; Victoria et al., 2009). A pyroszekvenálás során leolvasott, illetve összeillesztett szekvencia darabokat erre a célra fejlesztett szoftver (Delwart E., személyes közlés) és a Stanford Egyetem szuperszámítógépe (Stanford University, Stanford, CA, USA) segítségével hasonlítottuk össze a GenBank nukleotid és fehérje adatbázisaival a BLASTn és BLASTx keresők felhasználásával. A keletkezett adatok felhasználó-barát formában, védett web-oldalon (https://pronghorn.stanford.edu/virus/index#) érhetők el. A meghatározott virális nukleotid és aminosav szekvenciákat a GenBankban (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) helyeztük el.

Szekvencia és filogenetikai elemzés

A nukleotid, illetve aminosav szekvenciákat Clustal X (version 1.83) program segítségével illesztettük és GeneDoc (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility version 2.6.003) programmal értékeltük. A filogenetikai vizsgálatokhoz MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 3.1 és version 5) programot használtunk (Tamura et al., 2011). A filogenetikai ágrajzok megrajzolásához UPGMA, neighbor-joining, maximum-likelihood módszereket és Jones-Taylor-Thornton (JTT) és Whelan and Goldman (WAG) szubsztitúciós modelleket alkalmaztunk. Az egyes ágrajzokhoz alkalmazott módszerek az ábraaláírásokban szerepelnek. A norovírus szekvenciák genotípusba sorolása a NoroNet

Sequence typing tool web-alapú adatbázisa alapján történt (http://www.rivm.nl/en/Topics/Topics/N/NoroNet/Databases/Sequence_typing_tool).

Az RNS másodlagos szerkezetének elemzése

A +ssRNS vírusok RNS genomjának 5'UTR, 3'UTR és IGR régiói lehetséges termodinamikailag stabil másodlagos RNS szerkezetének felrajzolását a „thermodinamic folding energy minimization" algoritmus alapján az Mfold program (Zucker, 2003) segítette. Az elemző program „tökéletlenségét" – a rendelkezésre álló speciális szerkezeti ismeretek maximális figyelembe vételével - manuálisan igazítottuk ki az RNS már ismert szerkezeti hasonlóságait keresve.

Rekombináció elemzés

A vírusgenomok és genomrészek hasonlósági elemzésekor a nukleinsav szekvenciákat rekombináció vizsgálatának is alávetettük, melyet SimPlot (similarity plot) (version 3.5.1) (Lole et al., 1999) valamint RDP (bootscanning elemzés) (version 4.14) (Martin et al., 2010) számítógépes elemző programok segítségével végeztük el.

Nukleotid összetétel elemzés („Nucleotide Composition Analysis" - NCA).

Az elemzés arra a – jelenleg még nem megmagyarázott - megfigyelésre épül, hogy az egyes vírusok gazdafajok szerint hasonló dinukleotid gyakorisággal jellemezhetőek (Kapoor et al., 2010). Példaként az emlős eredetű egyszálú RNS vírusok CpG és UpA alulreprezentációval és CpA felülreprezentációval rendelkeznek (Kapoor et al., 2010). Az NCA elemzés összesen 352 reprezentatív, a picorna-szerű vírusok különböző fajába, nemzetségébe és családjába tartozó pozitív, egyszálú RNS vírus komplett vagy 3000 nukleotidnál hosszabb nukleotid szekvenciájának felhasználásával történt (Kapoor et al., 2010: a felhasznált szekvenciák listája az eredeti referenciában megtalálható). Minden vírus-szekvencia család, nemzetség és gazdafaj szerint be lett sorolva. A mono- és dinukleotid gyakoriság az egyes szekvenciáknál "Composition Scan" (SSE version 1.0) programmal lett

meghatározva (Simmonds P., a közlemény írás alatt). Minden egyes dinukleotid eltérés meghatározása a 16 dinukleotid (pl.: UA, UG, UC stb.) megfigyelt gyakoriságának és a két mononukleotid alapelem elvárt gyakoriságának aránya alapján történt az egyes vírusoknál. NCA-hoz az elkülönítő elemző programot ("discriminant analysis program") használtuk a SYSTAT statisztikai programcsomagból. A vírus-szekvenciákat 4 gazdaszervezeti kategória szerint osztottuk el: emlős (n=117), ízeltlábú (n=63), növény (n=167) és hal (n=5) eredetű vírus. A csoportok vírusainak mono- és dinukleotid gyakoriságának eloszlását használtuk fel egy-egy új vírus lehetséges gazdaszervezetének meghatározásához.

Polyprotein vágási helyek elemzése

A transzláció során keletkező picornavírus polyprotein lehetséges vágási helyeinek meghatározásához és ellenőrzéséhez, a referencia szekvenciák GeneDoc programban való összeillesztése („alignment") mellett, a NetPicoRNA program (Blom et al., 1996) predikcióit is figyelembe vettük.

Új picornavírus nemzetség definíciója

Az ICTV *Picornaviridae* Study Group 3 pontban foglalta össze azokat a szempontokat, melyek segítenek eldönteni egy új picornavírusról, hogy már meglévő, vagy új nemzetségbe tartozhat: http://www.picornastudygroup.com/definitions/genus_definition.htm. Ezek: 1) az L, 2A, 2B és 3A proteinek az azonos nemzetségbe tartozók között homológok, 2) az egy nemzetségbe tartozó vírusok alapvetően homológ IRES (internal ribosomal entry site) szerkezettel jellemezhetők (ha az 1. pont érvényes a 2. pont másodrendű) és 3) a nemzetség tagjainak P1, P2 és P3 régiói filogenetikailag hasonlóak, és ez aminosav hasonlóságban több mint 40%, 40% és 50%. Természetesen új ismeretek esetén az osztályozás szempontjai módosulhatnak, változhatnak.

Vírustenyésztés

A vizsgálati mintákat (széklet, liquor, garatmosó folyadék), az általános vírustenyésztésre leggyakrabban alkalmazott Vero (African green monkey kidney; ATCC CRL1586), GMK (Green monkey kidney) és „293” (human embryonic kidney) sejtkultúrára fertőztük. A -80°C-on 2,5ml virális transzport médiumban tárolt mintákat felolvasztás után centrifugáltuk és 0,45 μm-es steril szűrőn (Millex-HV, Millipore, Bedford, MA) átszűrtük. A savómentes inokulummal 25 cm^2 felületű szövettenyésztő palackra fertőztünk, közvetlenül az egyrétegű sejtrétegre. Másfél órás, 37°C-os inkubációt követően a fertőző inokulumot eltávolítottuk és a tenyészetet savómentes minimum essential medium (Sigma, Steinheim, Németország) fenntartó tápfolyadékot hozzáadva, 37°C-on inkubáltuk. A vizsgálati minta nélküli negatív kontrollt, minden fertőzéskor használtunk. A tenyészetet naponta fénymikroszkóppal ellenőriztük. Egyes esetekben 12 napos inkubációt követően a tenyészetet továbboltottuk. A tenyésztés végén a tenyészeteket lefagyasztottuk/olvasztottuk és RNS izolálás céljára -80°C-on tároltuk.

EREDMÉNYEK

A dolgozatban bemutatott vizsgálatok eredményeit öt fő részre osztottam. Ezek közül négy egy-egy ismert +ssRNS víruscsaládhoz (*Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Hepeviridae* és *Astroviridae*) kapcsolható vírusokról szól (kimutatás, új fajok, új nemzetségek, molekuláris-epidemiológiai-klinikai jellegzetességek stb.), az utolsó rész egy jelenleg taxonómiailag bizonytalan besorolású új, dicistronos +ssRNS genomú vírus bemutatását tartalmazza. Felépítésében, minden egyes rész tartalmaz egy rövid bevezetést, mely az adott víruscsoport (család, nemzetség, faj) legfontosabb ismereteit foglalja össze a vizsgálataink kezdetéig, ezt követi a vizsgálati minták és a felhasznált módszerek rövid ismertetése (a részletek az Anyagok és Módszerek fejezetben találhatók), majd az eredmények részletes bemutatása.

CALICIVIRIDAE

A calicivírusok (calix, calices – latin: kehely, kupa) írott története 1957-ben kezdődött (Smith et al., 1990), a légúti megbetegedést okozó feline (macska) calicivírus leírásával (Fastier 1957), bár akkor még az elektronmikroszkópos kép alapján történt osztályozás következtében ez a vírus is csak a „kis, kerek, strukturált vírusok” nagy – de főleg taxonómiailag bizonytalan - csoportjába került. Az első emberi (humán) calicivírust, a Norwalk ágenst/vírust, Albert Kapikian és munkatársai (immun)elektronmikroszkópos vizsgálattal mutatták ki egy Norwalk (Ohio) nevű amerikai kisvárosban, 1968-ban lezajlott általános iskolai, nem bakteriális eredetű gastroenteritis járvány székletmintáiból 1972-ben (Kapikian et al., 1972; Kapikian, 2000). Az 1999-ben megalkotott *Caliciviridae* víruscsaládnak (Pringle, 1999) jelenleg 5 elfogadott – és több javasolt - nemzetsége van: *Lagovírus*, *Nebovírus*, *Norovírus*, *Sapovírus* és *Vesivírus* (Clarke et al., 2012). Ezek közül a norovírusok és a sapovírusok között találunk ismert emberi kórokozókat.

Vizsgálatokat a *Caliciviridae* család *Norovírus*, *Sapovírus* és *Nebovírus* nemzetségei körében végeztünk.

***Norovírus* nemzetség**

Norovírusok emberben

Bár az első emberi calicivírus, a Norwalk ágens (= Norwalk vírus = „Norwalk-szerű vírusok” = norovírus) már 1972 óta ismert, de csak az 1990-es évek közepétől, a vírus genetikai állományának meghatározása után (Jiang et al., 1990) és a molekuláris biológiai módszerek megjelenésével váltak vizsgálhatóvá, más vírusoktól valóban elkülöníthetőkké. In vitro körülmények között a norovírus ma sem tenyészthető. Körülbelül 2000-re tehető, amikor az első molekuláris epidemiológiai vizsgálatok eredményei sejteni engedték a norovírusok valódi epidemiológiai szerepét a gastroenteritis járányok kóroki tényezői között. Az elmúlt 15 évben az egyes országok, nagyobb földrajzi régiók surveillance eredményei vezettek el annak felismeréséhez és bizonyításához, hogy a norovírus a széklettel terjedő gastroenteritis járványok, és nem csak a nem bakteriális gastroenteritis járványok vezető kórokozója, jelentős nemzeti és nemzetközi járványügyi és élelmiszer-biztonsági problémát is okozva. Az ismert norovírusokat 2007-re öt genocsoportra (GI-GV) (és 30 genotípusra) osztjuk, melyek közül a GI emberi (GI.1-8), a GII emberi (GII.1-10 és GII.12-17) és sertés (GII.11, GII.18 és GII.19 genotípusok), a GIII szarvasmarha (GIII.1-2), a GIV emberi (GIV.1) és újabban macskafélékből származó, a GV egér (GV.1) norovírusokat tartalmaz (Green, 2007).

- Norovírus járványok hazánkban

A „calicivírusok” hazai diagnosztikájának megteremtése, jelenlétének vizsgálata és cirkulációjának monitorizálása molekuláris módszerekkel – részben retrospektív módon - 1999-től kezdődött a szerző Ph.D. munkájának (címe: „A humán calicivírusok molekuláris epidemiológiája Magyarországon”, védés: PTE 2003) keretében dr. Szűcs György

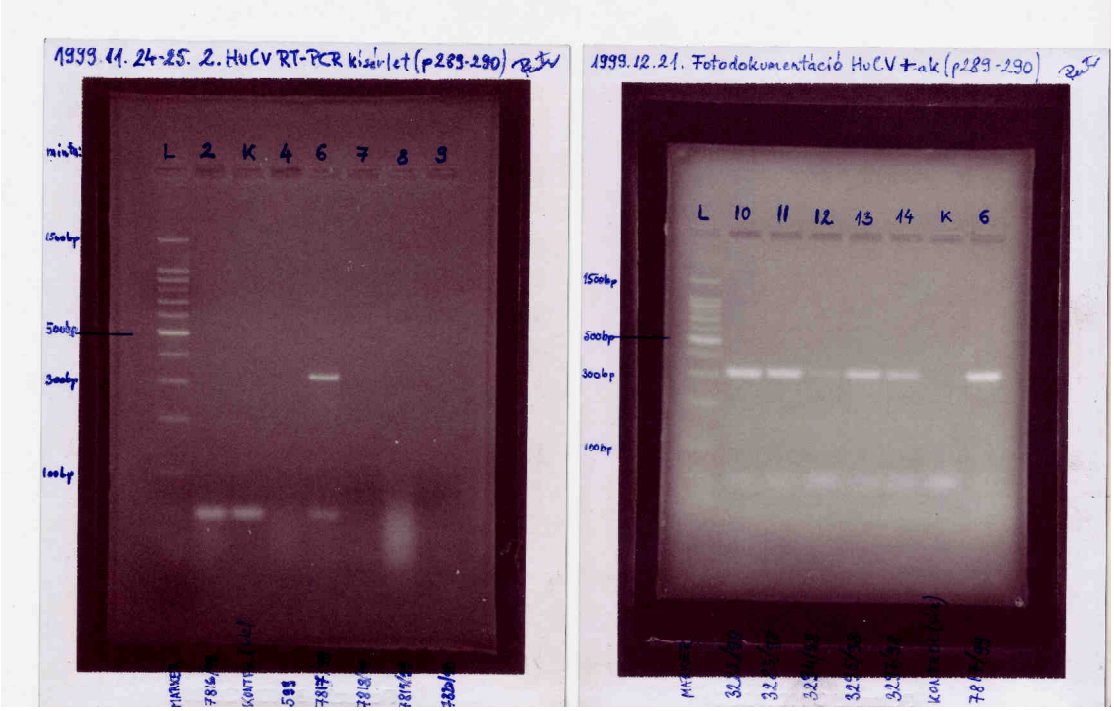
témavezetésével és az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT 118/2000) pályázat pénzügyi segítségével. Azonban már a vizsgálatok kezdetétől a téma nemzetközi tekintéjű kutatói (USA, Hollandia) segítették a munkánkat, melynek eredményeként tanulmányutak, a hazai mellett közös nemzetközi pályázatok és közlemények születtek. 1999 és 2003 között a vizsgálatok az Európai Unió által támogatott „Food-borne Viruses in Europe" (FBVE, European Union Framework 5, QLRT-1999-00594) társult tagjaiként, 2004 és 2008 között a „Prevention of emerging (food-borne) enteric viral infections: diagnosis, viability testing, networking and epidemiology (DIVINE-NET, European Union DG-Sanco 2003213), illetve a 2005 és 2009 között az „Enteric Virus Emergence – New Tools" (EVENT, European Union Framework 6, SP22-CT-2004-502571) pályázatok teljes jogú tagjaiként végeztük. A norovírusok nemzetközi surveillance munkája 2009-től napjankig a web-alapú „NoroNet" (http://www.rivm.nl/en/Topics/Topics/N/NoroNet) keretében folytatódik tovább. E pályázatok szakmai és pénzügyi háttere jelentősen elősegítette a Laboratórium fejlődését és a calicivírusok vizsgálatán keresztül megalapozta a Laboratórium jelenlegi tevékenységének profilját, képességét és irányát. Laboratóriumunk 1999-től nem hivatalosan, 2003-tól hivatalosan is a „Gastroenterális Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriuma" a Mikrobiológiai Szakmai Kollégium döntése által.

A vizsgálatainkat a kezdetektől fogva országos lefedettséggel terveztük, a statisztikákban szereplő, ismeretlen etológiájú, nem bakteriális gastroenteritis járványok kivizsgálására. Dr. Szűcs György főorvos Úrral úgy döntöttünk, hogy a „calicivírus" gyűjtőnévvel vezetjük be az ismereteket 1999-ben a hazai mikrobiológiai és járványügyi körökbe (a nehézkes „Norwalk-szerű vírusok" név helyett), mely időközben a médiában is megtapadt. Igyekeztünk a legkülönbözőbb fórumokon, továbbképzéseken a „calicivírus" járványok jellegzetességeit bemutatni, hogy a járványügyi szakemberek felismerjék (le kell írni, hogy a Salmonellán kívül is gondoljanak rá!) és éljenek a vizsgálati lehetőséggel. A

járványonkénti vizsgálati minták számát 5-ben maximalizáltuk, melynek helyességét utólag a szakirodalom is megerősített (Duizer et al., 2007). Megszerveztük a minták útját, epidemiológiai és klinikai adatokat gyűjtöttünk a járványokról egy általunk összeállított formanyomtatványon (ezek egyben segítették kezdetben az ismeretek terjesztését is) és minden esetben, a minták megérkezését követően, 3 napon belül, visszajelzést adtunk a beküldő fele a vizsgálatok eredményéről.

1998. november és 2013. február között összesen 984 nem bakteriális, ismeretlen etiológiájú hazai gastroenteritis járványból 5215 széklet mintát (5,3 minta/járvány) vizsgáltunk meg. A mintákból izolált RNS-t 2002. decemberig a norovírusok és sapovírusok RNS-függő RNS polimeráz régiójára tervezett p289/p290 jelű általános calicivírus primerekkel (Jiang et al., 1999), majd 2003. januártól a norovírusok RNS-polimeráz régiójára tervezett JV13I/JV12Y jelű primerpárok (Vennema et al., 2002) segítségével vizsgáltuk RT-PCR módszerrel. Minden egyes járványból legalább egy specifikus PCR-terméket megszekvenáltunk.

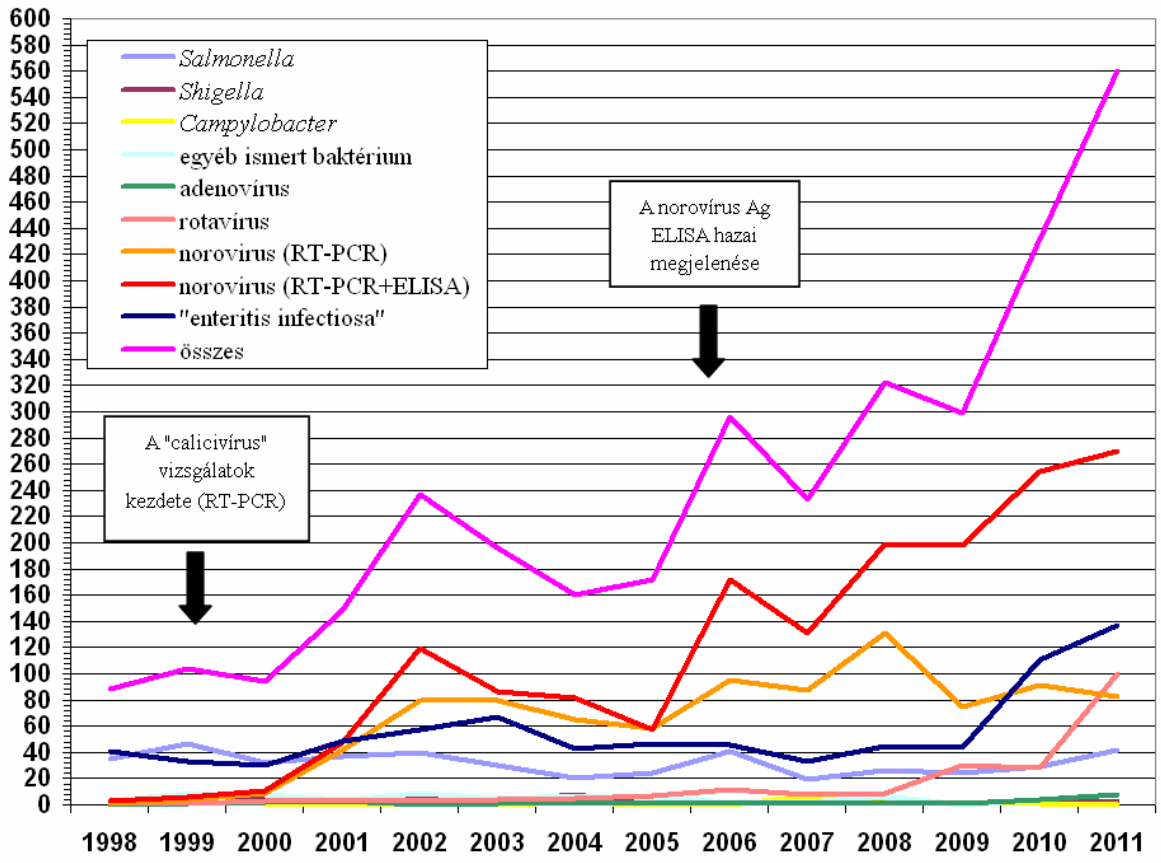
Történeti érdekességű az első igazolt hazai norovírus járvány RT-PCR vizsgálatáról készített fotódokumentáció (2. ábra).



A **B**

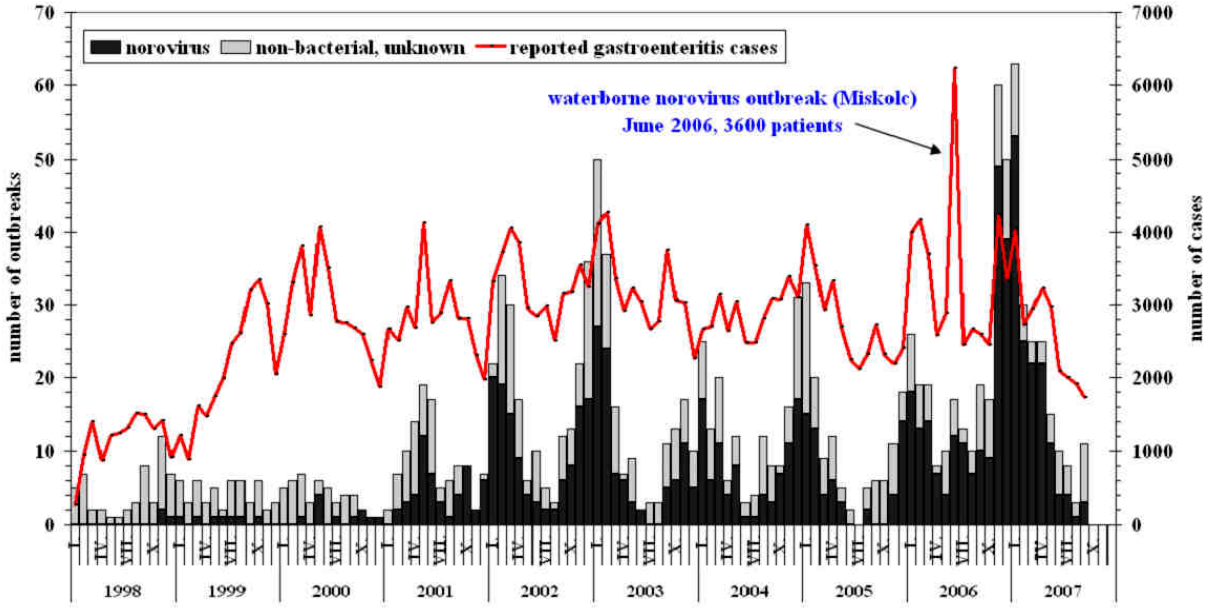
2. ábra. Történeti jelentőségű fotódokumentumok az emberi calicivírus (norovírus) első hazai kimutatásáról. A) az első norovírus pozitív minta („6” jelű minta; vizsgálat dátuma: 1999. november 24-25.); B) az első - retrospektív - igazolt hazai norovírus járvány, óvodai-általános iskolai élelmiszer-eredetű járvány, Szeged-Algyő, 1998. november („10-14” jelű minták, vizsgálat dátuma: 1999. december 21.). Már a második elvégzett RT-PCR vizsgálat és a 6. megvizsgált széklet minta vizsgálata sikerre vezetett. (Összehasonlításképpen: 2013. február 29.-én az 5215. emberi széklet minta calicivírus RT-PCR vizsgálata is megtörtént.)

1998 és 2011 között összesen 3342 gastroenteritis járványt jelentettek hazánkban (3. ábra). 1998 és 2000 között a bejelentett gastoenteritis járványok száma évi 100 körül volt, 2001-től (vizsgálataink 2. évétől) azonban jelentős emelkedés volt tapasztalható a bejelentésben, 2011-ben pedig elérte ez a szám az 560-at. 1998. november és 2013. február között 984 megvizsgált ismeretlen kórokú gastroenteritis járványból 928-ból (94%) sikerült norovírust legalább 1 mintából RT-PCR módszerrel kimutatnunk. 2001 óta a norovírus vezető kórokozóvá lépett elő a gastroenteritis járványokban hazánkban (3. ábra), melyek körében a részesedése is folyamatosan nőtt. (A járványügyi diagnosztikát segítette, hogy 2006-tól hazánkban is megjelentek a norovírus antigén (Ag) székletből való kimutatására alkalmas kereskedelmi forgalmú ELISA kittek is) (3. ábra).



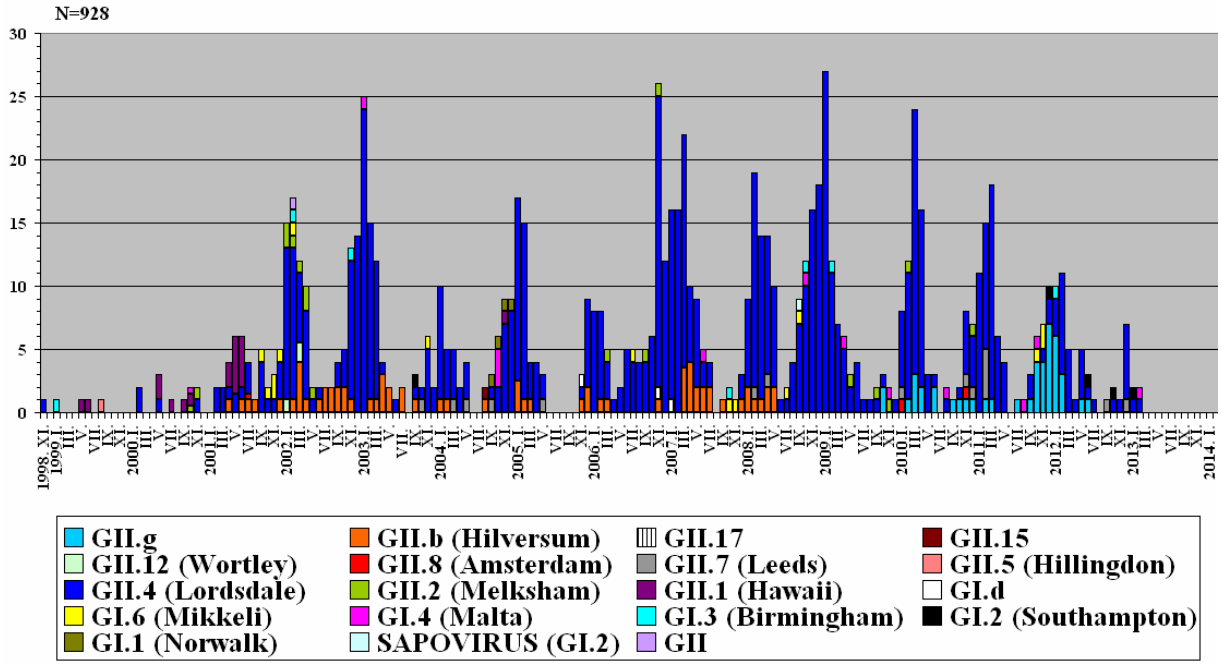
3. ábra. A hazai gastroenteritis járványok legfontosabb kórokozói 1998 és 2011 között (x-tengely). (y-tengely: járványok száma). A norovírus vizsgálatok 3 periódusra oszthatók: 1) 1998 és 2001 között a norovírus vizsgálatok kizárólag RT-PCR módszerrel történtek Laboratóriumunkban Pécsett; 2) 2001 és 2005 között az RT-PCR módszer mellett kereskedelmi forgalomban nem került, a székletből norovírus antigént (Ag) kimutatni képes ELISA módszert (Jiang X, Norfolk, USA ajándéka) is alkalmaztunk Laboratóriumunkban norovírus RT-PCR-negatív járványok esetében Pécsett; 3) A norovírus Ag kimutatására alkalmas első ELISA kittek kereskedelmi forgalmú megjelenésével az ÁNTSZ másik 3 regionális laboratóriumaiban (Miskolc, Szeged és Veszprém), valamint az Országos Epidemiológiai Központban (Budapest) is megkezdődtek a norovírus járványügyi vizsgálatok 2006-tól. Ettől kezdve ezekből a Laboratóriumokból az Ag ELISA-pozitív mintákból, illetve ELISA-negatív járványok mintáiból került referencia tevékenység érdekében Laboratóriumunkba vizsgálati anyag norovírus RT-PCR vizsgálatra.

A bejelentett nem bakteriális gastroenteritis járványok (igazolt norovírus és ismeretlen eredetű) havi bontásban 1998. és 2007. szeptember között a 4. ábrán láthatók. A norovírus járványok jellegzetes téli-tavaszi szezonalítást mutatnak, december és március közötti járványcsúccsal. (A norovírus szezon egyezményesen az adott év július 1.-től a következő év június 30.-ig tart.)

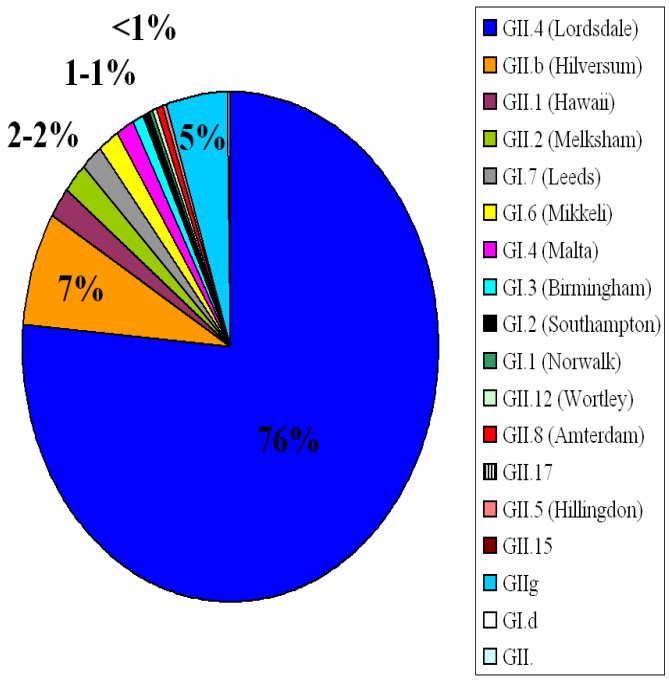


4. ábra. A bejelentett nem bakteriális gastroenteritis járványok, igazolt norovírus (fekete oszlop) és norovírusra nem vizsgált, továbbra is ismeretlen eredetű (szürke oszlop) járványok (bal oldali y-tengely) havi bontásban 1998 és 2007. szeptember között hazánkban. Az ábra a havonta jelentett gastroenteritis esetek számát (jobb oldali y-tengely) is mutatja (vörös vonal). A miskolci vízjárvány 2006. júniusában külön jelölve, lásd a magyarázatot a szövegben később. (Az ábra elkészítéséhez szükséges adatok részben az OEK, Járványügyi Osztályától, Budapest származnak, dr. Krisztalovics Katalin szíves segítségének köszönhetően.)

A 928 norovírus járványnak, a norovírus genotípus szerinti besorolása az 5. ábrán látható. Összesen 6 féle GI genocsoportú (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.6 és GI.d) és 11 féle GII genocsoportú (GII.1, GII.2, GII.4, GII.5, GII.7, GII.8, GII.12, GII.15, GII.17, GII.b és GII.g) norovírust azonosítottunk (6. ábra). A GI és a GII genocsoportú vírusok aránya 6,6% és 93,4%. Az egyes genotípusok időbeli megjelenése sajátos mintázatot mutat. A vizsgált időintervallumban a járványok döntő többségét (76%) a GII.4 genotípusba tartozó norovírusok okozták (6. ábra), és jellegzetesen a téli-tavaszi hónapokban a járványok számának emelkedését (szezon) e vírusok idézték elő (5. ábra). Más genotípusok messze kisebb százalékos arányban fordultak elő (6. ábra). Ugyanakkor e ritkábban kimutatott genotípusoknál is a járványok időbeli csoportosulása figyelhető meg: például a GI.6 2001. vége és 2002. eleje között; a GI.1 2004. végén; vagy a GII.2 2002 elején.

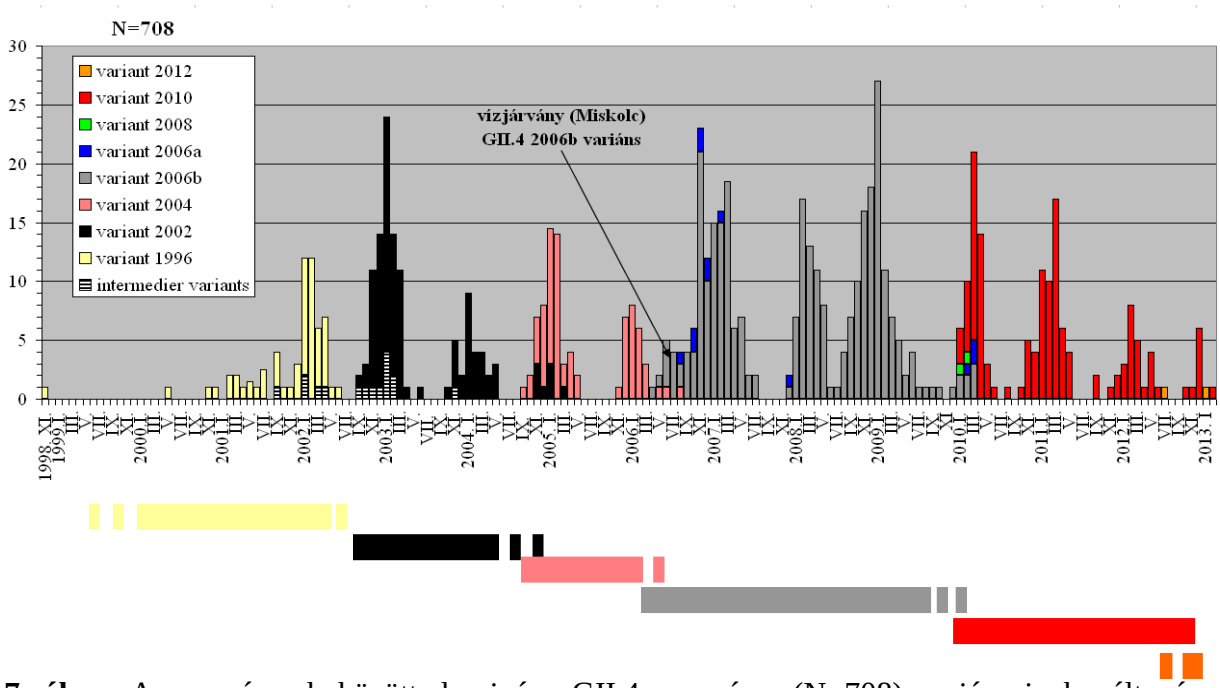


5. ábra. Az RT-PCR és szekvenálás módszerével igazolt hazai norovírus járványok (N=928) havi eloszlása 1998. november és 2013. február között (x-tengely), a járványból kimutatott norovírus genotípusának (RNS-polimeráz régió, ORF1) színkódolt megadásával. (y-tengely: a járványok száma: 1 egység az y-tengelyen 1 norovírus járványt jelöl).



6. ábra. A norovírus genotípusok százalékos aránya a norovírus járványokban (N=928) 1998 és 2013 között hazánkban a norovírusok RNS-polimeráz (ORF1) régiója alapján.

A GII.4 genotípusú norovírusok genetikai állományának finom szekvencia és filogenetikai elemzésével (ábra nélkül) további domináns változatok különíthetők el (7. ábra). Ezek valójában klonális genomvariánsok, jellegzetes pontmutációkkal (drift-mutánsok), vagy nukleotid inzercióval (GII.4-2006b), melyek 2-4 évig – meghatározó variánsként - cirkuláltak 2000 és 2013 között a populációban. Összesen 5 ilyen epidémiás GII.4 variánst lehet időrendben kiemelni: 2002-ig a GII.4-1996, 2002 és 2005 között a GII.4-2002, 2004 és 2006 között a GII.4-2004, 2006 és 2010 között a GII.4-2006b és 2010 és 2013 között a GII.4-2010. (Feltehetőleg a következő a GII.4-2012 variáns lehet, mely 2012-ben jelent meg.) Külön említést érdemel a 2006. júniusában Miskolcon kitört vízjárvány (65.000 fő exponált és 3600 fő



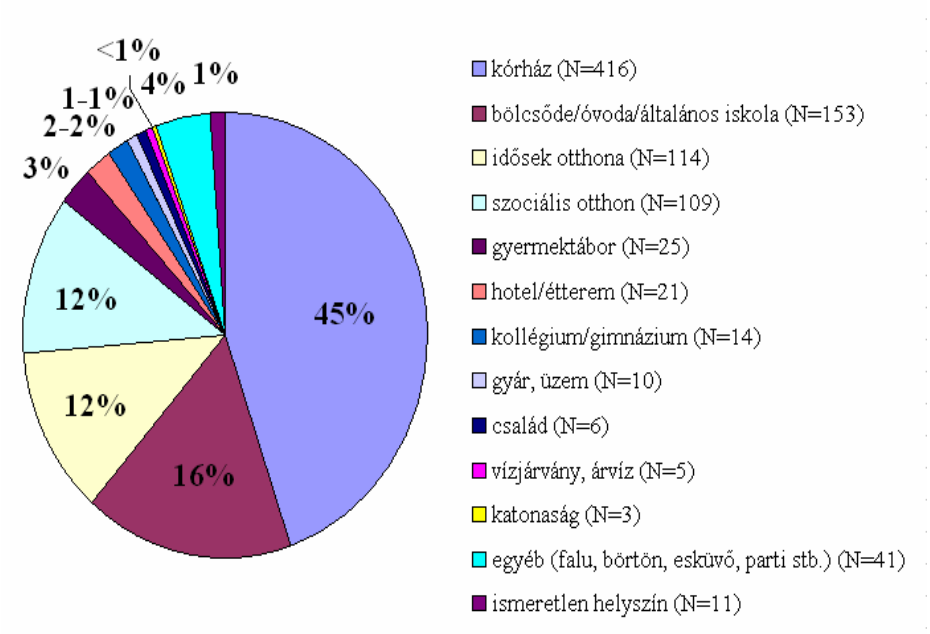
7. ábra. A norovírusok között domináns GII.4 norovírus (N=708) variánsainak változása (antigén drift) a járványokban 1998 és 2013 között hazánkban. Összesen öt GII.4 domináns klón (variáns 1996, 2002, 2004, 2006b, 2010) cirkulációját lehetett megfigyelni. 2012 végén a GII.4-2012 variáns is megjelent hazánban, mely várhatóan kiszoríthatja a GII.4-2010 klónt. 2006. júniusában Miskolcon történt vízjárvány jelentős járványügyi esemény volt hazánkban: a járványban érintettek nagy száma jelentősen befolyásolta az éppen akkor indult új klón, a GII.4-2006b, hazai felsokszorozódását és elterjedését.

megbetegedett), mely során a városi karszt vízbázis (majd a csapvíz) a heves esőzések és a Szinva patak áradása miatt szennyvízzel kontaminálódott. A megbetegedésekből a GII.4-2006b norovírus volt kimutatható, amely mint új drift mutáns éppen ekkor jelent meg a hazai

populációban. E járványügyi katasztrófa (mely az eddig regisztrált legnagyobb hazai vízjárvány volt) nagymértékben elősegítette a GII.4-2006b norovírus gyors felsokszorozódását és elterjedését a fogékony populációban és az igen erős és korán elindult 2006/2007-es norovírus szezonhoz vezetett. (Miskolcról kiindulva egyre tágabb földrajzi területről lehetett e virális klón megjelenését regisztrálni, a terjedését nyomon követni. Az első lépésként a miskolci betegek a környező kórházakba kerülve, immár kórházi járványokat indítottak el!). A GII4.-2006 a követő 2 szezonban is domináns maradt.

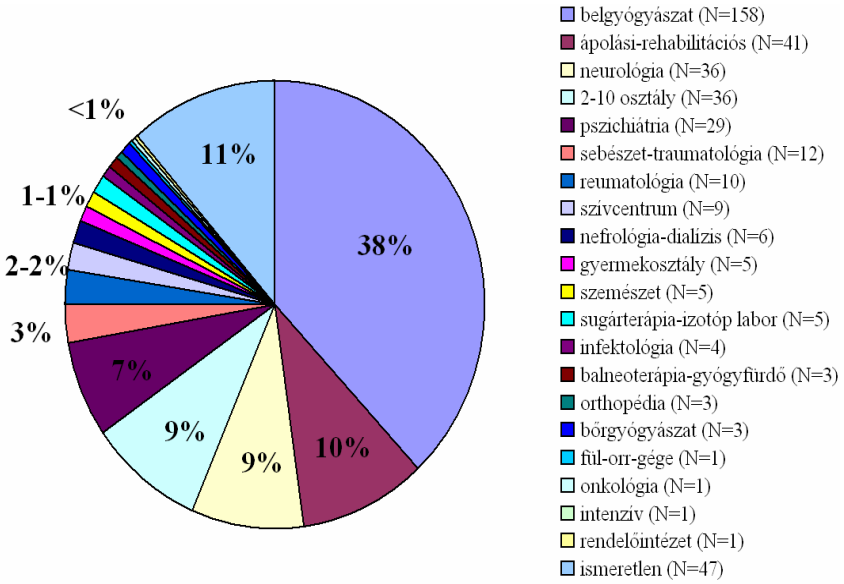
Az antigén drift mutáns GII.4 norovírusok mellett gyakoriságuknál, így a járványügyi jelentőségénél fogva kiemelendők a rekombináns norovírusok, amikor egy adott RNS-polimeráz genom régió (ORF1) különböző kapszidot kódoló genomrégiókkal (ORF2) rekombinálódik az ORF1/ORF2 kapocs-régió határán. A norovírusok rekombinációra való hajlamossága 1999-től ismert (Jiang et al., 1999b). A hazai járványok körében két rekombináns, a GII.b és a GII.g emelhető ki (5. és 6. ábra). A GII.b-t a járványok 7%-ból (N=68) lehetett kimutatni 2001. tavasza és 2008 nyár között, a GII.g-t pedig a járványok 5%-ból (N=44) lehetett azonosítani 2009. ősz és 2012. nyár között. A GII.b RNS-polimeráz régiója 4 különböző kapsziddal (GII.1, GII.2, GII.3 és GII.4), a GII.g RNS-polimeráz régiója pedig 2 különböző kapsziddal (GII.1 és GII.12) rekombinálódott (ábra nélkül).

A folyamatos, időben hosszú hazai surveillance alkalmat adott a norovírus járványok klinikai és epidemiológiai jellegzetességeinek leírásához is. A megbetegedési arány átlagosan 24,6% volt (6,2-83%; N=449 genotipizált járvány körében). A vezető tünetek a hasmenés (73,1%), hányás (62,2%), hasi fájdalom (49,8%), a hőemelkedés (19,9%; <37,5°C) és láz (17%; >37,5°C) voltak. Ezen kívül hányinger, izomfájdalom, fejfájás és elesettség társulhat a kórképpel. Gyermekkorban (18 év alatt) a hányás szignifikánsan gyakoribb (85%), mint a felnőttkorban (51%) (χ^2= 27; P<0,001), viszont a hasmenés ezzel éppen ellentétes, felnőttkorban gyakoribb (91%), gyermekkorban ritkább (35%) volt (χ^2= 67; P<0,001). A



8. ábra. A norovírus járványok helyszínei (N=928) hazánkban 1998 és 2013 között.

norovírus járványok helyszíneinek gyakorisága a 8. ábrán látható. A norovírus járványok leggyakoribb helyszínei a kórházak, egészségügyi intézmények (45%), majd a gyermekközösségek (16%) és idős és szociális otthonok lakói (12-12%) voltak. Az érintett kórházi osztályok a 9. ábrán láthatók a gyakoriság sorrendjében. A legtöbb norovírus



9. ábra. A kórházi norovírus járványok (N=416) helyszínei kórházi osztályok szerint.

járványt belgyógyászati (38%), ápolási-rehabilitációs (10%), neurológiai (9%), több kórházi osztályon (9%) és pszichiátriai (7%) osztályokról sikerült azonosítani. A kórházi járványok közvetlen kontaktussal terjedő nozokómiális járványoknak tekinthetők, melyek átlagosan 2 hétig tartottak egy-egy egészségügyi intézményben.

Tekintettel arra, hogy a norovírus járványügyi vizsgálatokat a „Foodborne Viruses in Europe" (FBVE) és az „Enteric Virus Emergence – New Tools" (EVENT) Konzorciumok keretében végeztük, célszerű e munka európai szinten összefoglalt eredményeit is bemutatni.

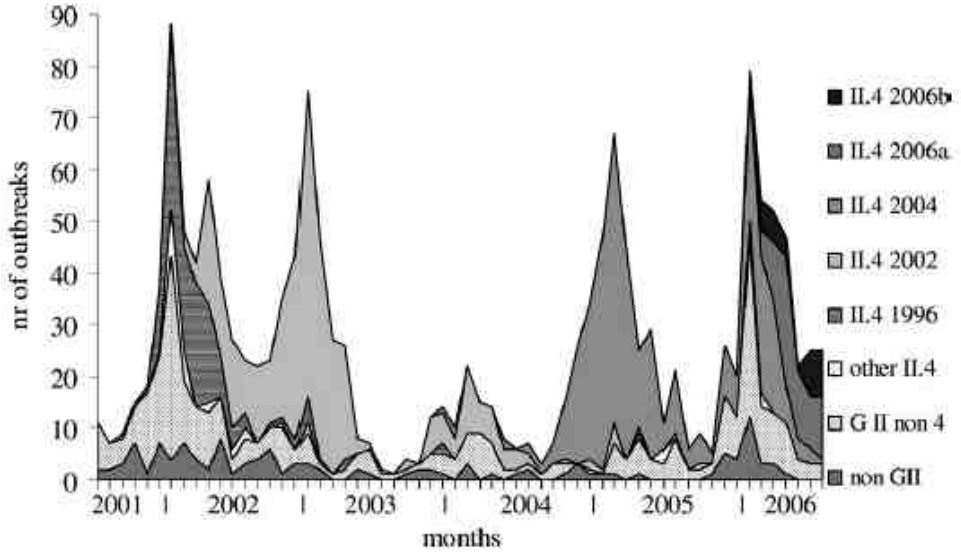
Country[b]	Value by season[a]: 2001–2002				2002–2003				2003–2004			
	N all (%)[c]	Rate[d]	N type (%)[e]	N type + epi (%)[f]	N all (%)	Rate	N type (%)	N type + epi (%)	N all (%)	Rate	N type (%)	N type + epi (%)
DE	74 (8.7)	0.9	74 (15.7)	74 (21.8)	99 (8.8)	1.2	99 (22.1)	98 (27.4)	0		0	0
DK	21 (2.5)	3.9	1 (0.2)	1 (0.3)	5 (0.4)	0.9	2 (0.4)	1 (0.3)	4 (1.2)	0.7	0	0
ES	43 (5.0)	1.0	34 (7.2)	19 (5.6)	36 (3.2)	0.9	24 (5.4)	15 (4.2)	4 (1.2)	0.1	3 (2.6)	0
FI	55 (6.5)	10.6	45 (9.6)	9 (2.6)	118 (10.5)	22.7	22 (4.9)	3 (0.8)	22 (6.6)	4.2	18 (15.4)	3 (4.5)
FR	9 (1.1)	0.1	7 (1.5)	5 (1.5)	13 (1.2)	0.2	11 (2.5)	11 (3.1)	9 (2.7)	0.1	8 (6.8)	4 (8.1)
EW	485 (56.9)	8.2	191 (40.6)	133 (39.1)	563 (50.0)	9.5	60 (13.4)	42 (11.7)	192 (57.8)	3.2	11 (9.4)	0
HU	92 (10.8)	9.0	61 (13.0)	43 (12.6)	112 (9.9)	11.0	97 (21.7)	63 (17.6)	51 (15.4)	5.0	39 (33.3)	22 (33.3)
IE	0				0				0			
IT	1 (0.1)	0.0	1 (0.2)	0	2 (0.2)	0.0	2 (0.4)	1 (0.3)	1 (0.3)	0.0	0	0
NL	59 (6.9)	3.7	55 (11.7)	54 (15.9)	148 (13.1)	9.1	107 (23.9)	101 (28.2)	27 (8.1)	1.7	25 (21.4)	25 (37.9)
NO	0				0				0			
SE	7 (0.8)	0.8	1 (0.2)	2 (0.6)	12 (1.1)	1.3	10 (2.2)	9 (2.5)	15 (4.5)	1.7	13 (11.1)	12 (18.2)
SL	6 (0.7)	3.0	0	0	19 (1.7)	9.5	14 (3.1)	14 (3.9)	7 (2.1)	3.5	0	0
Total	852 (100)	2.4	470 (100)	340 (100)	1,127 (100)	3.5	448 (100)	358 (100)	332 (100)	1.6	117 (100)	66 (100)

Value by season[a]: 2004–2005				2005–2006				Whole period, 2001–2006		
N all (%)	Rate	N type (%)	N type + epi (%)	N all (%)	Rate	N type (%)	N type + epi (%)	N all (%)	N type (%)	N type + epi (%)
1,500 (64.1)	18.2	0	0	2,135 (71.5)	25.9	0	0	3,808 (49.9)	173 (9.4)	172 (13.2)
7 (0.3)	1.3	3 (0.7)	3 (1.1)	18 (0.6)	3.3	17 (4.3)	16 (5.8)	55 (0.7)	23 (1.2)	21 (1.6)
14 (0.6)	0.3	13 (3.1)	3 (1.1)	30 (1.0)	0.7	27 (6.8)	23 (8.4)	127 (1.7)	101 (5.5)	60 (4.6)
54 (2.3)	10.3	31 (7.5)	5 (1.9)	44 (1.5)	8.4	16 (4.0)	9 (3.3)	293 (3.8)	132 (7.1)	29 (2.2)
26 (1.1)	0.4	26 (6.3)	18 (6.8)	31 (1.0)	0.5	31 (7.8)	24 (8.7)	88 (1.2)	83 (4.5)	62 (4.8)
357 (15.3)	5.9	41 (9.9)	0	341 (11.4)	5.6	81 (20.4)	0	1,938 (25.4)	384 (20.8)	175 (13.4)
81 (3.5)	8.0	71 (17.1)	41 (15.4)	62 (2.1)	6.2	41 (10.3)	34 (12.4)	398 (5.2)	309 (16.7)	203 (15.6)
81 (3.5)	19.7	68 (16.4)	67 (25.2)	128 (4.3)	30.4	44 (11.1)	44 (16.0)	209 (2.7)	112 (6.1)	111 (8.5)
9 (0.4)	0.2	5 (1.2)	1 (0.4)	3 (0.1)	0.1	2 (0.5)	1 (0.4)	16 (0.2)	10 (0.5)	3 (0.2)
168 (7.2)	10.3	132 (31.9)	104 (39.1)	120 (4.0)	7.3	101 (25.4)	89 (32.4)	522 (6.8)	420 (22.7)	373 (28.6)
16 (0.7)	3.5	0	0	22 (0.7)	4.7	0	0	38 (0.5)	0	0
11 (0.5)	1.2	10 (2.4)	10 (3.8)	26 (0.9)	2.9	20 (5.0)	20 (7.3)	71 (0.9)	54 (2.9)	53 (4.1)
16 (0.7)	8.0	14 (3.4)	14 (5.3)	25 (0.8)	12.5	18 (4.5)	15 (5.5)	73 (1.0)	46 (2.5)	43 (3.3)
2,340 (100)	6.4	414 (100)	266 (100)	2,985 (100)	8.2	398 (100)	275 (100)	7,636 (100)	1,847 (100)	1,305 (100)

[a] Date of onset between 1 July year x and 30 June year $x + 1$.
[b] DE, Germany; DK, Denmark; ES, Spain; FI, Finland; FR, France; EW, England and Wales; HU, Hungary; IE, Ireland; IT, Italy; NL, The Netherlands; NO, Norway; SE, Sweden; SL, Slovenia.
[c] N all (%), number of outbreaks per country and % of all outbreaks of that season.
[d] Rate, number of outbreaks per million inhabitants per country (population on 1 January of 2002 to 2006; source, Eurostat [http://epp.eurostat.ec.europa.eu]). Total rate per season is calculated using only the contributing countries within that season in the denominator.
[e] N type (%), number of outbreaks with typing data and % of all outbreaks with typing data.
[f] N type + epi (%), number of outbreaks with typing data and known mode of transmission and setting and % of all outbreaks with typing data and known mode of transmission and setting.

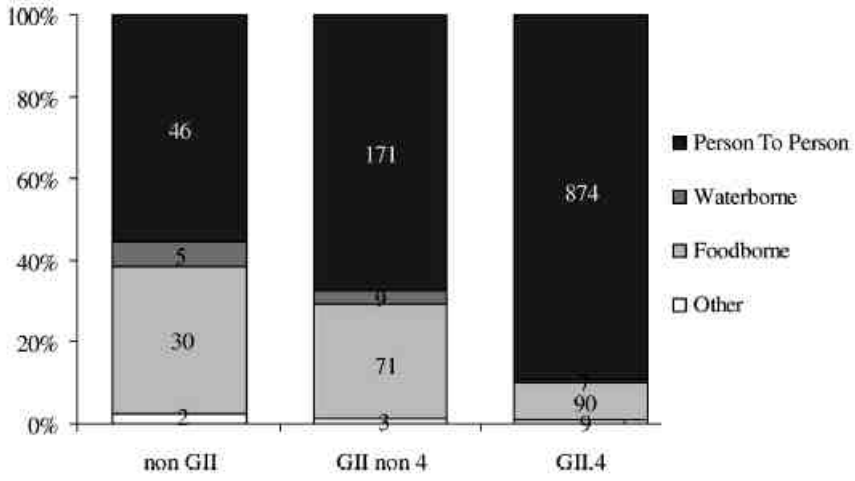
2. táblázat. A jelentett járványok száma az egyes norovírus járványszezonokban (2001-2006) országonként Európában.

A Konzorcium tagjai (13 ország) a norovírus járványok epidemiológiai és virológiai adatait egy integrált web-alapú adatbázisban gyűjtötte, és rendszeres időközönként elemezte. 2001. július 1. és 2006. június 30. között az egyes országokból származó adatok a 2. táblázatban láthatók. A hazánkból 2001 és 2006 között származó adatok az összes adat (amikor az adott járványt okozó norovírus genotípusa, átviteli módja és helyszíne is ismert) 15,6%-át tették ki. Ez azt jelenti, hogy Hollandia (28,6%) után, a 13 ország közül, a második legtöbb – egyben megfelelő minőségű - adatot szolgáltattuk az elemzésekhez. A vizsgálati periódusban azonosított legfontosabb norovírus genotípusok (és variánsok) kumulatív formában a 10. ábrán láthatók. Az 5 éves periódus alatt a GII.4 Európában is domináns volt minden szezonban és szignifikánsan összefüggött október és március között a norovírus járványok számának megszaporodásával. A GII.4 genotípuson belül a GII.4 variánsok (GII.4-1996, GII.4-2002, GII.4-2004, GII.4-2006a és GII.4-2006b) Európában is megkülönböztethetők (10. ábra).



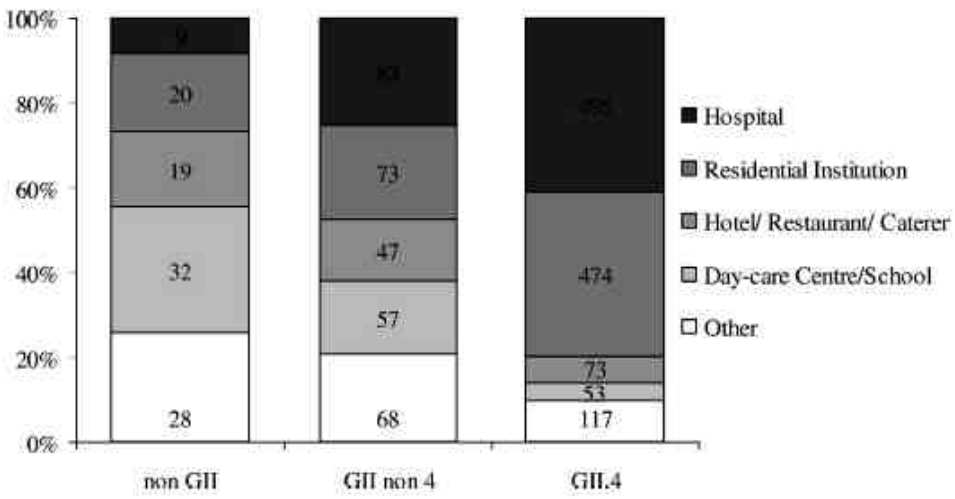
10. ábra. A járványokból kimutatott norovírus genotípusok és variánsok kumulatív adata 2001 és 2006 között havi bontásban abból a 7 európai országból (Anglia, Finnország, Franciaország, Hollandia, Magyarország, Spanyolország, Svédország), amely a vizsgálat teljes ideje alatt folyamatosan szolgáltatott szekvencia adatokat.

A jelentett norovírus járványok 88%-ban (N=4429) az átvitel közvetlen kontaktussal történt, 10%-ában (N=506) élelmiszer eredet, 2%-nál (N=76) pedig víz eredetet volt a fő átviteli út. Azokban a norovírus járványokban, ahol a genotípus is ismertté vált (N=1317), ugyancsak a közvetlen kontaktus (83%) volt a fő átviteli út. Ha a norovírus járvány átviteli módját a norovírus genotípussal vetjük össze (11. ábra), akkor azt látjuk, hogy a GII.4 norovírus szignifikánsan gyakrabban terjed közvetlen kontaktussal (OR, 6,3; 95% CI, 3,8-46,6; P<0,001), a nem GII norovírus (azaz GI) pedig élelmiszerrel.



11. ábra. A norovírus járvány átviteli módja és a norovírus genotípus kapcsolata (N=1317).

A jelentett norovírus járványok 72%-a (N=4710) egészségügyi-szociális intézményekben történt (idősek otthona N=2383; kórház N=2327). Azokban a norovírus járványokban, ahol a genotípus is ismertté vált (N=1641) ugyancsak ezek a helyszínek (70%) voltak a legfontosabbak. Ha a norovírus járvány helyszínét a norovírus genotípussal vetjük össze (12. ábra), akkor azt látjuk, hogy a kórházi és idős otthoni környezetben a GII.4 norovírus szignifikánsan nagyobb kockázattal fordul elő (OR, 11,8; 95% CI, 7,0-1086,6; P<0,001) más genotípusokhoz képest.



12. ábra. A norovírus járvány helyszíne és a norovírus genotípus kapcsolata (N=1648).

Összefoglalva a helyszínt, az átviteli módot és a szezonalítást és ezt multivariációs logisztikus regressziós modellben vizsgálva az tapasztalható (3. táblázat), hogy az egészségügyi-szociális intézményekben 9-szer nagyobb az esélye annak, hogy norovírus járványt a GII.4 okozta, minthogy nem GII.4 norovírus okozta a járványt. Annak pedig 2-szeres az esélye (9. táblázat), hogy egy közvetlen kontaktussal terjedő norovírus járványt a GII.4 norovírus okoz.

ORs of multinomial logistic regression, NoV strain groups for person-to-person transmission, high season, and health care outbreaks[a]

Variable	GII.4		GII non-4	
	OR	*P*	OR	*P*
Person to person	1.9	0.026	1.0	0.8981
Health care[b]	8.8	<0.0001	2.6	0.003
n[c]	976		250	

[a] Reference category for the equation is non-genogroup II (n = 79).
[b] Hospital or residential institution.
[c] Total n = 1,305.

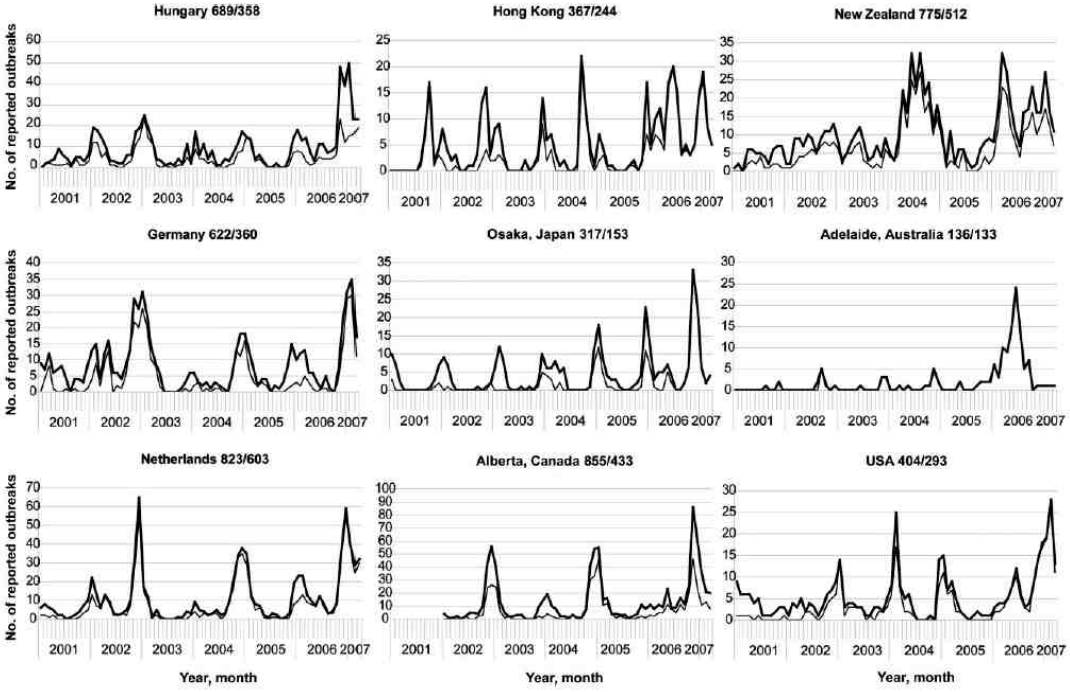
3. táblázat. A GII.4 és nem GII.4 norovírus genotípus kockázati szerepe a közvetlen kontaktusban, erős szezonban és egészségügyi-szociális intézményekben.

Az eredmények építve, a járványügyi felderítő munkát és az élelmiszer eredetű (akár nemzetközi) járványok kiszűrését elősegítő, epidemiológiai adatokra épülő, web-alapú program, a „Transmission mode tool”, került kifejlesztésre (http://www.rivm.nl/en/Topics/Topics/N/NoroNet/Databases/Transmission_mode_tool:183060), mely már a genotipizálás előtt (vagy nélkül!) valószínűsíti (szenzitivitás 80%, specificitás: 86%) a járvány élelmiszer eredetét (Verhoef et al., 2009).

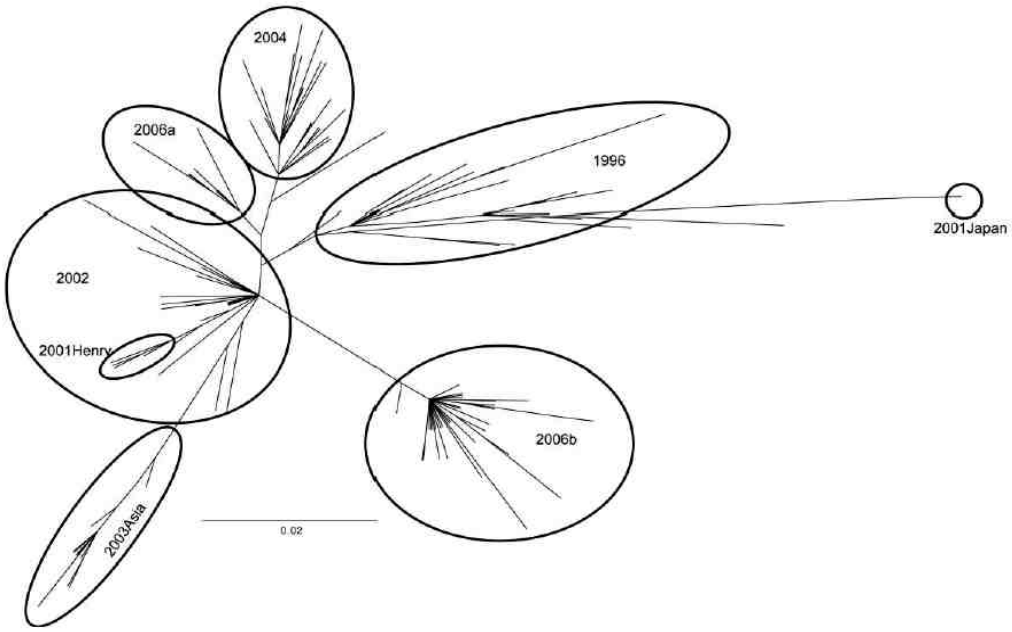
- A norovírusok pandémiás szerepe

Egy adott lokális földrajzi egység, ország területén a norovírusok szerepének feltárását követően felmerült, hogy a norovírusoknak nemcsak egy-egy járványban, epidémiákban, de kontinensre, illetve több kontinensre kiterjedő nemzetközi pandémiákban is szerepük lehet. Ennek első bizonyítéka a 2004-ben a Lancetben megjelent tanulmányunk volt (Lopman et al., 2004), mely a GII.4-2002 norovírus variáns első megjelenését, gyors európai elterjedését írta le számos európai országban, így hazánkba is. Felmerült, hogy az európai vizeken és folyókon egyre intenzívebben közlekedő kirándulóhajók szerepet játszhatnak egy-egy GII.4 variáns elterjesztésében, ennek következtében a szokatlanul erős tavaszi és nyári norovírus aktivitás prediktív értékkel rendelkezhet és befolyásolhatja egy következő norovírus szezon lefolyását (Verhoef et al., 2008). A pandémia igazolására alakult a NoroNet. A retrospektív elemzés során 5 kontinens 15 laboratóriuma a domináns GII.4 variánsok járványadatait egyesítette 2001. január és 2007. március között. Összesen 3098 GII.4 járvány (ez az összes genotipizált norovírus járvány 62%-a, 13. ábra) elemzése alapján 8 GII.4 variánst lehetett azonosítani, melyek közül 4 (GII.4-1996, GII.4-2002, GII.4-2004 és a GII.4-2006b) globálisan nagymértékben elterjedt, azaz pandémiás klónoknak tekinthetők (14. és 15. ábra). A 2003Asia és a GII.4-2006a GII.4 variánsok földrajzilag korlátozottabb epidémiákat, a 2001Japan és 2001Henry GII.4 minor variánsok alacsony intenzitású járványokat okozta szűk földrajzi

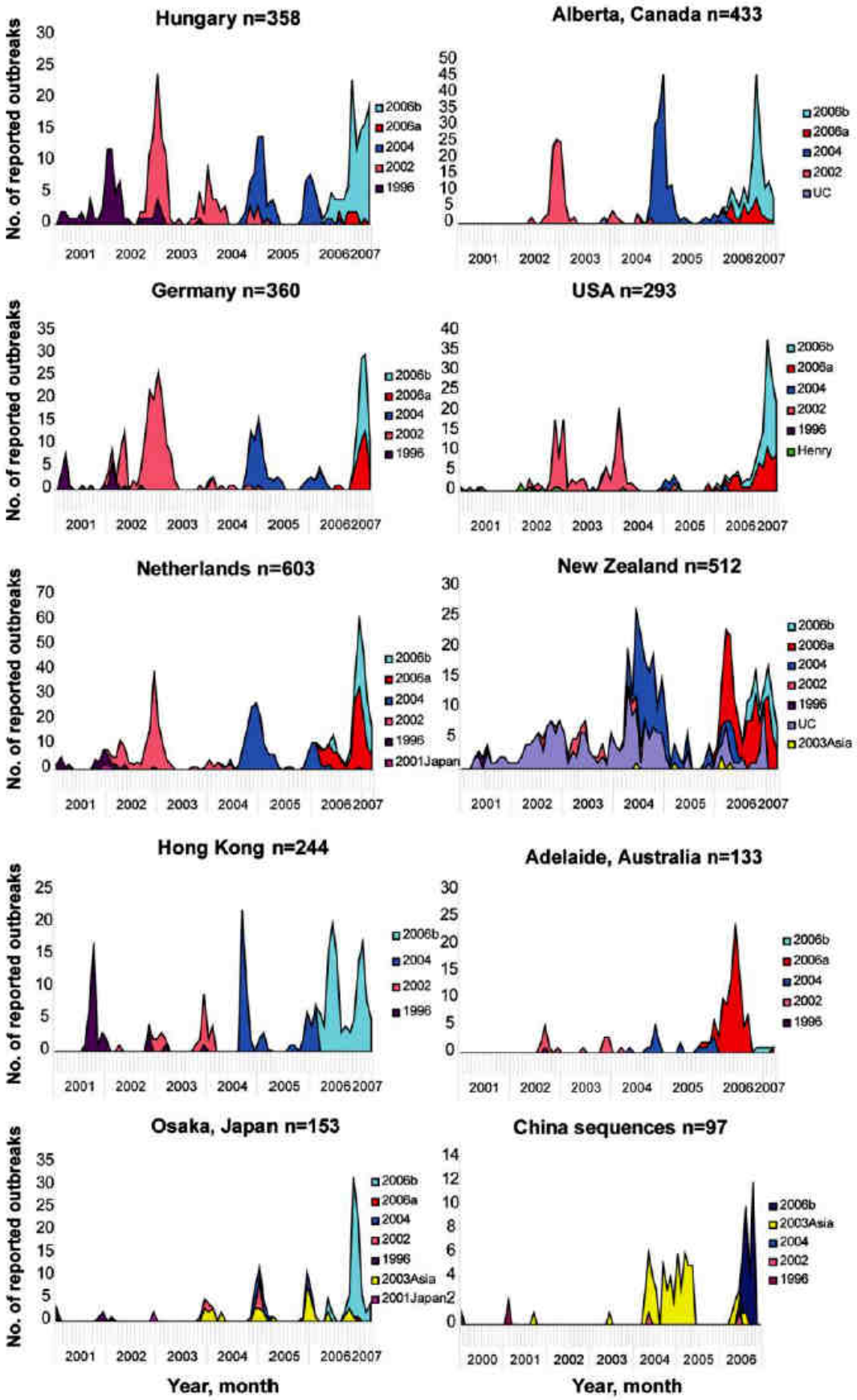
körben (15. ábra). A vizsgálat bizonyítja, hogy egy-egy GII.4 klón világszerte elterjedve képes pandémiát okozni viszonylag rövid időn belül (16. ábra).



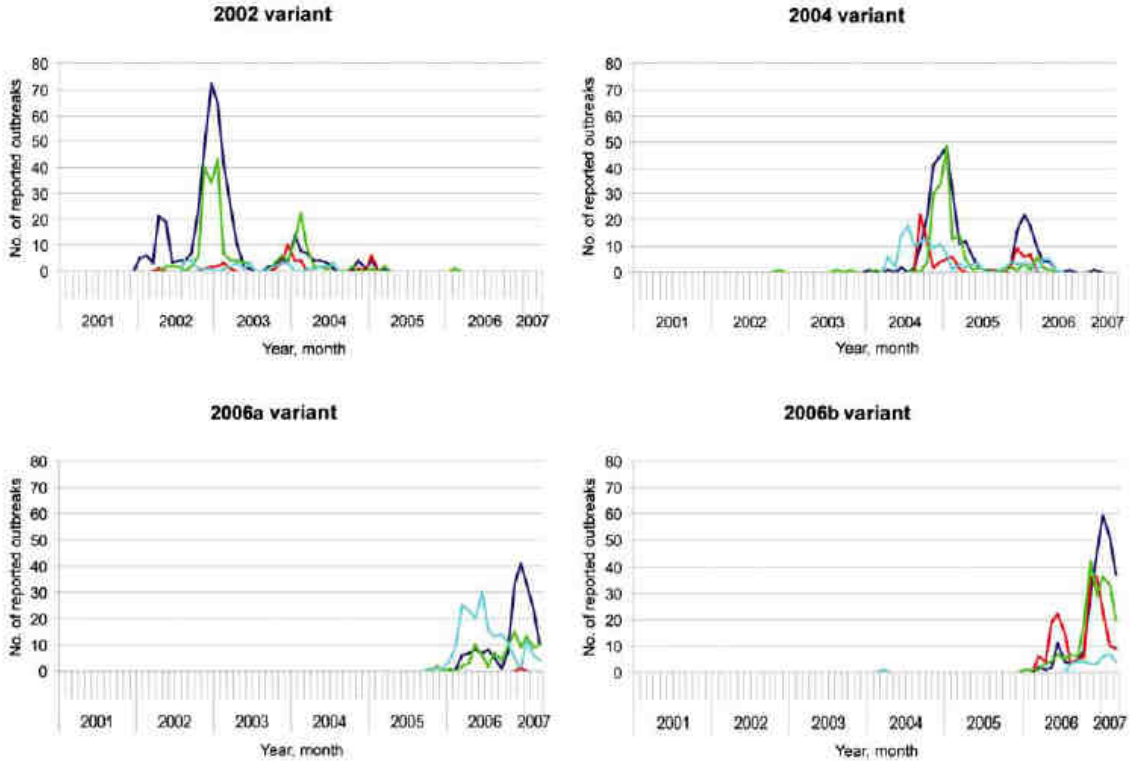
13. ábra. A jelentett norovírus járványok havi száma (vastag vonal) és ezen belül a GII.4 genotípusú norovírus járványok (vékony vonal) különböző földrajzi régiókban. (Az y-tengely különböző skálabeosztású.) A jelentett összes norovírus és GII.4 norovírus járványok összes száma az országok nevei mellett szerepelnek.



14. ábra. A GII.4 norovírus variánsok (N=301) részleges kapszid szekvenciája (ORF2) alapján készített filogenetikai elemzés (maximum-likelihood módszer). A GII.4 szekvenciák eredete: Ausztrália, Kína, Németország, Ghána, Hong Kong, Magyarország, Japán, Hollandia, Új-Zéland, USA.



15. ábra. A GII.4 variánsok prevalenciája különböző földrajzi régiókban 2001 és 2007 között. (Az y-tengely különböző skálabeosztású.)



16. ábra. A GII.4 norovírus variánsok által okozott járványok megjelenésének időrendje az egyes kontinenseken, kumulálva és színkódolva. Sötétkék: Európa (Hollandia, Magyarország, Németország); vörös: Ázsia (Hong Kong, Japán); zöld: Észak-Amerika (USA, Kanada); világoskék: Óceánia (Új-Zéland, Ausztrália).

Norovírusok állatokban

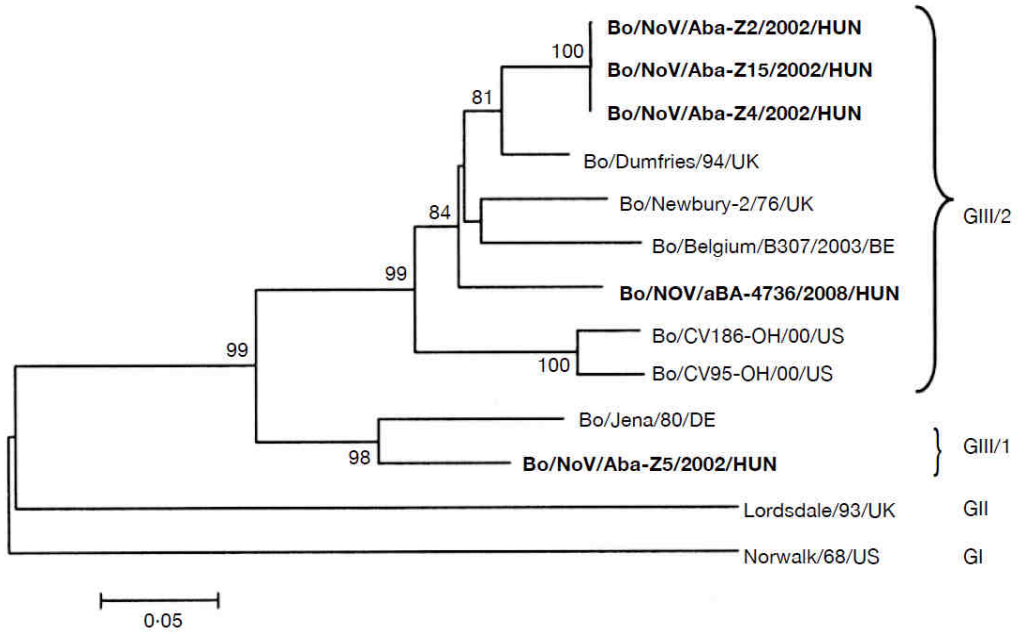
- Bovine (szarvasmarha) norovírus

A szarvasmarha norovírust először az Egyesült Királyságban, majd Németországban írták le szarvasmarhák hasmenéses megbetegedéseiből 1978-ban (Almeida et al., 1978) és 1980-ban (Günther et al., 1984), de csak az ezredfordulón határozták meg a két prototípus vírus, a Bo/Newbury2/1976/UK és a Bo/Jena/1980/DE, genetikai állományát. A norovírusok GIII genocsoportjában kaptak helyet 1999-ben, és mivel a két vírus a kapszid régió aminosav sorrendjében csak 68%-os azonosságot mutat két genotípusba (GIII.1 és GIII.2) sorolták őket (Oliver et al., 2003). Az ezredfordulót követően néhány további országból is beszámoltak szarvasmarha norovírus (elsősorban a GIII.2 genotípus) kimutatásáról szarvasmarha állományokból, így Hollandiából (van der Poel et al., 2000), az USA-ból (Smiley et al., 2003;

Wise et al., 2004), Belgiumból (GenBank), Dél-Koreából (Park et al., 2007) és Olaszországból (GenBank), mely jelzi e vírus földrajzi elterjedtségét. A GIII.1 genotípusban kevesebb, mint 10 víruskimutatás történt és csak a prototípus GIII.1, a Bo/Jena/1980/DE kapszidjának aminosav sorrendje ismert.

Összesen 47 szarvasmarha bélsár minta került összegyűjtésre két közép-magyarországi szarvasmarha telepen Abán (Fejér megye) és Tiszaalpáron (Bács-Kiskun megye) 2002. februárban. Az abai farmról a 870 állatból 32-től, a tiszaalpári farmról 15 állattól történt mintavétel. Az abai 32 mintavételbe vont állat koreloszlása a következő volt: 6 állat 1-9 napos, 4 állat 14-17 napos, 5 állat 6-7 hónapos és 17 állat 2,5-7,6 éves volt. A mintákból izolált RNS-t a norovírusok és sapovírusok RNS-függő RNS polimeráz régiójára tervezett p289/p290 jelű általános calicivírus primerekkel (Jiang et al., 1999) és a norovírusok RNS-polimeráz régiójára tervezett JV13I/JV12Y jelű primerpárok (Vennema et al., 2002) segítségével vizsgáltuk RT-PCR módszerrel.

A 47 szarvasmarha bélsár minta egyikéből sem sikerült calicivírust kimutatni a p289/p290 jelű primerpárral. Ugyanakkor 4 (8,5%) minta esetén kaptunk specifikus méretű terméket RT-PCR módszerrel a JV13I/JV12Y primerpárral. Mind a négy norovírust tartalmazó minta az abai farm fiatal életkorú állataitól származott. Három állat 1-9 nap közötti, egy állat 6-7 hónapos volt. Három szarvasmarha (két 1-9 napos és a 6-7 hónapos) mintája 2-es genotípusú (GIII.2, Newbury2 vírus) egy 1-9 napos szarvasmarha mintája 1-es genotípusú (GIII.1, Jena vírus) szarvasmarha norovírust tartalmazott (17. ábra).



17. ábra. A szarvasmarha norovírusok (Bo/NoV/Aba-Z2/2002/HUN, EU360813; Bo/NoV/Aba-Z4/2002/HUN; Bo/NoV/Aba-Z15/2002/HUN és Bo/NoV/Aba-Z5/2002/HUN, EU360814) filogenetikai elemzése a calicivírusok 285 nukleotid hosszú RNS-függő RNA polimeráz régió (ORF1) alapján (neighbor-joining módszer, MEGA3.1 program (version 3.1; http://www.megasoftware.net). A hazai vírus-szekvenciák félkövér betűkkel vannak szedve. Az elemzéshez csak a teljes, 285 nukleotid hosszú vírus-szekvenciákat használtuk fel a GenBankból. Az ágrajzon csak az 50%-nál nagyobb bootstrap értékek vannak jelölve. A felhasznált szekvenciák azonosító számai a GenBankban: Bo/Newbury2/76/UK (AF097917), Bo/Dumfries/94/UK (AY126474), Bo/CV186-OH/00/US (AF542084), Bo/CV95-OH/00/US (AF542083), Bo/Belgium/B307/2003/BE (AY686496), Bo/Jena/80/DE (AJ011099) és Norwalk/68/US (M87661).

Mindhárom GIII.2 genotípusú szarvasmarha norovírus (Bo/NoV/Aba-Z2/2002/HUN, EU360813; Bo/NoV/Aba-Z4/2002/HUN és Bo/NoV/Aba-Z15/2002/HUN) genetikailag azonos, 93% és 90%-os nukleotid azonosságot (97% és 98%-os aminosav azonosságot) mutat a genetikailag legközelebbi (Bo/Dumfries/94/UK; AY126474) és a prototípus GIII.2 szarvasmarha norovírushoz (Bo/Newbury2/76/UK; AF097917). A GIII.1 vírus (Bo/NoV/Aba-Z5/2002/HUN, EU360814) 87%-os nukleotid és 98%-os aminosav azonosságot mutat a prototípus Bo/Jena/80/DE (AJ011099) vírushoz az RNS-polimeráz régió alapján. A Bo/NoV/Aba-Z5/2002/HUN (EU360814) vírus teljes kapszid régióját (1557 nukleotid/519 aminosav) is meghatároztuk, melynek nukleotid/aminosav azonossága a prototípus GIII.1 genotípus képviselőjéhez, a Bo/Jena/1980/DE vírushoz, 86/97%-os. A

kapszid régión belül az S, P1A, P2 és P1B doméneket külön-külön összehasonlítva a nukleotid/aminosav azonosság a két szarvasmarha norovírus között 87/98%, 86/96%, 86/96% és 85/98%.

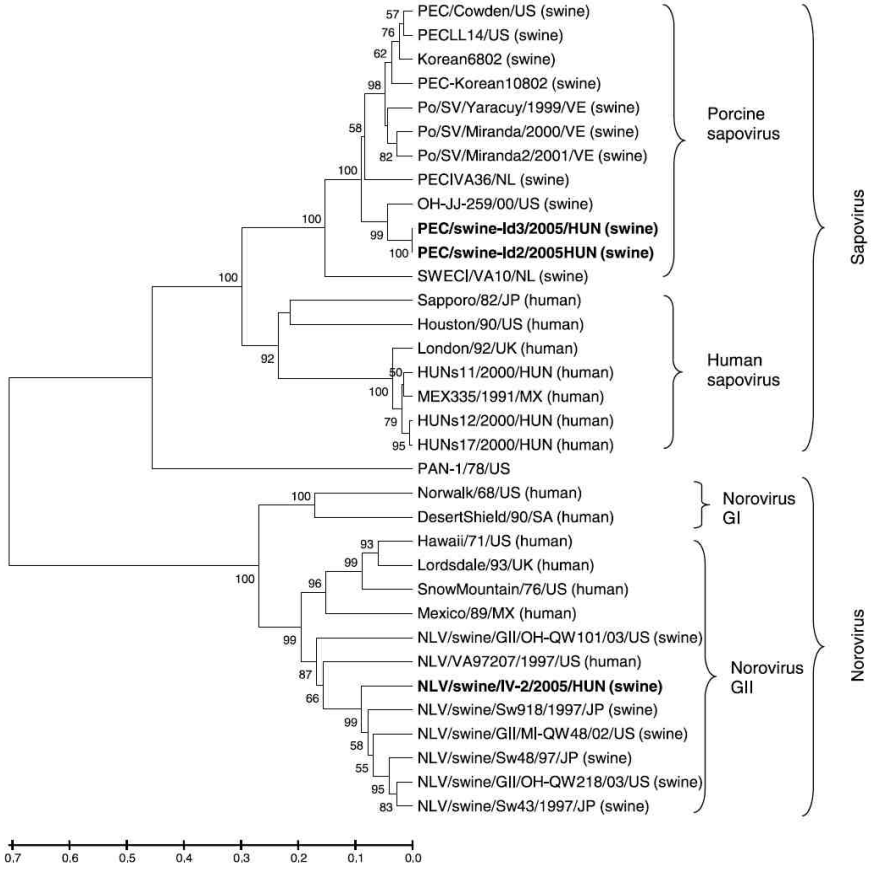
A 2002. februári mintavételt követően – az eredmények birtokában - 6 évvel később, 2008. februárban ismét mintákat gyűjtöttünk az abai szarvasmarha farmról. A 20 napnál fiatalabb 26 állat közül 1 bélsár mintából sikerült szarvasmarha norovírust kimutatni a JV12Y/JV13I primer-párral. A 8 napos üsző borjú a mintavételkor klinikailag egészséges volt. A kimutatott GIII.2 genotípusú vírus (Bo/NoV/Aba-4736/2008/HUN, EU583393) genetikailag 88%-ban, aminosav szinten 98%-ban azonos a Bo/NoV/Aba-Z2/2002/HUN vírushoz.

- Porcine (sertés) norovírus

A sertés norovírust először Japánban mutatták ki 1998-ban (Sugieda et al., 1998), majd Hollandiában (van der Poel et al., 2000) és az Egyesült Államokban (Wang et al., 2005a) sertések bélsár mintáiból. A sertésekből kimutatott norovírusok genetikailag a norovírusok GII genocsoportjába tartoznak és a három közlemény alapján felmerült, hogy talán zoonotikus potenciállal is rendelkezhetnek.

Összesen 17 sertés fécesz mintát vizsgáltunk, melyet két baranyai sertésfarmról gyűjtöttünk 2005. márciusában. A mintákat a calicivírusok RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) régiójára tervezett, univerzális calicivírus primerekkel (p289/p290) RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A PCR-termék mérete norovírusok esetén 319 bp, sapovírusok esetén 331 bp (Jiang et al., 1999). A 17 mintából 1 (5,9%) esetben lehetett norovírust (swine/IV-2/2005/HUN; DQ864982) kimutatni, mely egy 4 hónapos sertéstől származott (18. ábra). A részleges RdRp régió nukleotid sorrendje alapján a vírus 86%, 83%, 75% és 62%-os azonosságot mutatott a legközelebbi (Sw48/97/JP, GII.11), a prototípus sertés norovírushoz (Sw43/1997/JP), a legközelebbi (VA97207/1997/US) és a prototípus humán norovírushoz

(Norwalk/68US). A 2005-ben leírt MI-QW48/02/US és a rekombináns OH-QW218/03/US sertés norovírusokhoz (Wang et al., 2005a) a nukleotid azonosság 85% és 83%.



18. ábra. A sertés norovírus (NLV/swine/IV-2/2005/HUN, DQ864982) és a sertés sapovírusok (PEC/swine-Id2/2005/HUN and PEC/swine-Id3/2005/HUN, DQ383274) filogenetikai elemzése a calicivírusok részleges, 274 nukleotid hosszú RNS-függő RNS polimeráz régiója (ORF1) alapján. A hazai sertésekből kimutatott vírusok vastag betűkkel vannak szedve. Az ágrajz tartalmazza a hazánkban gyermekkori gastroenteritisekből kimutatott prototípus humán sapovírusokat is (HUNs11, HUNs12 és HUNs17) (UPGMA módszer; MEGA version 3.1, http://www.megasoftware.net). GenBank számok: PEC/Cowden/US (AF182760), PECLL14/US (AY425671), Korean6802 (AY289186), PEC-Korean10802 (AY289188), Po/SV/Yaracuy/1999/VE (AY633966), Po/SV/Miranda/2000/VE (AY633963), Po/SV/Miranda2/2001/VE (AY633965), PECIVA36/NL (AY615805), OH-JJ-259/00/US (AY826423), SWECI/VA10/NL (AY615807), Sapporo/82/JP (U77903), Houston/90/US (U95644), London/92/UK (U95645), HUNs11/2000/HUN (AF488717), MEX335/1991/MX (AY157869), HUNs12/2000/HUN (AF488718), HUNs17/2000/HUN (AF488720), Norwalk/68/US (M87661), Desert Shield/90/SA (U04469), Hawaii/71/US (U07611), Lordsdale/93/UK (X86557), Snow Mountain/76/US (U70059), Mexico/89/MX (U22498), NLV/VA97207/1997/US (AY038599), NLV/swine/GII/OH-QW101/03/US (AY823304), NLV/swine/Sw918/1997/JP (AB074893), NLV/swine/GII/MI-QW48/02/US (AY823303), NLV/swine/Sw48/97/JP (AB009413), NLV/swine/GII/OH-QW218/03/US (AY823307), NLV/swine/Sw43/1997/JP (AB074892) és primate vesivirus PAN-1/78/US (U52086).

***Sapovírus* nemzetség**

A sapovírusokat (korábbi néven Sapporo vírus = „Sapporo-szerű vírusok”) először egy árvaházi heveny gastroenteritis járvány során mutatták ki elektronmikroszkóppal („tipikus” vagy „klasszikus” calicivírusok), 1977-ben a japán Sapporoban, amelyről a vírus a nevét is kapta (Chiba et al., 1979; Chiba et al., 2000). A norovírusokhoz képest kevesebbet tudunk a sapovírusokról, járványos előfordulásukat jóval ritkábban írják le, mint a norovírusokét. Úgy tűnik, hogy e vírusok elsősorban a csecsemőket és kisgyermekeket betegítik meg, de idős emberek körében is leírtak járványt (Vinjé, 1999). Az ismert sapovírusokat 2000-ben egy (Vinjé, 1999), 2007-ben öt genocsoportra (GI-GV) osztották (9 genotípussal), melyek közül a sertésekből kimutatott GIII genocsoporton kívül a többi emberi kórokozó (Green, 2007).

Sapovírusok emberben

- Szórványos sapovírus esetek hazánkban

72 széklet mintát vizsgáltunk, melyek 2000. október-december hónapokban Baranya megye területéről (Pécs, Szigetvár és vonzáskörzetei) házi-, kórházi vagy rendelőintézeti orvosok által 2 hetes és 11 év 10 hónapos (átlagos életkor: 2 év 4 hónap) életkor közötti, hasmenésben szenvedő gyermekektől rotavírus kimutatásra Laboratóriumunkba küldött diagnosztikai minták voltak. A 36 fiú és 36 leánygyermek között kórházi fekvő és járóbetegek egyaránt szerepeltek. A 72 minta egyike sem tartalmazott enterális bakteriális kórokozót (tenyésztés), valamint adenovírust (tenyésztés, immunfluoreszcencia) és rotavírust (latex agglutináció). A mintákat a calicivírusok RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) régiójára tervezett, univerzális calicivírus primerekkel (p289/p290) RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A PCR-termék mérete sapovírusok esetén 331 bp (Jiang et al., 1999).

A 72 székletmintából 7-ben (9,7%) lehetett RT-PCR módszerrel sapovírust kimutatni. A 7 vírusszekvencia nukleotidsorrendben 92-93%-os, aminosavsorrendben pedig 96-97%-os hasonlóságot mutatott a sapovírusok GII genocsoportjának prototípus (GII.1, London/92/UK;

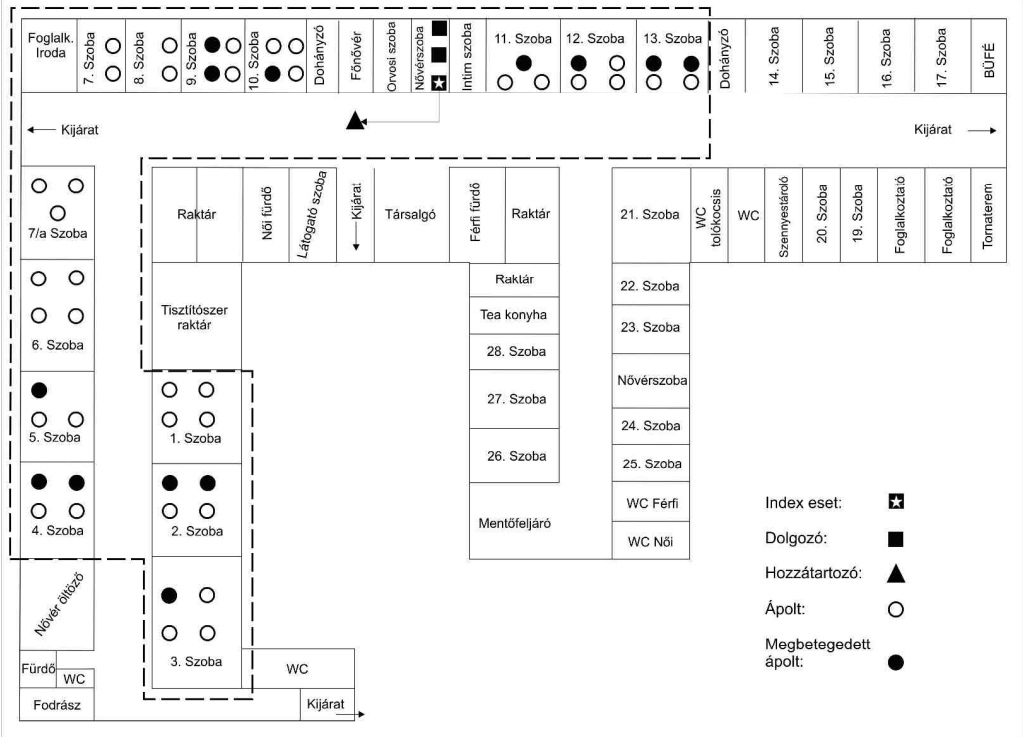
U95645) vírusához (18. ábra, lásd a sertés norovírus bekezdésben). Ugyanakkor a kórokozók jóval közelebbi rokonságban állnak egymással. Molekuláris epidemiológiai szempontból 3 csoportra oszthatók, melyek a megbetegedések lakóhely szerinti földrajzi eloszlásában is felismerhetők. Az egy csoportba tartozók 100%-ban megegyeznek egymással nukleinsav és aminosav sorrendben, míg a csoportok között a azonosság a nukleinsav sorrendben 96-98%-os (prototípusok: HUNs11/2000/HUN, AF488717; HUNs12/2000/HUN, AF488718 és HUNs17/2000/HUN, AF488720). Epidemiológiai oldalról nézve október hónapban 14 mintából egy sem (0%), novemberben 37 mintából 3 (8,1%), december hónapban 24 mintából 4 (16%) tartalmazott sapovírust. [Összehasonlításként a vizsgált 3 hónapban további 6 mintából lehetett rotavírust kimutatni (6/78, 7,7%)]. A sapovírus tartalmú minták a tünetek jelentkezése utáni 2. nap kerültek levételre. A megbetegedett 6 fiú és 1 lány 2,5 hét és 4 év 7 hónap közötti életkorú volt (átlagos életkor: 1 év 8,5 hónap). A vezető tünetként a hányást és a hasmenést jelölték meg. Egy esetben, a legfiatalabb 2,5 hetes csecsemőnél, a „dyspepsia” szerepelt diagnózisként. Öt esetben járó, 2 esetben fekvőbetegként tartották nyilván a gyermekeket.

- Sapovírus járvány hazánkban

A calicivírusok molekuláris laboratóriumi vizsgálatainak kezdete óta (az 1990-es évek közepe) rendkívül ritkán (~5 évente egyszer), csak egy-egy járvány kiváltójaként írták le a sapovírust a nemzetközi irodalomban. Laboratóriumunk a „calicivírusok” hazai cirkulációját 1998/1999-től követi a gastroenteritis járványokban molekuláris epidemiológiai módszerekkel. 2008-ig közel 800 nem bakteriális gastroenteritis járvány vizsgálata során sapovírust nem sikerült kimutatni. A nemzetközi calicivírus surveillance munkacsoportunk (FBVE, Food-borne Viruses in Europe) észleléséből származó informális adatok alapján 2008-ban a sapovírus okozta járványok számának szokatlan emelkedése volt megfigyelhető Európában.

2008. szeptemberében egy közép-magyarországi szociális otthon, szellemi fogyatékosokat gondozó részlegében, enterális megbetegedések halmozódását észlelték. A széklet mintákból rutin bakteriológiai módszerekkel (tenyésztés, toxin- és antigén kimutatás) kórokozó baktériumot, rotavírust (immunkromatográfia), adenovírust (immunkromatográfia) és norovírust (ELISA) nem lehetett kimutatni (ÁNTSZ, Szeged, dr. Kátai Andrea). A mintákat a norovírusok RNS-függő RNS polimeráz régiójára tervezett JV13I/JV12Y jelű primerpárok (Vennema et al., 2002) és a calicivírusok RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) régiójára tervezett, univerzális calicivírus primerekkel (p289/p290) RT-PCR módszerrel vizsgáltuk (Jiang et al., 1999).

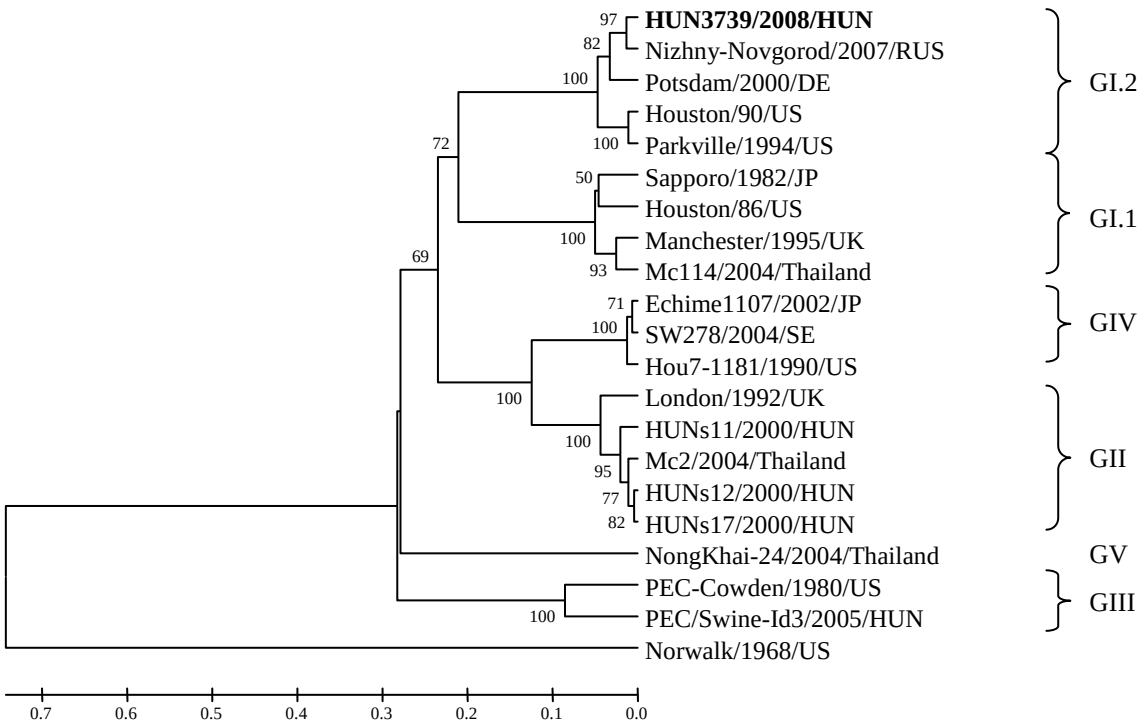
2008. szeptember 11 és 22-e között az intézmény 135 exponáltja közül 17 főnél (12,6%) jelentkeztek híg vizes hasmenéssel (76,5%), hányással (17,6%) járó megbetegedések, az ápoltak (13/100, 13%), a gondozók (3/35, 8,5%) és egy látogató között. Az indexeset ápolónőnek kb. 40-szer volt hasmenése a betegsége alatt. A 49,1 év átlag életkorú (19-82 év) betegek közül 6 férfi (35,3%) és 11 nő (64,7%) volt. A beteg gondozottak közül 10 beteg (76,9%) székürítéséhez gondozói segítség volt szükséges. Az otthon két részlegében a szobák és az otthon lakóinak elhelyezkedését a 19. ábra mutatja. A részleg két ápolási egységre különül, 1-13-as és a 14-28-as szobákra. A két ápolási egységben külön-külön ápolói csoport dolgozik. A járvány az első (1-13 szoba) részlegen alakult ki, melyet az indexeset ápolónő látott el. A második megbetegedett az indexeset hozzátartozója volt. Időrendben a szeptember 12.-ei járványcsúcsban megbetegedettek (ápoltak) a 2, 9 és 10-es szobákban laktak. A szeptember 14.-ei járványcsúcsban megbetegedettek az 5, 11, 13-as szobából és a nővérszobából kerültek ki.



19. ábra. A szellemi fogyatékosokat gondozó otthon alaprajza. Az első ápolási egységben (1-13 szoba) lezajlott gastroenteritis járványt szaggatott vonallal határoltuk körbe. Az egyes helységekben geometriai jelekkel ábrázoltak az exponált (világos) és a megbetegedett (sötét) személyek aszerint, hogy hozzátartozó (háromszög), dolgozó (négyzet) vagy ápoltról (kör) van szó. Az indexesetet sötét négyzetben fehér csillag jelöli (beteg ápoló).

Négy beteg széklet mintájából molekuláris módszerrel norovírust nem lehetett kimutatni JV13I/JV12Y primerrel, de egy (25%) ápolt mintájából sapovírusra specifikus méretű PCR-terméket kaptunk a p289/p290 jelű primerrel. A sapovírus (HUN3739/2008/HUN, FJ844411) és a referencia szekvenciák alapján készített filogenetikai ágrajzot a 20. ábra mutatja. A HUN3739 sapovírus 89,9%-os nukleotid azonosságot, 100%-os aminosav egyezést mutatott a GI.2 genotípusú Parkville/1994/US (U73124) referenciával és 94%-os nukleotid azonosságot adott a Potsdam/2000/DE (AF294739) szekvenciával a vizsgált 286bp hosszúságú szakaszon. A GenBank-ban található legközelebbi sapovírus az orosz Nizhny Novgorod/2007/RUS (EU620242) szekvencia 97%-os nukleotid azonosságot mutatott.

dc_704_13



20. ábra. A gastroenteritis járványból azonosított sapovírus (HUN3739/2008/HUN, FJ844411, vastagon jelölve) RNS-függő RNS polimeráz génrégiójának 286 bázispár hosszú szakasza alapján készült filogenetikai fa (UPGMA módszer, MEGA3.1). A sapovírus genocsoportokat/genotípusokat a jobb oldalon jelöltük. A hazai vírustörzsek (humán és sertés) nevei HUN jelzéssel végződnek. A filogenetikai fa megrajzolásához használt referencia szekvenciák a GenBank adatbázisából származnak: Sapporo/1982/JP (U65427); Houston/86/US (U95643); Manchester/1995/UK (X86560); Mc114/2004/Thailand (AY237422); Parkville/1994/US (U73124); Houston/90/US (U95644); London/1992/UK (U95645); Mc2/2004/Thailand (AY237419); Hou7-1181/1990/US (AF435814); Echime1107/2002/JP (DQ058829); SW278/2004/SE (DQ125333); NongKhai-24/2004/Thailand (AY646856); PEC-Cowden/1980/US (AF182760); Potsdam/2000/DE (AF294739); Nizhny Novgorod/2007/RUS (EU620242); Norwalk/1968/US (M87661); HUNs12/2000/HUN (AF488718); HUNs17/2000/HUN (AF488720); HUNs11/2000/HUN (AF488717); PEC/Swine-Id3/2005/HUN (DQ383274).

Sapovírusok állatokban

- Porcine (sertés) sapovírus

A porcine (sertés) sapovírust (korábbi néven „porcine enteric calicivirus” – PEC) elektronmikroszkóppal fedezték fel az USA-ban, 1980-ban (Saif et al., 1980), de csak 1999-ben határozták meg a genomját (Guo et al., 1999). Vizsgálataink kezdetéig további három országból, Hollandia (GenBank), Dél-Korea (Kim et al., 2006) és Venezuela (Martinez et al.,

2006), számoltak be porcine sapovírusok genomszintű kimutatásáról. Megemlítendő azonban, hogy hazánkban Nagy és mtsai 1996-ban „calicivírus-szerű” víruspartikulákat mutattak ki elektronmikroszkóppal sertések fécesz mintáiból (Nagy et al., 1996). A prototípus porcine sapovírus törzseket, Cowden és LL14/02/US, melyek a sapovírusok GIII genocsoportjába tartoznak, diarrheás kismalacokból azonosították (Flynn et al., 1988). Ezek a fertőzési kíséretek során is enterális megbetegedést és bélkárosodást okoztak gnotobiotikus sertésekben (Guo et al., 2001a). További molekuláris vizsgálatok azt vetették fel, hogy sertésekben korábban nem ismert, új sapovírus genocsoportok (GVI, GVII és GVIII) is cirkulálhatnak (Wang et al., 2005b; Yin et al., 2006; Martella et al., 2008). A porcine sapovírus genocsoportok további genotípusokra oszthatók.

Előzetesen 17 sertés fécesz mintát vizsgáltunk, melyet két baranyai sertésfarmról gyűjtöttünk 2005. márciusában. A mintákat a calicivírusok RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) régiójára tervezett, univerzális calicivírus primerekkel (p289/p290) RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A PCR-termék mérete sapovírusok esetén 331 bp (Jiang et al., 1999). A 17 mintából 2 (11,8%) esetben lehetett, genetikailag egyező, porcine (sertés) sapovírust (swine-Id2/2005/HUN; swine/Id3/2005/HUN, DQ383274) kimutatni ugyanarról a farmról, mely 10-12 napos sertésektől származott, (18. ábra, lásd a sertés norovírus bekezdésben). Ezek 91% és 82% nukleotid azonosságot mutattak a legközelebbi (OH-JJ259/00/US) és a prototípus (Cowden/US) porcine sapovírushoz.

A vizsgálatok az EVENT pályázat (Enteric Virus Emergence – New Tools, FP6 SP22-CT-2004-502571) keretében kiteljesedtek, melynek során 6 európai országból (Dánia, Finnország, Magyarország, Olaszország, Szlovénia és Spanyolország) 2004 és 2007 között, 88 sertéstelepről származó összesen 1050 sertés féceszt vizsgáltunk RT-PCR módszerrel a 4. táblázatban megadott primerekkel (4. táblázat). Az 1050 mintából 117-ben (11,1%) lehetett porcine sapovírust kimutatni RT-PCR módszerrel, melyek közül 80 esetben a

nukleotidsorrend meghatározás is megtörtént (4. táblázat). Kettős fertőzés, azaz két különböző sertés sapovírus szekvencia jelenléte ugyanabban a mintában, 7 esetben igazolódott (különböző calicivírus primerek használatával), így a vizsgált porcine sapovírus szekvenciák száma 87 lett. A fécesz mintákban a vírus előfordulási gyakorisága 1,6% (Magyarország) és 49,1% (Dánia) között változott. A 88 vizsgált sertésfarmból 39-ben (44,3%) lehetett a porcine sapovírus jelenlétét igazolni (4. táblázat). Dániában és Spanyolországban, ahol tünetek nélküli és diarrheában szenvedő állatok mintái is vizsgálatra kerültek szignifikáns eltérést nem találtunk a porcine sapovírus pozitív minták arányában (14/30, 47% versus 14/27, 52% és 13/113, 12% versus 14/108, 13%).

Country	Sampling period	Age group	Names of primers for RNA polymerase region (reference)	No. (%) of farms		No. (%) of fecal samples			Prevalence (%) of sapovirus in feces by age group	No. of sapovirus sequence(s) confirmed by sequencing (genogroup distribution)
				Tested	Positive	Tested	Positive[b]	Positive by age group		
Denmark	July and Dec. 2007	2–8 wk	p290 and p289 (10), 290D and p289D (3)	31	21 (68)	57	25 (43.8)	20	66.7	35, including double infections in 7 samples (III, VI, VII, VIII, IX, X)
		9–12 wk	SR80 and JV33 (23)	31	21 (68)	57	18 (31.6)	7	50	
		13–22 wk					28[c] (49.1)	1	7.7	
Finland	April and June 2007	2–3 mo	p290 and p289	11	2 (18)	52	5 (9.6)	3	17.6	5 (III, VIII, IX)
		3–4 mo						0	0	
		5–6 mo						2	7.7	
Hungary	March 2005, Feb. and March 2007	<10 days	p290 and p289	9	3 (33)	436	7 (1.6)	4	3.3	7 (III, VIII)
		3–4 wk						0	0	
		3 mo						3	2.8	
		6 mo						0	0	
Italy	Jan.–June 2006, Nov.–Dec. 2007	1–3 mo	p290 and p289	15	5 (33)	201	14 (6.9)	0	0	6 (VIII, IX, X)
		3–4 mo						13	27.6	
		6–10 mo						0	0	
		11–12 mo						1	7.1	
		1 year						0	0	
Slovenia	Jan.–April 2004, Oct. 2004 and Jan. 2005, May 2005, Dec. 2005	<3 wk	SR80 and JV33	8	7 (87.5)	83	36 (43.4)	10	35.7	33 (III, VII, VIII, X)
		4–10 wk						18	66.7	
		>11 wk						8	28.5	
Spain	2005 and 2006	<4 wk	p290 and p289	14	1 (7)	221	27 (12.2)	6	13.3	1 (III)
		4–8 wk						2	10.5	
		9–16 wk						10	12.0	
		17–24 wk						8	12.7	
		>25 wk						1	9.1	
Total	Jan. 2004–Dec. 2007		p290 and p289, SR80 and JV33	88	39 (44.3)	1,050	117 (11.1)			87 in 80 animals (7.6)

[a] Information on sampling periods, age groups, primers, the number of tested and positive farms, and the number of animals per country are shown. Samples from healthy animals were collected in Finland, Hungary, Italy, and Slovenia, whereas samples from both healthy and diarrheic animals were collected in Denmark and Spain.
[b] Bands with the expected size were detected.
[c] Total number of sapovirus-positive specimens.

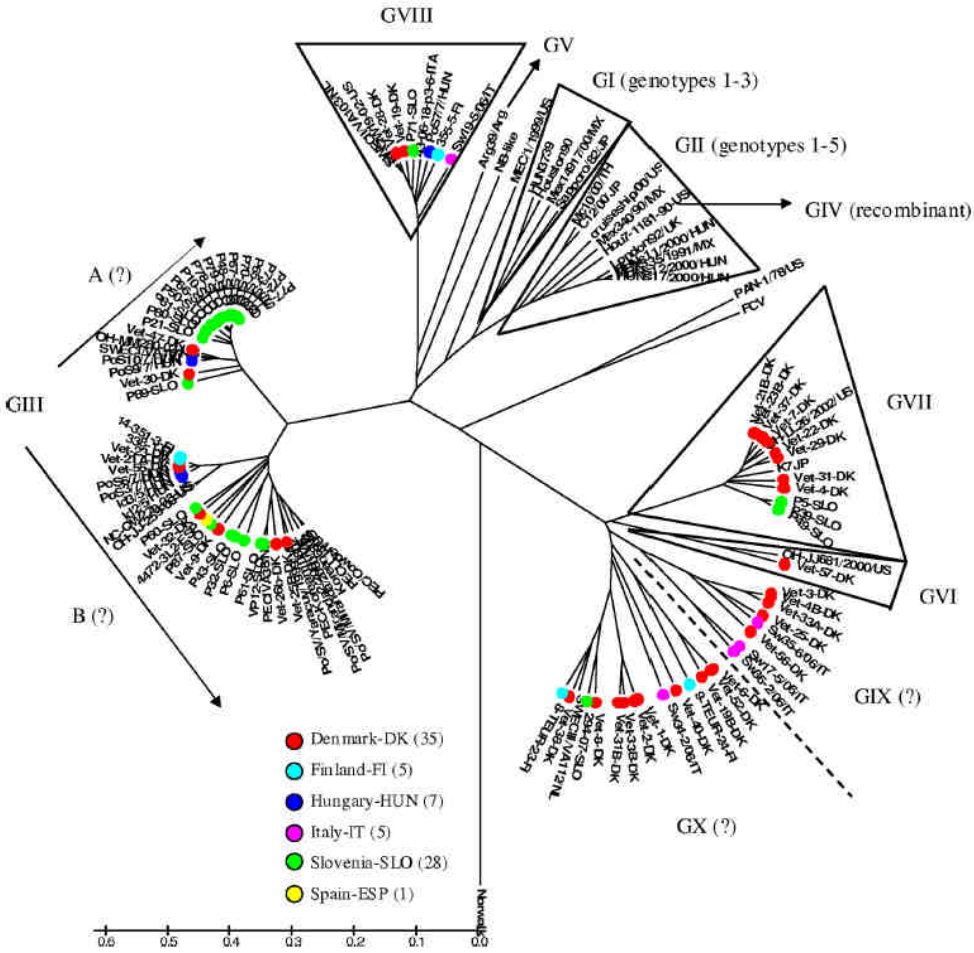
4. táblázat. A porcine (sertés) sapovírusok gyakorisága sertések fécesz mintáiban, 6 európai ország, 88 sertésfarmjában, 2004. január és 2007. december között.

A 87 porcine sapovírus szekvenciából 81-et használtunk fel további elemzéshez: 35 (43,2%) Dániából, 5 (6,2%) Finnországból, 7 (8,6%) Magyarországról, 5 (6,2%) Olaszországból, 28 (34,6%) Szlovéniából és 1 (1,2%) Spanyolországból (21. ábra) származott. A filogenetikai elemzés alapján a porcine sapovírus szekvenciák 6 különböző genocsoportba különíthetők el (21. ábra). A sertésekben klasszikusan ismert, vizsgáltunkban leggyakoribb GIII (N=41, 50,6%) genocsoport és a feltételezett GVI (N=1, 1,2%), GVII (N=11, 13,6%) és GVIII (N=6, 7,4%) genocsoportok mellett további két új sapovírus genocsoport is azonosítható, a GIX (N=8, 9,9%) és a GX (N=14, 17,3%) (21. ábra). Az elemzés alapján a GIII genocsoport is két genetikai vonalra (GIIIA és GIIIB) oszlik. Mind a 6 genocsoport kimutatható volt dán sertésekből (4. táblázat), a GIII sapovírusok jelenléte pedig 5 országban volt igazolható.

A porcine (sertés) és humán sapovírusok nukleotid és aminosav sorrendjének összehasonlítása során (5. táblázat) a legnagyobb szekvencia azonosság (maximálisan 66% aminosav szinten) a GVIII és a humán GIV sapovírus genocsoport között látható (a legkisebb pedig a GIX és a humán sapovírus genocsoportok között).

A genocsoport és a sertések korcsoportja közötti elemzés azt mutatja (22. ábra), hogy a GIII genocsoportú sapovírusok az 1 hónap alatti, az 1-3 hónap közötti és a 3 hónap feletti életkorú állatok féceszmintáiban 78%, 49% és 0%-ban fordult elő.

Kettős porcine (sertés) sapovírus fertőzés, azaz két különböző genocsoportba tartozó sapovírus egyidejű jelenléte a féceszben hét, 12 hétnél fiatalabb dán állat mintájából volt kimutatható. A 7 esetből 6-ban az állatnak diarrhoeája volt. Dániában és Magyarországon azonos porcine sapovírus szekvenciákat lehetett kimutatni, azonos sertésfarmról származó 4, illetve 2 állatpár mintái esetében.



21. ábra. A sapovírusok filogenetikai elemzése a vizsgálatok során Európában kimutatott porcine (sertés) sapovírusokkal a calicivírusok 286 nukleotid hosszú RNS-függő RNS polimeráz régiójának alapján (UPGMA módszer, MEGA 3.1). A vírusok származási országa színkódolt (Dánia: vörös, Finnország: világoskék, Magyarország: kék, Olaszország: lila, Szlovénia: zöld, Spanyolország: sárga). A sapovírusok genocsoportjainak nomenklatúrája Wang et al., (2005) és Martella et al., (2008) munkáinak megtartásával, ezek figyelembe vételével történt. A GI, GII, GIV és GV sapovírus genocsoportokat emberi fertőzésekből mutatták ki. A sertés eredetű sapovírusok a GIII, GVI, GVII, GVIII, GIX és GX genocsoportokba tartoznak. GenBank: PEC/Cowden/US (AF182760), PECLL14/US (AY425671), PECIVA36/NL (AY615805), Korean6802 (AY289186), London/92/UK (U95645), HUNs11/2000/HUN (AF488717), HUNs12/2000/HUN (AF488718), HUNs17/2000/HUN (AF488720), HUN3739/2008/HUN (FJ844411), Sapporo/82/JP (U77903), Houston/90/US (U95644), Po/SV/Yaracuy/1999/VE (AY633966), Po/SV/Miranda/2000/VE (AY633963), Po/SV/Miranda2/2001/VE (AY633965), PEC-Korean10802 (AY289188), OH-JJ259-00-US (AY826423), NC-QW270-03-US (AY826426), SWECI/VA10/NL (AY615807), OH-MM280-03-US (AY823308), MEX335/1991/MX (AY157869), PAN-1/78/US (AF091736), 43-06-18-p-3-6-ITA (AB221477), SWECIII/VA112/NL (AY615814), OH-LL26/2002/US (AY974195), OH-JJ681/2000/US (AY974192), Norwalk (M87661), Mex14917/00/MX (AF435810), Mex340/90/MX (AF435809), cruiseship/00/US (AY157863), Mc10/00/TH (AY237420), C12/00/JP (AY603425), Hou7-1181-90-US (AF435814), Arg39/Arg (AF405715), MEC/1/1999/US (AF338404), FCV (M86379), NB-like (AY082891), K7JP (AB221130), SWECII/VA103/NL (AY615811), MI-QW19-02-US (AY826424).

Genogroup and identity parameter[b]	% Identity with the following human sapoviruses:			
	GI Sapporo/82/JP (U77903)[c]	GII London/92/UK (U95645)	GIV Hou-7-1181-90-US (AF435814)	GV Arg39/Arg (AF405715)
GIIIA (n^d = 20)				
Nucleotide	51–55	52–57	54–58	52–56
Amino acid	51–55	50–54	50–54	49–52
GIIIB (n = 21)				
Nucleotide	50–59	54–59	55–60	53–55
Amino acid	52–62	50–60	53–57	46–49
GVI (n = 1)				
Nucleotide	49	50	52	45
Amino acid	41	42	43	32
GVII (n = 11)				
Nucleotide	42–46	44–48	44–47	41–45
Amino acid	36–38	35–41	36–42	33–36
GVIII (n = 6)				
Nucleotide	50–**62**	53–**64**	54–**65**	54–**60**
Amino acid	52–**63**	53–**65**	55–**66**	52–**55**
GIX (n = 8)				
Nucleotide	40–42	39–46	40–47	41–44
Amino acid	33–36	33–37	36–41	29–30
GX (n = 14)				
Nucleotide	47–52	44–52	44–56	41–48
Amino acid	37–41	37–43	38–43	30–35

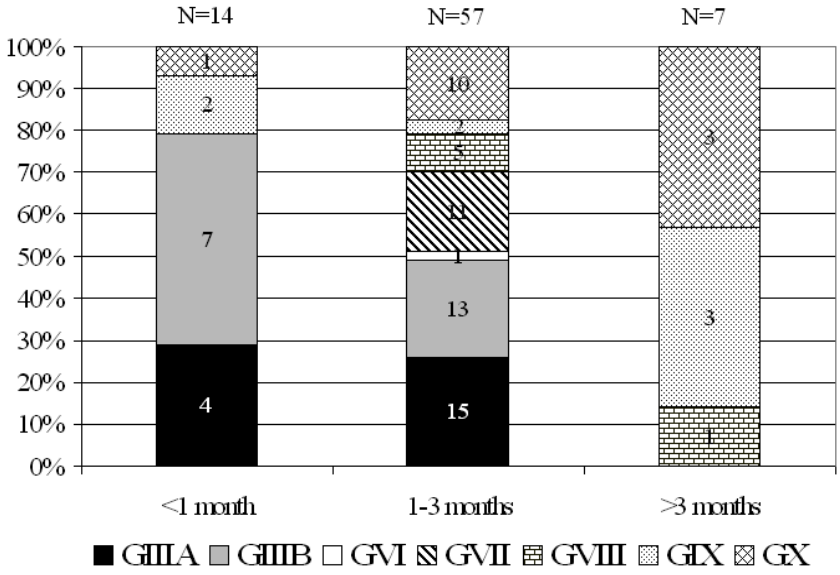
[a] Range of nucleotide and amino acid sequence identities for all strains sequenced on the basis of the sequence of the RNA polymerase region between the study strains detected in pigs (rows) and the sapovirus genogroup prototype strains of human origin (columns). Boldface numbers indicate the highest levels of nucleotide and amino acid sequence identity.

[b] All study strains (n = 81) in each genogroup, as separated in Fig. 1, were included for sequence analysis. For homology comparison, the results for the lowest and the highest nucleotide and amino acid strain identities are indicated in each cell as a percentage range for each genogroup.

[c] GenBank accession numbers are given in parentheses.

[d] n = number of sequences analyzed.

5. táblázat. Az európai porcine (sertés) sapovírusok nukleotid és aminosav hasonlósága az RNS-függő RNS polimeráz régió alapján a sapovírus genocsoportok prototípus tagjaihoz.

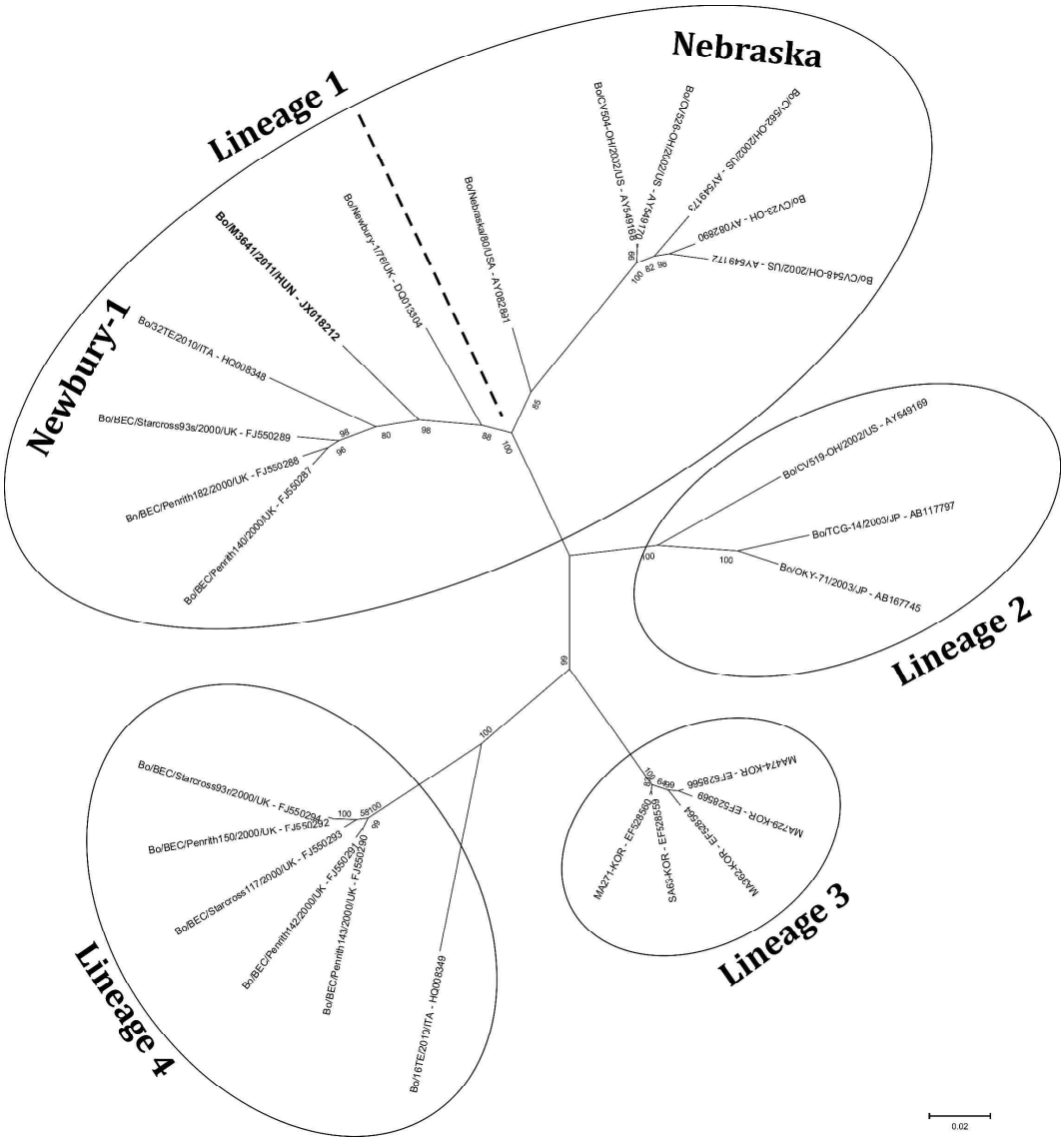


22. ábra. Az egyes sapovírus genocsoportok prevalenciája sertésekben, életkor szerint, 78 sapovírus törzs alapján. Az y-tengely a genocsoportok százalékos (%) prevalenciáját mutatja. Az egyes oszlopokban, az egyes genocsoportok a vizsgált minták számát jelentik. Az egyes korcsoportokban a vizsgált összes minta száma az oszlopok felett található.

***Nebovírus* nemzetség**

A nebovírusok a *Caliciviridae* család legújabb, *Nebovírus* nemzetségének tagjai, melyek szarvasmarha (*Bos taurus*) borjak hasmenéssel járó, enterális megbetegedéseiben játszhatnak kóroki szerepet. Két prototípus vírusa a Newbury-1 (Bo/Newbury1/1976/UK, DQ013304) és a Nebraska (BEC/NB/80/US, AY082891) vírus (Woode et al., 1978; Smiley et al., 2002). A virális kapszid fehérje (VP1) alapján a nebovírusok 4 leszármazási vonalba (lineage 1-4) csoportosíthatók (D'Mello et al., 2009).

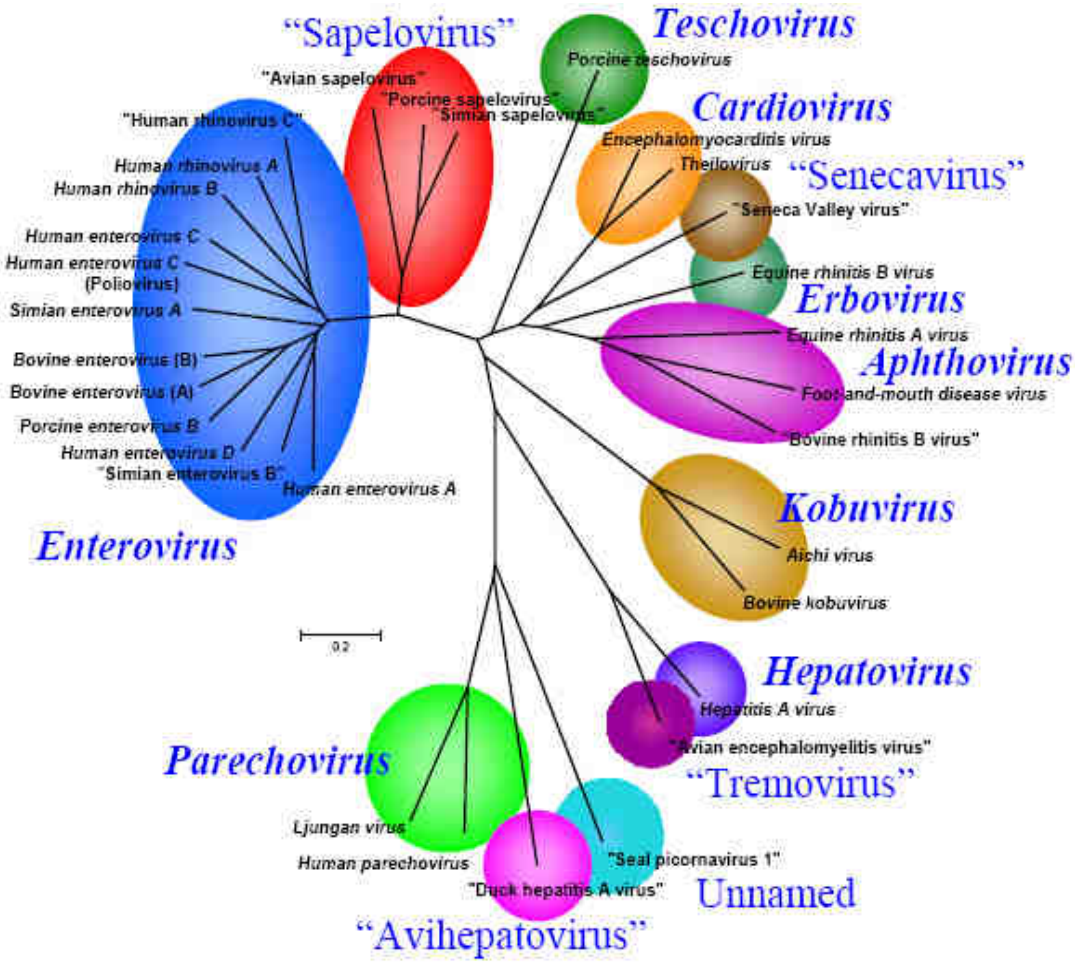
Két hasmenéses, itatásos szarvasmarha (*Bos taurus*) borjútól származó bélsármintát vizsgáltunk molekuláris módszerekkel, melyek 2011. áprilisából egy észak-dunántúli (M-3641) és egy dél-dunántúli (M-3897) szarvasmarhatelepről származtak. A kórelőzményi adatok alapján mindkét állat hasmenés tünetei között hullott el az alkalmazott gyógykezelés ellenére. A kórbonctani vizsgálatot követően (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Kaposvári Laboratóriumába, Dr. Nemes Csaba) – ahol mindkét borjúban heveny oltógyomor és vékonybélhurutot lehetett megfigyelni - a lépekből és a vékonybél-tartalmakból bakteriológiai tenyésztés történt. A bélsár mintákból a szarvasmarha rota-, és coronavírusok, valamint az *Escherichia coli* F5 fimbria-antigénje, illetve a cryptosporidiumok kimutatására is alkalmas ELISA teszttel (Bio-X Digestive ELISA Kit, Biox Diagnostics) történtek vizsgálatok, ahol az M-3897 mintából cryptosporidium protozoon jelenléte igazolódott. A két mintát ezt követően virális metagenomikai módszerekkel vizsgáltuk, ahol a 454-pyroszekvenálás során a két bélsár minta egyikéből (M-3641) összesen 29 nebovírus szekvencia darabot lehetett azonosítani. A Bo/M3641/2011/HUN (JX018212) nebovírus teljes genomja 7453 nt hosszúságú, a nem kódoló 5' vége 74 nt, míg a 3'vége 67 nt hosszúságú. Az ORF1 6630 nt (2210 aa), az ORF2 677 nt (225aa). A filogenetikai elemzés alapján a Bo/M3641/2011/HUN vírus az első leszármazási vonal (lineage 1) a Newbury-1-szerű vírusok közé sorolható (23. ábra).



23. ábra. A szarvasmarha nebovírusok nukleotid alapú filogenetikai elemzése az 1647 nt hosszúságú kapszid régió (VP1) alapján. A hazai (Bo/M3641/2011/HUN; JX018212) vírus szekvenciáját félkövér betűvel jelölve. (Maximum-Likelihood módszer, Tamura 3-as model, MEGA5). Az ágrajzon (bootstrap = 1000) csak az 50% feletti valószínűségi értékeket vannak jelölve. A filogenetikai csoportok (lineage 1-4) az ágrajzon karikázva láthatók. Az 1. genetikai vonal két prototípus ágát – Newbury, illetve Nebraska - szaggatott vonal választja el egymástól.

PICORNAVIRIDAE

Az ICTV *Picornaviridae* Study Group hivatalos filogenetikai elemzése és taxonómiai felosztása 2008-ban a picornavírus nemzetségekről (kék színnel) és az akkor ismert 22 reprezentatív vírusfajról (Knowles et al., 2008) a 24. ábrán látható. Az akkor hivatalosan elfogadott 8 nemzetség (*Aphthovírus, Cardiovírus, Enterovírus, Erbovírus, Hepatovírus, Kobuvírus, Parechovírus* és *Teschovírus*) mellett további 4 új picornavírus nemzetséget (*Avihepatovírus, Sapelovírus, Senecavírus, Tremovírus*) és 6 új vírusfajt fogadtak el 2010-ben (24. ábra). [Majd 2013. februárjában további 5 picornavírus nemzetség (*Dicipivírus, Aquamavírus, Cosavírus, Megrivírus* és *Salivírus*) került elfogadásra.]



24. ábra. A picornavírus nemzetségek (N=8) és vírusfajok 2008-ban a P1 kapszid régió aminosav sorrendje alapján (Knowles et al., 2008), mely tartalmazza a 2010-ben még el nem fogadott 4 nemzetséget is (macskakörmök között).

Vizsgálatainkkal az *Enterovírus*, a *Hepatovírus*, a *Kobuvírus*, a *Parechovírus* és a *Teschovírus* nemzetségek körében kaptunk új adatokat, valamint 3 potenciálisan új picornavírus nemzetséggel bővítettük a picornavírusokról szóló ismereteket.

***Enterovírus* nemzetség**

Az *Enterovírus* nemzetségnek 2012-ben 10, jelenleg (2013. február) 12 elfogadott vírusfaja van: Enterovírus A (EV-A, korábban Humán enterovírus A: HEV-A); Enterovírus B (EV-B, korábban Humán enterovírus B); Enterovírus C (EV-C, korábban Humán enterovírus C benne a poliovírusokkal); Enterovírus D (korábban Humán enterovírus D); Enterovírus E (korábban Bovine enterovírus 1: BEV1); Enterovírus F (korábban Bovine enterovírus 2:BEV2); Enterovírus G (korábban Porcine enterovírus B: PEV-B); Enterovírus H (korábban Simian enterovírus A), Enterovírus J; Rhinovírus A (korábban Humán rhinovírus A); Rhinovírus B (korábban Humán rhinovírus B) és Rhinovírus C (korábban Humán rhinovírus C). A humán enterovírusok népes csoportja napjainkban is folyamatosan bővül. Az egyes vírusfajokon belül, csak a humán enterovírusoknak több mint 202 szerotípusa ismert igen széles klinikai kór- és tünettannal (légúti betegségek, encephalitis, aspetikus meningitis, akut flaccid paralysis stb.).

Porcine (sertés) enterovírus 14 (EV-G3) és 15 (EV-G4)

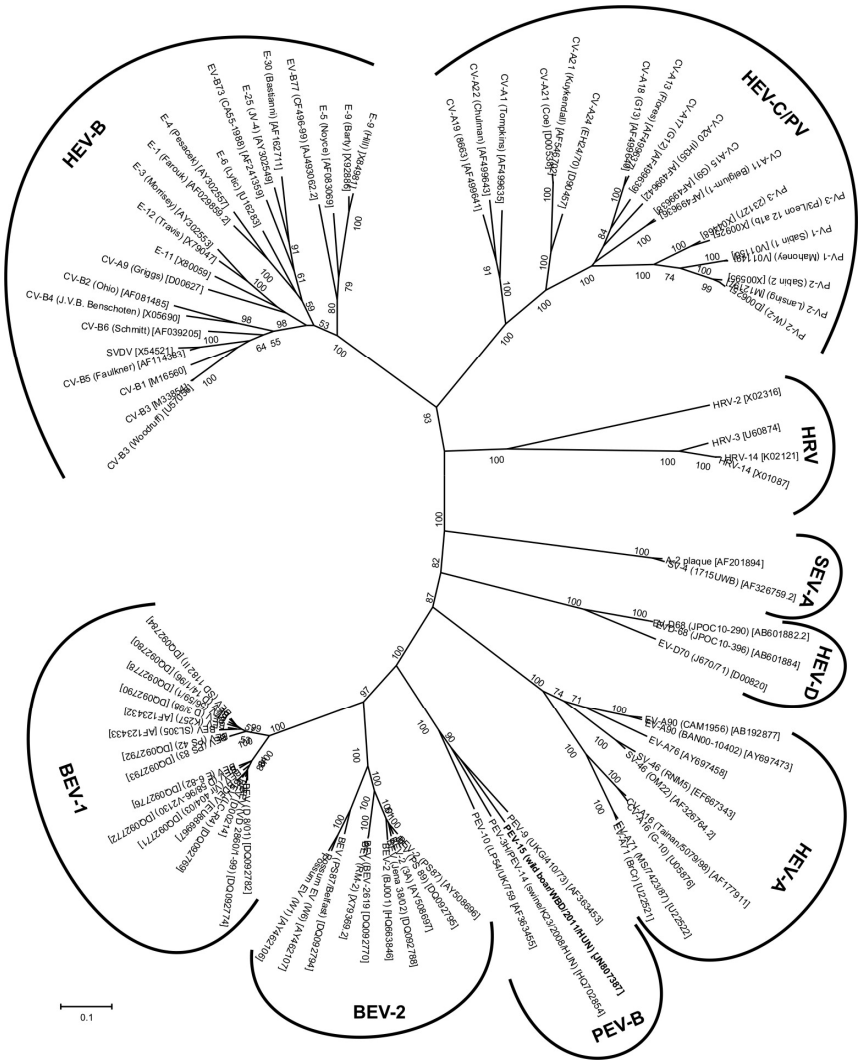
Történelmileg a „porcine enterovírus” (PEV) kifejezés számtalan picornavírust takart, melyek közös jellemzője az volt, hogy mindegyiket sertésekben izolálták. A taxonómiai változások e vírusokat jelentősen érintették az elmúlt években. Vírusneutralizációs tesztek alapján eredetileg 11 szerotípust (PEV1-11) különböztettek meg (Knowles et al., 1979), mely további 2 szerotípussal bővült (PEV1-13) (Auerbach et al., 1994). A későbbi genetikai elemzések alapján 10 „porcine enterovírus” - a PEV1-7 és PEV11-13 – az enterovírusoktól egy újonnan megalakított nemzetségbe, a *Teschovírus* nemzetségbe került, mint porcine

teschovírus (PTV), melyet 11 szerotípusra osztottak (PTV1-11) (Kaku et al., 2001; Zell et al., 2001). A maradék PEV-et két részre osztották: PEV-A (mely csak a PEV8-at tartalmazta) és a PEV-B (melybe a PEV9 és PEV10 tartozott). Előbbit – azaz a PEV8-at - azonban a genetikai jellegzetességek miatt az időközben létrejött *Sapelovírus* nemzetségbe sorolták át (mint porcine sapelovírus) (Krumbholz et al., 2002). Így a porcine enterovírusok kifejezés alatt - PEV-B névvel (2003. februártól Enterovírus G) - a legutóbbi időkig csak a PEV9 (2013. februártól Enterovírus G1) és a PEV10 (Enterovírus G2) szerotípusokat értették. E vírusok kóroki szerepe, gyakorisága a sertésekben nem ismert: bőrlézióból és székletből izolálták őket 1979 és 1990 között Angliában (Knowles et al., 1979), Olaszországban (Caracappa et al., 1985) és Japánban (Honda et al., 1990).

2008. novemberben, 45 fécesz és 45 vérszérum mintát gyűjtöttünk párban egészségesnek látszó 10 napos (N=15/15), 4 hetes (N=15/15) és 3 hónapos (N=15/15) sertésektől (*Sus scrofa domestica*) egy kelet-magyarországi sertés farmról (Ebes). A mintákat a Humán enterovírus A-B-C-D vírusfajok 5’UTR régiójára általunk tervezett (UnivEntero-5UTR-R: 5’-ATTGTCACCATAAGCAGCCA, UnivEntero-5UTR-F: 5’-GTACCYTTGTR CGCCTGTT) primerekkel vizsgáltuk RT-PCR módszerrel. A 10 napos állatok 15 fécesz mintája közül 6 (40%) esetben kaptunk megfelelő méretű PCR-terméket, más minta esetében termék nem volt látható. Mind a 6 szekvencia 82% nt azonosságot mutatott a prototípus PEV10 5’UTR régiójának nukleotid sorrendjével. Mind a 6 minta VP1 régióját is meghatároztuk, melyek nukleotid azonossága egymáshoz 99%, a PEV-10 vírushoz 66% volt. Egy vírus (K23/2008/HUN, HQ702854) teljes genomját meghatároztuk, mely 7391 nt hosszú a poly(A) vég nélkül. Az 5’ vég 809 nt, a polyproteint kódoló régió 6507 nt (2168 aa), a 3’ UTR 75 nt hosszú. Az 5’UTR másodlagos szerkezete hasonlít a PEV9 és PEV10 vírusokéhoz. A P1 régió nt és aa azonossága a prototípus PEV9 (UKG/410/73) és PEV10 (LP 54/UK/75) vírusokhoz 68%/75% és 66%/72%. A prototípusoktól leginkább eltérő genomrész, az

immunodomináns VP1 régió, ahol az eltérés 39-40%. A részletes szekvencia- és filogenetikai (25. ábra) elemzések alapján a K23/2008/HUN egy új porcine enterovírus geno(szero)típust (PEV14) képviselhet, melynek neve 2013. februártól Enterovírus G3 (EV-G3).

2011. áprilisában, 10 fécesz mintát gyűjtöttünk egészségesnek látszó, 6-8 hetes vaddisznóktól (*Sus scrofa*) egy délnyugat-magyarországi állatparkból (Bőszénfa). A vadmalacoknak házi sertéssel nem volt kapcsolatuk. A mintákat a Humán enterovírus A-B-C-D vírusfajok 5'UTR régiójára általunk tervezett (UnivEntero-5UTR-R/UnivEntero-5UTR-F) primerekkel vizsgálatuk RT-PCR módszerrel. Öt (50%) állat esetében kaptunk megfelelő méretű PCR-terméket, melyek nukleotid azonossága 86% volt a PEV14-hez.



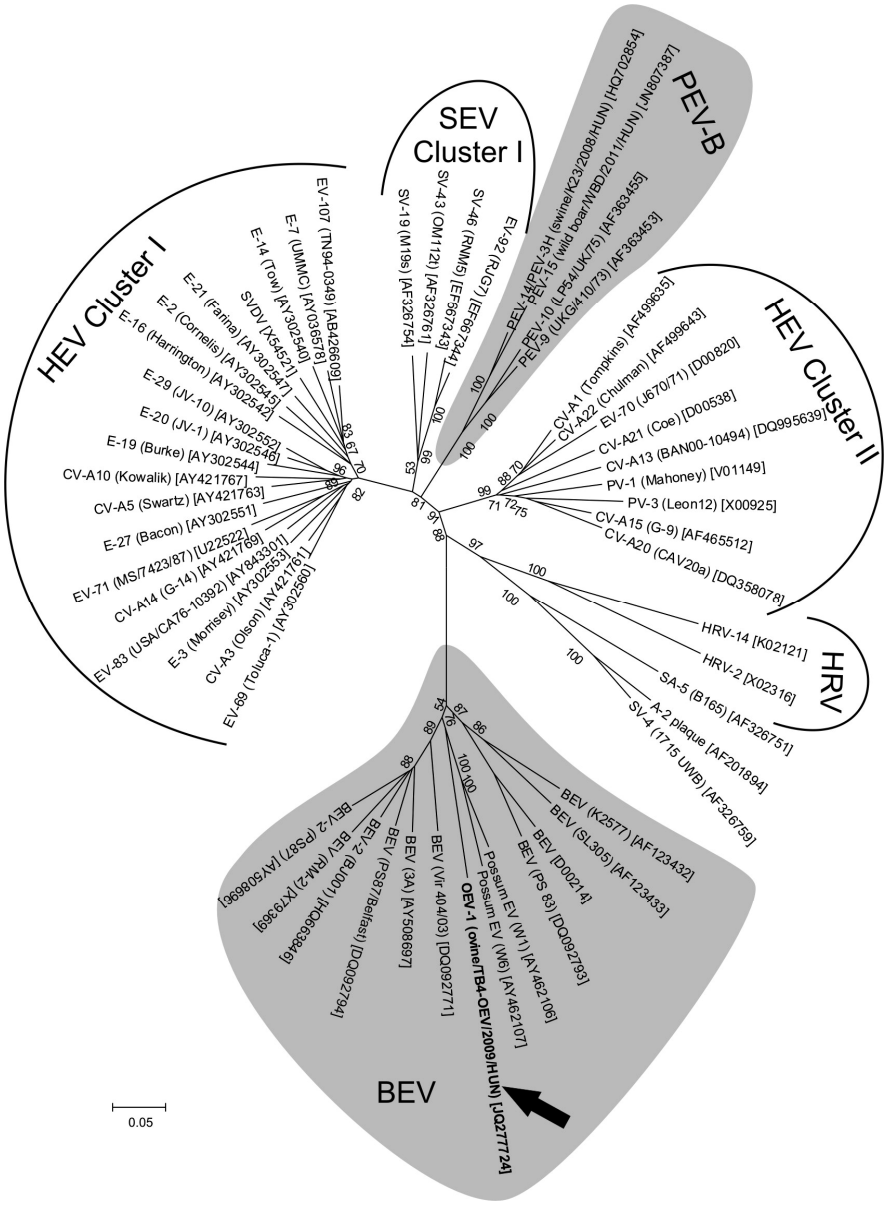
25. ábra. Az *Enterovírus* nemzetség P1 régiójának aminosav sorrendje alapján készített filogenetikai elemzés. Az új porcine enterovírusok (PEV14 házi sertésből és PEV15 vaddisznóból) a PEV-B fajban találhatók (Maximum-Likelihood módszer, Jones-Taylor-Thorrnton matrix model, N=1000 ismétlés, MEGA5 program).

Három mintából a vírus VP1 régióját is meghatároztuk, melyek nukleotid azonossága egymáshoz 99%, a PEV14-hez 66% volt. Egy vírus (WBD/2011/HUN, JN807387) teljes genomját meghatároztuk metagenomikai/pyroszekvenálás és „primer walking” módszerrel. A vírusgenom 7387 nt hosszú a poly(A) vég nélkül. Az 5’ vég 811 nt, a polyproteint kódoló régió 6507 nt (2168 aa), a 3’ UTR 68 nt hosszú. A részletes szekvencia- és filogenetikai (25. ábra) elemzések alapján a WBD/2011/HUN egy új porcine enterovírus geno(szero)típust (PEV15) képviselhet, melynek neve 2013. februártól Enterovírus G4 (EV-G4).

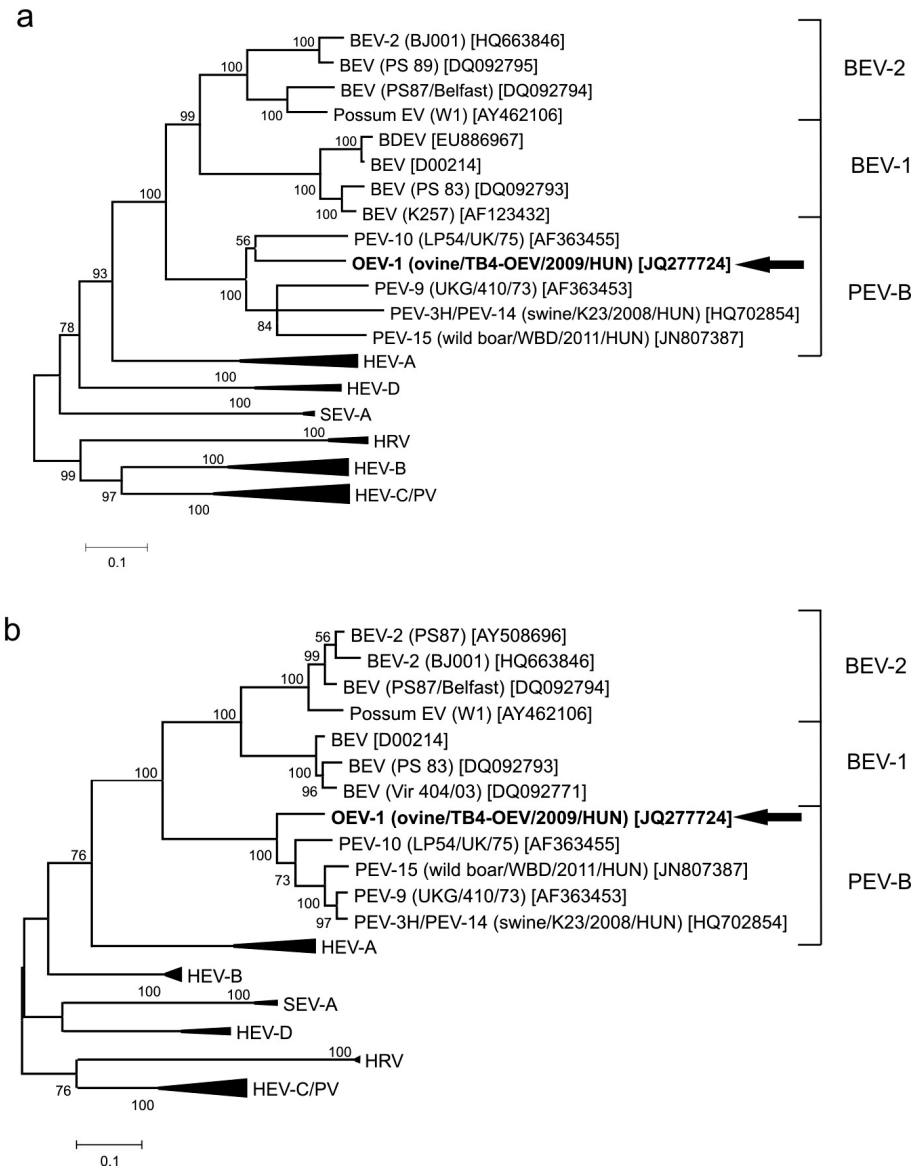
Ovine (juh) enterovírus (EV-G5)

2009. márciusában és 2010 áprilisában, 8-8 fécesz mintát gyűjtöttünk egészségesnek látszó, 3 hetes bárányoktól (*Ovis aries*) egy közép-magyarországi birkafarmról (Tárnok). A telepen magyar merino anyajuhokat pároztattak német feketefejű hús-kosokkal. A bárányoknak házi sertéssel és szarvasmarhával nem volt kapcsolatuk. A mintákat a Humán enterovírus A-B-C-D vírusfajok 5’UTR régiójára (UnivEntero-5UTR-R/UnivEntero-5UTR-F), illetve a bovine-, ovine-, possum- és palackorrú delfinből kimutatott enterovírusok 5’UTR régiójára általunk tervezett (NonHumanEntero-5UTR-R: 5’-CRGAGCTACCACTGGGGT/ NonHumanEntero-5UTR-F: 5’- GGGAGTAGTCCGACTCCG) primerekkel vizsgálatuk RT-PCR módszerrel. Az UnivEntero-5UTR-R/UnivEntero-5UTR-F primerekkel nem, de a NonHumanEntero-5UTR-R/F primerekkel 7 (44%) mintából (2009-ből 1, 2010-ből 6) kaptunk megfelelő méretű PCR-terméket. A szekvenciák 85-90%-os nukleotid azonosságot mutattak a bovine enterovírusok (BEV) 5’UTR régiójához (26. ábra) (egymáshoz a hasonlóság 93-100%) és az 5’UTR másodlagos szerkezete egy az egyben felrajzolható a BEV 5’UTR szekvenciák alapján (ábra nélkül). Az ovine enterovírus (OEV-1, ovine/TB4-OEV/2009/HUN; JQ277724) teljes genomja 7408 nt a poly(A) vég nélkül. A kódoló régió 6519 nt, mely 2172 aa hosszú polyproteint kódol (P1: 839 aa; P2: 578 aa; P3: 755 aa). Az 5’UTR 815 nt, a 3’UTR 74 nt hosszú. Meglepetésre, a szekvencia elemzések alapján, a

kódoló régiók viszont nem a bovine enterovírushoz (BEV), hanem a porcine (sertés) enterovírusokhoz (PEV-B) hasonlítanak jobban (27. ábra). Az OEV1 nt/aa azonosága a PEV-10-hez a P1, P2 és P3 régiókban 65/75%, 73/83% és 78/89%, miközben a legközelebbi BEV-hez (HQ663846) ugyanezen régiókban csak 61/61%, 61/64% és 65/74%.



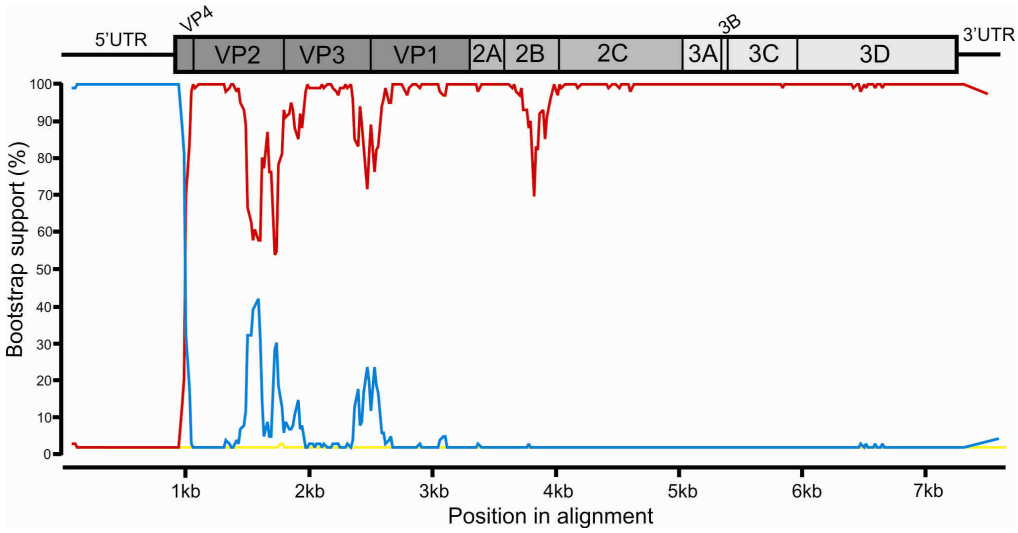
26. ábra. A humán (HEV), simian (SEV), bovine (BEV), porcine (PEV-B) entero-, és humán rhinovírusok (HRV) 5'UTR (nem kódoló) régióinak filogenetikai elemzése (Neighbor-Joining módszer, Jukes-Cantor model, MEGA 5; N=1000 ismétlés). A BEV és PEV-B vírusfajok szürke alapszínnel vannak jelölve. Az ovine enterovírus (OEV-1; ovine/TB4-OEV/2009/HUN; JQ277724) vastag betűvel és nyíllal jelölt.



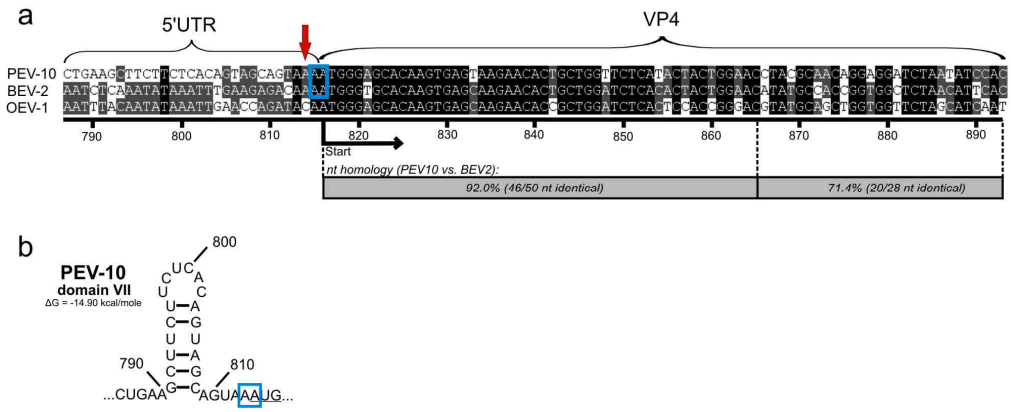
27. ábra. Az enterovírusok P1 (a) és P2P3 (b) kódoló régiók aminosav szekvenciái alapján készített filogenetikai elemzései (Maximum Likelihood módszer, Jones-Taylor-Thornton matrix-alapú model, MEGA5; N=1000 ismétlés). A jelölés a következő: szero-/genotípus név, strain név – zárójelben -, GenBank szám – szögletes zárójelben. Minden ábrázolt enterovírus faj homológ és heterológ szerotípusokat is tartalmaz. Az ovine enterovírus (OEV-1; ovine/TB4-OEV/2009/HUN; JQ277724) vastag betűvel és nyíllal jelölt.

A filogenetikai elemzések (26.-27. ábrák), és a rekombinációs elemzések (SimPlot, Bootscanning elemzés) (28. ábra) egyező eredményei azt mutatják, hogy az OEV-1 egy rekombináns enterovírus, melynek 5’UTR régiója a BEV-hez, a kódoló és 3’UTR régiói a PEV-hez állnak közelebb, jelezve a vírus interspecies (fajok közötti) rekombinációs

természetét. A rekombináció lehetséges töréspontja az elemzések alapján az 5’UTR és a VP4 régió határán az OEV-1 (2013. februártól Enterovírus G5, EV-G5) 814. nt pozíciójában a legvalószínűbb (29. ábra).



28. ábra. Az ovine enterovírus 1 (OEV-1; ovine/TB4-OEV/2009/HUN; JQ277724) teljes genomjának bootscanning elemzése a lehetséges parental szekvenciákkal - vörös vonal: PEV-10 (LP54/UK/75, AF363455); kék vonal: BEV-2 (BJ001; HQ663846) – és külső referenciával (outgroup), sárga vonal: humán poliovírus 1 (Mahoney; V01149). (window size: 400 nt, step size 20 nt). A rekombináció pontja a kék és piros vonal kereszteződésében lehetséges.



29. ábra. Az OEV-1 (JQ277724), a PEV-10 (LP54/UK/75; AF363455) és a BEV-2 (BJ001; HQ663846) 5’UTR/VP4 régió határának nukleotid illesztése. a) A fekete nyíl a transzláció kezdőpontját (ATG/AUG) jelöli. A piros nyíl a 814. nt pozíciót jelöli. b) A PEV-10 érintett régiójának (domén VII) lehetséges másodlagos szerkezete. A kék keret a mindhárom szekvenciában konzervatív adenin dinukleotidot (AA) jelöli mindkét ábrán, mely a negatív szálú RNS szintézis során a rekombináció kulcspontja lehet („template switch”).

Humán enterovírus C109 (EV-C109)

A humán enterovírus C109 (EV-C109) egy Nicaraguában, négy gyermekkori légúti fertőzésből 2008-ban kimutatott új rekombináns enterovírus (Yozwiak et al., 2010), mely a HEV-C (ma Enterovírus C) vírusfajba tartozik (a kódoló régió alapján). A vírus érdekessége, hogy a nem kódoló, 5'UTR régió valószínűleg egy interspecies rekombináció eredményeként a HEV-A vírusfajból származik. Az EV-C109-et eddig máshonnan nem mutatták ki. Vizsgálatunk során 92 nasopharyngeális aspirátumot vizsgáltunk - előbb UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F primerpárral (lásd később), majd az EV-C109-re specifikus VP1 primerekkel (123F/363R, Yozwiak et al., 2010) RT-PCR módszerrel, melyek 10 éven aluli, alsó és felső légúti fertőzésben (rhinitis, pharingitis, tracheitis, bronchitis, croup, pneumonia) szenvedő gyermekektől lettek véve a Kaposi Mór Oktató Kórház Pulmonológiai Osztályán (Mosdós). A mintákat 2 légúti szezonban (2005/2006 és 2006/2007) október és május között gyűjtöttük (betegtájékoztatást követően) és előzetesen molekuláris módszerekkel humán metapneumovírusra (Reuter et al., 2006a), A és B típusú influenzavírusra (Pankovics et al., 2009), légúti óriássejtes vírusra (RSV) (Pankovics et al., 2009), anellovírusra (Burián et al., 2011), coronavírusokra, adenovírusra, bocavírusra és rhinovírusra is megvizsgáltunk. Egy (1,1%) mintából (előbb az UNIV-kobu R/UNIV-kobu F primerpárral és szekvenálással aspecifikusan), majd a 123F/363R primerpárral specifikusan EV-C109-et sikerült kimutatni, egy 2,5 éves fiú, lázzal (38,1°C), köhögéssel (bronchitis), orrfolyással járó megbetegedéséből 2007. januárjában. A fizikális és röntgen vizsgálat alapján a megbetegedés pneumóniával szövődött. Két héttel később a gyermek a kórházból gyógyultan távozott. A vírus (L87/HUN/2007; JN900470) teljes genomját (7354 nt) meghatároztuk, mely a VP1 régióban 92/96% nt/aa azonosságot mutat a prototípus EV-C109-hez (NICA08-4327; GQ865517). Az 5'UTR 663 nt hosszú és 96%-ban azonos a prototípus vírushoz, mely azt jelenti, hogy a két

vírus rekombinációs mintázata egyezik: EV-A a nem kódoló régióban és EV-C a kódoló és a 3'UTR régióban.

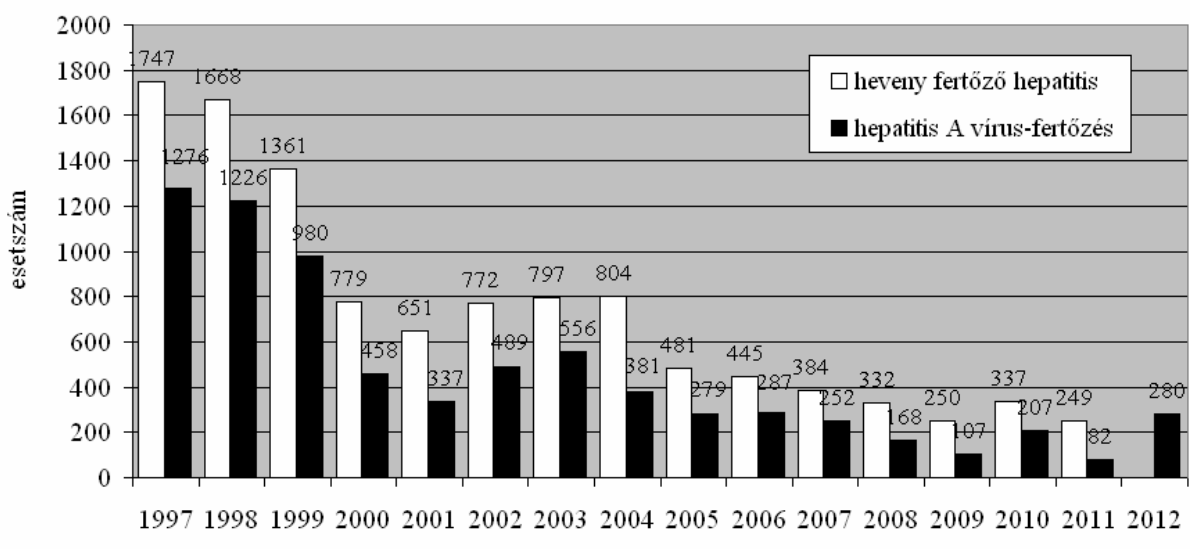
Hepatovírus nemzetség

Hepatitis A vírus

A hepatitis A vírus (HAV) fertőzést, mint kórképet az emberiség már hosszú ideje ismeri. Régóta megfelelő (szerológiai) módszerekkel rendelkezünk a fertőzés igazolására, és oltóanyag is rendelkezésre áll a hatékony megelőzéshez. A picornavírust – mely a *Hepatovírus* nemzetség egyetlen ismert tagja - 1973-ban Feinstone és munkatársai azonosították (immun)elektronmikroszkópos vizsgálattal (Feinstone et al., 1973). Mindez a molekuláris éra megjelenése előtt már megtörtént, ezért a legutóbbi időkig a hepatitis A vírus genetikai változatossága, molekuláris epidemiológiája felé kevés figyelem fordult. A HAV-nak egy szerotípusa van, de jelenleg 7 (I-VII) genotípust különítenek el a szerkezeti fehérjék alapján (Hollinger et al., 2007). Az I, II, III és VII genotípusba tartozó vírusokat emberből (a többit óvilági majmokból) azonosították, melyek közül az I és III genotípus további két-két szubgenotípusba (IA és IB, valamint IIIA és IIIB) sorolhatók. Az emberi HAV-ok többsége az I-es genotípusba tartozik (Hollinger et al., 2007).

Magyarországon a bejelentett megbetegedések száma csökken, az incidencia azonban jelentős földrajzi eltéréseket mutat. Észak-Kelet Magyarország a HAV szempontjából továbbra is endémiás vidéknek (52,2/100000 fő) tekinthető (hazai átlag 3,8/100000 fő, Dunántúl <1/100000 fő 2003-ban). Az 1960-as évekbeli évi ~16.000 eset a 2000-es évek elején 1000 alá, 2005-ben 500 alá csökkent (30. ábra). Ezzel egyidőben a szeroprevalencia is csökkent (Pohl et al., 2001), a fogékony populáció nagysága ezzel arányban növekedett. Ez azzal a veszéllyel jár(hat), hogy járványok alakulnak ki, a fertőződés a későbbi életkorra tolódik, és így gyakrabban jár tünetekkel. HAV genotipizálás hazánkban még nem történt.

dc_704_13

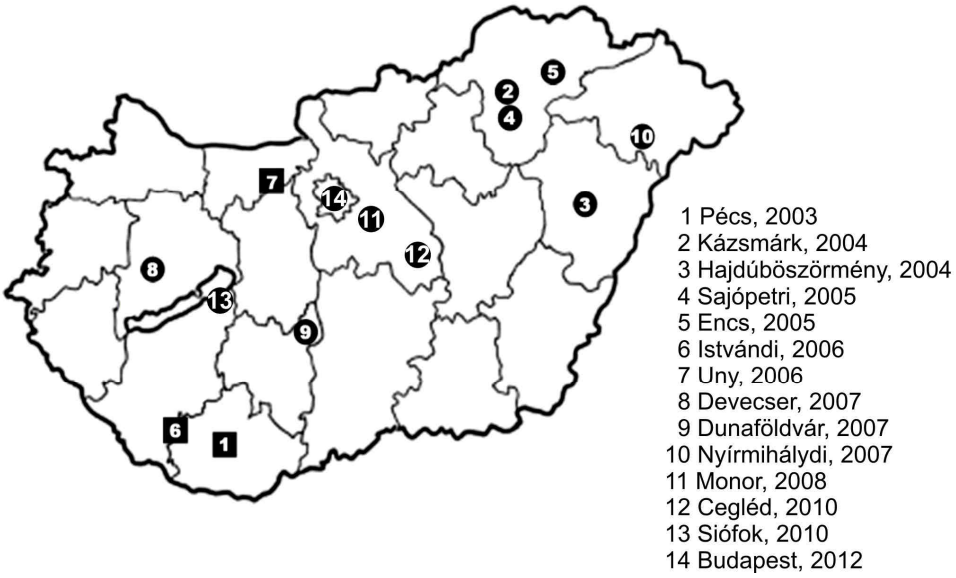


30. ábra. A nyilvántartott heveny hepatitis és hepatitis A vírus-fertőzések száma Magyarországon 1997 és 2012 között (az OEK Epinfo című kiadvány éves jelentéseinek számadatai alapján).

2003. január és 2013. február között összesen 358 szerológiai módszerrel (HAV IgM ELISA) hepatitis A vírus-fertőzésnek igazolt heveny hepatitisben szenvedő beteg szérummintáját vizsgáltuk az ország különböző részéből (endémiás és endémiásnak nem tekinthető területről), járványokból és szórványos (importált és utazáshoz nem köthető) esetekből. A szérum mintákból izolált virális RNS-t a HAV VP1/2A kapocs-régiójára tervezett primerek (Robertson et al., 1992) segítségével mutattuk ki RT-PCR módszerrel. A specifikus méretű PCR-termékeket (360 nt) szekvenáltunk (majd válogatott mintákon a HAV teljes VP1 szekvenciáit is meghatároztuk).

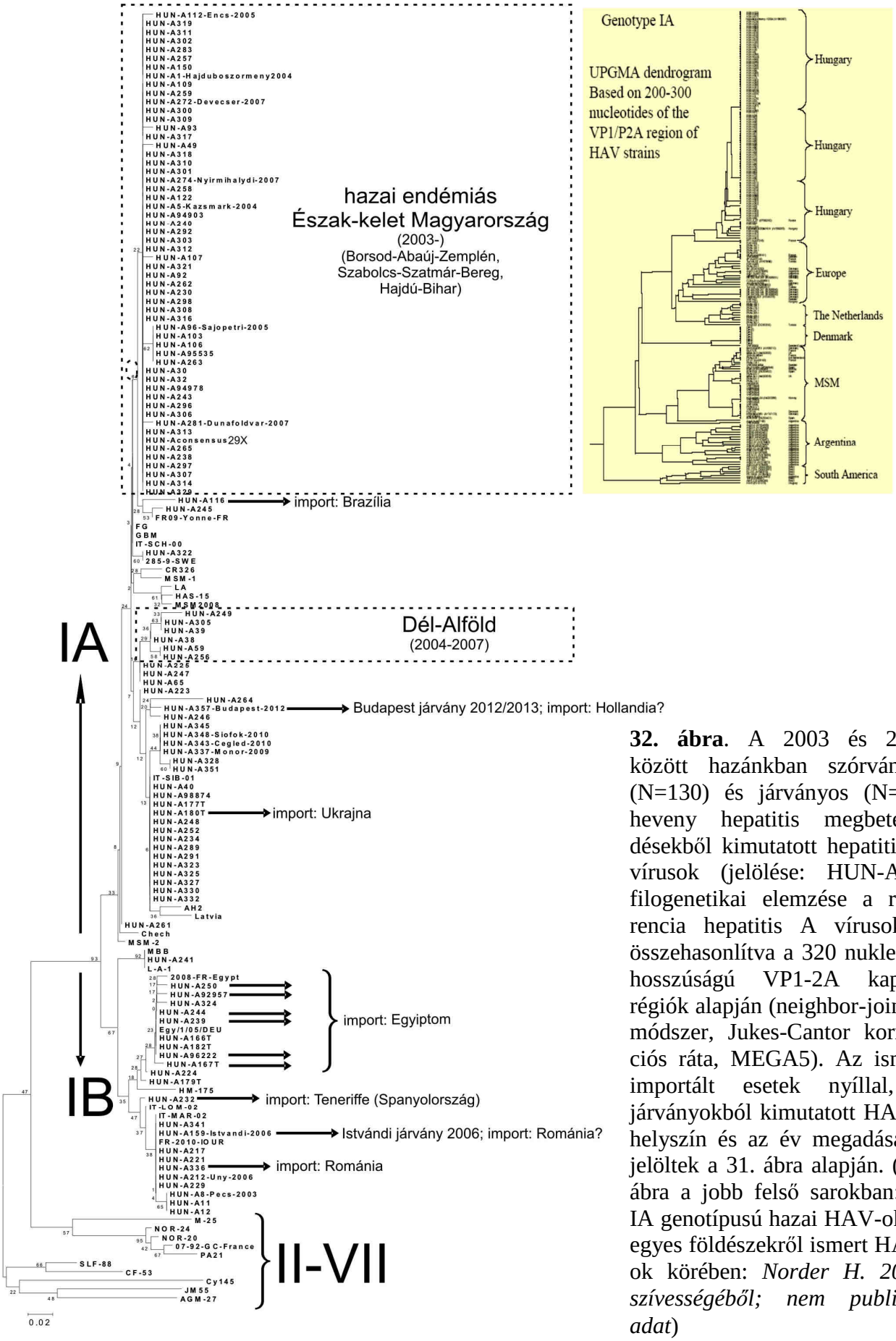
A 358 szérum mintából 249-ből (69,6%) sikerült a virális nukleinsav kimutatása RT-PCR módszerrel. A 130 szórványos eset mellett 14 – az ÁNTSZ járványügyi osztályai által - HAV járványként kezelt esethalmozódásból (31. ábra) történt meg a virális nukleinsav szekvenciájának meghatározása, mely mindegyike I-es genotípusú HAV-t igazolt (32. ábra). Az egyes járványokhoz tartozó esetekből egymással 100%-ban egyező nukleotidsorrendű HAV-t lehetett kimutatni, molekuláris szinten is igazolva az esetek közötti kapcsolatot. (Ezért a további elemzéshez e 14 HAV járványból csak 1-1 szekvenciát vettünk figyelembe).

dc_704_13



31. ábra. Hepatitis A vírus okozta járványok helyszínei hazánkban 2003 és 2013 között, melyekből a virális genom meghatározásra került. A fekete kör az IA genotípusú, a fekete négyzet az IB genotípusú HAV járványokat jelöli.

Az epidemiológiailag szórványosnak tekintett hazai HAV esetek (N=130) és a 14 HAV járványból származó HAV szekvenciák filogenetikai elemzése – és összehasonlítása különböző földrajzi régiókból származó HAV-okkal - a 32. ábrán látható. A 14 HAV járvány közül 11-et IA, míg 3-at IB genotípusú HAV okozott (31. és 32. ábrák). A Dunától keletre csak IA genotípusú HAV-t lehetett kimutatni (31. ábra). A hazai HAV-ok szekvencia elemzése alapján jól elkülöníthető egy IA genotípusú endémiás HAV Észak-kelet Magyarországon, mely a szórványosnak tekintett megbetegedések mellett időről-időre járványokat is okoz a térségben (illetve onnan szóródva az országban). Az IA genotípuson belül egy dél-alföldi HAV ág is elkülöníthető volt 2004 és 2007 között (32. ábra). Az anamnézissel külföldről importált HAV megbetegedések a hazai esetektől viszonylag jól megkülönböztethetők (32. ábra). Brazíliából (IA), Ukrajnából (IA), Egyiptomból (IB), Spanyolországból (IB) és Romániából (IB) importált HAV fertőzéseket azonosítottunk. Különösen az IB genotípusú HAV-ok között jellegzetesen elkülöníthető vonalat képvisel az

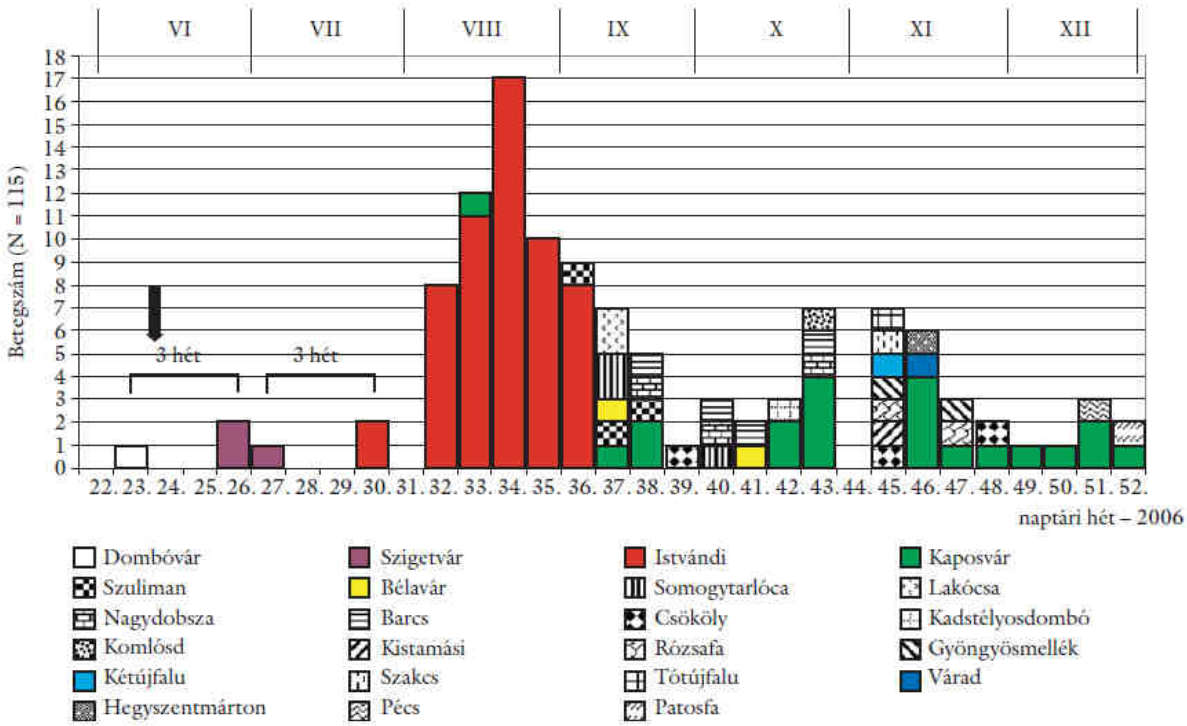


32. ábra. A 2003 és 2013 között hazánkban szórványos (N=130) és járványos (N=14) heveny hepatitis megbetegedésekből kimutatott hepatitis A vírusok (jelölése: HUN-A…) filogenetikai elemzése a referencia hepatitis A vírusokkal összehasonlítva a 320 nukleotid hosszúságú VP1-2A kapocs régiók alapján (neighbor-joining módszer, Jukes-Cantor korrekciós ráta, MEGA5). Az ismert importált esetek nyíllal, a járványokból kimutatott HAV a helyszín és az év megadásával jelöltek a 31. ábra alapján. (Kis ábra a jobb felső sarokban: az IA genotípusú hazai HAV-ok az egyes földészekről ismert HAV-ok körében: *Norder H. 2009, szívességéből; nem publikált adat*)

Egyiptomból (általában földközi tengeri?), turisták által importált hazai (és ezzel egyidőben európai) esetek. Az IB egy másik ága (32. ábra) Romániából került be hazánkba igazolhatóan két alkalommal, melyek közül az egyik szóródva kiterjedt járványt okozott a Dél-Dunántúlon.

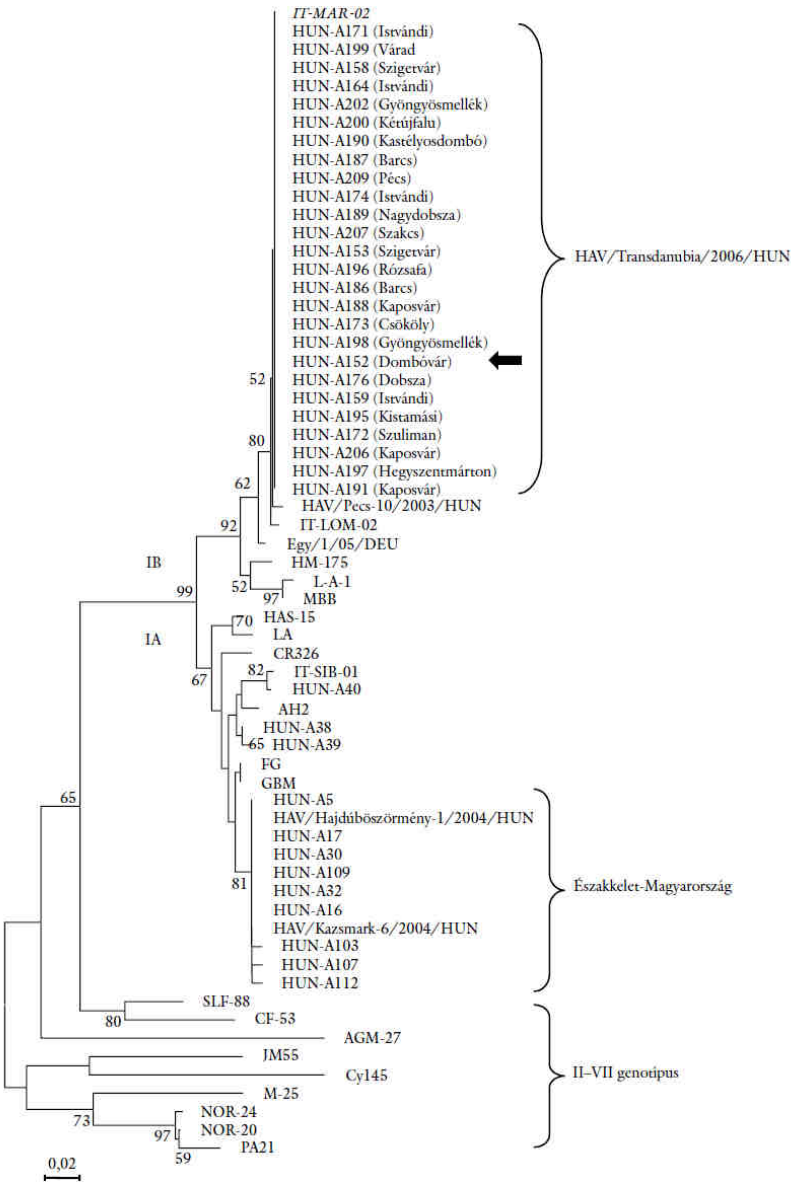
Ez az „Istvándi” néven 2006-ban elhíresült HAV járvány külön kiemelést érdemel, melynek „real-time” molekuláris epidemiológiai feldolgozása, és az összefüggések részletes és korszerű laboratóriumi módszerekkel való feltárása rávilágított új epidemiológiai következtetések levonhatóságára és a hazai járványügyi munka újragondolására. 2006. június 6.-án (23. naptári hét) az ÁNTSZ Tolna Megyei Járványügyi Osztálya jelezte Laboratóriumunknak, hogy az itt folyó HAV molekuláris epidemiológiai vizsgálatok elősegítése érdekében egy HAV IgM-pozitív szérum mintát küld el további elemzésre egy frissen diagnosztizált, egyedi hepatitis A fertőzésből, Dombóvárról (Tolna megye) (33. ábra). A mintából IB szubgenotípusú HAV vírus volt kimutatható. A 4 éves beteg fiú és családja román állampolgárok voltak, rossz szociális körülmények között vándor életmódot folytattak, és házaló kereskedéssel foglalkoztak az ország területén.

Három hét múlva, 2006. júliusban (26.-27. hét) 3 hepatitis megbetegedést észleltek Szigetváron (Baranya megye) (33. ábra). A mintákból kimutatott vírus genetikailag 100%-ban megegyezett a Dombóvárról kimutatott vírussal (33. ábra). A két fiú (17 és 18 éves) és egy leány beteg (18 éves) jó szociális és higiénés környezetben éltek. A 18 éves fiú gyakorlati képzésen vett részt egy pécsi cukrászdában az inkubációs idő alatt. A 17 éves fiú fertőzése súlyos lefolyású volt, többszöri peritoneális dialízist követően a májtranszplantáció is felmerült. Anamnézisében nem intravénás kábítószer használat szerepelt. Az időben és térben összefüggő 4 eset, valamint a kimutatott genetikailag azonos kórokozó miatt a fertőzéseket 2006. július elején hepatitis A vírus járványként értékelte és kezelte az ÁNTSZ Baranya Megyei Intézete Járványügyi Osztálya. A szigetvári megbetegedésekkel összefüggésben feltárt 103 exponált személyből 96-an részesültek passzív oltásban.



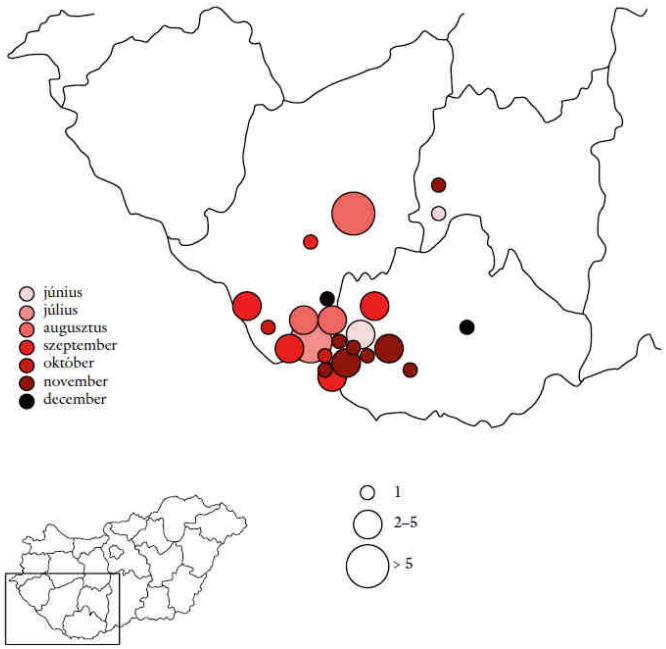
33. ábra. A dél-dunántúli hepatitis A vírus okozta járvány járványgörbéje a megbetegedettek lakhelye szerint 2006. június és december között naptári heti (X-tengely) bontásban. Az Y-tengely a betegek számát, a nyíl az indexesetet jelöli.

Három hét múlva 2006. augusztus 2.-án (30. hét) a Szigetvártól (Baranya megye) 12 km-re – a 6-os főközlekedési úton - fekvő Istvándiból (Somogy megye) jelentettek két hepatitis esetet, majd újabb 2 hét elteltével (32-36. hét) már kiterjedt hepatitis A járványt (33. ábra). A kórokozó genetikailag 100%-ban egyezett a dombóvári és szigetvári esetekből kimutatott vírus-szekvenciákkal (34. ábra). Összesen 56 (8,3%) megbetegedés történt az exponált 675 fős falu lakosai között. Minden 12. lakos klinikai tüneteket mutatott. A település érintett lakói rossz szociális és higiénés körülmények között élnek, a házak egy része mellékhelységgel sem rendelkezett. Istvándiban összesen 668 passzív és 66 aktív oltóanyagot használtak fel.



34. ábra. A dél-dunántúli hepatitis A vírus okozta járványból azonosított IB szubgenotípusú vírus HAV/Transdanubia/2006/HUN (EF190998) filogenetikai elemzése egyes hazai endémiás és referencia hepatitis A vírusokkal összehasonlítva a 320 nukleotid hosszúságú VP1-2A kapocs-régiók alapján (neighbor-joining módszer, Jukes-Cantor korrekciós ráta, MEGA5). A nyíl az index esetet jelöli.

A 36.-37. héttől a vírus Istvándiból a környező, majd távolabbi településekre is átterjedt (33. és 35. ábrák). Időrendben előbb somogy megyei, majd novembertől elsősorban baranya megyei településeket érintett a járvány. November-decemberben a vírus a horvát határ mentén (Ormánság) terjedt kelet felé Dél-Baranyában (35. ábra).



35. ábra. A hepatitis A járvány földrajzi terjedése a Dél-Dunántúlon a molekuláris epidemiológiai eredmények alapján 2006. június és december között. A körök átmérője a megadott értékkel nő az adott településen megbetegedett személyek számától függően; a körök színének tónusa, pedig az időben előrehaladva sötétül az adott településen történt első megbetegedés idejét figyelembe véve.

2006. december 31.-ig 23 településen összesen 115 személy szérum mintájából sikerült HAV IgM ellenanyagot kimutatni (64 nő, 55,7% és 51 férfi, 44,3%). A betegek átlagéletkora 18 év volt (17 hónap-80 év). A férfiak átlagéletkora 19,6 év, míg a nők átlagéletkora 16,8 év volt. A nők körében a legtöbb fertőzött a 9-12 éves (N=15) korcsoportba, a férfiak esetén a 3-9 éves (N=14) és a 20-27 éves (N=14) korcsoportba tartozott. Minden (100%) beteget kórházban kezeltek. A fertőzés átvitelében a közvetlen kontaktusnak volt elsődleges szerepe. Összesen 2067 passzív (1594 főnek) és 3623 aktív oltóanyag került felhasználásra a járvány során. A passzív oltás ellenére 44 (2,8%) személy betegedett meg, ez a tüneteket mutató betegek 38,3%-a. A 44 személy átlagosan 9 nappal (1-33 nap) a tünetek megjelenése előtt kapta meg a passzív oltást.

A Kaposi Mór Oktató Kórházban 2006. július 31. és 2006. október 31. között kezelt összesen 79 betegek klinikai jellegzetességeit is elemeztük. A 47 (59%) nő és 32 (41%) férfi

átlagéletkora 16,3 év (1-60 év) volt. Az első tünetek jelentkezését követően a betegek átlagosan 3 nap (1-10 nap) múlva fordultak háziorvoshoz, majd kerültek kórházi felvételre. Leggyakoribb panaszok a hasi fájdalom (52; 65,8%) az émelygés, hányinger (51; 64,6%), a hányás (44; 55,7%), a testhőmérséklet emelkedése (40; 50,6%) és az étvágytalanság (45; 57%) volt. Harminchét (44,5%) betegnél a subicterus volt a vezető tünet. Fejfájás 5 (6,3%), hasmenés 3 (3,8%), anuria 1 (1,2%) betegnél jelentkezett. Fizikális vizsgálattal 45 (54,4%) betegnél hepatomegália, 37 (46,8%) esetben klinikai sárgaság és 35 (44,3%) betegnél epigastriális, jobb bordaív alatti hasi nyomásérzékenység volt észlelhető. Tizenegy (13,9%) beteg esetén fizikális eltérés nem volt. A klinikai kémiai laboratóriumi vizsgálatokkal a maximális GOT értékek átlaga 1847 IU/l (61 IU/l-9914 IU/l), a GPT 2379 IU/l (66 IU/l-8898IU/l) volt, mely a betegek 89,9%-nál (71 beteg) a felvételkor volt a legmagasabb. A maximális seBi értékek átlaga 132,8 μmol/l (4 μmol/l-407 μmol/l) volt. A betegek 43%-ánál (34 eset) a felvételkor mért emelkedett seBi szint egyenletes csökkent az ápolás során. Ezzel szemben a betegek több mint felénél (50,6%; 40 eset) csak átlagosan a 6. ápolási napon (3-10 nap) érte el a seBi szint a csúcsot. Öt esetben (6,3%) a seBi szint mindvégig a normál tartományban maradt. Az ALP, illetve az LDH értékek a felvételkor voltak a legmagasabbak (ALP: 1144 IU/l, 407 IU/l-8346 IU/l; LDH: 854 IU/l, 162 IU/l-2292 IU/l). A γGT szint csak kis mértékben voltak emelkedettek (221 IU/l, 22 IU/l-1125 IU/l). Minden beteg tüneti és silymarin kezelésben részesült, valamint 1,2 feletti INR érték miatt 56 (70,9%) beteg kapott K-vitamint. A betegek kórházi elbocsátása panaszmentes esetben került sor, amikor a seBi szint 90 μmol/l alá és a transzamináz érték 500 IU/l alá csökkentek. Az elbocsátást követően 2 hét múlva 54 (68,35%) betegnél történt kontroll laboratóriumi vizsgálat. A GOT átlaga 46,9 IU/l (19 IU/l-129 IU/l) a GPT átlaga 62,9 IU/l (19 IU/l-177 IU/l), a SeBi átlaga 18 μmol/l (5 μmol/l-55 μmol/l) volt. Négy (5,1%) beteg esetében a 100 IU/l feletti transzamináz értékek miatt további két hét múlva ismételt kontroll vizsgálatra volt szükség. Ekkor a 4-ből 3 (75%)

betegnél a transzamináz értékek már 100 IU/l alá csökkentek. A 79 beteg átlagosan 9,4 napig (5-16 nap) volt kórházban. Két szövődményes megbetegedés volt. Az egyik egy 42 éves, alkoholbeteg férfi volt, aki a felvételét követő 5. napon 408 μmol/l seBi és 10,6 INR értékek, tudatzavar miatt intenzív osztályra került, ahol kórházi kezelésének 10. napján gyomorvérzés miatt elhunyt. A másik egy ugyancsak alkoholt fogyasztó, ismert cisztás májbetegségben szenvedő 60 éves férfi volt. Anuriás panaszok, icterus (seBi 388 μmol/l) és hepatorenális szindróma miatt hemodialízis kezelést kapott. Állapota javult.

A járvány során összesen 39 (33,9%) HAV IgM pozitív szérum mintát vizsgáltunk RT-PCR módszerrel. A 39-ből 30 (76,9%) mintából sikerült a virális RNS kimutatása. Huszonhat reprezentatívan válogatott PCR-pozitív mintából határoztuk meg szekvenálással a vírus 320 nukleotid hosszúságú nukleotid sorrendjét. Minden szekvencia genetikailag 100%-ban azonos volt (34. ábra). A vírus (HAV/Transdanubia/2006/HUN, EF190998) az IB szubgenotípusba tartozott, genetikai állománya a vizsgált VP1/2A régióban 100%-ban egy 2002-ben az olaszországi Bariban kimutatott (Chironna et al., 2004) új, variáns hepatitis A víruséval (IT-MAR-02, AY294047) egyezett meg (34. ábra). A HAV/Transdanubia/2006/HUN 99%-os nukleotid azonosságot mutat (3 szinonim nukleotid eltérés) a 2003-ban Pécsett esethalmozódást okozó HAV vírussal (HAV/Pecs-10/2003/HUN, DQ163904).

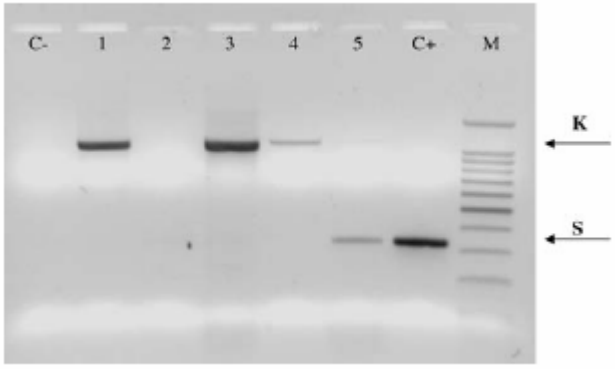
***Kobuvírus* nemzetség**

A kobuvírust (Aichi vírus, 2003. februártól *Aichivírus A* vírusfaj) a japán Aichi Prefektúrában 1989-ben lezajlott, kagylófogyasztáshoz köthető gastroenteritis járványból származó széklet mintákból izolálták először (Yamashita et al., 1991). A genetikai állomány meghatározását (Yamashita et al., 1998) követően 1999-ben az új *Kobuvírus* (kobu=dudor, japán) nemzetséget alkották meg a számára a *Picornaviridae* családban. 2003-ban ugyanez a

japán kutatócsoport írta le a nemzetség második faját (U-1, bovine kobuvírus; 2013. februártól *Aichivírus B* vírusfaj) szövettenyészetben, illetve szarvasmarhák fécesz mintáiból (Yamashita et al., 2003). Érdekességként megemlíthető, hogy 1991 és 2006 között a japán kutatócsoporton kívül a kobuvírusok senkinek sem keltették fel az érdeklődését. Bár 2000-2002 között megkíséreltük az Aichi vírus kimutatását RT-PCR módszerrel szórványos gyermekkori és járványos gastroenteritisekből hazánkban – még a prototípus Aichi vírust (A846/88) is megkaptuk Dr. Teruo Yamashita szívességéből – de ez sikerrel nem járt. 2008-ban azonban egy véletlen folytán visszakanyarodtunk a kobuvírusokhoz…

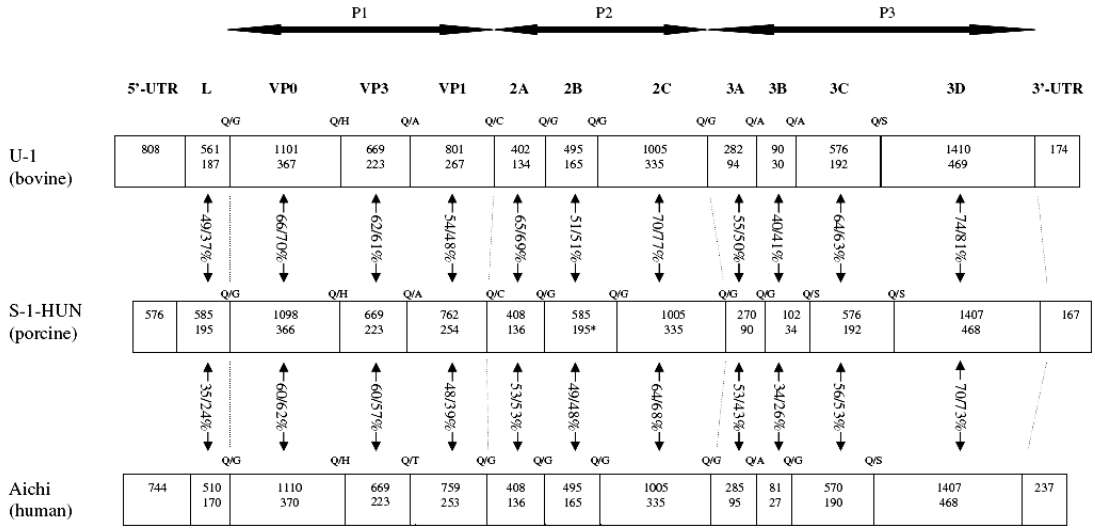
Porcine (sertés) kobuvírus

Miközben sertések (*Sus scrofa domestica*) fécesz mintáiból calicivírusokat kerestünk RT-PCR módszerrel – a sertés calicivírusoknál írtak szerint – az egyik kelet-magyarországi farm (Ebes) mintáiból aspecifikus, de konzekvens méretű PCR-termékek nagy számára (35%; 21/60 minta) lettünk figyelmesek (36. és 57. ábrák). Az 1065nt hosszú szekvenciák a legközelebbi nt/aa azonosságot az Aichi vírushoz (79%/70%) és a bovine (szarvasmarha)



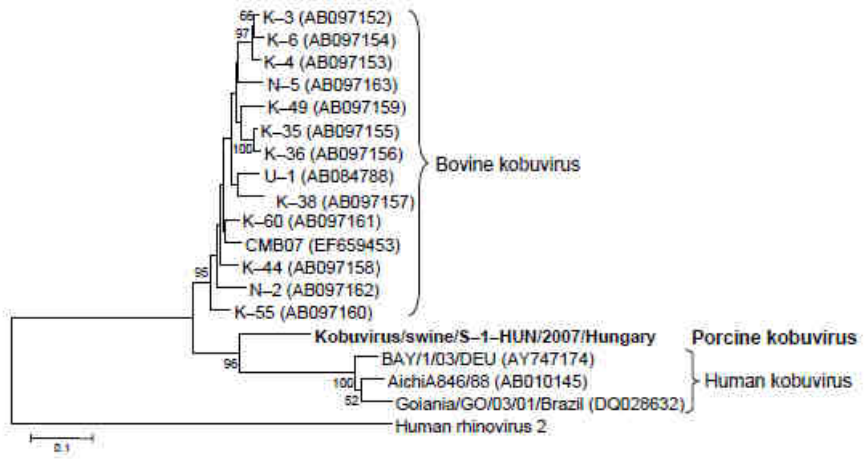
36. ábra. A sertés kobuvírus első – véletlen - kimutatása RT-PCR módszerrel p289/p290 calicivírus primerekkel sertések bélsár mintáiból, ethidium-bromiddal festett, negatív agaróz-gélelektroforetikus képen: a sertés sapovírusra specifikus (S: 331nt) és nem specifikus (K:~1100nt) méretű PCR-termékek agaróz gélelektroforetikus képe. A nem specifikus ~1100 nt méretű termékek (1., 3., 4. és 5. lyukak) szekvenciája a bovine kobuvírushoz és az Aichi vírus 3C/3D régiójához hasonlítottak. C-: negatív kontroll; C+: pozitív kontroll; M: 100bp DNA Ladder (Promega); 5. lyuk: sertés sapovírus és sertés kobuvírus társfertőzés. (További, ~1100 nt hosszúságú aspecifikus PCR-termékek a sertésfarmról származó bélsár mintákból az 57. ábrán is láthatóak.)

kobuvírushoz (73%/69%) mutattak a GenBank adatbázisával összehasonlítva. A sertésből kimutatott kobuvírus - porcine (sertés) kobuvírus S-1-HUN/2007/Hungary; EU787450 (2003. februártól elfogadott vírusfaj: *Aichivírus C*) - teljes genomja 8210nt a poly(A) farok nélkül. Az egyes génrégiói és ezek összehasonlítása az Aichi vírushoz és a bovine kobuvírushoz az 37. ábrán látható. A porcine kobuvírus (S-1-HUN) kódoló régiója 7467nt (2488aa) hosszú, mely 57%/56% és 63%/64% nt/aa átlagos azonosságot mutat az Aichi vírushoz és a bovine kobuvírushoz. A kódoló régióban jelen van az L (leader) fehérje, a VP0 pedig - a másik két kobuvírushoz hasonlóan - nem hasítódik VP4 és VP2 fehérjékre. Jelentős eltérés figyelhető meg a 2B régióban, mely porcine kobuvírus esetén tartalmaz egy 2x90nt hosszú (2x30aa) tandem ismétlődő szekvenciát (AANRVAESIETTAS(/T)V(/A)VREADL ARSTLNISM), mely jelentősen növeli e régió és fehérje hosszát. A 2B fehérje funkciója nem ismert kobuvírusban, analógiák alapján elképzelhető, hogy a sejtmembránokon keresztüli transzportban vehet részt, mint „viroporin”. A 2C, 3C és 3D régiók kódolják a virális enzim centrumok konzervatív aminosav motívumait.



37. ábra. A porcine (sertés) kobuvírus (S-1-HUN) genomjának felépítése és összehasonlítása az Aichi vírussal és a bovine (szarvasmarha) kobuvírussal. P1 a strukturális fehérjéket, a P2 és P3 a nem strukturális fehérjék kódoló régióit jelenti. A génkazettákban a felső szám az adott régió nukleotid, az alsó szám az aminosav hosszúságot adja meg. Az egyes régiók nukleotid és aminosav (nt/aa) hasonlósága a felrajzolt prototípusok között látható. A lehetséges N-terminális fehérje vágási helyek az egyes régiók határa felett található.
*: 30 aminosav (90 nukleotid) hosszú tandem ismétlődés a sertés kobuvírus 2B régiójában.

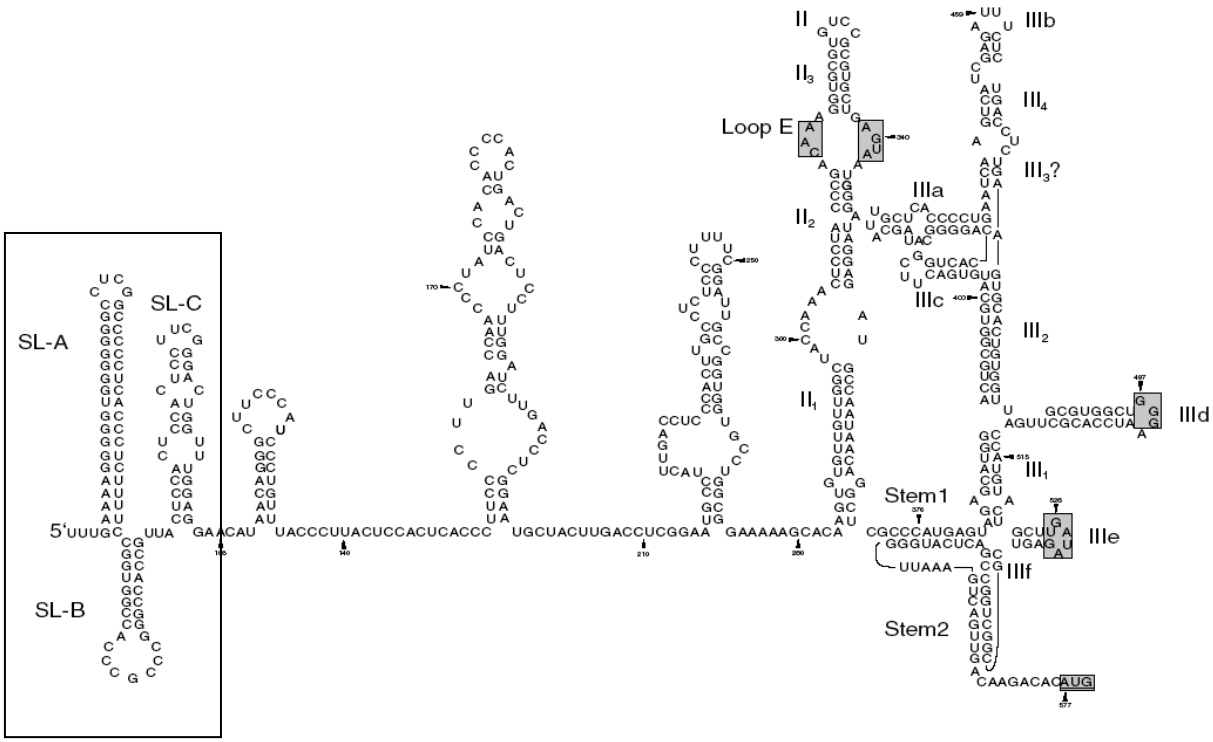
A porcine kobuvírus részleges, 3C/3D kódoló régiója alapján készített filogenetikai elemzés a 38. ábrán látható.



38. ábra. A porcine (sertés) kobuvírus (S-1-HUN/2007/Hungary; EU787450) 1065 nt hosszú, részleges 3C/3D kódoló régiójának nukleotid sorrendje alapján készített filogenetikai elemzés (neighbor-joining módszer, MEGA5 program).

A porcine kobuvírus 5’UTR, nem kódoló régió – benne a belső riboszóma kötő hely (internal ribosomal entry site – IRES) másodlagos szerkezetének meghatározása igazi kihívást jelentett. Ez a szerkezet alapvető fontossággal bír a virális replikációban és a transzlációban. Az RNS 5’UTR részének másodlagos szerkezetének szerveződése alapján az IRES négy típusát (I-IV) különítették el egyes RNS vírusokban, így a picornavírusok esetén is. Az Aichi vírus és a bovine kobuvírus esetén nem volt ismert azok szerkezete (bár mindkettőnél II-es típusú IRES jelenlétét valószínűsítették) és a három 5’UTR RNS szekvencia elemzése (hossz, „alignment”) is azt mutatta, hogy lényegesen eltérhetnek egymástól (37. ábra). Azonban a porcine kobuvírus esetén 79% és 74%-os nt azonosságot találtunk az 5’UTR régió 3’ vége (a 469-549 nt és 496-5689 nt között), valamint a duck hepatitis vírus 1 (EU395440) és porcine (sertés) teschovírus (AY392537) megfelelő IRES régiója között. Mivel e két utóbbi vírus IV-es típusú („hepacivírus/pestivírus-szerű”) IRES-sel jellemezhető (Hellen et al., 2007) a hasonlóság alapján a IV-es típusú IRES felrajzolása adta magát a porcine kobuvírus esetében

is. A porcine kobuvírus esetén végül sikerült megtalálni minden fontos IRES motívumot és szerkezetet, mely egyértelműen bizonyítja a IV-es típusú IRES jelenlétét (39. ábra). Érdekes módon azonban az 5’UTR extrém 5’ végén (az első 108 nt) nagyfokú nukleotid konzervativitást és másodlagos szerkezetet („stem-loop”; SL) találtunk a három kobuvírus esetén (39. ábra). Így a porcine kobuvírus genom ambivalenciát mutat az 5’UTR régióban, az 5’ vég a kobuvírusokhoz hasonló, a 3’ vég (IRES) azonban az Aichi vírustól és a bovine kobuvírustól nagymértékben eltér. (Megjegyzés: Az Aichi vírus, a bovine kobuvírus és más további picornavírusok 5’UTR IRES részének másodlagos szerkezetét csak 2012-ben határozták meg, mint a legújabb, V-ös típusú IRES (Sweeney et al., 2012).



39. ábra. A porcine (sertés) kobuvírus (S-1-HUN) 5’UTR régiójának lehetséges másodlagos RNS szerkezete Mfold program és a meglévő ismeret figyelembe vételével, szabadkézi módosítással. Az extrém 5’ végen elhelyezkedő három „stem-loop” (SL) (SL-A, SL-B és SL-C) (mely minden eddig ismert kobuvírusban jelen van) és a IV-es típusú IRES-re emlékeztető szerkezet (mely a kobuvírusok körében eddig csak a porcine kobuvírusban ismert) a korábban más IV-es típusú IRES-sel rendelkező vírusok körében ismertek figyelembe vételével készült. Az aktuális nevezéktani kontinuitás érdekében a domének jelölése II és III, az egyedi helikális szegmentumok jelölése II_1, II_2, III_1, III_2, stb.; az egyedi hajtűkanyarok jelölése pedig III_a, III_b, stb. A polyproteint kódoló AUG start kodon és a szerkezetre jellemző konzervatív domének szürke keretben jelöltek.

Az Aichi vírus, a bovine kobuvírus és a porcine kobuvírus egyidejű kimutatása érdekében egy „univerzális” pirmerpárt (UNIV-kobu-F: 5’-TGGAYTACAAG(/R)TGTTTTG ATGC és UNIV-kobu-R: 5’-ATGTTGTTRATGATGGTGTTGA) terveztünk a kobuvírusok 3D konzervatív régiójára. A felsokszorozott termék 216nt hosszúságú. E primerpár segítségével a vizsgált sertésfarmról 2007. februárjában gyűjtött 60 fécesz mintából 39-ben (65%) lehetett kobuvírust kimutatni (6. táblázat). Korcsoportonként: a 10 napnál fiatalabbak körében 100% (15/15), a 3 hetesek körében 93,3% (14/15), a 3 hónaposak körében 20% (3/15) és a 6 hónaposak körében 46,7% (7/15). 2008. novemberében a mintavételt a sertésfarmon megismételtük és az újabb 60 fécesz minta mellett párban 60 savót is gyűjtöttünk. A második mintavétel során a féceszből 53,3%-ban a szérumból 26,6%-ban sikerült kobuvírust kimutatni RT-PCR módszerrel (6. táblázat). A korcsoportokon belüli kimutatási arányokat a 6. táblázat mutatja.

	mintavétel		
	2007. február	2008. november	
életkor	fécesz	fécesz	szérum
<10 nap	15 (100%)	8 (53,3%)	1 (6,7%)
<3-4 hét	14 (93,3%)	13 (86,7%)	7 (46,7%)
<3 hónap	3 (20%)	5 (33,3%)	0
<6 hónap	7 (46,7%)	6 (40%)	8 (53,3%)
összesen	39/60 (65%)	32/60 (53,3%)	16/60 (26,6%)

6. táblázat. A porcine (sertés) kobuvírus RNS kimutatása RT-PCR módszerrel sertések fécesz és szérum mintáiból. Mindkét időpontban történt mintavételezés során az egyes korcsoportokba 15 egyed került. A 2008. novemberi fécesz és szérum minta gyűjtése párban történt ugyanazoktól az állatoktól.

A porcine kobuvírus ismételt kimutatása 21 hónappal később ugyanarról a farmról lehetőséget adott a porcine kobuvírusok teljes genomjának meghatározásával a vírus evolúciójának mérésére. A 7. táblázat a természetes gazdaközti in vivo mutációs változást

mutatja két porcine kobuvírus (S-1-HUN/2007/Hungary; EU787450 és K-30-HUN/2008/Hungary; GQ249161) teljes genomja alapján. Feltehetően a zárt sertés telepen a fiatal állomány folyamatosan fertőződik, a vírus a gazdaszervezeten kívül töltött ciklusideje rövid (nem replikatív virális forma). A mutációs ráta ($8.84x10^{-3}$) egyezik más picornavírusoknál tapasztalt rátával, mely a vírus-gazda közötti jó adaptációval magyarázható.

	nukleotid				aminosav		
régió	hosszúság	különbség	%-os különbség	csere/ nukleotid/év	hosszúság	különbség	%-os különbség
5'UTR	576	1	0,17	$1,0x10^{-3}$	-	-	-
L	585	15	2,56	$1,46x10^{-2}$	195	1	0,51
VP0	1098	19	1,73	$9,88x10^{-3}$	366	3	0,82
VP3	669	8	1,19	$6,83x10^{-3}$	223	3	1,34
VP1	762	9	1,18	$6,75x10^{-3}$	254	0	0
2A	408	6	1,47	$8,40x10^{-3}$	136	2	1,47
2B	585	7	1,19	$6,83x10^{-3}$	195	2	1,02
2C	1005	23	2,28	$1,31x10^{-2}$	335	5	1,49
3A	270	6	2,22	$1,27x10^{-2}$	90	0	0
3B	102	2	1,96	$1,12x10^{-2}$	34	0	0
3C	576	14	2,43	$1,39x10^{-2}$	192	2	1,04
3D	1407	16	1,14	$6,50x10^{-3}$	469	2	0,42
3'UTR	167	1	0,6	$3,42x10^{-3}$	-	-	-
nem-strukturális*	4353	74	1,7	$9,71x10^{-3}$	1451	13	0,89
strukturális†	2529	36	1,42	$8,13x10^{-3}$	843	6	0,71
teljes genom	8210	127	1,54	$8,84x10^{-3}$	2489	20	0,80

7. táblázat. A porcine kobuvírus (S-1-HUN/2007/Hungary (EU787450) és K-30-HUN/2008/Hungary (GQ249161) természetes gazdaközti in vivo mutációs változása ugyanabban a farmból, 21 hónap különbséggel gyűjtött két fécesz mintában.
* 2A-3D
† VP0-VP1

A porcine kobuvírust metagenomikai vizsgálatokkal, majd RT-PCR módszerrel (UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F primerekkel) 6-8 hetes vaddisznók (100%; 5/5) féceszmintáiból is sikerült kimutatni. A teljes vírusgenom (JX177612) meghatározását követően a szekvencia elemzése azt mutatta, hogy a nukleotid azonosság a vaddisznó és a sertésekben talált kobuvírusok között 90%.

Bovine (szarvasmarha) kobuvírus

2002. februárban 32, 2008. februárban 26 fécesz mintát gyűjtöttünk egy közép-magyarországi szarvasmarha telepen (Aba) elsősorban 20 napnál fiatalabb (62%), egészséges szarvasmarha (*Bos taurus*) egyedektől. A telep átlagosan 870 állatot számlál. Az általunk tervezett „univerzális" kobuvírus primerrel (UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F) vizsgálva 2 (6,25%; 2/32) esetben sikerült kobuvírust RT-PCR módszerrel kimutatni 1 éves életkorú állatok 2002-ből származó fécesz mintáiból. Az egyik bovine kobuvírus (Aba-Z20/2002/Hungary; FJ225406) 862 nt hosszú 3' végét (3D-polimeráz+3'UTR) határoztuk meg.

2009. márciusban 8 fécesz mintát gyűjtöttünk 3 hétnél fiatalabb, egészséges birkáktól (*Ovis aries*) egy 400 állatot számláló közép-magyarországi (Tárnok) telepről. A farmon hazai „merino ewes" állatokat kereszteztek Németországból származó feketefejű hús kosokkal. Az általunk tervezett „univerzális" kobuvírus primerrel (UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F) vizsgálva 5 (62,5%; 5/8) esetben sikerült kobuvírust RT-PCR módszerrel kimutatni. A vizsgált rövid 3D szakaszon a PCR-termékek egyező nukleotid sorrendet mutattak. Egy mintát kiválasztva a kobuvírus teljes genomját meghatároztuk (TB3/2009/Hungary; GU245693), melynek hossza 8378 nukleotid. Az átíródó polyprotein 2468 aa hosszú és 84% hasonlóságot mutat a prototípus U-1 bovine kobuvírushoz.

Aichi vírus (kobuvírus emberben)

2000. október és december között 65 székletmintát gyűjtöttünk szórványos gastroenteritisben szenvedő 2 hét és 12 év közötti életkorú (átlagosan 28 hónapos) gyermekektől (35 fiú és 35 lány), melyek hátterében tenyésztéssel bakteriális kórokozó (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus* és *C. perfringens*), rotavírus, adenovírus és calicivírus (norovírus és sapovírus) nem volt kimutatható. Az általunk tervezett „univerzális" kobuvírus primerrel (UNIV-kobu-R/UNIV-

kobu-F) vizsgálva 1 (1,5%; 1/65) esetben sikerült kobuvírust RT-PCR módszerrel kimutatni egy 3 éves életkorú leány széklet mintájából. A vírus (Szigetvár-HUN298/2000/Hungary; FJ225407) 96/97% nt és 100/98% aa azonosságot mutatott a prototípus japán (AB010145) és a német (AY747174) - az első 2006-ban, Európában leírt - Aichi vírushoz. A gyermeknek a mintavételt megelőző 2-3 napban száraz köhögéssel járó obstruktív bronchitise és hőemelkedése volt. A mintavétel napján a hasmenés mellett rhinitis és purulens conjuctivitis is jelentkezett. A mintavételt követő 2 nappal bronchopneumónia alakult ki. A hasmenés 3 napig tartott. A mintavételt követő 10. napon a gyermek gyógyultnak volt tekinthető.

Járványos gastroenteritisekből az Aichi vírust nem sikerült kimutatni. 2001 és 2008 között összesen 75 ismeretlen eredetű (nem bakteriális, rota-, adeno, és calicivírus) hazai gastroenteritis járvány 233 széklet mintájából a kobuvírus nem volt kimutatható.

Parechovírus nemzetség

Humán parechovírusok

A *Parechovírus* nemzetség két vírusfajt foglal magába: humán parechovírust (HPeV) és Ljungan vírust. A humán parechovírusoknak jelenleg 16 szerotípusa (HPeV1-16) ismert, melyek közül a prototípus a HPeV1 (korábbi néven 1999-ig echovírus 22), melyet 1956-ban Albert Sabin és mtsa. hasmenéses gyermek székletmintájából mutatott ki (Wigand R et al., 1961). Jelentőségükre, és az echovírusoktól (*Enterovírus* nemzetség) való lényeges genetikai különbözőségükre a molekuláris vizsgálatok világítottak rá az ezredfordulón (Ghazi et al., 1998). A humán parechovírusok többnyire tünetmentes fertőzéseket okoznak, de néha – valószínűleg a típustól is függően - súlyos klinikai szindrómákkal (gastroenteritis, légúti megbetegedés, encephalitis, meningitis, flaccid paralysis, pyrexia) járnak együtt elsősorban csecsemő- és kisgyermekkorban (Abed et al., 2006; Watanabe et al., 2007; van der Sanden et al., 2008; Harvala et al., 2009a). A HPeV1 a leggyakoribb, viszont úgy néz ki, hogy a HPeV3

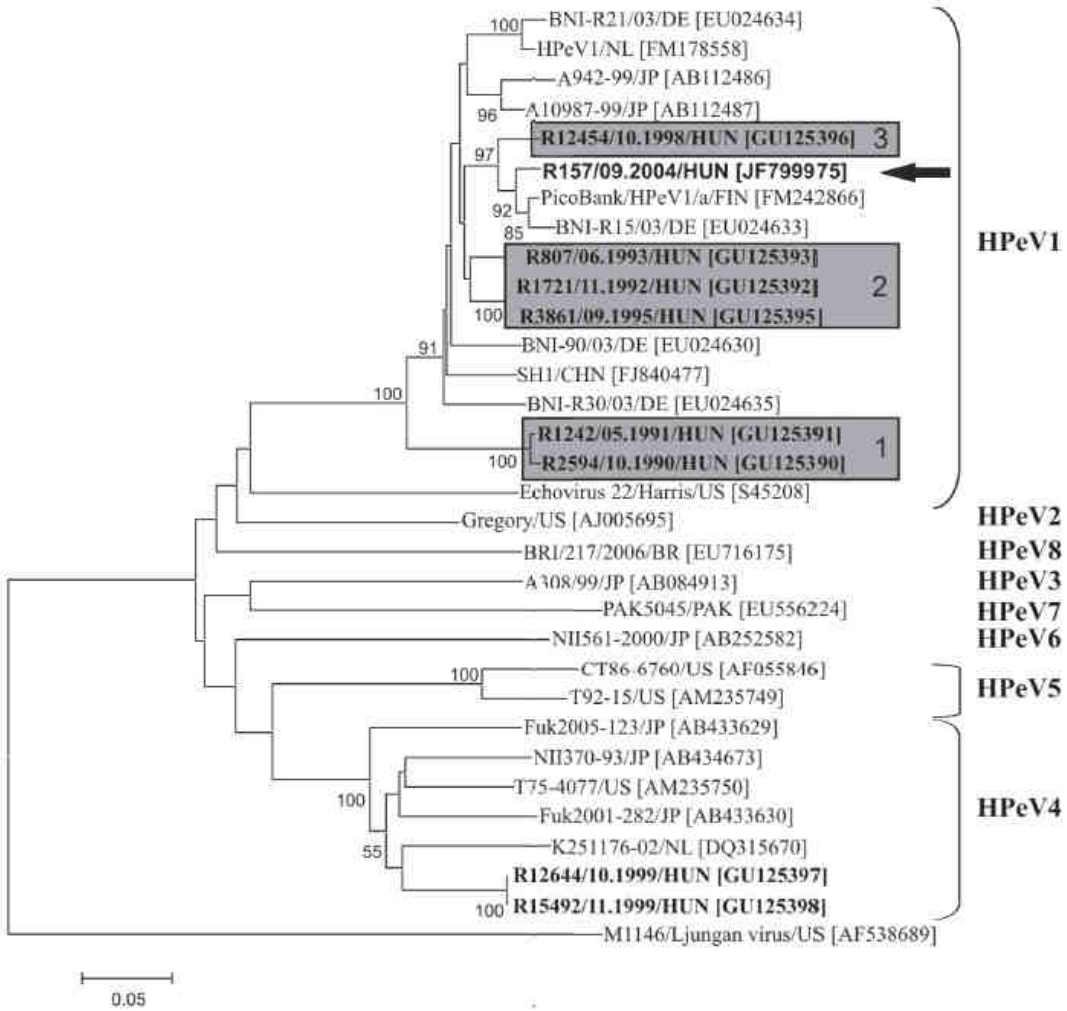
okozza a legsúlyosabb, szepszis-szerű megbetegedéssel, valamint encephalitissel járó fertőzéseket, újszülöttekben és 3 hónapos kor alatti csecsemőkben (Harvala et al., 2009b). Szeroepidemiológiai tanulmányok szerint 2 éves életkorra 88-95%-ban van a HPeV1 ellen ellenanyag a populációban (Abed et al., 2007). A frissen felismert, jelentős szerepük ellenére a parechovírusok kimutatása jelenleg nem része a rutin laboratóriumi diagnosztikának. Retrospektív vizsgálataink célja a HPeV kimutatása és azonosítása volt molekuláris módszerekkel, részben a Laboratóriumunkban 1990 és 2000 között archivált „enterovírus”-szerű cytopathiás hatást mutató és a 110-ból még fellelhető 66 (60%) GMK (green monkey kidney) és „293” (humán embrionális vese) sejtkultúrából. Ezek heveny gastroenteritisben szenvedő 10 év - döntően 1 év - alatti gyermekek széklet mintáinak tenyészetei voltak. Másrészt a Szent László Kórház (Budapest, dr. Mihály Ilona) hasonló 4 beteganyagából (2 széklet, 1 liquor, 1 garatmosó folyadék) származtak, melyek HPeV1 immunszérummal (ECHO22, Denka-Seiken, Tokió, Japán) neutralizálhatók voltak 2000 és 2004 között. A nyilvánosan elérhető HPeV1-8 szekvenciák konzervatív 5’ UTR régiójára tervezett primerekkel a 66 mintából 9-ben (13,6%) és a Szent László Kórház mind a 4 anyagából (8. táblázat) sikerült HPeV-t RT-PCR módszerrel kimutatni.

	A minta típusa (azonosító)	A mintavétel ideje (év, hónap, nap)	Nem és életkor	Vezető tünetek (diagnózis)
1	Széklet (76/2000)	2000. XI. 22–29.	Férfi, 24 év	Hányás, hasmenés, láz (gastroenteritis)
2	Nasopharyngealis váladék (87/2000)	2000. XII. 15.	Férfi, 42 év	Recidív stomatitis aphtosa táplálási képtelenséggel
3	Liquor (78/2001)	2001. IX. 24.	Leány, 10 év	Hőemelkedés, fejfájás, szédülés, hányinger, járási bizonytalanság, (encephalitis)
4	Széklet (R157/09.2004/HUN)	2004. IX. 10.	Fiú, 15 hónap	Hasmenés, láz, exanthema, járási bizonytalanság (ataxia cerebellaris acuta)

8. táblázat. RT-PCR módszerrel igazolt HPeV-fertőzések epidemiológiai és klinikai jellegzetességei a Szent László Kórház anyagából. Az első két beteg (1 és 2) nem tartozik a HPeV-fertőzés irodalomban ismert életkori kockázati csoportjába.

A vírusok teljes P1 (kapszid) régióinak nukleotid sorrendjének meghatározásával 10 minta HPeV1-t, 2 HPeV4-et tartalmazhatott (40. ábra). Egy mintából a vírust nem sikerült

meghatározni. Az izolálás éve szerint 3 HPeV1 klasztert (1990/1991; 1992/1995 és 1998) figyeltünk meg a baranya megyei mintákból (40. ábra). Az egyes klaszterek között a nt/aa azonosság 85-92%/96-98%. A két HPeV4-es izolátum 1 hónap különbséggel került izolálásra 1999-ben és egymástól 7 nt-ban különböztek a P1 régióban.



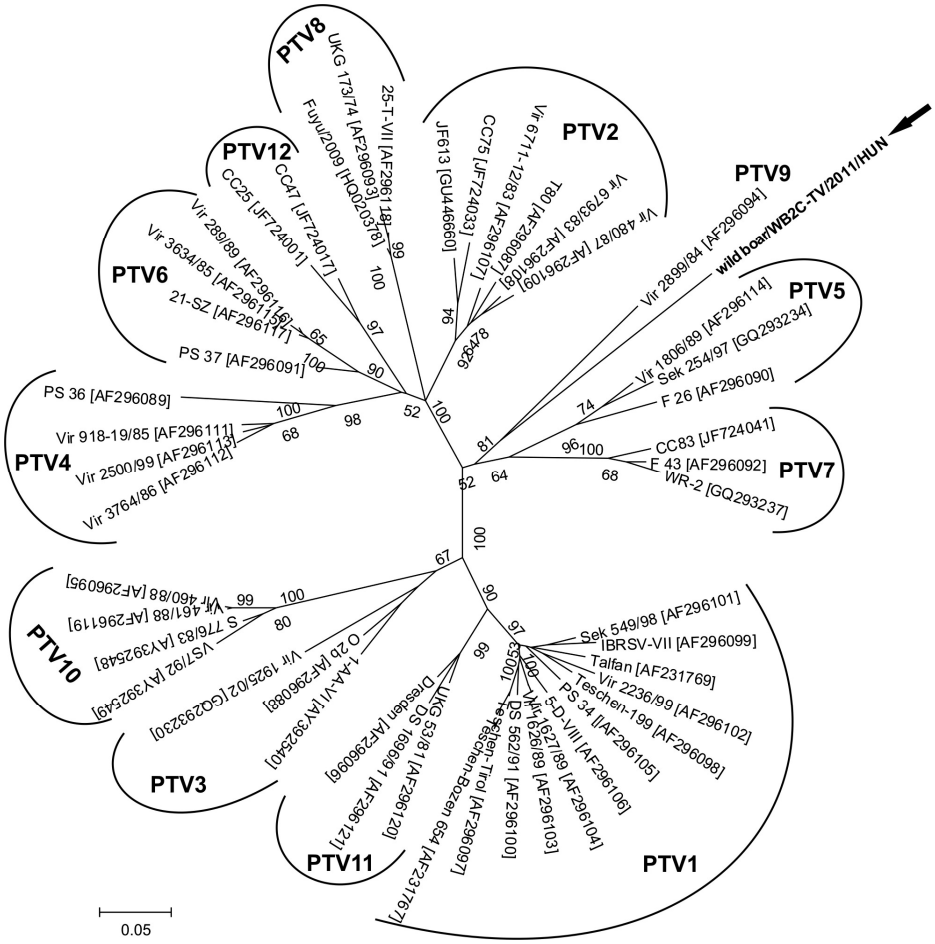
40**. ábra**. A humán parechovírusok (HPeV) teljes kapszid régiója (VP0-VP3-VP1) alapján készített nukleotid alapú filogenetikai elemzés (neighbor-joining módszer, MEGA5). A hazai HPeV szekvenciák vastag betűvel vannak szedve és tartalmazzák az izolálás idejét (hónap, és és GenBank azonosító) is. Az arab számok (1-3) a szürke mezőkben feltüntetve az egy földrajzi régióból (Baranya megye) 11 év alatt kimutatott HPeV1 csoportokat jelzik. A fekete nyíllal jelölt vírus a Szent László Kórházban kezelt 15 hónapos gyermek széklet mintájából származik.

***Teschovírus* nemzetség**

Porcine (sertés) teschovírus vaddisznókban

Eddig 12 porcine (sertés) teschovírus (PTV1-12) szerotípus volt ismert, melyet kizárólag házi sertésekből mutattak ki különböző gyakorisággal világszerte (Zell et al., 2001). A porcine teschovírus fertőzések döntő hányada tünetek nélkül zajlik, de előfordulnak a reprodukciót érintő, diarrheával járó és légúti tünetekkel jelentkező megbetegedések is sertésekben. Ugyanakkor ki kell emelni a „teschovírus encephalomyelitis” vagy „Teschen megbetegedés”-nek nevezett ritka, de súlyos, a központi idegrendszert érintő tünetegyüttest, mely időről-időre egy-egy virulens PTV járványos megjelenésével, nagy gazdasági károkkal jár (Kouba, 2009). Érdekes módon a PTV vaddisznókból (a házi sertések vadon élő fajtársaiból) való kimutatásáról eddig még nem számoltak be. 2011. áprilisában, 10 fécesz mintát gyűjtöttünk egészségesnek látszó, 6-8 hetes vaddisznóktól (*Sus scrofa*) egy délnyugat-magyarországi állatparkból (Bőszénfa). Az vadmalacoknak házi sertéssel nem volt kapcsolatunk. Virális metagenomikai (454-pyroszekvenálás) módszerrel 7 (70%) mintából lehetett PTV szekvenciákat felismerni. Az ismert PTV-ok VP1 régiójára tervezett primerekkel ugyanebből a 7 mintából lehetett specifikus PCR-terméket RT-PCR módszerrel felsokszorozni. A VP1 régióban a vaddisznóból kimutatott PTV-ok egymással 99/100%-os, az egyes PTV típusokhoz 65-72% és 66-74% nt/aa azonosságot mutattak. A filogenetikai elemzés alapján a legközelebbi rokonságban a PTV-5, PTV-7 és PTV-9 típusok vannak (41. ábra). A különbség azonban nagyobb a vaddisznó (előzetes név: PTV-13) és PTV-9 között, mint például a PTV-1 és PTV-11 között (ez igaz a teljes P1 régióra is). Egy mintából a vírus (WB2C-TV/2011/HUN; JQ429405) teljes genomját is meghatároztuk, mely 7108 nt a poly(A) vég nélkül. A polyproteint kódoló régió 6624 nt (2207 aa), az 5’UTR 421 nt, a 3’UTR 63 nt.

dc_704_13



41. ábra. A porcine (sertés) teschovírusok (PTV) VP1 fehérje aminosav sorrendje alapján készített filogenetikai elemzés a 12 ismert PTV szerotípus (PTV1-12) és a vaddisznóból (WB2C-TV/2011/HUN; JQ429405; PTV-13?) kimutatott PTV felhasználásával (Maximum-Likelihood módszer, N=1000 ismétlés, MEGA5 program).

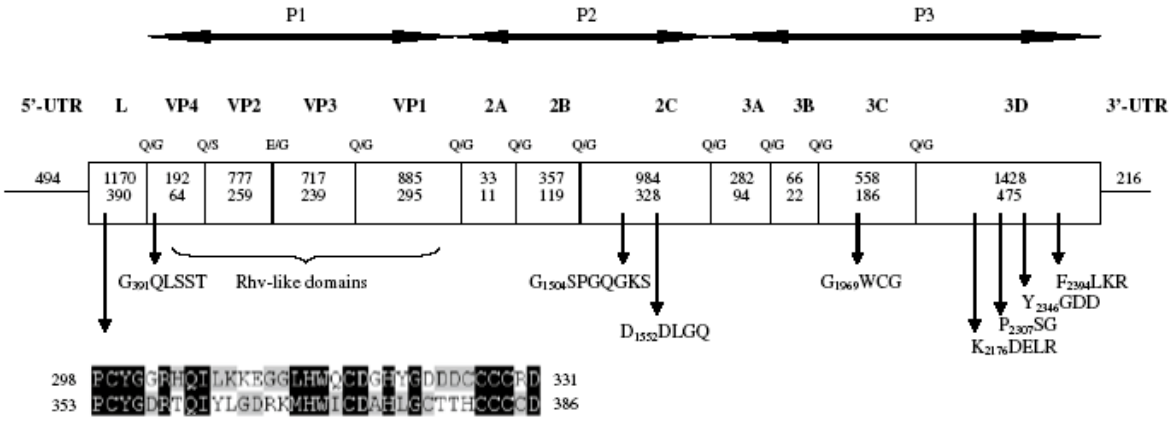
Potenciális nemzetségalkotó, új picornavírus fajok

A következőkben olyan új picornavírusok bemutatására kerül sor, melyek a mellett, hogy új picornavírus fajokat képviselnek, egyben egy-egy (összesen három) új picornavírus nemzetség (”Unassigned” „Gallivírus” és „Hunnivírus”) első tagjai lehetnek.

”Unassigned” nemzetség

Quail (fürj) picornavírus

2010. júliusában egy fécesz mintát gyűjtöttünk házi fürjtől (*Coturnix coturnix*), egy 2 éven aluli, 20 egyedet számláló délkelet-magyarországi családi farmról. Az általunk tervezett „univerzális” kobuvírus primerrel (UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F) vizsgálva kobuvírusra jellemző méretű, igen erős PCR-terméket kaptunk RT-PCR módszerrel. A terméket megszekvenálva egy 74 nt hosszú szekvencia rész 81%-os azonosságot mutatott a humán enterovírus 99 (EF015012) 3D régiójával a GenBank adatbázisával összehasonlítva. A vírus (quail (fürj) picornavírus; QPV1/2010/HUN, JN674502) teljes genomja 8159 nt hosszú a poly(A) vég nélkül (42. ábra). Az 5’UTR 494 nt, a polyproteint kódoló régió 7449 nt



42. ábra. A quail (fürj) picornavírus (QPV1/2010/HUN, JN674502) genom szerveződése. A P1 régió a strukturális fehérjéket, a P2 és P3 régiók a nem-strukturális fehérjéket kódolják. A génkazettákban a felső szám az adott régió nukleotid, az alsó szám az aminosav hosszúságot adja meg. A konzervatív picornavírus aminosav motívumok és a potenciális N-terminális hasítási helyek a génboxok alatt és felett láthatók. A konzervatív aminosav motívumok helyét az első aminosavak mutatják. A 34 aminosav hosszú cysteinben gazdag ismétlődő régiók külön feltüntetve az L-fehérjében.

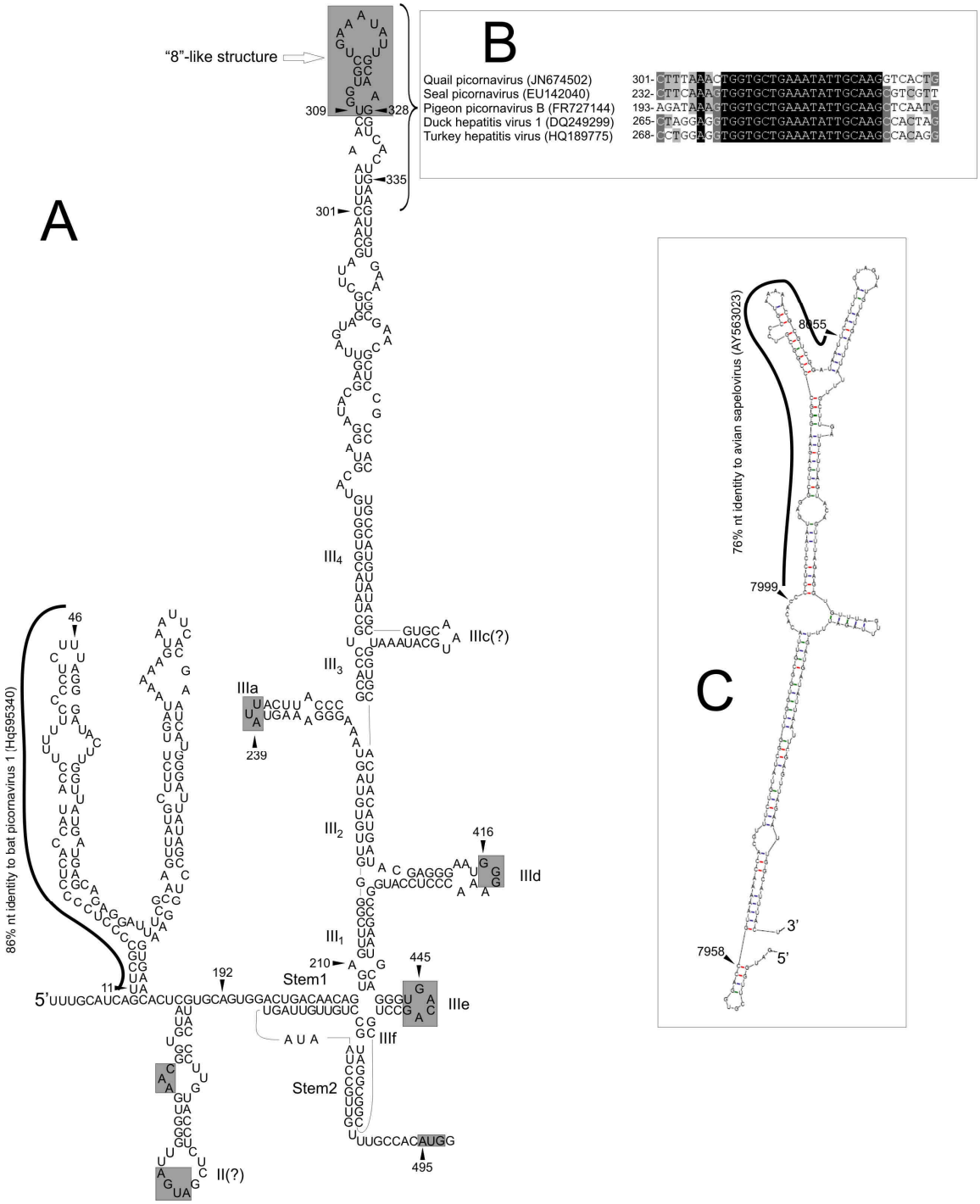
(2482 aa), a 3’ UTR 216 nt hosszú. A QPV1 L-proteinje 1170 nt (390 aa), mely cysteinben gazdag (9,5%) és 5 olyan motívumot is tartalmaz, melyben 3 vagy 4 cystein helyezkedik el egymás mellett. Ezen kívül, egy 34 aminosavból álló ismétlődő szekvencia is megfigyelhető az L proteinben (42. ábra), melyek között 54% nt és 50% aa azonosság van és cysteinben és

histidinben gazdag. A P1 (2571 nt; 857 aa), P2 (1374 nt, 458 aa) és P3 (2334 nt, 777 aa) régiók 43%, 39% és 47% aminosav azonosságot mutatnak a GenBankban található legközelebbi picornavírushoz, az avian sapelovírushoz (korábban duck picornavírus TW90A, AY563023). A VP1 régióban az aa azonosság 35% a két vírus között. A picornavírusokra jellemző konzervatív aminosav motívumok a QPV1 esetén is megtalálhatók (42. ábra). A quail picornavírus teljes polyproteinje alapján készült filogenetikai elemzés a 43. ábrán látható.

43. ábra. A quail (fürj) picornavírus (QPV1-HUN/2010; JN674502, fekete nyíllal megjelölve) teljes kódoló régiójának („L”, P1, P2 és P3) aminosav sorrendje alapján készített filogenetikai elemzés a 12 picornavírus nemzetséggel és további még nem besorolt picornavírusokkal összehasonlítva (neighbor-joining módszer, JTT model, N=1000, MEGA5). A madarakban eddig megtalált picornavírusok fekete kőrrel vannak jelölve.

A QPV1 5’UTR régiója 494 nt hosszú. Szekvencia hasonlóságot 5 picornavírussal találtunk a GenBankban, melyek a 44.A ábrán láthatók. A QPV1 86%-os nt azonosságot mutat a 11. és 46. nt pozíció között a bat picornavírus 1-hez (HQ595340). Egy 20 nt-ból álló teljesen egyező szekvenciát találtunk a QPV1 (309-328 nt pozíció) és további 4 picornavírus [pigeon picornavírus B (FR727144), duck hepatitis vírus 1 (DQ249299), turkey hepatitis vírus (HQ189775) és seal picornavírus (EU142040)] között (44.B ábra). Az 5’UTR lehetséges másodlagos RNS szerkezete a pigeon picornavírus B és a turkey hepatitis vírus esetén nem ismert, a másik három picornavírus (duck hepatitis vírus 1, seal picornavírus és bat kobuvírus 1) esetében pedig a *h*epacivírus/*p*estivírus-szerű (HP) IVB típusú IRES-sel jellemezhető. Ez a IV-es típusú IRES struktúra a QPV1 esetén is felrajzolható (44.A ábra). Ugyanakkor lényeges szerkezeti különbség is tapasztalható: A III-as domén nem a III_b hajtűkanyarban végződik, hanem az 5’UTR-ben talált 20 nt-ból álló konzervatív szekvenciaszakasz másodlagos RNS szerkezete egy „8”-asnak megfelelő szerkezetbe szerveződik a QPV1-ben az igen hosszú III-as domén apikális végén („apical 8-like structure”-nak neveztük el). Ez a struktúra korábban nem volt ismert. Érdekeségként megemlíthető, hogy bár az apikális 8-szerű struktúra csúcsi elhelyezkedésű, de a duck hepatitis vírus 1 és a seal picornavírus esetében a II-es domén előtt található. A 3’UTR-ben a 7999 és a 8055 nukleotidok között 76%-os nt hasonlóság figyelhető meg a QPV1 és az avian sapelovírus (AY563023) között (44.C ábra), a 3’UTR másodlagos szerkezete strukturált (44.C ábra).

A mintavételt 2011. áprilisában megismételtük és 10 fécesz mintát gyűjtöttünk a fürjektől a farmon. A 10 mintából 3 (30%) esetben lehetett a quail picornavírust RT-PCR módszerrel azonosítani. Ugyanakkor a vírust kereskedelmi forgalomban kapható fürjtojások (N=12) tojáshéjának külső felszínéről RT-PCR módszerrel nem sikerült kimutatni.

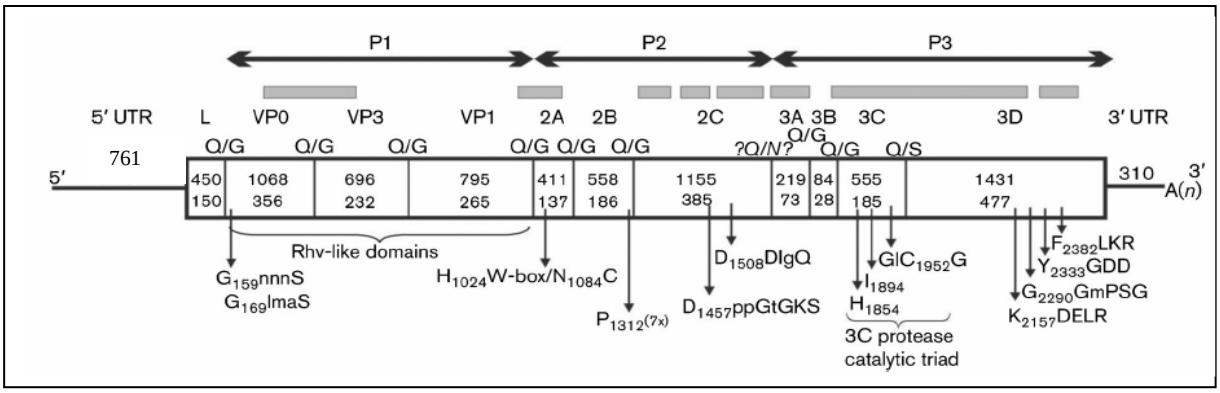


44. ábra. A quail (fürj) picornavírus (QPV1/2010/HUN; JN674502) 5'UTR (A) és 3'UTR (C) régiójának lehetséges másodlagos RNS szerkezete Mfold program és a meglévő ismeret figyelembe vételével, szabadkézi módosítással. IV-es típusú IRES-re emlékeztető szerkezet a korábban más IV-es típusú IRES-sel rendelkező vírusok körében ismertek figyelembe vételével készült. Az aktuális nevezéktani kontinuitás érdekében a domének jelölése II és III, az egyedi helikális szegmentumok jelölése III_1, III_2, stb.; az egyedi hajtűkanyarok jelölése pedig III_a, III_d, stb. A polyproteint kódoló AUG start kodon és a szerkezetre jellemző konzervatív domének szürke keretben jelöltek. A III-as domén apikális részén elhelyezkedő konzervatív „8"-as struktúra, és ezek nukleotid hasonlósága 4 további picornavírushoz a B ábrán látható. Egyéb szekvencia hasonlóságok a QPV1 és más picornavírusok 5'UTR és 3'UTR régiói között folyamatos vonallal vannak jelölve a nukleotid pozícióknak megfelelően.

„Gallivírus” nemzetség

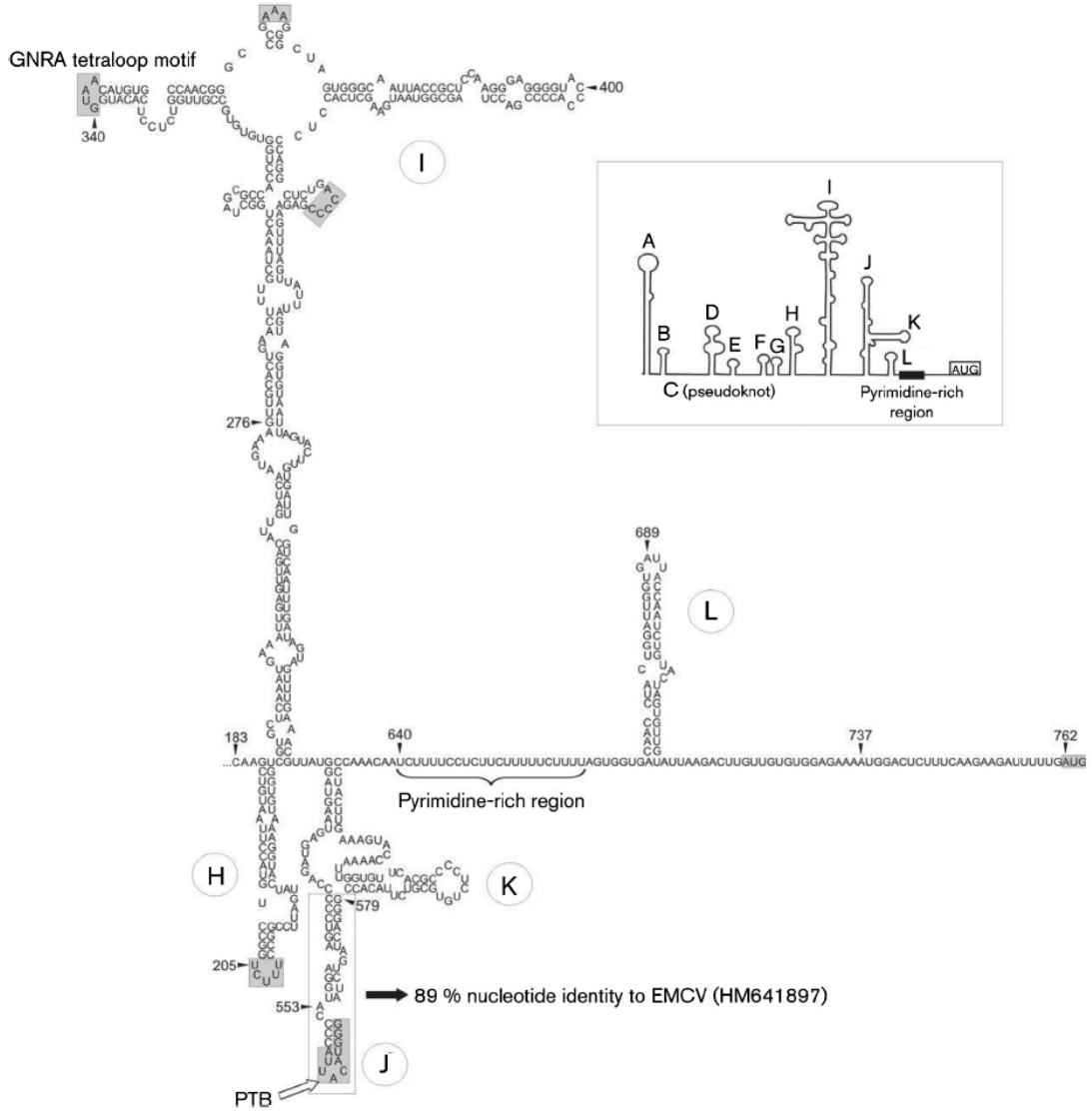
Turkey (pulyka) picornavírus

2011. áprilisában egy fécesz mintát (M176) gyűjtöttünk húsa miatt kereskedelmi forgalomba szánt pulykától (*Meleagris gallopavo)*, mely fejlődésben visszamaradottságot („stunting” szindróma) mutatott egy észak-nyugat magyarországi pulykafarmon (Bögöte). A mintát szekvencia független virális nukleinsav amplifikáció (virális metagenomika) és 454-pyroszekvenálás módszereivel vizsgáltuk. A metagenomikai elemzéssel összesen 15 picornavírus nukleotid szekvenciát azonosítottunk, mely 8 genomdarabba rendeződve (45. ábra) a genetikailag legközelebbi picornavírus – a 2010-ben, rigóféléből leírt, hivatalos nemzetségbe még nem besorolt turdivírus 1 (GU182406) (Woo et al, 2010) - genomjának 42% fedte le. A pulykából kimutatott picornavírus (turkey picornavírus/M176/2011/HUN; JQ691613) teljes genomja 8496 nt a poly(A)-vég nélkül és a picornavírusokra jellemző genomszerkezettel és konzervatív aminosav motívumokkal jellemezhető (45. ábra). Az ORF 7425 nt hosszú, mely egy 2474 aa hosszú polyproteint kódol. Az 5’ vég 761 nt, a 3’ vég 310 nt hosszúságú. Az L-protein 450 nt-ot (675aa) tartalmaz, melyhez hasonló picornavírus szekvenciát nem találtunk a GenBankban. A teljes P1 (2562nt; 854aa), P2 (2025nt; 675aa) és P3 (2391nt; 796aa) a legnagyobb aa szekvencia azonosságot 18%/32%/45% a turdivírus 1-hez (GU182406) mutatott. Ugyanakkor, a P3 régióban 77% és 96%-os aa azonosságot találtunk, az akkor még csak közlés alatt álló, de a GenBankban éppen elhelyezett és előzetesen elnevezett, chicken „gallivirus” (ChGV; JF424824) és turkey „gallivirus” (TuGV; JF424828-JF424830) részleges 3D/3’UTR picornavírus szekvenciákkal, melyeket csirke és pulyka fécesz mintákból azonosítottak az Egyesült Államokban, ugyancsak 2012-ben (Farkas et al., 2012).



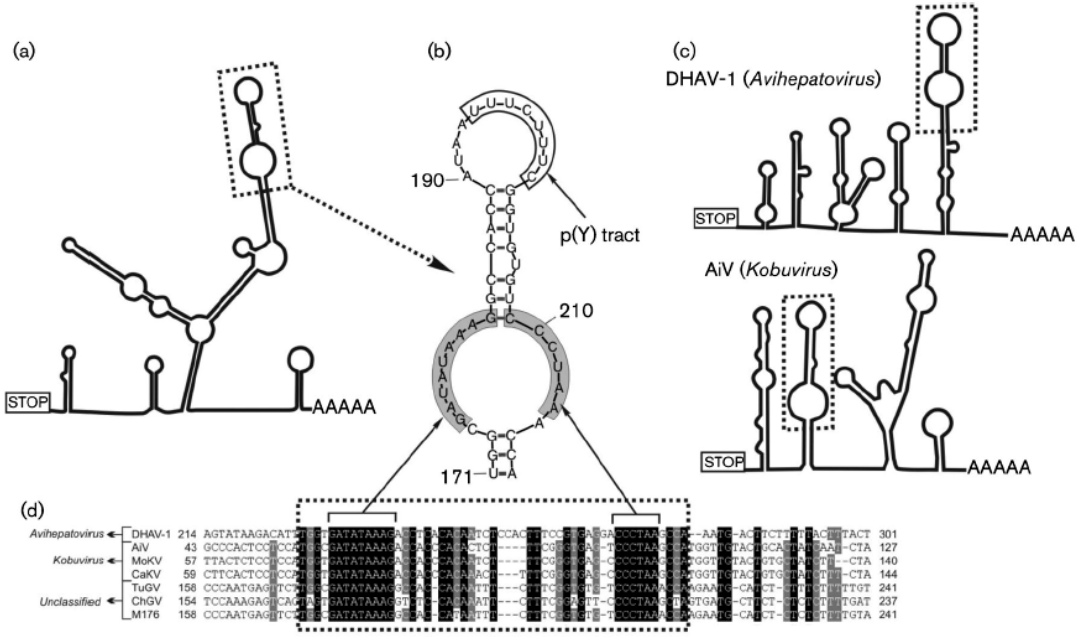
45. ábra. A turkey (pulyka) picornavírus (turkey/M176/2011/HUN; JQ691613) genomjának lehetséges genomszerkezete. A P1 a strukturális, a P2 és P3 a nem strukturális fehérjéket kódolja. Az egyes gének hosszai nukleotidban (felső számok) és aminosavban (alsó számok) az egyes génboxokon belül vannak jelölve. A konzervatív aminosav motívumok és a lehetséges N-terminális polyprotein hasító helyek (NetPicoRNA program) az ábra alatt és fölött láthatók. Az aminosav motívumok pozíciói az első aminosav helye szerint vannak ábrázolva. A pyroszekvenálás során kapott szekvenciadarabok a génboxok felett szürke csíkkal vannak bejelölve.

A turkey (pulyka) picornavírus (M176) 5’UTR régiója 761 nt hosszúságú. A valószínűsíthető AUG start kodon a 762-764 nt pozícióban lehet (46. ábra). Ezt megelőzik jelentős hosszúságú polypyrimidine traktusok, melyek közül a leghosszabb, a 640 és 662 nukleotidok között található (46. ábra). A BLASTn kereséssel 89%-os nt szekvencia azonosságot találtunk a turkey/M176/2011/HUN 543-579 nt-ja és a *Cardiovírus* nemzetségbe tartozó encephalomyocarditis vírus (EMCV; HM641897) IRES J doménjének apikális régiója között (46. ábra). Ennek és a felrajzolt másodlagos szerkezet alapján (46. ábra) a turkey/M176/2011/HUN potenciálisan II-es típusú IRES-sel rendelkezhet. Ez a fajta IRES 5 központi doménnel (H-tól L-ig) és több konzervatív nt motívummal rendelkezik, melyek a vírusban felismerhetőek (46. ábra). Az EMCV vírussal analóg nukleotid sorrend és szerkezet miatt a J domén és a p(Y) tract-binding protein (PTB), valamint a J/K domének és az eIF4G és eIF4A iniciációs faktorok között vírusban is létrejöhet a kapcsolat (46. ábra). Ugyanakkor különbség a két vírus IRES-e között az L domén és a polypyrimidine traktus egymáshoz viszonyított sorrendje és többek mellett az, hogy 6-nál több cytozin (C) nukleotid a turkey/M176/2011/HUN 5’UTR szekvenciájában nem található.



46. ábra. A turkey/M176/2011/HUN (JQ691613) vírusgenom 5'UTR IRES részének lehetséges másodlagos RNS szerkezete Mfold program és a meglévő ismeretek figyelembe vételével, szabadkézi módosítással. II-es típusú IRES-re emlékeztető szerkezet más II-es típusú IRES-sel rendelkező vírusok körében ismertek figyelembe vételével készült. Egy II-es típusú IRES teljes 5'UTR és IRES másodlagos szerkezete (az A-tól a L-ig jelzett doménekkel) a keretezett sematikus ábrán belül látható. A turkey/M176/2011/HUN IRES centrális doménjei H-tól L-ig vannak jelölve, megtartva a nomenklatúrát. A konzervatív II-es típusú IRES struktúrák és a polyprotein start kodon (ATG) szürke alapszínben van jelölve. A százalékos nukleotid hasonlóság a J domén csúcsi részén látható az EMCV (encephalomyocarditis vírus; *Cardiovírus* nemzetség) vírussal összevetve. Az EMCV vírus analógiája alapján a J doménhez potenciálisan kötődő PTB fehérje (=p(Y) tract-binding protein) kötődési helye fehér nyíllal jelölve látható.

A turkey/M176/2011/HUN 3’UTR régiója 310 nt hosszúságú, mely közel egyezik (309 nt és 311 nt) az Egyesült Államokban kimutatott chicken „gallivírus” (CHK1/USA/2010; JF424824) és turkey „gallivírus” (TRK90/USA/2010; JF424829) megfelelő szekvenciáival. A nt azonosság ez utóbbi két vírus 3’UTR-jéhez 73% és 96%. A 3’UTR másodlagos RNS szerkezete többszörös összekapcsolódásokat jelez, köztük egy 48 nt hosszú „súlyzó-szerű” struktúrát, melynek csúcsi része egy rövid polypyrimidine motívumot tartalmaz (47. ábra). A „súlyzó-szerű” struktúra, meglepetésre, két további picornavírus nemzetség (*Avihepatovírus* és *Kobuvírus*) tagjai körében is felismerhető, igaz, a 3’UTR különböző nukleotid pozícióiban.



47. ábra. A 3’UTR konzervatív nukleotid motívumainak elemzése: A 3’UTR lehetséges másodlagos szerkezete a) A turkey/M176/2011/HUN (JQ691613) és c) *Avihepatovírus* (duck hepatitis A vírus; DHAV-1; DQ249299) és *Kobuvírus* (Aichi vírus; AiV; FJ890523) nemzetség egy-egy tagja esetén. A pontozott terület a három vírusban hasonló „súlyzó-szerű” másodlagos szerkezetbe elrendeződő konzervatív nukleotidokat jelöli, mely nukleotidok illesztése a d) ábrán látható további hasonló motívumokat mutató vírusokkal együtt. A b) ábra a turkey/M176/2011/HUN vírus „súlyzó-szerű” részének felnagyított másodlagos szerkezetét ábrázolja. A szürke alapszínnel jelölt nukleotidok a három vírusban egyeznek. Rövidítések: MoKV: mouse kobuvírus (JF755427); CaKV: canine kobuvírus (JN088541); TuGV: turkey „gallivírus” (JF424829); ChGV: chicken „gallivírus” (JF424824). A 3’UTR számozásai a kódoló régió stop kodonjaitól kezdődnek.

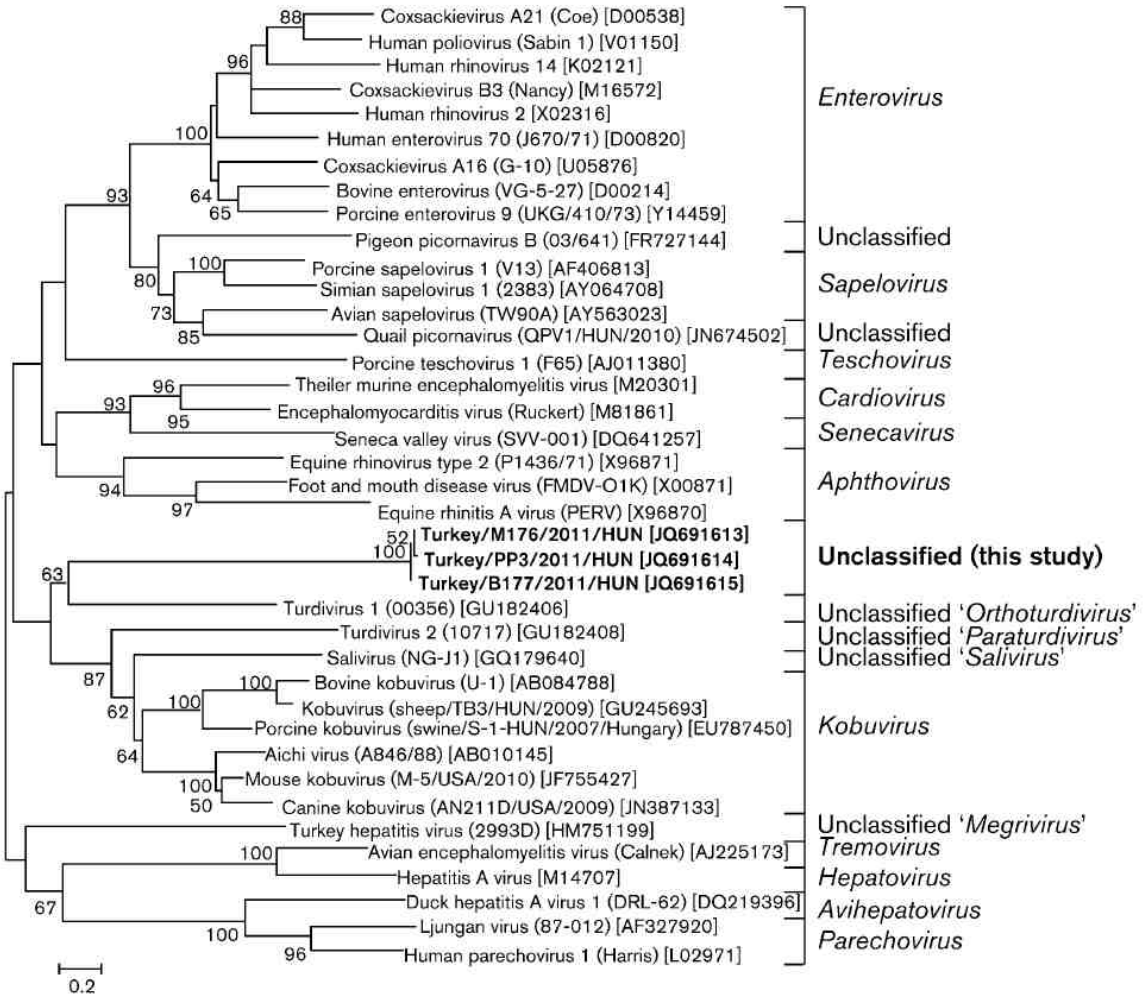
A turkey (pulyka) picornavírus teljes VP1 régióját befogó specifikus primerpárral, egészséges és különböző kórképekben szenvedő pulykáktól származó féceszeket vizsgáltunk további 7 farmról (9. táblázat). Mind a 7 farmról ki lehetett mutatni a turkey picornavírust, a 10 fécesz mintából 8 minta bizonyult RT-PCR pozitívnak. A nemesbődi telepen a mintavétel 1-1 hét különbséggel történt ugyanattól a pulykától. A 7 napos egészséges állat fécesze még RT-PCR negatív volt, de a 2. és 3. héten már a vírus kimutatható volt a féceszben (9. táblázat).

Farm location	Sample ID	Age (days)	Symptoms	Routine diagnostic tests*	VP1 RT-PCR†	GenBank accession no.
Bogyiszló	B-177	8	Catarrhal enteritis, foamy/watery caecum content	par, − bact, −	Positive	JQ691615
	B-415	14	Rickets	par, − bact, −	Positive	
Szalánta	B-195	7	Catarrhal enteritis, foamy/watery caecum content	par, − bact, −	Negative	
Karakószörcsök	B-232	21	Growth depression	par, − bact, −	Positive	
Nagyalásony	B-308	47	Growth depression, skeletal disorders	par, − bact, −	Positive	
Bakonypölöske	B-356	14	Uneven growth, catarrhal enteritis, foamy/watery caecum content	par, − bact, + (*E. coli* bacteraemia)	Positive	
Bikal	B-407	42	Skeletal disorders	par, − bact, −	Positive	
Nemesbőd	PP-1	7	Healthy	None	Negative	
	PP-2	14	Healthy	None	Positive	
	PP-3	21	Healthy	None	Positive	JQ691614
Bögöte	M176	20	Growth depression	par, − bact, −	Positive	JQ691613§

*par, Pathogen parasite diagnostics based on microscopic observation using native faecal samples; bact, routine bacterial culture of heart blood, and liver or bone marrow.
†For the primer sequences, see Table S1 (available in JGV Online).
§Complete genome.

9. táblázat. Epidemiológiai, klinikai jellegzetességek és a vizsgálatok eredményei a 8 hazai pulykafarmról származó pulykák körében.

A picornavírusok különböző régióinak aa sorrendje alapján készített filogenetikai elemzések (P1, P2 és P3) a turkey/M176/2011/HUN picornavírust konzekvensen a turdivírus 1 távoli, de legközelebbi ismert rokonának ábrázolják (ábra nélkül). A VP1 régió alapján készült filogenetikai elemzés ezt (18% aa azonosság), és a további hazai pulyka farmokról származó hazai pulyka picornavírusok közeli rokonságát (95-96% nt és 98% aa hasonlóság) ábrázolja (48. ábra).



48. ábra. A turkey (pulyka) picornavírus (turkey/M176/2011/HUN; JQ691613) és a *Picornaviridae* család reprezentatív tagjainak a VP1 kapszid fehérjéi alapján készített filogenetikai elemzése (neighbor-joining módszer, Jones-Taylor-Thornton model, N=1000 ismétlés, MEGA5 program).

„Hunnivírus” nemzetség

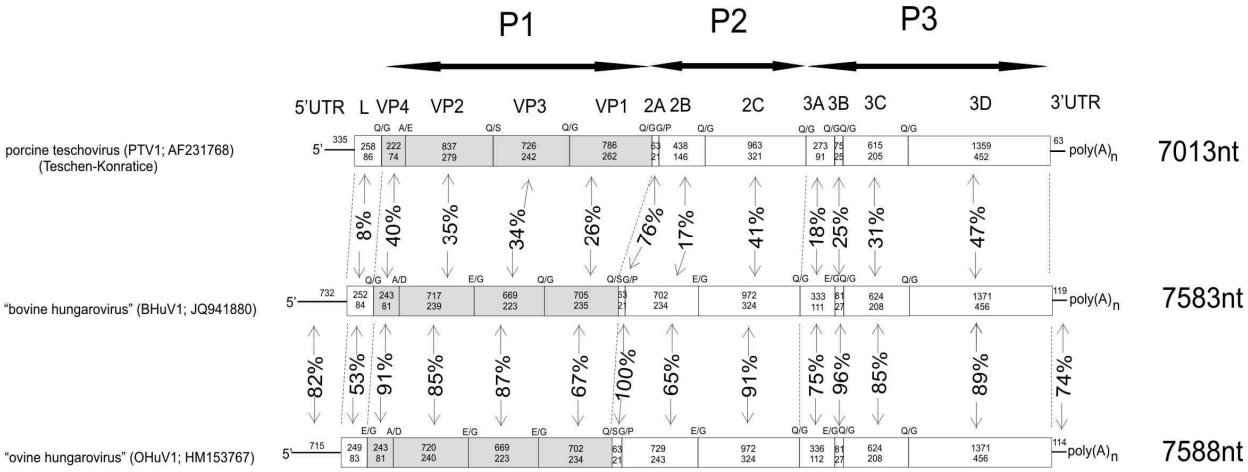
Bovine (szarvasmarha) hungarovírus és ovine (juh) hungarovírus

Az általunk tervezett „univerzális” kobuvírus primereket (UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F) használva, a quail (fürj) picornavírus kimutatása mellett, újabb, eddig ismeretlen, de egymással rokon picornavírusokat sikerült azonosítani az eredetileg kobuvírusok kimutatása érdekében összegyűjtött szarvasmarha és juh fécesz mintákban. (2008. februárban 26 fécesz mintát gyűjtöttünk egy közép-magyarországi szarvasmarha telepen (Aba) elsősorban 20 napnál fiatalabb, egészséges szarvasmarha (*Bos taurus*) egyedektől. A telep átlagosan 870

állatot számlál. 2009. márciusban és 2010. áprilisban 8-8 fécesz mintát gyűjtöttünk 3 hétnél fiatalabb, egészséges juhoktól (*Ovis aries*) egy 400 állatot számláló közép-magyarországi (Tárnok) telepről. A farmon hazai „merino ewes” állatokat kereszteztek Németországból származó feketefejű hús-kosokkal.)

E primereket használva a bovine (szarvasmarha) és ovine (juh) kobuvírus mellett a kobuvírusra jellemző méretű (216 nt) erős PCR-terméket kaptunk RT-PCR módszerrel, mely terméket megszekvenálva azonban az nem kobuvírus szekvenciákat takart. A 26 szarvasmarha mintából 1-ben (4%), a kapott szekvencia 54%-os aminosav azonosságot mutatott a porcine teschovírus (genus *Teschovírus*) 7-es típusának (PTV-7; AF296092) 3D régiójával a GenBankban. A vírusgenom – melyet eredetileg bovine (szarvasmarha) hungarovírusnak, BHuV1/2008/HUN (JQ941880) neveztünk el - teljes szekvenciája 7583 nt a poly(A) vég nélkül. A kódoló régió 6732 nt, mely egy 2243 aa hosszú polyproteint kódol (49. ábra). Az 5’UTR 732 nt a 3’UTR 119 nt hosszú. Az L-protein 252 nt (84 aa) hosszúságú. A teljes P1 (2334 nt; 778 aa), P2 (1737 nt; 579 aa) és P3 (2409 nt; 802 aa) régiók aminosav azonossága 30%, 32% és 38% a porcine teschovírus 1-es típusával (PTV-1; Teschen-Konratice; AF231768) összehasonlítva (10. táblázat). Az egyes régiók egymás közötti részletes aminosav azonossága a 10. ábrán látható. A mintákból PTV-t nem, de a specifikus hungarovírus szűrő primerrel, a 26 szarvasmarha fécesz minta közül összesen 4-ből (15%) lehetett a hungarovírust kimutatni.

A juh fécesz minták közül 6 (75%), illetve 2 (25%) esetben kaptunk kobuvírusra jellemző hosszúságú (216 nt) PCR-terméket a 2009-es, illetve a 2010-es évi mintagyűjtésből a farmon. Szekvenálást követően 7 PCR-termék kobuvírus szekvenciát mutatott (Lásd: Ovine kobuvírus fejezetet), ugyanakkor az egyik kobuvírusra nem, de aminosav sorrendben 85%-os azonosságot mutatott a bovine hungarovírus (BHuV1/2008/HUN) 3D régiójával. Az ovine (juh) hungarovírusnak (OHuV1/2009/HUN; (HM153767) elnevezett vírusszekvencia teljes



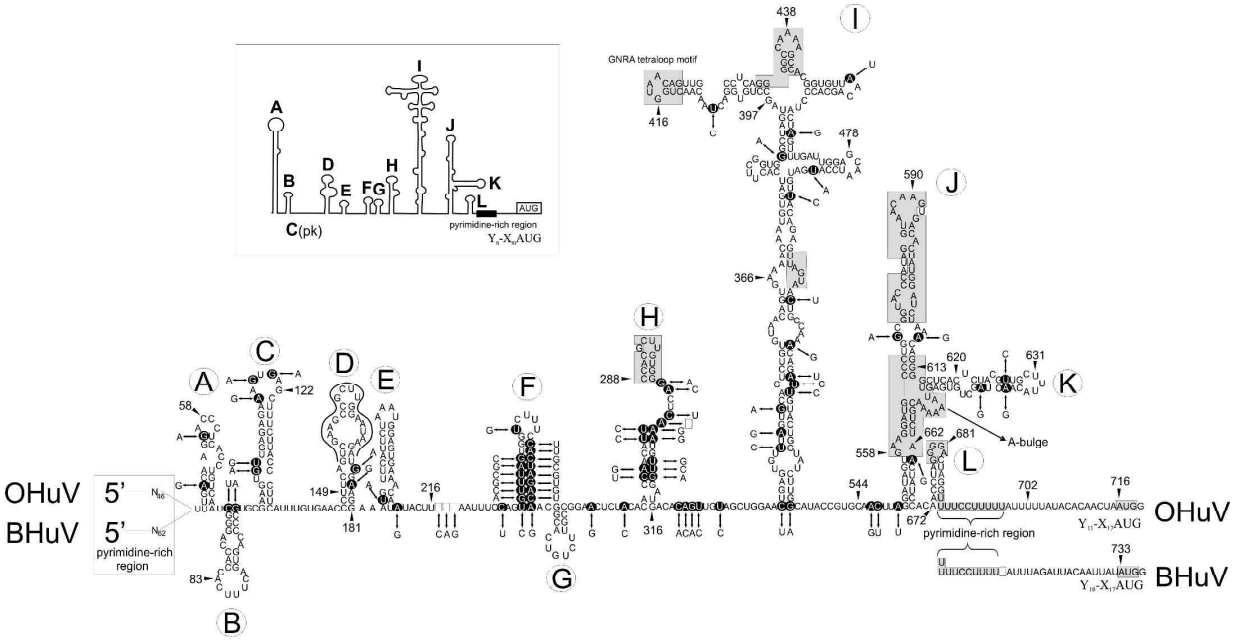
49. ábra. A bovine (szarvasmarha) hungarovírus (BHuV1; JQ941880) és az ovine (juh) hungarovírus (OHuV1; HM153767) genomszerveződése, a legközelebbi rokon, a porcine (sertés) teschovírussal (PTV-1; AF231768) összehasonlítva. A P1 (szürke színnel jelölve) a strukturális proteineket (VP4-VP2-VP3-VP1), a P2 és a P3 a nem strukturális fehérjéket jelöli. Az egyes gének nukleotid (felső szám) és az aminosav (alsó szám) hosszúsága a génboxokon belül vannak jelölve. Az egyes génrégiók egymáshoz való %-os aminosav (az 5' és 3' UTR esetén %-os nukleotid) hasonlósága a vírusok között látható. A polyprotein lehetséges vágási helyei (NetPicoRNA program) a gének határai felett olvashatók.

		Genome features			Pairwise amino acid identity (%)[a]									
					BHuV-1					OHuV-1				
Picornavirus genus	Virus (type) name	Accession no.	Size (nt)	G+C (%)	P1	P2	P3	$3C^{pro}$	$3D^{pol}$	P1	P2	P3	$3C^{pro}$	$3D^{pol}$
Aphthovirus	Foot-and-mouth disease virus C	NC_002554	8,115	54	21	24	23	20	36	21	24	23	19	35
Avihepatovirus	Duck hepatitis A virus 1	NC_008250	7,687	43	12	11	17	13	20	11	10	17	15	20
Cardiovirus	Encephalomyocarditis virus 1	NC_001479	7,835	49	23	17	29	29	37	22	18	30	29	38
Enterovirus	Human enterovirus C PV-1	NC_002058	7,440	46	16	14	22	17	29	16	15	22	17	30
Erbovirus	Equine rhinitis B virus 2	NC_003077	8,821	50	24	22	25	14	39	24	21	25	13	39
Hepatovirus	Hepatitis A virus 1	NC_001489	7,478	38	12	11	16	14	21	11	11	16	13	20
Kobuvirus	Aichi virus 1	NC_001918	8,251	59	16	13	21	13	28	16	14	20	14	28
Parechovirus	Human parechovirus 2	NC_001897	7,348	39	13	13	15	9	20	13	12	15	9	20
Sapelovirus	Porcine sapelovirus 1	NC_003987	7,491	41	18	13	24	13	32	17	13	24	14	32
Senecavirus	Seneca valley virus 1	NC_011349	7,310	51	22	20	28	23	37	22	21	27	21	36
Teschovirus	Porcine teschovirus 1	NC_003985	7,117	45	**31**	**32**	**38**	**31**	**47**	**31**	**33**	**37**	**30**	**46**
Tremovirus	Avian encephalomyelitis virus 1	NC_003990	7,055	45	13	12	16	11	20	13	13	15	12	19
Unclassified	Bovine hungarovirus 1	JQ941880	7,583	46						**81**	**81**	**86**	**85**	**89**
Unclassified	Ovine hungarovirus 1	HM153767	7,588	46	**81**	**81**	**86**	**85**	**89**					

10. táblázat. A bovine (szarvasmarha) hungarovírus (BHuV1; JQ941880) és az ovine (juh) hungarovírus (OHuV1; HM153767) genomjellegzetességei és összehasonlító szekvencia elemzése a jelenleg elfogadott picornavírus nemzetségek prototípus vírusaival. A vastagon szedett számok a legmagasabb %-os aminosav azonosságot jelölik.

nukleotid hossza 7588 nt a poly(A) vég nélkül, mely a bovine hungarovírushoz hasonló genomszerkezettel jellemezhető (49. ábra). Az ORF 6759 nt hosszú, mely egy 2252 aa hosszú polyproteint kódol. Az 5'UTR 716 nt, a 3'UTR 114 nt hosszúságú. Az L-protein 249 nt (83 aa). A teljes P1 (2334 nt; 778 aa), P2 (1764 nt; 588 aa) és P3 (2412 nt; 803 aa) régiók aminosav azonossága 81%, 81% és 86% a bovine hungarovírushoz hasonlítva (10. táblázat). A BHuV1 és az OHuV1 VP1 kapszid fehérjéi között az azonosság 67%. Az egyes régiók egymás közötti részletes aminosav azonossága a 10. ábrán látható. A mintákból PTV-t nem, de specifikus hungarovírus szűrő primerrel, a 16 birka fécesz mintából összesen 4-ből (25%) lehetett a hungarovírust kimutatni.

A BHuV1 és az OHuV1 5'UTR 732 nt és 715 nt hosszúságú, rokon másodlagos RNS szerkezettel (50. ábra). Az iniciációs kodonok közel optimális Kozák-kontextusban (A/GNNAUGG; Kozak, 1987) helyezkednek el: UAUAUGG (BHuV1), illetve CUAAUGG (OHuV1). Az AUG start kodont mindkét vírus esetében jelentős hosszúságú polypyrimidin szekvencia előzi meg (50. ábra). Az Y_n-X_m-AUG formula, mely a pyrimidine traktus nt hosszát/az összekötő szekvencia nt hosszát/AUG iniciációs kodont foglalja magába, a BHuV1 esetén Y_{10}-X_{17}-AUG, az OHuV1 esetén Y_{11}-X_{17}-AUG (50. ábra). A GenBankban való keresés során maximálisan 69% nt szekvencia-azonosságot találtunk a hungarovírusok 5'UTR 3' vége (BHuV1: 415 nt és 732 nt között; OHuV1: 397 nt és 715 nt között) és a humán parechovírusok (HPeV; *Parechovírus* nemzetség) II-es típusú IRES-ének, I-J-K-L doménjei között. A leghosszabb és legjobb nukleotid egyezés az OHuV1 és a humán parechovírusok 3-as (HPeV3, GQ183027) típusa között van. A legnagyobb nt egyezés (78%) a humán parechovírus IRES-ek J doménje és az OHuV1 558 és 662 nukleotidja között található (a BHuV1 esetén 576 és 620 nt) (50. ábra). Az OHuV1 558-620 (J domén), 559-613 (J domén), 559-613 (J domén) és 672-702 (L domén+3'pyrimidin gazdag régió) nukleotidszakaszai 84%, 84%, 86% és 100% nukleotid azonosságot mutatnak a Ljungan vírus 1 (EF202833), a foot-



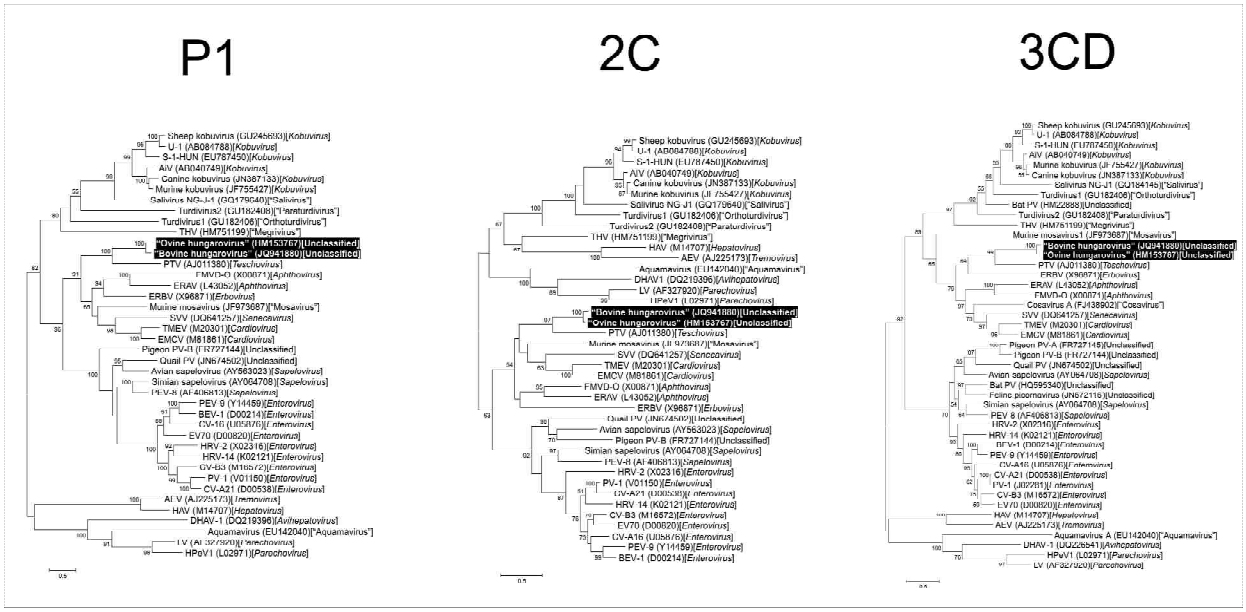
50. ábra. A bovine (szarvasmarha) hungarovírus (BHuV1; JQ941880) és az ovine (juh) hungarovírus (OHuV1; HM153767) 5'UTR és IRES szekvenciájának lehetséges másodlagos RNS szerkezete (Mfold program és manuális kiigazítás). Az egyező alapstruktúra összehasonlíthatósága érdekében az OHuV1 szekvenciáját a BHuV1 nukleotid szekvenciájával van felülírva, jelezve, hogy a komplementer nukleotid cserék csak a szekvencia sorrendjét változtatják, de a struktúrát nem. A nukleotid különbségek helyei kettős nyíllal vannak jelölve az OHuV1 (fekete alapon fehér betűk) és a BHuV1 között. A pyrimidine gazdag régiók az extrém 5' végen és az Y_n-X_n-AUG motívum (=a pyrimidine traktus nt hossza/az összekötő szekvencia nt hossza/AUG iniciációs kódon) a 3' végen mindkét hungarovírus esetén külön láthatók. A nukleotid deléciók/inzerciók üres négyzettel jelöltek. Az 5'UTR-ek, a domének (A-tól L-ig) és a II-es típusú IRES szerkezetének felrajzolása a humán parechovírusok 5'UTR szerkezetének figyelembe vételével történt (lásd sematikus ábrasziget; Ghazi et al., 1998). A II-es típusú IRES központi 5 doménje – a nomenklatúrát megtartva – H-tól L-ig van jelölve. A konzervatív II-es típusú IRES motívumok helyei, a humán parechovírusokhoz különösen hasonlító nukleotid szakaszok az IRES H, I, J és L doménjeiben, a pyrimidine gazdag régiók a 3' végen, valamint a valószínű AUG start kodon szürke alapszínnel láthatóak. A D domén körül látható folyamatos fekete vonal azt a 22 nukleotidot jelzi, mely teljesen megegyezik a hungarovírusok és a Ljungan vírus 4-es típusa (EU854568) között.

mouth disease vírus SAT 1 (FMDV, HM067706), a bovine rhinitis A vírus 2 (JN936206) és a humán cosavírus B1 (FJ438907) szakaszaival. A hungarovírusok D doménjének csúcsi 22 nukleotidja 100%-ban egyezik a Ljungan vírus 4-es típusának 2-23 nukleotidjaival (50. ábra). Ezek, és az 5'UTR felrajzolható RNS másodlagos szerkezete alapján a hungarovírusok II-es típusú IRES-sel rendelkeznek, melyek lehetséges részletes szerkezete az 50. ábrán látható. A

két hungarovírus 5'UTR egymással 82%-os nt azonosságot mutat, de a nukleotid eltérések/mutációk döntő többsége komplementer bázispárcsere (Watson-Crick és „wobble"), és így az RNS másodlagos szerkezete a két genomban megtartott (50. ábra). Az 5'UTR extrém 5' vége (OHuV1: 1-46 nt; BHuV1: 1-62 nt) ugyancsak pyrimidine gazdag, de másodlagos RNS szerkezettel nem jellemezhető. A 3'UTR 119 nt és 114 nt hosszú, mely egymáshoz 74% nt azonosságot mutat. Többszörös másodlagos RNS szerkezete van, hosszú kettősláncú hajtűvel (ábra nélkül). A hungarovírusok 3'UTR-jéhez hasonló nukleotidszekvencia a GenBankban nem található.

A két hungarovírus genom közel egyenlő hosszúságú, a G+C tartalom mindkét esetben 46% (10. táblázat). A polyprotein hasítási helyek - az L/VP4 és a VP3/VP1 határokon kívül – a két vírusban megegyeznek (10. ábra). 1%-nál nagyobb nt szekvencia hosszúság eltérés az 5'UTR (2,3%), az L-protein (1,2%), a 2B (3,7%) és a 3'UTR (4,2%) régiókban található (49. ábra). A két hungarovírus proteinjei közül a legnagyobb különbség az L-proteinben (53%-os hasonlóság) van; a 2A protein viszont azonos (49. ábra). A hungarovírusok polyproteinjének fehérjéi a legnagyobb azonosságot a porcine teschovírusok megfelelő fehérjéivel mutatnak (10. táblázat), kivétel a 2A régió, mely 90%-os azonosságot mutat az *Erbovírus* nemzetségbe tartozó equine (ló) rhinitis B vírus 1-hez (NC_003983). Ugyanakkor, az aminosav azonosság az egyes P régiókban 40% alatti a hungarovírus és a prototípus picornavírusok között (10. táblázat). Az 51. ábra a hungarovírusok és a reprezentatív picornavírusok P1, 2C és 3CD régióinak aminosav sorrendje alapján készített filogenetikai elemzését mutatja (51. ábra).

Sem cytopathiás elváltozást, sem a hungarovírus RNS replikációját nem lehetett megfigyelni, illetve kimutatni a bovine hungarovírus és az ovine hungarovírus Vero sejtenyészetében megkísérelt tenyésztésével és továbboltásával.



51. ábra. A bovine (szarvasmarha) hungarovírus (BHuV1; JQ941880) és az ovine (juh) hungarovírus (OHuV1; HM153767) - mindkettő fekete alapon fehér betűkkel kiemelve - filogenetikai elemzése a P1, 2C és 3CD régiók aminosav sorrendje alapján a reprezentatív picornavírusok körében (Maximum-likelihood módszer, WAG szubsztitúciós modell, N=1000 ismétlés, MEGA5)

HEPEVIRIDAE

A hepatitis E vírust (HEV) Balayan és munkatársai fedezték fel immun-elektronmikroszkópos vizsgálattal, ismeretlen eredetű májgyulladásban szenvedő beteg székletmintájával mesterségesen fertőzött önkéntesek székletéből 1983-ban, Üzbegisztánban (Balayan et al., 1983). Reyes és munkatársai kezdték el a HEV genetikai állományának leírását 1990-ben (Reyes et al., 1990). A HEV a heveny májgyulladások (hepatitis) egyik leggyakoribb oka, amely jellegzetesen vízjárványok formájában jelentkezik a tradícionálisan ismert endémiás vidékeken Ázsiában, Afrikában és Latin Amerikában (Purcell et al., 2001; Schlauder et al., 2003). Észak-Amerikát és Európát a HEV-fertőzés szempontjából nem endémiás területeknek tartották - itt a fertőzéseket behurcolt eredetűnek tekintették - annak ellenére, hogy a szeroprevalencia 1-26% között változott (Meng et al., 2002; Withers et al., 2002; Widdowson et al., 2003). A molekuláris genetikai vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy az Európában kimutatható vírusok jelentősen eltérnek a tradícionális endémiás területeken cirkuláló HEV-októl (Schlauder et al., 1999; Schlauder et al., 2003). Áttörést jelentett, hogy a HEV-t 1997-ben sertésekből is azonosították, mely genetikailag nagy hasonlóságot mutatott az emberi HEV-okhoz (Meng et al., 1997). Mindezek megalapozták azt az ezredfordulóra kialakult nézetet, hogy a sertések az emberi HEV-fertőzések rezervoárjai lehetnek, és valójában a mérsékelt égövön az emberi HEV fertőzések zoonózisok (van der Poel et al., 2001; Yazaki et al., 2003; Mansuy et al., 2004).

A HEV kisméretű, burok nélküli vírus, mely pozitív, egyszálú kb. 7200 nukleotid hosszú RNS genomot tartalmaz (1. ábra) három nyílt leolvasó kerettel (ORF): az ORF2 a virális kapszidot kódolja. A HEV 2004 óta egy új család, a *Hepeviridae* család tagja (korábban a *Caliciviridae* családba sorolták őket), mely jelenleg két nemzetséget, a *Hepevírus* nemzetséget, a hepatitis E vírussal, mint vírusfaj (és egy nem megnevezett nemzetséget, mely egy madár eredetű hepatitis E vírusfajt tartalmaz) fog össze. A HEV-nak négy (1-4)

genotípusa ismert, mely számos szubtípusra oszlik (Emerson et al., 2004; Lu et al., 2006). A tradicionálisan endémiás vidékeken az emberi fertőzéseket az 1-es és a 2-es genotípusú vírusok okozzák. Ezzel ellentétben, a fejlett országokban a szórványos (nem importált), helyi fertőzésekből a 3-as (Ázsiában kisebb részben még a 4-es) genotípusú vírust lehet kimutatni, mely a sertésekben is jelen van (Lu et al., 2006).

A hepatitis E vírus emberben és állatokban (sertés, szarvasmarha, vaddisznó és őz) hazánkban

Vizsgálatainkkal a HEV hazai közvetlen kimutatására, genetikai elemzésére, molekuláris epidemiológiai vizsgálatára vállalkoztunk a vírus jelentőségének és zoonótikus hátterének feltérképezése érdekében. **Humán minták:** A klinikailag fertőző hepatitisben (emelkedett májenzimértékek: AST, ALT és sárgaság) szenvedő betegek szérum mintáiból (egy minta/beteg) a hepatitis E fertőzés laboratóriumi diagnosztikája ELISA módszerrel történt: HEV IgM (HEV IgM, Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l., Italy) és teljes HEV ellenanyag (HEV Ab, Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l., Italy). A vizsgált hepatitises betegek a Szeged Megyei Jogú Város Önkormányzata Városi Kórháza, Infektológiai Osztályának betegei voltak (Dél-Alföld) 2001. január 1. és 2006. június 30. között. A gyógyszer, alkohol és metabolikus eredetű hepatitises betegek a vizsgálatban nem vettek részt. A betegek szérum mintának ELISA vizsgálatával a heveny HAV, HBV (HBsAg), HCV, EBV és CMV fertőzés kizárható volt. (Az ELISA vizsgálatok az ÁNTSZ Csongrád Megyei Intézete, Virológiai Laboratóriumában történtek, dr. Kátai Andrea). A HEV IgM-pozitív minták csak 2004-től voltak elérhetők a molekuláris vizsgálatokra. **Állatoktól származó minták:** 2005. február és 2006. május között fécesz, máj és bélmintákat gyűjtöttünk házi állatoktól (sertés és szarvasmarha) és poszt mortem fécesz, máj és bél mintákat vadászatokon elejtett vadon élő állatoktól (vaddisznó: *Sus scrofa* és őz: *Capreolus rufus*, *Capreolus capreolus*) a hivatalos állatorvosi szemlén országszerte. Az RNS izolálást

követően a HEV jelenlétét a mintákban az ORF2 kapszid régióra tervezett HEVORF2con-a1/HEVORF2con-s1 szűrőprimerekkel (Schlauder et al., 1999) RT-PCR módszerrel kerestük. (Az állati mintákból a HEV RT-PCR – a humán minták feldolgozásával egyező protokoll szerint - a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Mikrobiológiai Intézetében történt, dr. Forgách Petra.)

A hepatitis E vírus kimutatása és epidemiológiája emberben

A megvizsgált 1203 humán szérum mintából 116 (9,6%) esetén lehetett HEV IgM ellenanyagokat kimutatni (11. táblázat). A megvizsgált 933 szérumból 172 (18,4%) tartalmazott totál ellenanyagot HEV ellen (11. táblázat). Az IgM-pozitivitás aránya 8,4% és 13,2% között változott évente. Az IgM-pozitív minták átlagos optikai denzitása 4,05-ször (1,14-10,7) magasabb volt, mint az ELISA reakció „cut-off” értéke.

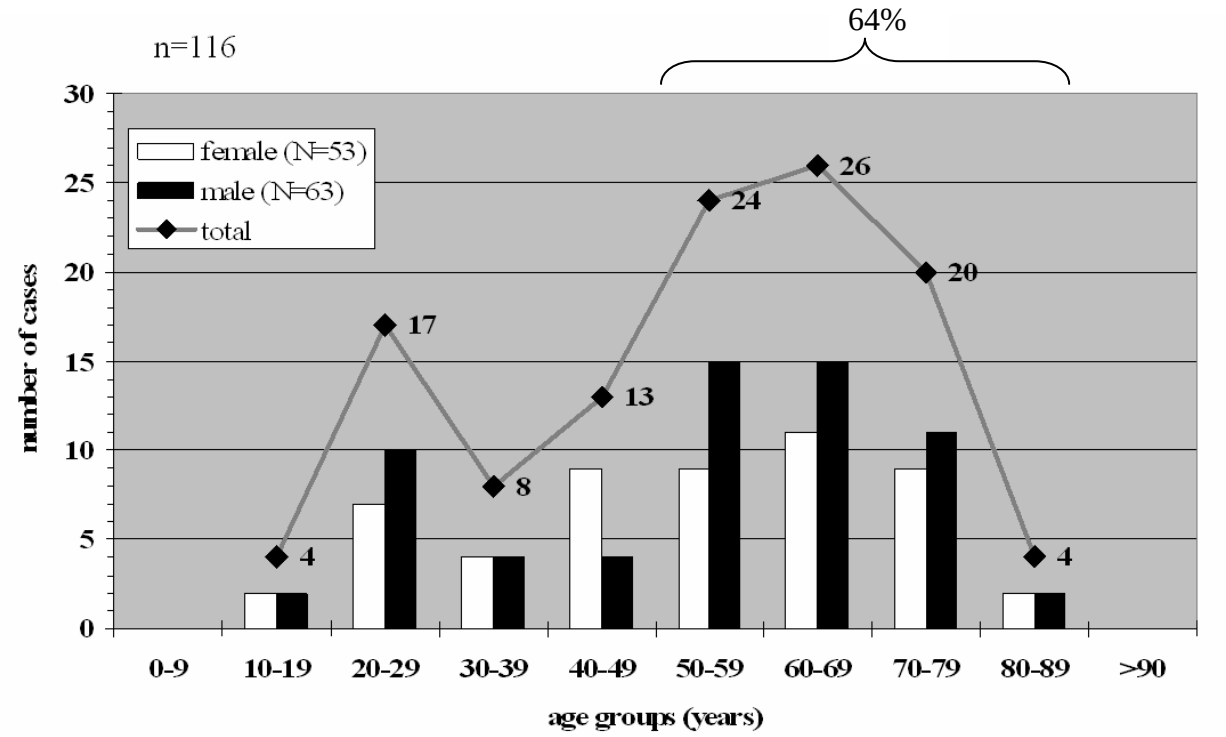
Év	Pozitív minták száma/vizsgált minták számaa (%) ELISA módszerrel (HEV)		HEV RT-PCR-pozitív/vizsgált HEV-IgM-pozitív minták (%)
	IgM	Totál Abb	
2001	3/35 (8,6%)	1/2 (50,0%)c	0/0
2002	25/188 (13,2%)	4/13 (30,7%)c	0/0
2003	28/293 (9,6%)	85/252 (33,7%)	0/0
2004	25/277 (9,0%)	36/260 (13,8%)	3/20 (15,0%)
2005	21/251 (8,4%)	27/248 (10,9%)	5/17 (29,4%)
2006 június	14/159 (8,8%)	19/158 (12,0%)	5/16 (31,3%)
Összesen	116/1203 (9,6%)	172/933 (18,4%)	13/53 (24,5%)

[a]Nem hepatitis A–C vírus okozta hepatitises betegekből.,
[b]Totál ellenanyag (IgM és IgG).
[c]A totál ellenanyag kimutatása ezekben az években nem volt rutinszerűen alkalmazott módszer.

11. táblázat. A hepatitis E vírus-fertőzés gyakorisága nem hepatitis A-C vírus okozta heveny hepatitisekben a Dél-Alföldön 2001. január és 2006. június között.

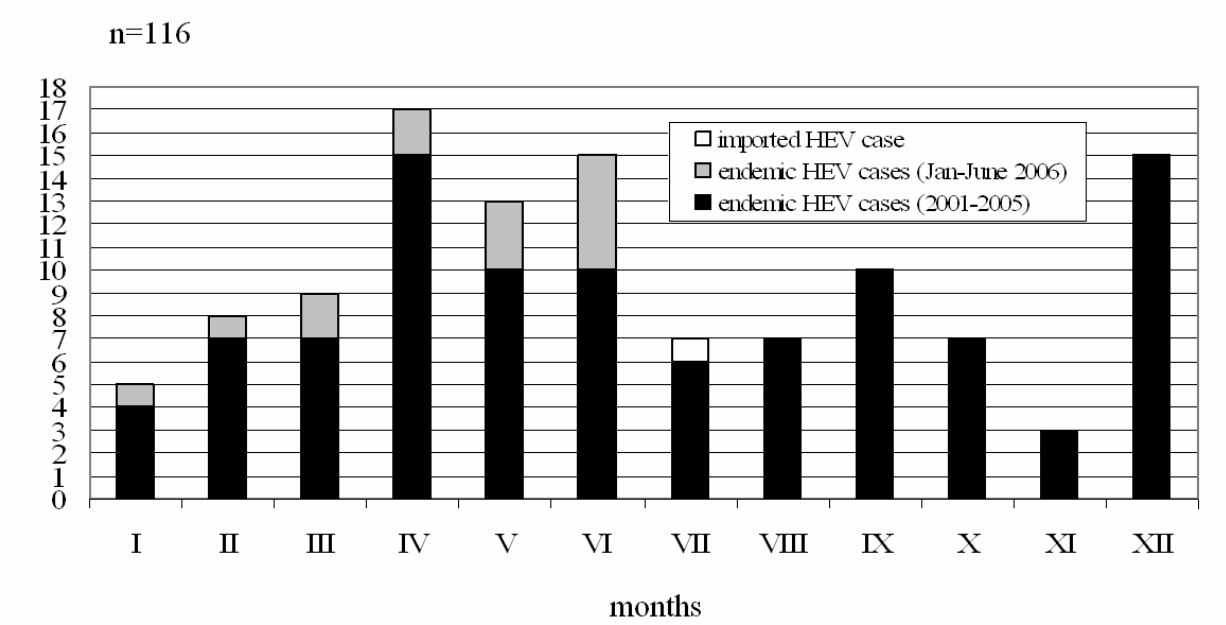
A 63 (54,3%) férfi és az 53 nő (45,7%) átlagéletkora 53 év (16-85 év) volt (52. ábra). Két életkori kiugrás figyelhető meg a 20-29 és az 50-69 éves korosztály körében. A 40-49 éves korcsoportban szignifikánsan (χ^2-teszt, $P \leq 0,05$) több nő, mint férfi, a 20-29, az 50-59 és a 60-69 éves korcsoportokban szignifikánsan (χ^2-teszt, $P \leq 0,05$) több férfi, mint nő szérum mintája tartalmazott HEV IgM ellenanyagokat. A fertőzések 82% és 64%-a 30, illetve 50 év felett történt. Hat HEV fertőzés családi volt (férj és feleség), amikor 7, 15 és 56 nap különb-

dc_704_13



52. ábra. Nemi és életkori jellegzetességek 116 HEV IgM-pozitív beteg (Dél-Alföld) esetében.

séggel jelentkeztek a klinikai tünetek a családtagokon. Egy 2006-ban Indiából importált eseten kívül senkinek az anamnézisében nem szerepelt külföldi utazás a lappangási időnek megfelelően. A HEV fertőzések az év minden hónapjában jelentkeztek, de két halmozódás volt megfigyelhető április-júniusban és decemberben (53. ábra).



53. ábra. A hepatitis E vírus IgM-pozitív esetek (Y tengely) kumulatív havi (X tengely) eloszlása 2001 és 2006 között a Dél-Alföldön.

Öt esetben történt külön retrospektív, személyes elbeszélgetés, ismételt anamnézis felvétel: házi disznóölésből származó hús és kolbászáru (4 eset), illetve egy esetben a részlegesen kisütött fiatal malac fogyasztása szerepelhetett a fertőzések forrásául. Az 53 megvizsgált HEV IgM-pozitív szérummintából, 13-ból (24,5%) a vírus közvetlenül is kimutatható volt RT-PCR módszerrel (11. táblázat). A HEV RT-PCR-pozitív minták optikai denzitása 5,05-ször (2,3-9,7) volt magasabb, mint az ELISA reakció „cut-off” értéke.

Az egyik beteg esetét külön is feldolgoztuk. A 60 éves férfi 2004. június 28.-án láz nélküli hányinger, gyengeség, sárgaság, sápadt arc és sötét vizelet tüneteivel jelentkezett kórházi felvételre. A tünetei 7 nappal korábban kezdődtek. Külföldön nem járt, de a 1 hónappal a tünetek jelentkezése előtt házi disznóölésből származó sertés hurkát evett. Emelkedett májenzimeket és bilirubin szintet lehetett a vérből kimutatni a kórházi ellátás első 9 napjáig (12. táblázat). ELISA módszerrel hepatitis A-B-C vírus-fertőzést nem lehetett igazolni, de a HEV elleni IgM és IgG ellenanyagok pozitívak voltak. A szérumból a HEV (HUN-E22; Hungary1; AY940427) RT-PCR módszerrel kimutatható volt. A kórházi kezelés 11 napig tartott: a 30. napon a májenzim-funkciók normálisak, a HEV IgM pedig negatív volt.

[a]	Day 1	Day 3	Day 5	Day 9	Day 30	Reference ranges
Bili (mmol/l)	84.3	59.4	25	18	nt	1.0–20.0
AST (IU/L)	440	320	120	39	nt	2–44
ALT (IU/L)	1502	996	373	120	79	2–50
ALP (IU/L)	952	872	511	330	nt	100–280
GGT (IU/L)	705	nt	339	199	nt	7–70
TLC (10^3 mm^{-3})	11.3	13.1	9.8	nt	nt	4.6–10.2

[a] Bili, serum total bilirubin; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyltransferase; TLC, total leukocyte count; nt, not tested.

12. táblázat. Biokémiai és hematológiai jellegzetességek a hepatitis E vírus-fertőzés alatt a 60 éves férfibeteg kórházi felvételét követően.

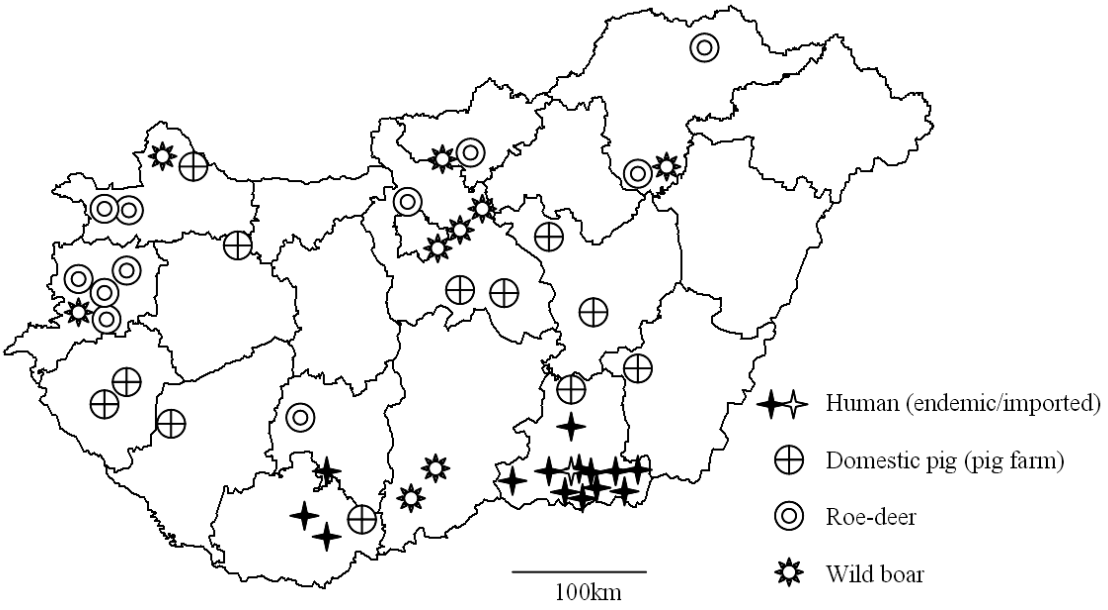
A HEV kimutatása és epidemiológiája állatokban

Összesen 321 mintát vizsgáltunk RT-PCR módszerrel 290 állattól: 154 házi sertés (3 hét és 40 hónap közötti életkorúak 30 sertés farmról), 32 őz, 74 vaddisznó és 30 szarvasmarha (13. táblázat). Összesen 62 (19%) minta mutatott RT-PCR-pozitivitást. Ezek közül 42 sertés

	Bélsár	Máj	Bélminta
Házisertés	30/132 (22,7%)	12/39 (30,8%)	0/4 (0%)
Őz	0/7 (0%)	11/32 (34,4%)	–
Vaddisznó	–	9/74 (12,2%)	0/1 (0%)
Szarvasmarha	0/30 (0%)	0/2 (0%)	–

13. táblázat. A hepatitis E vírus kimutatása RT-PCR módszerrel (pozitív/vizsgált, %) különböző állatfajokból származó mintákból (N=321).

(bélsár: 30/132; 22,7%; máj: 12/39; 30,8%) minta volt, mely 6 és 10 hetes (14-47kg) közötti életkorú állatoktól származott 12 (40%) sertés-farmról. A bélsár és a máj mintát 17 sertés esetén vizsgáltuk egyszerre; a minta-pár 10 (59%) állat esetében volt egyidejűleg RT-PCR-pozitív. A 32 őz mintából 11 (34,4%), a 74 vaddisznó mintából 9 (12,2%) máj esetében lehetett a vírust kimutatni. A szarvasmarha mintákból HEV nem volt kimutatható. Az 54. ábra az emberi és állati fertőzések földrajzi elhelyezkedését ábrázolja (54. ábra).



54. ábra. A hepatitis E vírusra RT-PCR-pozitív és szekvenálással megerősített dél-alföldi humán (N=13) és állati (sertés: sertésfarm; őz/szarvas; vaddisznó) esetek földrajzi eloszlása. (Az ábra további 2 HEV RT-PCR-pozitív humán esetet is jelöl a Dél-Dunántúlon.)

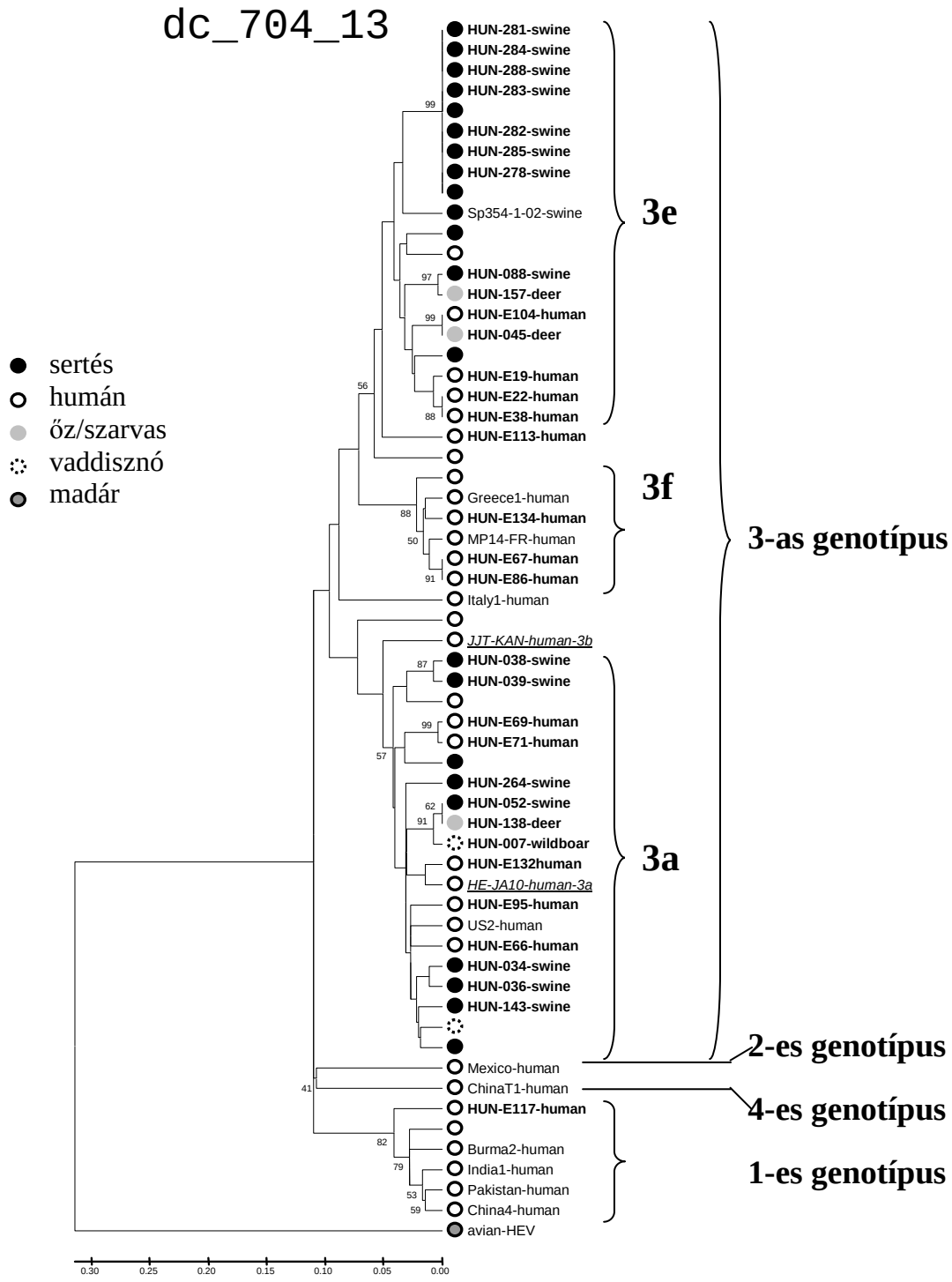
Szekvencia és filogenetikai elemzés

A PCR-termékek nukleotid sorrendjét 37 mintából határoztuk meg; 19 sertés bélsár vagy máj mintából, 3 őz máj mintából, 2 vaddisznó máj mintából és mind a 13 PCR-pozitív

humán szérum mintából. Az Indiából importált emberi 1-es genotípusú (HUN-E117) hepatitis E fertőzésen kívül minden HEV szekvencia a 3-as genotípusba tartozott (55. ábra).

Genetikailag azonos HEV szekvenciákat lehetett kimutatni 6 hónap különbséggel 2004-ben (HUN-E22/HUN-E38) és 15 nap különbséggel 2005. áprilisában (HUN-E67/HUN-E86) emberi fertőzésekből (55. ábra). A HUN-045 (őz) és HUN-E104 (humán) vírusok ugyancsak megegyeztek a vizsgált szakaszon: a telefoninterjú alapján vadhúsfogyasztás (őz) nem szerepelt az anamnézisben. Egy sertés farmon azonos vírus-szekvenciákat (HUN278-HUN290) lehetett kimutatni az állatokból.

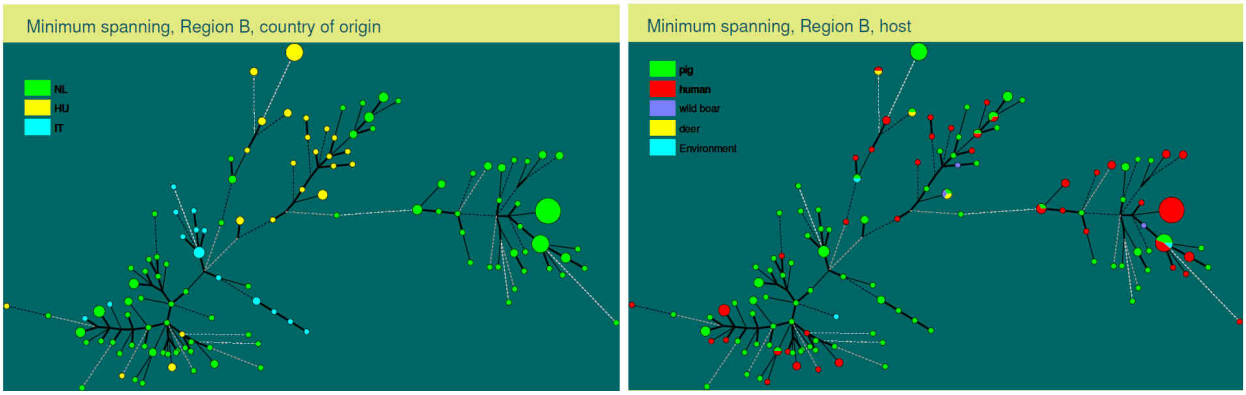
Az emberi fertőzésekből azonosított 3-as genotípusú, 3a, 3e és 3f szubtípusú HEV vírusok (N=12) 92-97% nukleotid azonosságot mutattak a legközelebbi HEV-hoz a GenBankban (55. ábra). Ugyanakkor, 7 (58%) humán vírus (HUN-E19/E22/E38/E69/E71/E104/E113) sertés HEV vírusokkal mutatott közeli rokonságot. Fordítva, a HUN-006/HUN-007 vaddisznóból származó vírusok és a HUN-034/HUN-038 sertés vírusok 95-97% nukleotid azonosságot mutattak az emberi HE-JA10 japán HEV vírussal. A HUN-072 sertés vírus azonossága a HUN-E22-höz 95%. A HUN-052, HUN-007 és a HUN-038 nukleotid azonossága 95% volt a HUN-E91 vírushoz hasonlítva. Egy egyedi, nukleotid mutációt (A→G csere a kódon második nukleotidjában az US1 vírus 6312. pozíciójában) találtunk, mely a vizsgált kapszid régióban eddig nem ismert aminosav (Glu→Arg) változással jár vaddisznó (HUN-006/HUN-007) és sertés (HUN-034/HUN-038) HEV esetén. A vaddisznókból kimutatott vírusok (HUN-006/HUN-007) közelebb (97-98%) állnak a sertésekből kimutatott HEV vírusokhoz, mint egymáshoz (92%) (55. ábra). A nukleotid azonosság a hosszabb ORF2 régiók (417 nt - 534 nt) esetében (HUN-E66/E67/E69/E71/E91/E95/E104/E113/E117) számszerűleg kisebbek (91-95%) a GenBankban található legközelebbi HEV vírusokhoz képest, mint a rövid, 148 nukleotid hosszúságú régiókban (92-98%).



55. ábra. A hepatitis E vírus 148 nt hosszú kapszid régiója alapján készített filogenetikai elemzés (Neighbor-joining módszer, MEGA5). A hazai vírus-szekvenciák „HUN” jelzéssel ellátva és vastagon szedve láthatóak. A prototípus és legközelebbi GenBank szekvenciák: US1 (AF060668), US2 (AF060669), Argentina2 (AF264012), Italy1 (AF110390), Greece1 (AF110391), Greece2 (AF110392), HE-JA10/JP (AB089824), MP14-FR (AY626042), Pakistan (M80581), China4 (D11093), Nepal (AF051830), India1 (X98292), Burma2 (D10330), Mexico (M74506), ChinaT1 (AJ272108), P354/1/02/UK (AF503511), P143/11/02/UK (AF503512), NLSW22 (AF336291) és avian-HEV (AY043166).

A hepatitis E vírusok molekuláris epidemiológiája Európában – a gazdaszervezet és a földrajzi eloszlás kapcsolata

Ha az egyes földrajzi vidékekről (országok: Hollandia, Olaszország és Magyarország) kimutatott HEV-okat szimultán, filogenetikai elemzéssel úgy hasonlítjuk össze, hogy milyen gazdaszervezetből történt az azonosításuk, akkor a HEV fajok közötti átvitel szempontjából fontos összefüggésre juthatunk (56. ábra). A filogenetikai elemzés szerint a HEV-ok földrajzi régionként (országonként) jól elkülöníthetőek; adott vidékről származó HEV-ok filogenetikailag közeli rokonságban állnak egymással, míg az izolálás eredete (gazdaszervezet) szerint ez az elkülönülés nem figyelhető meg. Azaz az elemzés arra utal, hogy a HEV-ok átlépik a faji határokat, és a HEV-ok genomja egy adott földrajzi régióra jellemző.



56. ábra. A hepatitis E vírus részleges ORF2 nukleotid régiója alapján készített filogenetikai elemzés, ahol a – két egyező ágrajzon - bal oldali ábrán a színes körök a HEV kimutatásának földrajzi helyeit (NL: Hollandia, HU: Magyarország, IT: Olaszország), a jobb oldali ábrán a gazdaszervezetet jelölik.

ASTROVIRIDAE

Amint láttuk, a norovírusok vezető kóroki szerepe a heveny, nem bakteriális gastroenteritis járványokban igazolható. E járványok kb. 10%-ban azonban az erőfeszítések ellenére sem sikerül norovírust kimutatni. A négy legfontosabb humán gastroenteritist okozó víruscsoport (calicivírus/norovírus, rotavírus, astrovírus és enterális adenovírus) közül, a calicivírusok/norovírusok mellett, az astrovírusok genomja pozitív, egyszálú RNS (1. ábra).

Humán astrovírus okozta gastroenteritis járvány

Egy komárom-esztergom megyei, napközi otthonos bölcsődében 29 exponált (24 gyermek, 5 felnőtt) közül 7 (24,1%) gyermek betegedett meg a hasmenéssel, egy esetben hányással is járó gastroenteritisben 2010. június 4-15. között. Bakteriális kórokozót, rotavírust, adenovírust, norovírust nem, de 3 (42,8%) gyermek székletmintájából, egymással megegyező, 1-es genotípusú „klasszikus” humán astrovírust sikerült specifikus astrovírus primerekkel multiplex RT-PCR módszerrel kimutatni (58. ábra). A vírus (Nyergesújfalu/ HUN4520/2010/HUN; HQ398856) teljes genomja 6816 nt hosszúságú. Az astrovírus-járvány forrása feltehetően az első beteg gyermek lehetett, a vírus pedig fekális-orális úton, közvetlen kontaktussal terjedhetett a közösségben.

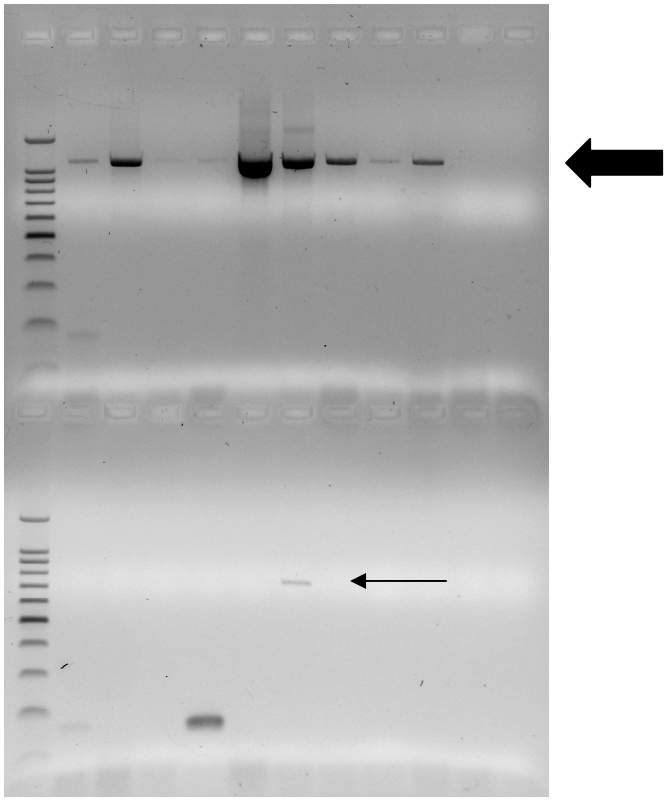
Új, állati eredetű astrovírus fajok

Egy esetben hagyományos RT-PCR reakció aspecifikus termékének szekvenálásával, két esetben pedig metagenomikai és pyroszekvenálás módszerekkel új astrovírus szekvenciákat sikerült azonosítani házi sertés (*Sus scrofa domestica*), juh (*Ovis aries*), illetve vaddisznó (*Sus scrofa*) bélsármintákból.

Porcine (sertés) astrovírus (PAstV4)

Morfológia jellegzetességek alapján a sertés astrovírus elektronmikroszkópos kimutatásáról 1980-ban számoltak be (Bridger, 1980), melyet 1990-ben izoláltak (Shimizu et al., 1990), majd 2001-ben, Japánban az ORF2 kapszid régió szekvenciáját (PAstV1, Y15938)

határozták meg (Jonassen et al., 2001). Egy, az előző astrovírussal genetikailag egyező, 2006-ban, Csehországban izolált és részlegesen (ORF2) meghatározott további sertés astrovírussal (Indik et al., 2006) együtt összesen 2 sertés astrovírus szekvencia volt ismert 2011-ig. A sertés sapovírusok keresése közben, a fentebb leírt, később a sertés kobuvírusnak bizonyult aspecifikus PCR-termékek mellett az egyik 3 hónapos sertés székletmintájából, egy további aspecifikus, de a „kobuvírusra jellemzőnél" rövidebb, ~720 bp méretű PCR-terméket is észleltünk a p289/p290 jelű humán calicivírus primerpár használata során (57. ábra).

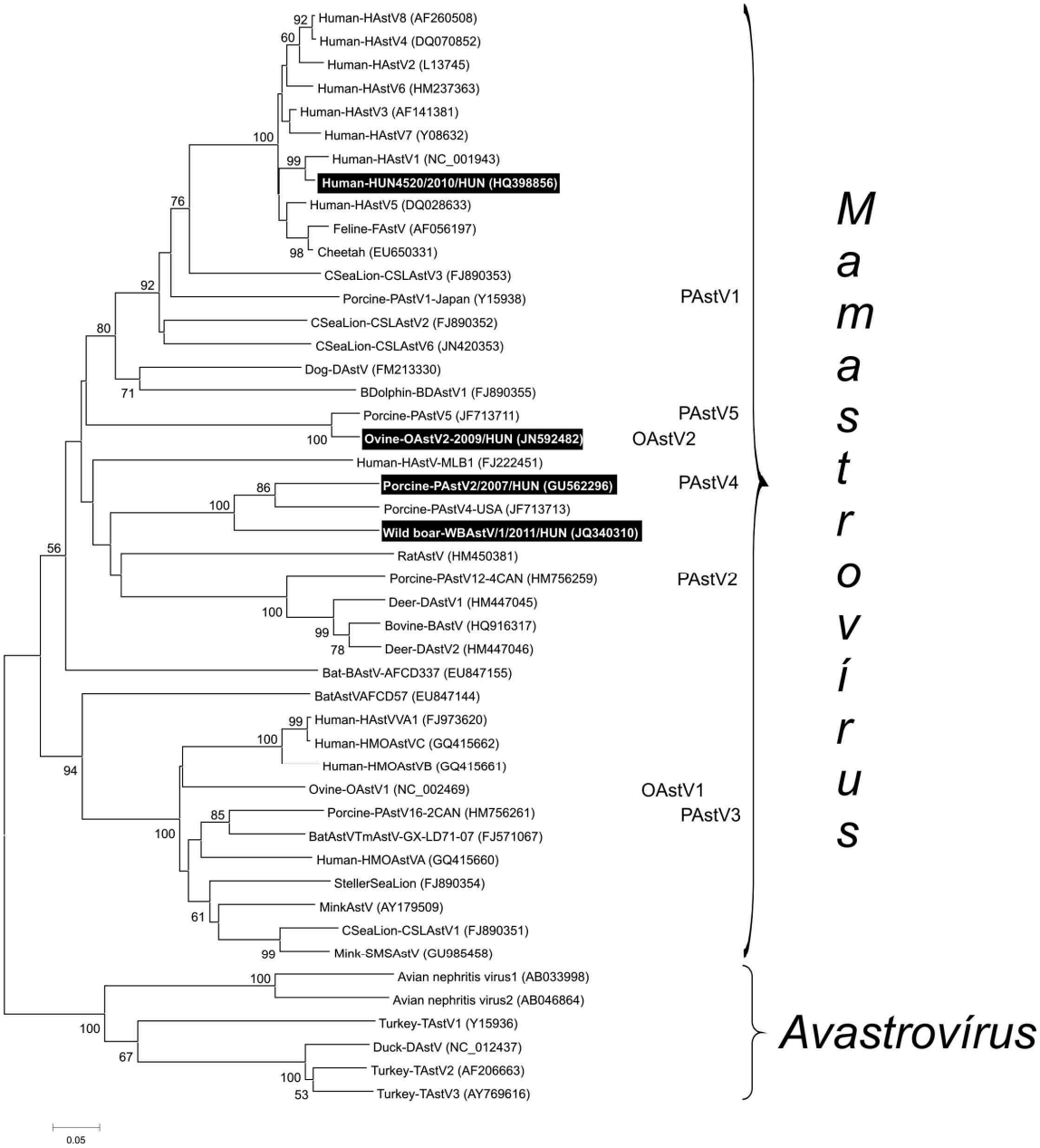


57. ábra. Aspecifikus PCR-termékek, ethidium-bromiddal festett negatív gélelektroforetikus képe a p289/p290 humán calicivírus primerpár használatával sertések bélsár mintáiból. A két soros futtató gélben, a felső sorban ~1100 bp hosszúságú sertés kobuvírusnak bizonyult PCR-termékek sorakoznak (fekete vastag nyíl), az alsó sor 7. pozíciójában (vékony fekete nyíl) pedig egy ~720 bp hosszúságú, szekvenálással astrovírus szekvencia PCR-terméke látható. Mindkét sor első pozíciójában molekuláris marker van (100bp DNA Ladder, Promega).

Ennek a PCR-terméknek a nukleotid szekvenciája 67%-os azonosságot mutatott a 3-as típusú humán astrovírus ORF1b (RNS-függő RNS polimeráz) régiójához (HAstV3, AF141381). Az

eredeti vizsgálati minta időközben elfogyott, és a farmról származó további sertés székletmintákból szekvencia-specifikus primerekkel az astrovírust nem sikerült kimutatni. Így csak az astrovírus 3625 nukleotid hosszú ORF1b/ORF2/3'UTR (PAstV2/2007/HUN; GU562296) folytonos genom szekvenciáját tudtuk meghatározni. A vírus az ORF1b és az ORF2 régióban is a humán astrovírusokkal mutatott közelebbi nukleotid és aminosav (58-61%/61-62%, illetve 31-32%/18-19%) azonosságot, nem pedig a már ismert 2 sertés astrovírus ORF2 szekvenciákkal. Az ORF1b/ORF2 régiók határán, a szubgenomikus RNS átírási kezdőpontjának szekvenciája is eltért az eddig ismert astrovírusoktól. Az általános ORF2 promoter szekvencia formája az UUUGGAGNGGNGGACCNAAN$_{4\text{-}8}$AUGNC képlettel írható le, ahol az ORF2 start kodon aláhúzva szerepel és az N bármilyen nukleotidot jelenthet (Méndez et al., 2007). A PAstV2/2007/HUN esetén az AUG kodon előtt a képletben 11 nukleotid (N_{11}=GCATAAGCCTA) áll (a teljes szekvencia: UUUGGAGGGGCGGACCA AAN$_{11}$AUGGC), mely a leghosszabb az eddig ismert astrovírusok körében. Ezzel ellentétben a 3'UTR szekvenciájának hossza (23 nt) a legrövidebb az astrovírusok között. Ezen kívül az astrovírusok jellegzetesnek gondolt konzervatív, az ORF2/3'UTR régiók határán elhelyezkedő másodlagos RNS szerkezettel jellemezhető stem-loop II-like struktúra (s2m) (Méndez et al., 2007, illetve lásd később) sem található meg a PAstV2/2007/HUN szekvenciájában. Ez azt jelenti, hogy az erre a régióra tervezett és használt astrovírus szűrő-primerekkel ezt az astrovírust nem lehet kimutatni. Az egyedi szekvencia jellegzetességek és az ORF2 régió az eddig ismert astrovírusoktól való jelentős különbözősége (az ORF1b régió pedig eddig sertés astrovírus esetén nem volt ismert) miatt a PAstV2/2007/HUN-t a sertés astrovírusok 2-es típusának neveztük el eredetileg. Mint utóbb kiderült, kanadai kutatók a publikációnkkal egyidőben jelentették meg dolgozatukat, melyben további két új sertés astrovírus leírásáról számoltak be, PAstV2 és PAstV3 néven (Luo et al., 2011). Ezért a jövőbeni nevezéktani félreértések elkerülése érdekében az az egyezség született, hogy a

PAstV2/2007/HUN a sertés astrovírusok 4-es típusának (PAstV4) a prototípusa. Időközben amerikai kutatók a sertés astrovírus 5-ös típusának (PAstV5) kimutatásáról is beszámoltak (Shan et al., 2011), ezzel rövid időn belül sertésekben öt, egymástól különböző sertés (porcine) astrovírus faj (PAstV1-5) leírására került sor (58. ábra).



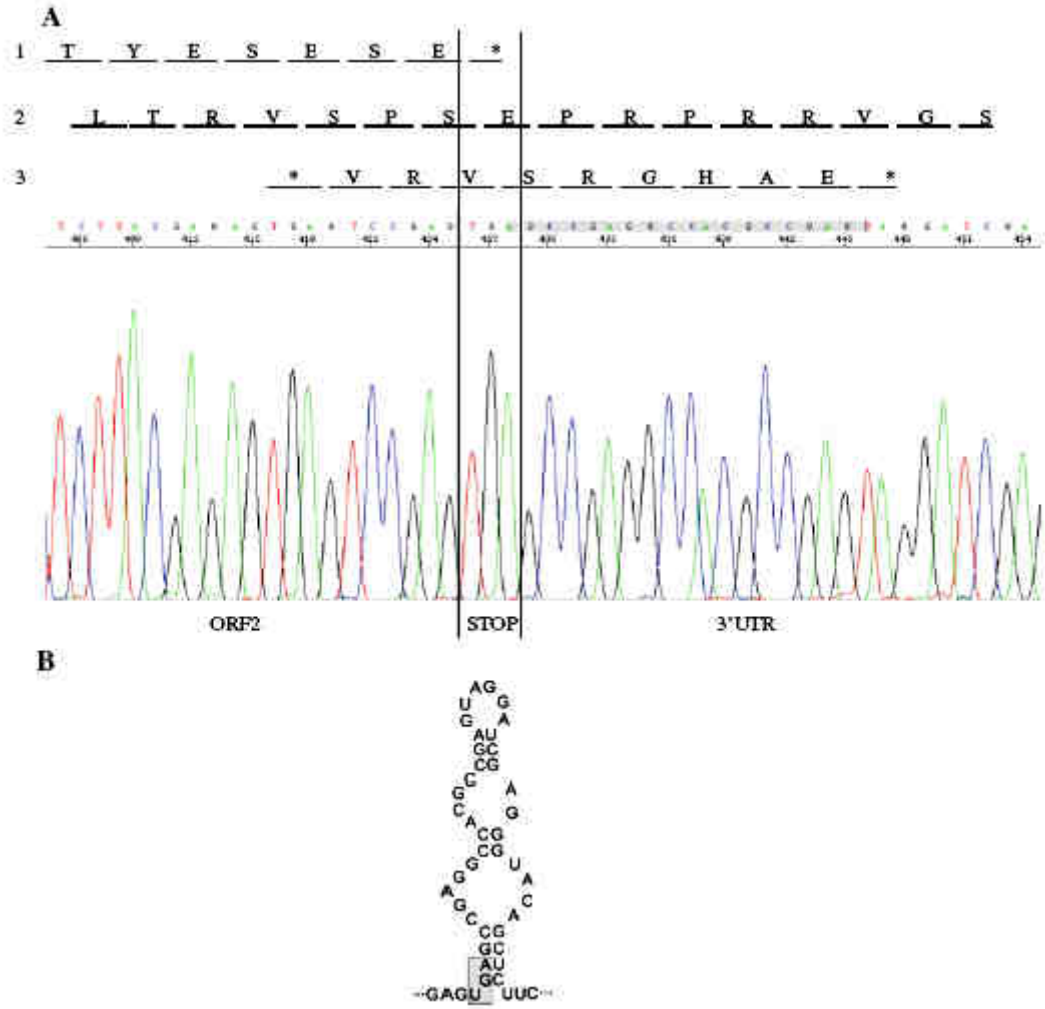
58. ábra. Az astrovírusok filogenetikai elemzése az ORF2 kapszid régió aminosav sorrendje alapján (Neighbor-Joining módszer JTT elemzéssel, MEGA 5; N=1000 ismétlés). A dolgozatban bemutatott astrovírusok fekete alapszínnel, fehér betűkkel vannak kiemelve, az 5 újonnan leírt sertés (porcine) astrovírus prototípus (PAstV1-5) és a 2 juh (ovine) astrovírus prototípus (OAstV1-2) fajok megjelölve láthatóak.

Ovine (juh) astrovírus (OAstV2)

Az ovine (juh) astrovírust 1977-ben mutatták ki elektronmikroszkópos vizsgálattal (Snodgrass és Gray, 1977) egy skóciai diarrhoea tünetét mutató birka bélsár mintájából. A vírust először 1981-ben jellemezték (Herring et al., 1981), majd előbb az ORF2 (Jonassen et al., 2001), majd 2003-ban a teljes genomszekvenciáját (OAstV1, Y15937) meghatározták (Jonassen et al., 2003). 2012-ig egyedül erre az egy astrovírus leírására került sor juhokból, mely kísérleti körülmények között enyhe enteritist okozott 2 napos gnotobiotikus bárányokban (Snodgrass et al., 1979).

Egy közép-magyarországi juh farmról összesen 17 bélsár mintát gyűjtöttünk 3 hétnél fiatalabb, egészségesnek látszó bárányoktól 2009. márciusában és 2010. áprilisában. Egy random módon kiválasztott bélsár mintát metagenomikai és pyroszekvenálás módszeréivel vizsgáltunk, melyből egy 147 nt (ORF1b) és egy 128 nt (ORF2) hosszú astrovírus szekvencia darabot lehetett azonosítani. Az astrovírus 2474 nt hosszú ORF1b/ORF2/3'UTR szekvenciáját határoztuk meg (ovine (juh) astrovírus 2-es típusa; OAstV2/2009/Hungary, JN592482). Az ORF2 promoter szekvenciája UUUGGGGGGGAGGACCAAAN_8<u>AUG</u>GC volt, ahol az N_8=AAGAGATG. Az OAstV2 ORF2 a legmagasabb aminosav azonosságot (22-23%) a szarvas (deer) astrovírusokhoz (HM447045 és HM447046) mutatta. Az OAstV1-hoz (Y15937) való azonossága csak 18% volt, és az OAstV2 még 25 aminosavval rövidebb is. Az astrovírusokra jellemzőnek tartott stem-loop-II struktúra (s2m) (Jonassen et al., 1998) nukleotid szekvenciája jelen van az OAstV2 genom ORF2/3'UTR határán, de nem a kapszidot átíró triplet keretben helyezkedik el és nem része a kódoló régiónak sem. Így a kapszid fehérje nem a „dogmatikus" SRGHAE aminosavakra végződik (59.A ábra). A stop kodon az s2m struktúra 5' végi alapján lehet (59.B ábra) az OAstV2-ben. Az ORF2 filogenetikai elemzése megerősíti, hogy az OAstV2 evolúciós szinten is jelentősen eltér az OAstV1-től és más astrovírusoktól (58. ábra). Érdemes azonban megjegyezni, hogy az

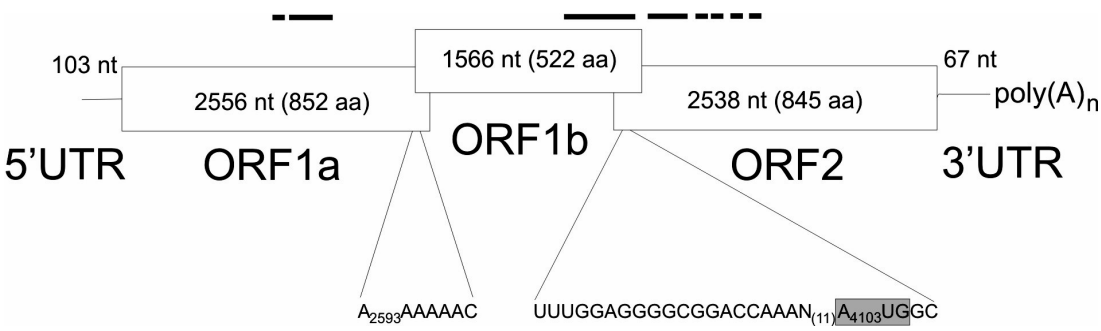
időközben leírt 5-ös típusú sertés astrovírus (Shan et al., 2011) az OAstV2-vel egy ágon helyezkedik el. A farmról származó további bárány széklet mintákból szekvencia-specifikus primerekkel az OAstV2-t nem sikerült kimutatni.



59. ábra. (A) A juh astrovírus (OAstV2/2009/Hungary, JN592482) ORF2/3'UTR határán elhelyezkedő – az astrovírusokra általánosan jellemzőnek vélt - stem-loop-II motívum (s2m) nukleotid szekvenciájának (szürke alapszínben) elhelyezkedése és a transzláció elvi lehetőségei a három triplet-leolvasási keretben (1., 2. és 3. sor). Az astrovírus ORF2 kapszid fehérjére általában jellemző, carboxy-végén elhelyezkedő SRGHAE aminosav záró motívum az OAstV2 esetében nem a kapszidot kódoló fehérje leolvasási keretében (1. sor) van, hanem az át nem írható 3. sorban. (B) Az OAstV2 s2m struktúrájának lehetséges másodlagos RNS szerkezete. Az ORF2 kapszid fehérjét záró stop kodon (UGA) az s2m struktúra 5' végi alapján lehet (szürke alapszínnel jelölve) az OAstV2 genomban, szemben más s2m struktúrával rendelkező astrovírusok esetében, ahol a stop kodon a struktúra csúcsán helyezkedik el.

Wild boar (vaddisznó) astrovírus (WBAstV1)

Az astrovírus kimutatásáról vaddisznókból még nem számoltak be. Egy dél-nyugat magyarországi állatpark 6-8 hetes, klinikailag egészséges vaddisznóborjainak bélsár mintáit vizsgáltuk. A vaddisznók házi sertésekkel nem voltak kapcsolatban. A 2011. áprilisában gyűjtött 10 mintából, 5-ből (50%) lehetett astrovírus szekvenciákat azonosítani pyroszekvenálás módszerével (60. ábra). Egy mintából az astrovírus (WBAstV-1/2011/HUN, JQ340310) teljes genom szekvenciáját meghatároztuk, mely 6707 nukleotid hosszú a poly(A) vég nélkül (60. ábra). A vírus genomjának részletes felépítése, az egyes régiók hosszai és jellegzetes nukleotid motívumok a 60. ábrán láthatóak. A konzervatív „stem-loop-II-like” (s2m) nukleotid motívum a 3’ genom végén a vaddisznó astrovírusban nem található meg.



60. ábra. A vaddisznó astrovírus (WBAstV-1/2011/HUN; JQ340310) genomjának szerveződése. A fekete vonalak a pyroszekvenálás során kapott szekvenciadarabok elhelyezkedését mutatják. Az egyes nyílt leolvasó keretek („open reading frame”, ORF) nukleotid (nt) és az aminosav (aa) hosszai a régióknak megfelelően láthatók. A konzervatív heptanukleotid framshift szignál (AAAAAAC) az ORF1a/ORF1b és a szubgenomikus RNS átírási kezdőpontjának szekvenciája az ORF1b/ORF2 határán külön ki van emelve (N_{11}=GCATAAGCCTA).

A vaddisznó astrovírushoz a legközelebbi hasonlóságot a házi sertésből fentebb általunk kimutatott prototípus 4-es típusú sertés astrovírushoz (PAstV2/2007/HUN), illetve az ezt követően az USA-ban leírt 4-es típusú sertés astrovírushoz (porcine astrovirus 4, PAstV4, JF713713) találtunk (Shan et al., 2011). Az aminosav azonosság az ORF1a, ORF1b és az

ORF2 régiókban 76%, 95% és 56% az amerikai PAstV4-hez. Ezen kívül az ORF2 kapszid fehérje 20 aminosavval hosszabb, mint a PAstV4 esetén. Az alacsony százalékos azonosság és a filogenetikai elhelyezkedés pedig jelezheti az antigenitásbeli különbözőséget is (58. ábra). Az ORF2 kapszid régió alacsonyabb azonossága a gazdaszervezet erős szelekciós nyomásának köszönhető és ismert jelenség az astrovírusoknál (van Hemert et al., 2007). Megerősítve a pyroszekvenálás eredményét, szűrő primert használva ugyanabból az 5 mintából lehetett csak astrovírust kimutatni RT-PCR módszerrel is. Az vaddisznó astrovírusok diverzitása kevesebb, mint 3% volt a vizsgált 378 nukleotid hosszú ORF1b/ORF2 kapocs-régió területén.

Új, dicistronos +ssRNS genomú vírus kimutatása és meghatározása

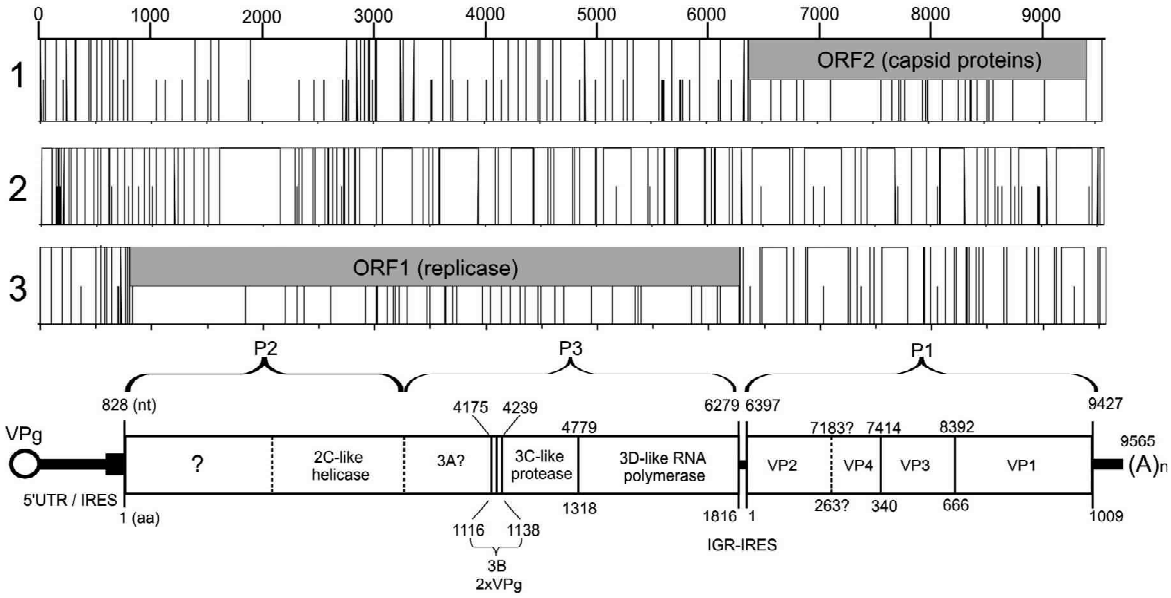
A genom szerveződése szerint a burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS (+ssRNS) genomú vírusoknak a *Picornavirales* renden belül két csoportja van: azok a vírusok, melyeknek a genomja monocistronos és azoké, melyeknek dicistronos (1. ábra). Utóbbiak genomjának jellegzetessége, hogy a kódoló szakaszokat nem kódoló régió szakítja meg. A renden belül az iflavírusok (*Iflaviridae*), a marnavírusok (*Marnaviridae*) és a secovírusok (*Secoviridae*) monocistronos genomúak (a picornavírusokat (*Picornaviridae*) is ide sorolták 2012-ig), melyek egyetlen ORF-et tartalmaznak, és az átíródás során egyetlen polyprotein keletkezik. A dicistrovírusok (*Dicistroviridae*) - nevükkel egyezően – két nem átfedő nyílt leolvasó kerettel (ORF1 és ORF2) rendelkeznek, melyeket nem kódoló régió köt össze. Ebből következően a dicistrovírusok két IRES elemmel rendelkeznek, egy az ORF1 régió (replikáz) translációjára, egy az ORF2 (strukturális/kapszid fehérjék: VP2-VP4-VP3-VP1) átírására szolgál: ezt az utóbbit gének közötti IGR-IRES („intergenic region”-IRES) régiónak nevezünk. Japán kutatók nemrég arra a következtetésre jutottak a Plautia stali intestine vírus (PSIV) vizsgálata alapján, hogy a dicistrovírusok ORF1 prekurzor polyproteinjei tartalmazhatják mindazokat a replikációhoz szükséges fehérjéket (2A-2C és 3A-3D) – és ugyanabban a sorrendben -, melyek a picornavírusoknál is megtalálhatók (Nakashima et al., 2010).

A dicistrovírusokat eredetileg ízeltlábúakban, így tetvekből, kabócából, méhekből, hangyákból, rákból stb. mutatták ki (Bonning et al., 2010). Néhányuk jelentős gazdasági károkat okozó kórokozó pl. méhekben és rákban (Bonning et al., 2010). Újabban dicistronos genomú vírusokat tengervízben és tengervízi közösségekben is találtak. Ilyen dicistronos genomú vírusok a „marine RNA virus JP-A” és „JP-B”, melyeket tengervízmintákból mutattak ki, de a gazdaszervezet(ek) nem ismertek (Culley et al., 2003; Culley et al., 2007). Ugyancsak kimutattak dicistronos vírusokat tengeri protiszták (egyszerű eukaryóták), így

diatom algák (Nagasaki et al., 2004; Shirai et al., 2008; Tomaru et al., 2009) és gombaszerű protisztákból is (Takao et al., 2005). Ezek a „tengeri eredetű” dicistrovírusok jelenleg nem tagjai egyetlen víruscsaládnak sem. A két javasolt új víruscsalád a diatom vírusok [*Rhizosolenia setigera* RNS vírus (RsetRNAV), *Chaetoceros socialis f. radians* RNS vírus (CsfrRNAV) és *Chaetoceros tenuissimus* RNS vírus (CtenRNAV)] és a fungoid protist vírus [*Aurantiochytrium* single-straded RNS vírus (AsRNAV): korábbi nevén *Schizochytrium* single-stranded RNS vírus (SssRNAV)] részére – a “Bacillariornaviridae” és “Labyrnaviridae” [Tomaru et al., 2009; Takao et al., 2006). Érdekesség, hogy egy monocistronos RNS vírus, a *Heterosigma akashiwo* RNS vírus (HaRNAV), a *Marnaviridae* család prototípusa, egy egysejtű algát fertőz (Tai et al., 2003; Lang et al., 2004). Figyelemre méltó, hogy dicistonos vírusok emberi béltraktusból való metagenomikai kimutatásáról is beszámoltak 2008-ban (Victoria et al., 2008). Ugyancsak napjainkban számoltak be az RNS vírusok első metagenomikai vizsgálatáról édesvízből (tóvíz) (Djikeng et al., 2009). E vizsgálat eredményei a tóvízi RNS vírusok nagy számára és sokszínűségére utalnak.

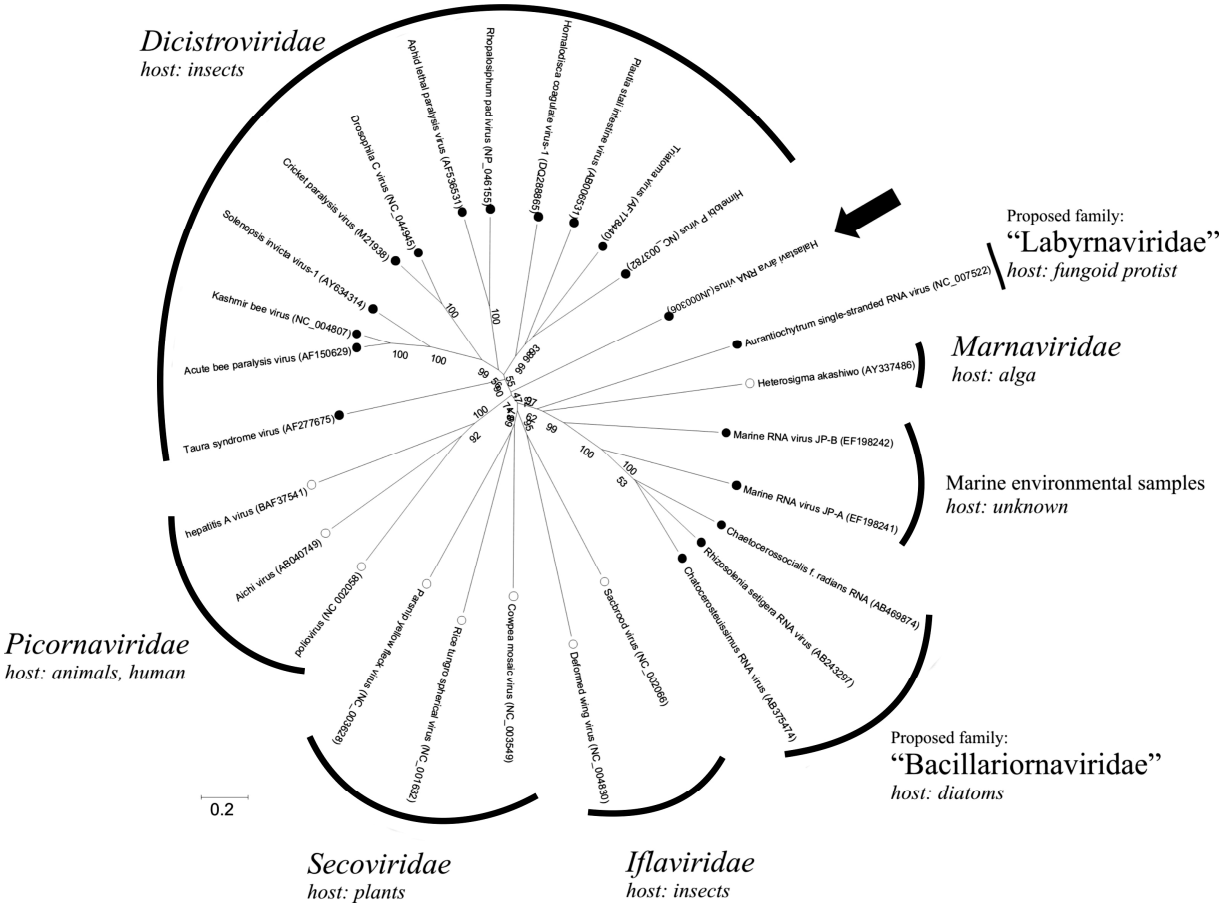
A burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS genomú vírusok keresése közben egy potenciálisan új, dicistronos vírusra akadtunk RT-PCR módszerrel a nem humán enterovírusok (*Picornaviridae*) 5’UTR nem kódoló régiójára tervezett szűrő-primerekkel (Non-human Enterovirus-5’UTR-R/F). A dicistronos vírust, melynek teljes genomja 9565 nt hosszú (a poly(A) farok nélkül), egy veszprém megyei halastóból kifogott pontyok (*Cyprinus carpio*) bélsár mintáiból mutattuk ki (61. ábra). A GenBankban homológ nukleotid szekvenciát nem találtunk, de egyes konzervatív replikáz aminosav motívumok (YGDD és FLKR), illetve alacsony százalékú aminosav szekvencia hasonlóságok jelezték, hogy vírusunk a picorna-szerű vírusok (pl.: dicistrovírus, picornavírus, secovírus) közé tartozhat. A legnagyobb azonosságot a gazdafaj nélküli JP-B vírussal (EF198242; *E* value = 4 x 10^{-14}, identitás = 64/179; 36%) találtunk az ORF1 régió alapján. Az új vírust Halastavi árva RNS

vírusnak (rövidítése: HalV) neveztük el. A vírus teljes genomja, felépítése, a kódoló és nem kódoló részei a 61. ábrán láthatóak. A 827 nt hosszú 5’ végű nem kódoló régiót (5’UTR) az 5451 nt (1816 aa) hosszú ORF1, majd a 118 nt hosszú IGR régiót a 3030 nt (1009 aa) hosszú ORF2 követi. A 3’ UTR 139 nt hosszú. Az ORF1 tartalmazza a jellegzetesen konzervatív Hel-$(VPg)_x$-Pro-Pol replikon motívumot, melyben felismerhető a 2C-szerű helikáz, 3C-szerű cystein-proteáz, 3D-szerű RNS-függő RNS polimeráz, valamint két VPg (3B). Az ORF2 kapszid fehérjék közül konzervatív aminosav motívumok a VP2, VP4 és a VP3 fehérjékben ismerhetők fel. A VP2 N-terminális részén felmerült egy peptidáz jelenléte, melyet dicistrovírusokban eddig még nem azonosítottak. Mivel a vírus IRES és az IGR-IRES másodlagos szerkezete nem rajzolható fel a már ismert szerkezetekkel, feltételezhető új IRES struktúrák jelenléte is. A vírus genom további, részletekbe menő összehasonlító elemzése a Boros et al., 2011 közleményben található meg.



61. ábra. A Halastavi árva RNS vírus (HalV) teljes genetikai állománya (9565 nt a poly-A farok nélkül), kódoló régiói, nyílt leolvasó keretei (ORF). A potenciális start kodonok (AUG) félmagasságú, a potenciális stop kodonok (UGA, UAA, UAG) teljes magasságú függőleges vonalakkal vannak ábrázolva mindhárom leolvasási keretben. A felismerhető virális fehérjék és a genom más jellegzetességei (UTR = untranslated region; IGR = intergenic region) ugyancsak jelölve vannak. A nukleotid (nt; felső számok) és az aminosav (aa; alső számok) pozíciók az egyes régiók kezdőpontját jelentik. A hasítási helyek meghatározása szekvencia-elemzéssel történtek.

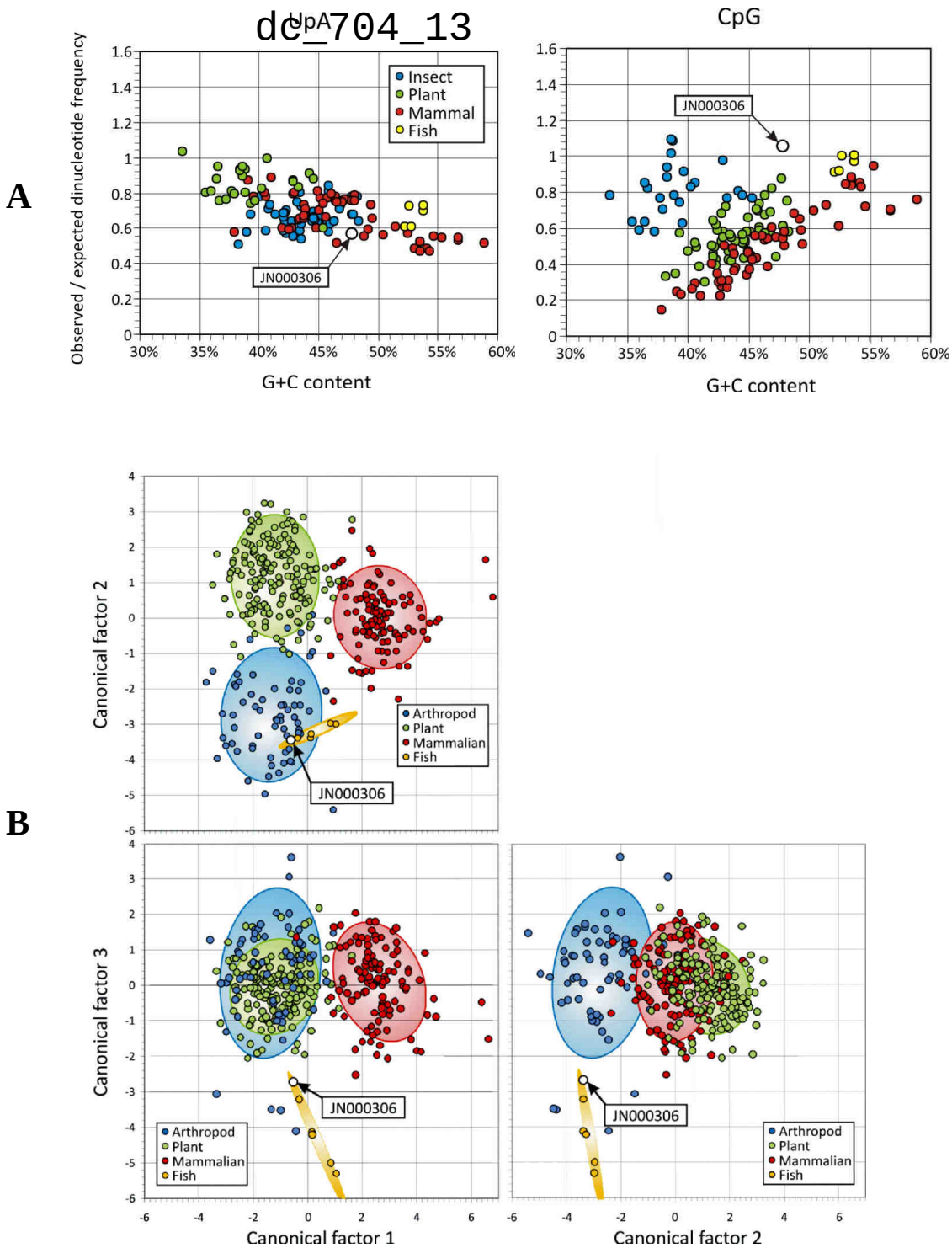
A 62. ábra a Halastavi árva RNS vírus filogenetikai elemzését mutatja a teljes ORF1 régió aminosav sorrendje alapján a *Picornavirales* rendben. A vírus az ismert +ssRNS vírusokkal közeli rokonságot nem mutat, jelenleg ismeretlen besorolású a *Picornavirales* rendben.



62. ábra. A Halastavi árva RNS vírus (JN000306) filogenetikai elemzése a nem strukturális régió (ORF1) teljes aminosav sorrendje alapján (beleértve 2C-szerű helikáz, a 3C-szerű proteáz és a 3D-szerű RNS-függő RNS polymeráz proteineket) a *Picornavirales* rendbe tartózó víruscsaládok (*Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Picornaviridae* és *Secoviridae*) tagjaival, és a jelenleg még nem besorolt vírusokkal vagy javasolt víruscsaládokkal. A fekete körök (●) a dicistronos, a fehér körök (○) a monocistronos genomú vírusokat jelölik. Az adott vírus ismert gazdafajai a családnév alatt szerepelnek. A Halastavi árva RNS vírust fekete nyíl jelzi.

A Halastavi árva RNS bázisösszetétele: 26,6% A, 27,4% C, 20,3% G és 25,7%U; a G+C arány 47,7%. Más RNS vírusokhoz (és gazdaszervezeti genomokhoz) hasonlóan, a Halastavi árva RNS vírus is különböző alul- és felül reprezentációt mutat összehasonlítva a dinukleotid gyakoriságokat a mononukleotid összetételével (63.A ábra). Az UpA dinukleotid gyakoriság például csak 57%-a az elvárt értéknek, ennek alapján a picorna-szerű vírusokhoz áll közelebb. Ugyanakkor, más emlős és növényi picorna-szerű vírusokkal ellentétben a Halastavi árva RNS vírus nem mutat CpG dinukleotid alul reprezentációt; a tapasztalt/elvárt arány ebben az esetben nagyobb, mint 1 (63.A ábra). Ennek alapján a vírus genom összetétele azokhoz a vírusokhoz áll közelebb, melyek rovarokat és halakat fertőznek (kék és sárga pontok a 63.A ábrán).

A Halastavi árva RNS vírus lehetséges gazdaszervezetének további behatárolása érdekében nukleotid összetétel elemzést (Nucleotide Composition Analysis - NCA) alkalmaztunk (Kapoor et al., 2010), melyben hal eredetű vírusok is szerepeltek (63.B ábra). A 95%-os konkordancia mellett a vírus-szekvenciái jól elkülöníthetők gazdaszervezetek szerint. Ez alapján a hal eredetű vírus szekvenciák is jól elkülöníthetők az ízeltlábúaktól származó vírusoktól annak ellenére, hogy ez utóbbiaknál ugyancsak hiányzik az emlős és növényi vírusoknál tapasztalt CpG alulreprezentáció. E módszer eredménye szerint a Halastavi árva RNS vírus hal eredetű vírus. A 63.B ábrán az első 3 (leginkább szignifikáns) elismert tényező ("canonical factor”, CF) kivetítése látható, mely a kontroll szekvenciák segítségével a mono- és dinukleotidok gyakorisága alapján utalhat a vírus gazdaszervezetére. Miközben az elkülönülés a hal és az ízeltlábú vírusok között a CF1-ben („canonical factor”) korlátozott (mely elsődlegesen CpG dinukleotidokon alapult), a CF3 a két gazdaszervezet jelentős elkülönítését mutatja, két különböző (kék és sárga ellipszisek) klasztert képezve; a Halastavi árva RNS vírus a hal eredetű klaszterben foglal helyet az elkülönítő elemzés szerint.



63. ábra. Halastavi árva RNS vírus (JN000306) nukleotid összetétel elemzése ("Nucleotide Composition Analysis", NCA) matematikai modellszámítás alapján a lehetséges gazdaszervezet meghatározása érdekében. (A) A CpG és UpA dinukleotidok előfordulási gyakorisága különböző gazdaszervezetekből származó picorna-szerű vírusokban (kék: ízeltlábú, zöld: növény, piros: emlős, sárga: hal). Az y-tengely a tapasztalt/elvárt arányt („observed-to-expected ratio"), az x-tengely a G+C százalékos arányát jelenti a genomban. (B) Az első 3 (leginkább szignifikáns) elismert tényező ("canonical factor") kivetítése, mely a kontroll szekvenciák segítségével a mono- és dinukleotidok gyakorisága alapján utalhat a vírus gazdaszervezetére. Minden egyes pont egy egyedi szekvenciát jelöl. Az ellipszisek a 95%-os konfidencia intervallumot jelölik az ellipszis középpontjához képest, mely az adott gazdaszervezetre jellemző vírusokat tartalmazza (Kapoor et al., 2010). A Halastavi árva RNS vírus (JN000306) helyzetét az ábrákon a fekete nyíl jelzi.

MEGBESZÉLÉS

A vírusokról alkotott képünk korántsem teljes, napjainkban nagymértékben változik. Egyre világosabb és sürgetőbb, hogy a mikrobákról szélesebb és mélyebb kontextusban kell(ene) gondolkodnunk. Számuk (arányuk az élővilágban), sokszínűségük, gyors változásra való képességük és az, hogy képesek benépesíteni a földi bioszféra minden részét, sikeresen alkalmazkodva akár rendkívül extrém (antropomorf felfogással „élettel összeegyeztethetetlen") körülményekhez is (Földön kívül?) megkerülhetetlen szerepüket és sikerességüket bizonyítja. A mikrobák nem csak egyszerűen kórokozók! Vagy még szűkebb szemüvegen, az orvosi mikrobiológiai nyelvén át nézve: A mikrobák nem csak egyszerűen humán kórokozók! Mindezidáig a mikrobák csak akkor kerültek a látóterünkbe, ha valamilyen kóros elváltozást észlelve (tünet, betegség, szindróma, halálozás) a háttérben sikerült valamilyen mikrobiális ágens kóroki szerepét igazolni. Igaz ez a vírusokra is, melyek létezéséről is csak kb. 120 éve tudunk. Napjainkban változik a szemléletünk a mikrobákról, amikor egyre világosabban látszik, hogy a „kórokozó mikrobák" csak a mikrobák kis (az egészet szemlélve talán elhanyagolható!) részét képezik és a mikrobák valódi jelentősége ezen messze túlmutat. E szemléletváltozást - a szerző véges tudása alapján - a 64. ábra foglalja össze (64. ábra).

Heveny (akut) (*humán)* betegség >1410 féle emberi kórokozó
(tünetmentes fertőzés – enyhe – középsúlyos – súlyos megbetegedés – fatális betegség)

Idült (krónikus) (*humán)* betegség
(daganatok, fekélyek, (auto)immun megbetegedések, szív betegségek, caries, parodontális betegségek stb.)

(*Humán*) mikrobiális flóra
(esszenciális – szimbiotikus kapcsolat/interakció; pre- és probiotikumok, széklet transzplantáció!)

Az élő organizmusok evolúciója
(mikroba – gazda együttes evolúciója; retrovírusok!)

A földi élet kialakulása
(hypothesis: Az első eukaryota sejt kialakulása: prokaryota sejtek - Archaea fúziója)

64. ábra. A mikrobák jelenleg ismert szerepének 5 lehetséges szintje, példákkal. A „(*humán*)" szó nem szerves része az ábrának. (A szerző gondolatmenete.)

Ezért ahhoz, hogy a mikrobák valódi szerepét, jelentőségét és összefüggéseit jobban érthessük (megérthessük?) a természetben, a „kórokozó” mikrobák mellett, a természetes mikrobiális világ mind teljesebb megismerésére kell törekednünk. Vizsgálatainkat a burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkező vírusok körében (*Caliciviridae, Picornaviridae, Astroviridae* és *Hepeviridae*) végeztük. Közös vizsgálatukat éppen az tette lehetővé, hogy a genomjuk felépítése és szerveződése hasonló biokémiai tulajdonságokkal jellemezhető. Munkánk során részben már ismert vírusok molekuláris epidemiológiai összefüggéseinek feltárását végeztük el hazai, európai és nemzetközi szinten, másrészt ígéretes mintákból (taxonómiailag is) új, pozitív, egyszálú RNS genomú vírusokat azonosítottunk és írtunk le. Egyidejűleg mind a vírusok sokszínűségét (genetikai és antigén diverzitását), mind az adott vírus gazdafaj spektrumát kutattuk. A vizsgálatokhoz a virológiai módszerek széles tárházát felhasználtuk a hagyományos virológiai módszerektől a legkorszerűbb, „up-to-date” – tulajdonképpen szekvencia független - virális metagenomikai és bioinformatikai módszerekig.

Calicivírusok (*Caliciviridae*)

● A „calicivírusok” hosszú időn keresztül - néhány, az állategészségügyben kórokozóként jegyzett „calicivíruson” kívül - az 1990-es évek közepéig laboratóriumi módszerekkel nehezen megközelíthető, nem tenyészthető, „zavaros” víruscsoporto(ka)t alkottak. Bár az első emberi calicivírus, a Norwalk ágens (= Norwalk vírus = „Norwalk-szerű vírusok” = norovírus) már 1972 óta ismert volt, de csak a vírus genetikai állományának meghatározása után (Jiang et al., 1990) és a molekuláris biológiai módszerek megjelenésével váltak vizsgálhatóvá, más vírusoktól valóban elkülöníthetőkké. Talán nem túlzás leírni, hogy a „humán calicivírusok” - vizsgálataink kezdetén (1999) - úgy is, mint fogalom, úgy is, mint gastroenteritist okozó kórokozó még szakmai körökben is teljesen ismeretlenek voltak

hazánkban (és tulajdonképpen máshol is a világon). Vizsgálatainkkal megteremtettük és lefektettük a calicivírusok (ezen belül különösen a norovírusok) hazai laboratóriumi diagnosztikájának alapjait, országos lefedettségű, reprezentatív surveillance keretében. Figyelmünk kiterjedt a laboratóriumi diagnosztika mellett a hazai surveillance megszervezése, az epidemiológiai-járványügyi szolgálat képzése és az ismeretterjesztés területeire is. Vizsgálatainkat a kezdetektől fogva nemzetközi kooperációban végezzük, melyek elmélyítését több hazai és Európai Uniós kutatási pályázat segítette elő. E pályázatok szakmai és pénzügyi háttere jelentősen elősegítette a Laboratórium fejlődését, és a calicivírusok vizsgálatán keresztül megalapozta a Laboratórium jelenlegi tevékenységének profilját, képességét és irányát is. Laboratóriumunk 1999-től nem hivatalosan, 2003-tól hivatalosan is a „Gastroenterális Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriuma" a Mikrobiológiai Szakmai Kollégium döntése és felülvizsgálatai alapján.

Ma a calicivírusok neve és szerepe a gastroenteritis megbetegedésekben és járványokban nem csak a szakmai körökben ismert, de a média segítségével közismertté is vált hazánkban. Mindez lehetőséget adott/ad a probléma felismerését követően a megelőzés hatékony módjainak kidolgozásához és gyakorlati alkalmazásához is. Az OEK Epinfo című kiadványai útján a Referencia Laboratórium lefektette a calicivírus (különösen a kórházi, nozokómiális) járványok során szükséges járványügyi intézkedések irány- és alapelveit, a megelőzés, a laboratóriumi kivizsgálás és vizsgálat (költséghatékony) szabályait. Ma már a járványügyi szakemberek gastroenteritis járvány esetén nemcsak gondolnak a norovírusra, de az első felmerülő gondolattá vált (a Salmonella helyett), különösen szezonban. A gyors (és szakmailag megalapozott) döntés fontossága evidencia a járványügyi munkában. Norovírus esetén, ha az első beteg megjelenését követően nem 4, hanem csak 3 nap telik el a diagnózisig (és az intervencióig) a kórházi járvány hossza 7 nappal csökkenthető (Lopman et al., 2004b). A molekuláris epidemiológiai surveillance munka során bizonyítottuk a norovírusok vezető

kóroki szerepét a hazai gastroenteritis (és nem csak a nem bakteriális) járványok körében. Bizonyítottuk a norovírus járványok téli-kora tavaszi szezonalítását. Megismertük a legfontosabb klinikai és epidemiológiai jellegzetességeket (tünetek és gyakoriságuk, a járványok legfontosabb helyszínei). A járványokból számos, összesen 17 féle norovírus genotípust sikerült azonosítanunk, a GII genocsoportú vírusok jelentős dominanciájával. A vizsgált járványszezonokban a norovírus járványok több mint a háromnegyedét a GII.4 genotípusú vírusok okozták. A vizsgálatok kezdete óta a GII.4 norovírus összesen öt fő genetikai variánsát (epidémiás antigén drift mutáns klónok) lehetett azonosítani, melyek 2-4 évente jelentek meg (1996, 2002, 2004, 2006 és 2010) a populációban. Egy GII.4 variáns dominánsan 2-3 járványszezonon keresztül cirkulált a populációban úgy, hogy az adott variáns az 1.-2. szezonban mindig kiterjedtebb, több járványt okozott, mint a 3.-4. járványszezonban. Ez a jellegzetesség „kísértetiesen” hasonlít az influenza vírusnál már ismert genetikai drift jelenségéhez, amikor a fogékony populációban 2-3 év alatt alakul ki megfelelő szintű immunitás az adott domináns influenza vírus variánssal szemben (Koelle et al., 2006). Ezt követően, pedig egy genetikailag módosult, antigenitásában megváltozott influenza vírus (drift-mutáns) szorítja ki a korábbi variánst, mely ellen a populáció újabb 2-3 év alatt szerez ismét majd megfelelő szintű immunitást. E megfigyelés fontos hozadéka, hogy a norovírus járványok folyamatos, molekuláris epidemiológiai nyomon követése, az influenza vírusok előrejelzéséhez hasonlóan képessé tehet bennünket arra, hogy a norovírusok és azok variánsainak megjelenését is előre jelezhessük. (Ennek alapján a GII.4-2012 potenciálisan egy következő dominánssá váló, pandémiás GII.4 variáns lehet.)

2006 nyarán a norovírusok szokatlanul erős aktivitását lehetett megfigyelni, mely a molekuláris adatok alapján a GII.4-2006b variánshoz köthető. Ezt a vírust – mely egyben az elsőszámú kórokozó is volt - lehetett kimutatni 2006. júniusában a miskolci vízjárványból is, mely a legtöbb megbetegedéssel járó vízjárvány volt a hazai epidemiológiai nyilvántartás

szerint. A miskolci vezetékes vízhálózat, melyet eddig a várost körbevevő karsztvíz biztonságosan táplált, egy igen heves esőzést követő árvíz (éghajlatváltozás?) következtében szennyeződött. Az eset számos elgondolkodtató tanulsággal járt, de egyet külön is érdemes kiemelni. A járványban a GII.4-2006b vírus-variánssal megbetegedettek/fertőződöttek igen nagy száma, majd a vírusnak a molekuláris vizsgálatokkal követhető terjedése a környező földrajzi régiók egyre nagyobb körére (járványok sora, köztük nozokómiális kórházi járványok a miskolci vízjárvány kezelt betegeivel) adják a következtetést, hogy a miskolci vízjárvány szignifikáns szerepet játszott a szokatlanul erős 2006. évi nyári és a 2006/2007 évi járványszezonban. Általános következtetésként az vonható le az esetből, hogy jelentős közegészségügyi katasztrófának a norovírusok esetében jelentős másodlagos hatása lehet. Jelen esetben – szerencsétlen módon (?!) - egy új, virulens GII.4 variáns (GII.4-2006b) megjelenése a populációban egybeesett egy igen jelentős számú potenciális megbetegedéssel járó járványügyi esemény bekövetkezésével, mely a vírus nagymértékű felsokszorozódásához vezetett (emlékeztetőül 1ml székletben minimum 1 millió norovírus van!). Ez felgyorsította és fel is erősíthette a soron következő 2006/2007-es norovírus járványszezont, mely a hazai norovírus surveillance óta az egyik „legerősebb” volt.

Vizsgálataink eredményeit – nemzetközi együttműködés alapján - elhelyezhettük az európai és több kontinensre kiterjedt elemzések körébe is. Az adatok egybevágnak; a GII.4 és egyes GII.4 genetikai variánsok domináns cirkulációja volt megfigyelhető világszerte. Ez azt jelenti, hogy a GII.4 vírus földrajzilag és populációs szinten nem izoláltan szereplője a járványoknak, képes nemzetközi járványok és akár pandémia kialakítására is. Más szóval, a norovírus járványszám emelkedésének a legvalószínűbb oka az adott populációban az, hogy egy új GII.4 genetikai variáns jelenik meg egy nemzetközi járvány (pandémia) részeként. (Megjegyezhető azonban, hogy a GII.4 norovírus variánsok hazánkban mindig néhány héttel, hónappal később bukkantak fel először – az influenzához hasonlóan. A 2001 óta jól szervezett

hazai surveillance miatt ez nem az elkéső azonosítás miatt tapasztalható, hanem hogy a GII.4 vírus importált formában – így később - került be a hazai populációba. Talán ez is egy közvetett bizonyíték arra, hogy hazánk nem elsődleges célpontja a turista és átmenő forgalomnak; ez járványügyi szempontból persze előnyös.)

Norovírus járványszezon minden évben (volt), van (és lesz). A GII.4 norovírusok meghatározó szerepének és biológiájának megismerése valószínűleg közelebb vihet minket általában is a „calicivírus-járványok” megértéséhez. Ezért fontos felismerés, hogy a GII.4 norovírusok szignifikánsan gyakrabban terjednek közvetlen kontaktussal és okoznak járványt egészségügyi és szociális intézményekben. A GII.4 genotípus esetén a feltárt genetikai/antigén drift az egyik lehetséges faktor, mely időről-időre elősegíti a GII.4 variánsok sikeres megjelenését és elterjedését a populációban. A norovírusok nyomon követésének molekuláris epidemiológiai eredményei és a GII.4 vírusok elemzése alapját képezi a hatékonyabb megelőzési és érzékenyebb laboratóriumi módszereknek, valamint az aktív oltóanyag kifejlesztésének.

A GII.4 norovírussal ellentétben, más, messze ritkábban, viszont időben halmozódva jelentkező norovírus genotípus (és különösen a GI genocsoport tagjai) fontos szerepet játszhatnak az élelmiszer és víz eredetű és közvetítette járványokban, néha jelentős nemzeti, nemzetközi járványügyi és élelmiszer-biztonsági problémát is okozva. Ilyen volt a hazai „Junior-járvány” néven elhíresült közétkeztetéssel összefüggő norovírus járvány 2001. május közepén. Itt a szennyeződött étel (gyümölcsből készült hideg eperleves?) okozott több száz megbetegedést a cég ellátási területén (Epinfo, 2001) majd az országban több helyen felbukkanva, melyből a GII.1 (Hawaii) norovírust lehetett kimutatni (5. ábra). Ez a vírus azonban már 2001. áprilisban is az országban volt (5. ábra), ezért elképzelhető, hogy nem az alapanyag, hanem a konyhai feldolgozás során (beteg ember?) történhetett a kontamináció. Ugyancsak ritkán, 4 alkalommal sikerült a prototípus Norwalk vírust (GI.1) azonosítani,

mindannyiszor 2004-ben (5. ábra), egy alkalommal vízjárvány (vezetékes víz csőtörése egy faluban) részeként. A GII.b jelű, többszörös rekombináns – korábban nem ismert - norovírus pedig nemzetközi jelentőségű élelmiszer eredetű járványra – és egyben a vírus ugrásszerű változékonyságára - jó példa. A járvány eredeti forrása feltehetően szennyezett kagylók fogyasztásához köthető Nyugat-Európában (Franciaország?) 2000. augusztusában (Koopmans, személyes közlés). Nyolc hónappal később már mind a 10 norovírus surveillance-ben részt vevő tagországból beszámoltak a GIIb valamelyik rekombináns típusának megjelenéséről. Magyarországon mind a 4 kapszid típus jelenléte igazolható volt 2001. április és 2008. május között (5. ábra), mely időszak alatt a második leggyakoribb genotípus volt a GII.4 norovírus után. Érdekes módon a GII.b eltűnését követően 2009. október és 2012. június között ismét egy rekombináns norovírus, a GII.g vált meghatározóvá hazánkban, és gyakorivá Nyugat-Európában, melynek eredete feltehetően ugyancsak kagylófogyasztáshoz köthető Franciaországban (Ambert-Balay, személyes közlés). Érdekes módon mindkét rekombináns norovírus (GII.b és GII.g) esetén elsősorban gyermekközösségek voltak a járványok érintettjei. Az antigén drift mellett a norovírusok váratlanul gyakori rekombinációja így ugyancsak jelentősen befolyásolja és színesíti a járványügyi helyzetet, kihatással van a taxonómiára, a laboratóriumi diagnosztikára és a vakcina fejlesztésre is.

A norovírus járványokból csak humán eredetűnek tartott norovírusokat mutattunk ki. Az eddig ismert és állati eredetűnek tartott norovírusokat a megvizsgált nagyszámú emberi gastroenteritis járványból nem tudtunk azonosítani. A calicivírusokról szóló ismereteink azonban koránt sem teljesek. Az ismert 5 calicivírus nemzetség mellett 2008-ban, 2009-ben és 2011-ben is egy-egy potenciálisan új calicivírus nemzetség („Recovírus” és „Valovírus” és „csirke calicivírus”) első tagjait azonosították majmokban (Farkas et al., 2008), sertésekben (L’Homme et al., 2009) és csirkékben (Wolf et al., 2011). Ezek közül a „Recovírus”-hoz

legközelebb álló calicivírust immár emberi diarrheaból is kimutattak Bangladesből (Smith et al., 2012).

- Eddig csak néhány országból számoltak be a szarvasmarha norovírusok kimutatásáról, bár a szeroepidemiológiai vizsgálatok alapján a szarvasmarhák átfertőződése szinte teljes (99%) (Deng et al., 2003). Vizsgálatainkkal először sikerült a szarvasmarha norovírust - és mindkét genotípusát (GIII.1 és GIII.2) - hazai szarvasmarha állományból kimutatni, követni és molekuláris módszerekkel jellemezni. A hazai GIII.1 vírus a második olyan vírus a prototípus mellett, melynek teljes kapszid régiója is meghatározásra került. Érdekes, hogy a két szarvasmarha norovírus genotípus egyidejű cirkulációját sikerült kimutatni ugyanazon a farmon. Ez a szituáció megerősíti azokat az eredményeket, hogy a GIII.1 és GIII.2 vírusok nemcsak külön genetikai, hanem különböző antigén csoportot is alkotnak (Oliver et al., 2006a/b), és az ilyen egyidejű természetes jelenlét a genetikai rekombináció lehetőségét is biztosítja a két genotípus között (Han et al., 2004). Bár a p289/p290 jelű univerzális calicivírus primerpár (Jiang et al., 1999) „képességeiről" többszörösen meggyőződhettünk, időnként váratlanul jelentősen lendítve kutatásaink sikerét, a szarvasmarha norovírusok esetén vele – az emberi norovírusokra tervezett JV12Y/JV13I primerpárral (Vennema et al., 2002) ellentétben – hamis negatív RT-PCR eredményt kaptunk. A 22 nukleotid hosszú p289 primer és a Bo/NoV/Aba-Z5/2002/HUN vírus szekvenciájának összehasonlító elemzése összesen 6 nukleotid eltérést mutatott, mely az egyik oka lehetett az érzékenységi problémának. A szarvasmarha norovírus további földrajzi régiókban történő kimutatásával és a vírus genetikai meghatározása segítségével újabb ismeretekhez juthatunk a vírus földrajzi eloszlásáról és a vírus genetikai/antigén változatosságáról. Bár a GIII.1 szarvasmarha norovírus, fertőzési kísérlet során, vizes diarrheát okozott újszülött borjakban (Otto et al., 2011), további vizsgálatokat igényel a szarvasmarha norovírusok gyakoriságának, kóroki szerepének és jelentőségének tisztázása. Ez annak a szeroepidemiológiai

tanulmánynak fényében még fontosabb, hogy holland állatorvosok körében 28%-ban, a kontroll emberi populációban pedig 20%-ban kimutathatók ellenanyagok rekombináns GIII.2 szarvasmarha norovírussal szemben (Widdowson et al., 2005).

● Az ismert állati norovírusok közül a sertés (porcine) norovírusok állnak genetikailag a legközelebb a humán norovírusokhoz. A sertés norovírusok is abba a GII genocsoportba tartoznak, melybe az emberi gastroenteritis járványokért leginkább felelős norovírusok vannak. A jelenleg ismert sertés norovírusok a GII.11, GII.18 és GII.19 norovírus genotípusok közé tartoznak (Wang et al., 2005a). Japán, Hollandia és USA után negyedikként számoltunk be a sertés norovírus (genotípus szerint: GII.11) kimutatásáról sertés bélsár mintából. A sertés norovírusok kimutatásáról időközben Kanadából, Új-Zélandról, Belgiumból, Koreából és Kínából is megjelent egy-egy közlemény (Cunha et al., 2010). Az EVENT („Enteric Virus Emergence, New Tools" FP6, SP22-CT-2004-502571) Konzorciumunk egyes partnerei (Dánia, Finnország, Magyarország, Olaszország, Szlovénia Spanyolország) által (nem publikált) összesített adatok alapján, 2005-2008 között a vizsgált európai farmok (N=87) 9%-ban (7-16%), a vizsgált sertés fécesz minták (N=1059) 1%-ban (0,2-9%) lehetett sertés norovírust kimutatni, elsősorban a 3-6 hónapos kor közötti állatokból. Bár egy friss kísérletes tanulmány szerint a sertés norovírusoknak talán lehet szerepe sertések diarrheájában (Shen et al., 2012), de a sertés norovírusok valódi kóroki szerepe sertések körében, valamint jelentősége a norovírusok evolúciójában és humán megbetegedésekben (zoonózis?) továbbra is megválaszolatlan kérdés (Scipioni et al., 2008).

● A sapovírusokról a norovírusokhoz képest jóval kevesebbet tudunk és 2000-ig – a vizsgálataink kezdetéig - kevesebb, mint 10 országból jelent csak meg közlemény emberi kimutatásukról (Chiba et al., 2000). A tanulmányok szerint a gyermekkori szórványos gastroenteritisek 0,9-9,2%-áért lehetnek felelősek (Vinjé, 1999; Pang et al., 2001). A megbetegedések szempontjából a leginkább érintett a 6 hónap-2 év közötti korosztály.

Tizenkét éves korra a populáció nagyobb részéből kimutathatók az ellenanyagok (Vinjé, 1999). Hazánkban először sikerült sapovírusokat ismeretlen eredetű, szórványos és járványos, emberi gastroenteritis megbetegedésekből is azonosítani és molekuláris módszerekkel elemezni. A szórványos csecsemő-kisgyermekkori esetekből (a molekuláris epidemiológiai elemzés alapján feltehetően valójában esethalmozódás) a sapovírusok GII.1, (London/1992/UK), a szociális otthoni, feltehetően nosokomiális járványból a GI.2 (Parkville/1994/US) genotípust sikerült azonosítani. Majd 14 éve követjük a „calicivírusok" cirkulációját a gastroenteritis járványokban hazánkban molekuláris epidemiológiai módszerekkel. Mégis a több mint 900, nem bakteriális gastroenteritis járvány vizsgálata során csak ez egyszer sikerült a sapovírusok kóroki szerepét igazolni, 2008-ban. Először Ázsiában (Hansman et al., 2006; Hansman et al., 2007; Wu et al., 2008) és ezzel közel egyidőben a nemzetközi calicivírus munkacsoportunk (FBVE, Food-borne Viruses in Europe) észlelése alapján 2008-ban a sapovírusok okozta járványok számának szokatlan emelkedése volt megfigyelhető Európában is, az idősebb korosztályokban, amelyekből rendre a GI.2 genotípusú sapovírust lehetett kimutatni (Svraka et al., 2010). Hollandiában az elmúlt 15 év alatt ugyancsak 2008-ban sikerült először sapovírust gastroenteritis járványból kimutatni, melyet ugyancsak ez a genotípus okozott (Koopmans, személyes közlés). A feltételezhetően szélesebb földrajzi régiókat érintő járványos sapovírus cirkulációt alátámasztja az is, hogy a GenBank-ban található hat GI.2-es sapovírus szekvencia közül a legközelebbi rokonságot, az RdRp régió alapján, egy 2007-ből Oroszországból származó vírus (Nizhny Novgorod/2007/RUS; EU620242) mutatott a hazai vírushoz. Hogy pontosan milyen változás áll a sapovírus járványok több földrajzi régióban tapasztalt „klonális" megszaporodásának hátterében, elsősorban az idősebb korosztály körében, az nem ismert.

- Az ember mellett sertésekben ismert a sapovírusok jelenléte, bár nyércben (Guo et al., 2001b), és újabban kutyában (Li et al., 2011a), fókában (Li et al., 2011b) és denevérben

(Tse et al., 2012) is kimutattak – egyelőre nem besorolt - sapovírusokat. A vizsgálataink kezdetéig csak négy ország számolt be a sertés sapovírusok molekuláris azonosításáról. 2004 és 2007 között 6 ország 88 sertésfarmjáról származó minták vizsgálata alapján számoltunk be a sertés sapovírusok incidenciájáról, genetikai sokszínűségéről és molekuláris epidemiológiájáról Európában. Az állatok átlagosan 8%-a ürítette a vírust, mely a farmok több mint 40%-ban jelen volt. Ez a sapovírusok endémiás elterjedtségére utal sertések körében, bár az egyes országok adataiban jelentős különbségek láthatók. Ezek részben a mintagyűjtés, a vizsgált állatok életkora és egészségügyi állapota, részben az alkalmazott módszerek (pl.: primerek) különbözőségéből adódhattak. Az adatok alapján a sertések már a korai (2-8 hetes) életkorban fertőződnek sapovírussal. Egyenlő arányban találtunk sapovírus fertőzött állatot a klinikailag tünetmentes és a diarrhoeában szenvedő állatokban, de a hasmenés szignifikánsan gyakrabban fordult elő sapovírus genotípusok társfertőzése esetén. Ez nem feltétlenül arra utal, hogy a kettős sapovírus fertőzés diarrhoeához vezet, de jelezheti, hogy ezekben a farmokban a higiénés standardok alacsonyabbak és más, pathogén mikrobák is jelen lehetnek. Az alkalmazott primerek érzékenységi problémájára utal, hogy különböző primerekkel eltérő genocsoportú sapovírust lehetett kimutatni ugyanazon mintákból. Éppen ezért is figyelemre méltó a sapovírusok extrém genetikai sokszínűsége sertésekben, hogy az ismert (GIII), illetve három feltételezett sapovírus genocsoport (GVI, GVII és GVIII) mellett további két új sapovírus genocsoportot (GIX és GX) is sikerült azonosítani. A leggyakoribb (50,6%) a GIII genocsoportú sapovírus volt, ezért felmerül, hogy a háttérben nem-e egy, a sertések között zajló nemzetközi GIII genocsoport okozta járvány részjelenségét észleltük. Az egyik legfontosabb kérdés, hogy a sertés sapovírusok zoonótikus ágensek-e. A filogenetikai elemzéseink alapján a sapovírusok a sertésekben genetikailag sokszínűbbek, mint emberben. Ez azt jelentheti, hogy a sapovírusok ko-evolúciója a sertésekben hosszabb ideje tart, mint emberben. A sertésekből kimutatott sapovírusok közül a GVIII genocsoport foglal el speciális

helyzetet, mert ez mutatja a legközelebbi rokonságot (evolúciós keresztezőpontot) az emberi sapovírusokkal. Figyelemre méltó, hogy a GVIII genocsoport közelebbi rokonságban van a humán sapovírusokkal (elsősorban a GV és GI-hez), mint a többi sertésekből kimutatott sapovírus genocsoporttal. Tekintettel arra, hogy GVIII genocsoportú sapovírust emberből még nem mutattak ki és e kiterjedt európai tanulmányunkban - bár genetikailag nagyon heterogén sapovírusok kerültek leírásra - sem sikerült genetikailag egyértelmű humán sapovírust kimutatnunk, a sertések rezervoár szerepe és a sapovírus zoonózis eredete továbbra is kérdéses.

- A nebovírusok 1978-as első elektronmikroszkópos felfedezése után 2006-ig összesen két tanulmány vizsgálta molekuláris biológiai módszerekkel a nebovírusok jelenlétét szarvasmarhák körében (Smiley et al., 2002; Oliver et al., 2006a). 2006-tól a nebovírusokról szóló közleményekben már a vírus prevalenciájáról is információhoz juthatunk, mivel a 2008-ban létrehozott új nemzetségbe (Carstens, 2009) tartozó nebovírusokat már célzottan keresték. Park és mtsai 2004 és 2005 között összesen 645, 3 és 70 nap közötti életkorú hasmenéses borjaktól gyűjtöttek bélsár mintákat Dél-Koreában. A minták 9,2%-ban igazolták a nebovírus jelenlétét, és endemikusnak találták a hasmenéses állatok körében (Park et al., 2008). Martino és mtsai 2009 és 2010-ben 16 dél-olaszországi szarvasmarha farmról közel 100 állattól – melyek közül 32 állatnak volt hasmenése – gyűjtött székletmintát 0 és 6 hetes állatoktól. Összesen 5 (5%) esetben mutatott ki nebovírust, melyek kivétel nélkül hasmenéses tüneteket mutató borjaktól vett bélsármintákból származtak (Di Martino et al., 2011). Kaplon és mtsai retrospektív vizsgálata során 415, átlagosan 9 napos borjú székletmintáinak 7%-ban tudtak nebovírusokat kimutatni Franciaországban (Kaplon et al., 2011). Hassine-Zaafrane és mtsai 2006 és 2010 között Tunéziában gyűjtött 169 szarvasmarha (a borjak átlagéletkora 55 nap volt) székletmintáit vizsgálták meg, és a minták 3%-ában (5/169) találtak nebovírust (Hassine-Zaafrane et al., 2012). E vizsgálatok alapján a nebovírusok molekuláris

prevalenciája a borjak körében 3-10% között változik, és úgy tűnik, hogy jelenléte a hasmenéssel járó kórképekkel összefügghet. Hasmenéses, itatásos borjú bélsár mintájából először sikerült hazánkban a calicivírusok közé tartózó nebovírust kimutatni. A vírus (Bo/M3641/2011/HUN) a filogenetikai elemzés alapján a nebovírusok 4 genetikai csoportja közül az 1. leszármazási vonalbeli, és ezen belül is az Angliában és Olaszországban cirkuláló Newbury-1-szerű genotípushoz hasonlít. Azonban nem kizárt, hogy a jelenlegi ismereteknél a nebovírusok filogenetikai térképe színesebb lehet. Ennek vizsgálatára molekuláris epidemiológiai vizsgálatok lennének szükségesek további európai és hazai szarvasmarha telepeken. A valószínűleg kórokozó nebovírus a hazai szarvasmarha állományokban is jelen lehet, és egyben szerepe lehet az ismeretlen eredetű hasmenéssel járó megbetegedésekben.

Picornavírusok (*Picornaviridae*)

A *Picornaviridae* a legnépesebb ismert víruscsalád. Az új nemzetségek, vírusfajok, geno(szero)típusok száma rohamosan nő. Csak az elmúlt 4 évben 8-ról 17-re emelkedett a picornavírus nemzetségek száma. Az ICTV *Picornaviridae* Study Group nevezéktani szabályai szerint (www.picornastudygroup.com/definitions/genus_definition.htm), más ismérvek mellett (lásd: Anyag és Módszer fejezet), akkor beszélhetünk új picornavírus nemzetségről, ha az új vírus aminosav hasonlósága az ismert picornavírus nemzetségekhez képest a P1, P2 és P3 régiókban kisebb, mint 40-40-50%. Ennek alapján 2013. februárig hivatalosan 12 (*Aphthovírus, Avihepatovírus, Cardiovírus, Entrovírus, Erbovírus, Hepatovírus, Kobuvírus, Parechovírus, Sapelovírus, Senecavírus, Teschovírus* és *Tremovírus*) (Knowles et al., 2012), 2013. februártól további 5 (*Aquamavírus, Dicipivírus, Cosavírus, Megrivírus* és *Salivírus*) picornavírus nemzetség került elfogadásra (http://www.picornaviridae.com/).

● Vizsgálatainkkal először sikerült a PEV-B (2013. februártól Enterovírus G) vírusfajon belül (*Enterovírus* nemzetség) porcine enterovírust vaddisznókból, illetve hazánkban (Közép-Európában) porcine enterovírust sertésekből kimutatni. A porcine enterovírusokat a humán enterovírusok 5'UTR régiójára tervezett primerekkel a 2-8 hetes életkor közötti házi- és vadmalacokból nagy arányban lehetett kimutatni. Ez utalhat arra, hogy az állatok a porcine enterovírusokkal születést követően gyorsan átfertőződnek, a fertőzési ciklus 3-8 hétnél rövidebb ideig tarthat, hisz az ugyanazon telepről származó idősebb házi sertésekből a vírust már nem lehetett kimutatni. Az egy környezetben élő fertőzött állatokból, nagymértékben hasonló vírust találtunk, mely a porcine enterovírus endémiás jelenlétére utal. A tünetmentes, de fertőzött sertések vérszérumából a vírus nem volt kimutatható. A porcine enterovírus vaddisznókban való jelenléte azt jelenti, hogy a vaddisznók is e vírus rezervoárjai lehetnek. A PEV-B (Enterovírus G) vírusfajon belül jelenleg csak négy teljes genommal rendelkező porcine enterovírus érhető el a GenBankban. Ez a PEV9 (UKG410/73, Enterovírus G1), a PEV10 (LP 54/UK/75, Enterovírus G2), a K23/2008/HUN (Enterovírus G3) és a WBD/2011/HUN (Enterovírus G4). A jelenlegi ICTV szabályok szerint, akkor beszélhetünk új enterovírus geno(szero)típusról, ha a VP1 régióban az enterovírus nt/aa különbsége az ismert geno(szero)típustól 25/12%-ot meghaladja. Mivel ez mindkét hazai vírus, a K23/2008/HUN és a WBD/2011/HUN esetén teljesül, az ICTV *Picornaviridae* Study Group PEV14 (Enterovírus G3) és a PEV15 (Enterovírus G4) néven új geno(szero)típusoknak fogadta el őket.

● A fajon belüli (intraspecies) rekombináció az enterovírusok körében jól ismert. Azonban először sikerült az enterovírusok körében egy állati interspecies (állatfajok közötti) természetes rekombináns enterovírust azonosítani és teljes genom szekvenciáját meghatározni. Az ovine enterovírus 1 (OEV-1) egy bovine/porcine enterovírus rekombináns, melyet viszonylag magas százalékban, mindkét vizsgált évben sikerül bárányokból

kimutatnunk, jelezve a vírus endémiás cirkulációját és „életképességét” (evolúciós előnyét) juhokban. A rekombináció eredete, kialakulása, és a porcine/bovine/ovine enterovírusok (esetleg más jelenleg nem ismert enterovírusok) egymáshoz való viszonya tisztázásra vár. Érdekességként megemlíthető egy 2011-es közlemény, melyben PEV és BEV enterovírusokat (külön-külön) sikerült újszülöttkori bárány (!) vesesejtben (FLK-N3) in vitro tenyészteni (Matsuura et al., 2011), mely abba az irányba mutat, hogy a juhokban BEV és PEV (így akár társfertőzés során is) eredményes lehet. Azaz a juhokban alakulhatott ki a rekombináns ovine enterovírus. A rekombináció meglétét számos kísérlettel erősítettük meg, illetve az esetleges „artefact” eredetét több kísérlettel zártuk ki (Boros et al., 2012). A rekombináns ovine enterovírus egy jó példa arra, hogy a picornavírusok kódoló és nem kódoló régiói modulárisak, és ezeknek a genom régióknak az evolúciója egymástól független lehet. Egyben ez azt is jelenti, hogy egy picornavírus megfelelő leírása nem képzelhető el a vírus teljes genomjának meghatározása nélkül. Ellenkező esetben, attól függően, hogy milyen régiót vizsgálunk fals negatív eredményt („misidentification”), téves osztályozást („misclassification”) és téves következtetést („misinterpretation”) vonhatunk le a vírusunk eredetére, természetére vonatkozóan. A hivatalos taxonómiai besorolás alapján jelenleg az OEV-1 „sertés” enterovírus (PEV-B, Enterovírus G a kódoló régió alapján), annak egy új geno-/szerotípus típusa (Enterovírus G5). De az OEV-1 rekombináns volta a PEV, BEV és OEV taxonómia felülvizsgálatát eredményezheti (Nick Knowles, személyes közlés).

- A rekombináns EV-C109-et (*Enterovírus* nemzetség) először sikerült Európában kimutatni méghozzá archivált nasopharyngeális mintából, mely 1 évvel korábbról származik, mint a prototípus nicaraguai vírus. Az ismeretlen eredetű gyermekkori légúti fertőzések 1,6% és 1,1% köthető Nicaraguában (Yozwiak et al., 2010) és hazánkban az EV-C109-hez, azaz kb. minden 100. ilyen eset, jelezve, hogy a vírus kóroki szerepet játszhat e fertőzésekben és esetleg alsó légúti fertőzést, pneumóniát is okozhat (bakteriális kórokozót, vagy más virális

ágenset a mintából nem sikerült kimutatni). Célszerűnek látszik, hogy a molekuláris epidemiológiai vizsgálatokban (és esetleg később, a klinikai virológiai diagnosztikában is) gondoljunk az EV-C109 kóroki szerepére és keressük molekuláris módszerekkel a jelenlétét.

- A hepatitis A vírus (HAV) különlegessége éppen az, hogy már hosszú ideje ismerjük a klinikumát, megfelelő szerológiai módszerekkel rendelkezünk a fertőzés laboratóriumi kimutatásához (mely már a molekuláris éra előtt is elérhető volt!), és oltóanyag is rendelkezésre áll a hatékony megelőzéshez. Elvileg tehát megoldott kérdésről van szó. Talán éppen ezért nem fordítottak kellő figyelmet a hepatitis A vírus molekuláris epidemiológiai vizsgálatára, genomjának elemzésére és az összefüggések feltárására. Reprezentatív vizsgálatainkkal 2003 és 2013 között betekintést nyertünk a szórványos, járványos és importált hepatitis A vírus okozta megbetegedések hazai molekuláris epidemiológiájába. Minden esetben a HAV I-es genotípusát lehetett azonosítani; ezen belül azonban az IA és az IB genotípus egyaránt kimutatható volt. A vizsgálatok bizonyítják egy IA genotípusú HAV észak-kelet magyarországi endémiás jelenlétét, mely időről-időre járványokat is okoz a térségben, illetve szóródással az ország más részén is. Ettől jól elkülöníthetők az importált esetek. Különösen az IB genotípusú HAV-ok között jellegzetesen elkülöníthető vonalat képviselnek az Egyiptomból, turisták által importált megbetegedések. E csoport Egyiptomra (Földközi-tengerre?) jellegzetes vírusai Európa más országai (Franciaország, Németország stb.) turistáinak megbetegedéseiből is rendszeresen kimutatásra kerülnek, nem ritkán járványok okozóiként (Frank et al., 2007). A prospektív molekuláris vizsgálatainkkal az is leírhatóvá vált, hogy szórványos (importált) hepatitis A fertőzésből hogyan alakulhat ki előbb egy közösséget érintő járvány, majd hogy hogyan válik a vírus egy adott földrajzi régióban (3 megyében) endémiássá. Bár az „Istvándi” néven elhíresült hepatitis A járvány már július elején felismerésre került, a fertőzéseket nem sikerült lokalizálni. Ennek legfontosabb okai a következők lehettek: a hepatitis A vírus-fertőzés hosszú inkubációs ideje

miatt az első beteg felismerésekor a járványügyi intézkedés már - minimum az inkubációs időnek megfelelő - 30 napos késésben volt/van; a fertőzések kisebbik része jár csak klinikai tünetekkel; egy tünetet mutató betegre 3-11 tünetmentes, de vírust ürítő jut; a fertőzések 3 megyét érintették, a megyei járványügyi osztályok csak az ellátási területüknek megfelelő exponált személyeket látták el, az esetek közötti kapcsolat a vírus genetikai azonossága alapján járványügyi osztályok számára csak később vált egyértelművé; a passzív oltás alkalmazása sok esetben már későn, az inkubációs idő végén történt; illetve Istvándiban a rendkívül rossz szociális és higiénés környezetben a klasszikus járványügyi intézkedések csak korlátozott mértékben lehettek hatásosak. A Dél-Dunántúlon lezajlott hepatitis A vírus-fertőzés további, nemzetközi következményére is ki kell térni. A járványban érintett lakosságból ebben az időben Svédországba emigráltak, másrészt a fertőzések közvetlenül a horvát határ menti településeken élőket is érintették. Jól működő járványügyi rendszer alapja a megelőzés, ezért a járványügyi információk időbeni megosztása a hazai járványügyi szervek mellett a szomszédos, illetve az érintett országok járványügyi szerveivel is szükséges (lenne) mind informális, mind hivatalos megkeresés és tájékoztatás útján. Ezen kívül is számos tanulság volt levonható a járványból. A megelőzés érdekében az aktív oltóanyag alkalmazását szorgalmaztuk, mely - véleményünk szerint - ma a járandó út. Kérdésként csak az elsődlegesen védendő populáció nagysága merülhet fel. Ez lehet a populáció egészének immunizálása (életkorhoz kötött kötelező oltás, mint például 1999 óta Spanyolországban, részben az USA-ban) vagy csak a rizikócsoportok (rossz szociális és higiénés környezetben élők, olyan területeken élők, ahol az incidencia az országos átlag felett van) előzetes immunizálása, vagy már megerősített fertőzést követően a szélesen vett exponált személyek azonnali aktív védelme. Az utóbbi eljárás nem költség-hatékony (Fiore et al., 2006). A passzív oltóanyag elsődleges szerepét a megelőzésben nem tartottuk megfelelőnek, sőt, a késve adott immunglobulin adása hamis biztonságérzetet kelt és maszkírozhatja a fertőzést, a

megbetegedést, így e személyek a fertőzések további forrásai lehetnek. Néhány hét múlva pedig a passzív oltásban részesült nagyrizikójú személy ismételten teljes mértékben fogékonnyá válik a fertőzésre. A passzív és aktív oltás koncepció nélküli kombinált alkalmazásának pedig egymást gyengítő hatása is lehet (Fiore et al., 2006).

A költség-hatékonyság szempontjából, ha a populációban a HAV szeropozitívok aránya 45% alá csökken, az aktív oltóanyag általános bevezetését javasolják (Rajan et al., 2000). Magyarországon, a legutolsó felmérés szerint, a véradók körében 20% alá csökkent ez az arány (Pohl et al., 2001). Az USA-ban 1999-től, a rizikócsoportok (ahol az incidencia 9-14,5/100000 fő feletti – a populáció 40%-a!) aktív oltását követően 2004-re 79%-kal csökkent a HAV incidenciája az 1992-es legalacsonyabb természetes incidencia-értékhez képest (Fiore et al., 2006). Az aktív oltóanyag már elérhető a 12-23 hónapos kisgyermekek részére is. Számításunk szerint a dél-dunántúli HAV járvány minimális, közvetlen egészségügyi költségei (kórházi kezelés, laboratóriumi vizsgálatok, járványügyi intézkedések az aktív oltások nélkül) – akkori értéken számítva - elérték a 15-20 millió forintot, mely megegyezik 1800-2400 fő teljes, két dózisból álló, előre tervezett aktív HAV immunizálásának árával. A WHO javaslata az, hogy az európai országokban 2015-ig kerüljön be a HAV oltás a gyermekkori oltási rendbe (McMurrow, 2006). Talán nem tévedünk, ha munkánk hatására is 2009-ben az aktív HAV oltás bekerült járványügyi munka első vonalába, így a hepatitis A megbetegedés előfordulása esetén legalább a beteg környezetéhez tartozó személyek meghatározott köre 2009-től aktív immunizálásban részesíthető (Epinfo, 2009). Csak bízhatunk abban, hogy az egészségügyért felelős mindenkori döntéshozók is figyelembe veszik a megfigyeléseket, javaslatokat, és sikerül a járványügyi „események” rövidtávú kezelése helyett a megelőzés hosszú távú, elsődleges lehetőségeivel élni.

A dél-dunántúli HAV járványban megbetegedettek átlagéletkora jól illeszkedik az egyenlítőtől a sarkkörökig terjedő földrajzi régiók, illetve a fejlődő országoktól a fejlett

országok irányában tapasztalható életkori sajátosságokhoz. A trópusi fejlődő országokhoz képest az átlagéletkor magasabb, de az észak-európai országokhoz képest alacsonyabb volt. A HAV-fertőződés magasabb életkor felé tolódása a tünetekkel járó és súlyosabb lefolyású fertőzések arányának emelkedését okozza. Az életkorral előrehaladva gyakoribb a súlyos megbetegedés, elsősorban a májat érintő alapbetegségek miatt. Így a hazai letalitás értéke (0,87%) is beilleszthető az átlagéletkort meghatározó földrajzi és fejlettségbeli eloszlásba.

Nem endémiás vidéken ma már kevés HAV megbetegedéssel találkoznak a gyakorló orvosok. A klasszikus sárgaság pedig a dél-dunántúli járvány során is csak a felderített esetek közel felénél fordult elő. A járvány során – különösen az első beteg jelentkezésekor – a betegség klinikai felismerése az anamnézis és a klinikai tünetek helyes értelmezése alapján nagy fontosságú. A járványban a betegek jelentős részének igen enyhe és aspecifikus tünetei voltak. Járványmentes időszakban sokuk valószínűleg nem fordult volna orvoshoz, illetve a háziorvos is jóval kisebb arányban utalta volna őket kórházba. A felismerés ezért is fontos, és nem maradhat el az eset azonnali bejelentése a járványügyi hatóságnak, hisz a késlekedés alapvetően határozhatja meg a járvány további menetét.

Hepatitis A járvány bárhol és bármikor kialakulhat hazánkban. Nagy az esély élelmiszer vagy víz közvetítette járvány kitörésére, és a példánk alapján a szórványos (endémiás vagy importált) esetből kiinduló, közvetlen kontaktussal terjesztett járvány kialakulására is. Új fejlemény, hogy Nyugat-Európa után 2012-ben hazánkban is megjelent homoszexuális közösségek (MSM) körében a HAV, mint új kockázati tényező. A feltehetőleg 2011. decemberében Hollandiából behurcolt, szekvenciájában 100%-ban egyező HAV (a vírus „Budapest-2012” néven a 32. ábrán látható) budapesti „meleg” szaunák és bárok látogatói körében indult 2012. márciusában (és hasonlóan Franciaországban) (még nem publikált adatok), majd erőteljesen szóródott a fogékony budapesti és hazai populációban

(Epinfo, 2013). A vírus IA genotípusú, mely azonban nukleotid sorrendjében, a hazánkban eddig talált vírusoktól különbözik.

A molekuláris genetikai vizsgálatok új eszközt adnak a járványügyi szakemberek kezébe a járványügyi, közegészségügyi munkában. A molekuláris epidemiológiai eredmények értelmezésével olyan összefüggések is feltárásra kerülhetnek, melyek a hagyományos epidemiológiai módszerekkel eddig rejtve maradtak. Véleményünk szerint hepatitis A fertőzést vagy járványt molekuláris genetikai vizsgálatok nélkül nem lenne szabad lezárni. Az aktív oltóanyag használatának elsődleges szerepet kellene kapnia a fertőzés, a megbetegedés megelőzésében, mely lehetőséget adhat az endémiás hepatitis A fertőzés felszámolására.

● A *Kobuvírus* nemzetségen belül is növekszik a potenciálisan új vírusfajok száma, illetve azon állatok száma, melyek potenciálisan a kobuvírusok gazdafajának tekinthetők. Sőt egyre valószínűbb, hogy az 1989-ben felfedezett, majd 2006-ig periférikusan kezelt kobuvírusok és a prototípus Aichi vírus tagjai világszerte elterjedtek és igen népes lehet a gazdafaj spektrumuk. A kobuvírusok kikerültek az „egzotikus” csak Ázsiára korlátozódó, kagylófogyasztáshoz kötődő fertőzések kategóriájából. Bár a szórványos emberi gastroenteritisekben csak 0,9-2,2%-ban lehet Aichi vírust kimutatni RT-PCR módszerrel (Yamashita et al., 1995; Ambert-Balay et al., 2008), - a vizsgálataink alapján nálunk 1,5% - ban – de a vírussal gyakorlatilag mindenki találkozik. A szeroepidemiológiai vizsgálatok alapján 30-40 éves életkorra már 80-95%-os szeropozitivitás figyelhető meg a legkülönbözőbb emberi populációkban (Yamashita et al., 1993; Oh et al., 2006; Goyer et al., 2008). Ez az eddig nem feloldott ellentmondás – azaz az alacsony kimutatási arány a gastroenteritisekben magas szeropozitivitás mellett – elméletileg többféleképpen magyarázható. Talán az Aichi vírusfertőzés többnyire tünetmentesen, vagy enyhe tünetekkel zajlik, vagy a fertőzés ugyan tünetekkel jár, de a vezető tünet nem a gastroenteritis és más kórképekhez társulva kellene a vírust keresni. Hogy a kobuvírusokról alkotott képünk koránt

sem teljes, azt jól bizonyítja, hogy a 2011-ben kutyában (Li et al., 2011a; Kapoor et al., 2011) és egérben (Phan et al., 2011) talált kobuvírusok az Aichi vírushoz nagyon közeli rokonságot mutatnak (gyakorlatilag nagymértékű genetikai egyezőséget), mely az első bizonyíték lehet arra a feltételezésre (Reuter et al., 2011), hogy itt valójában egy faji határokat átlépő - ember esetében zoonótikus – fertőzésről is szó lehet. Vizsgálatainkkal az Aichi vírus (ember), a bovine kobuvírus (szarvasmarha) első hazai, illetve utóbbi esetében európai kimutatása mellett, bovine kobuvírust mutattunk ki juhokban. Sertésekből (házi sertés és vaddisznó) egy új kobuvírus fajt (a porcine kobuvírust) sikerült azonosítanunk és genomját meghatároznunk. A 2012. közepéig megismert kobuvírusokat a 14. táblázat foglalja össze.

gazdafaj	kobuvírus faj	prototípus	a kimutatás helye időrendben	Irodalom
Humán (*Homo sapiens*)	*Aichi vírus* (***Aichivírus A***)	A846/88 (AB040749)	Japán Németország, Brazília Banglades, Thaiföld, Vietnám Franciaország Tunézia Magyarország Kína Finnország	Yamashita *et al*., 1991, 1993 Oh *et al*., 2006 Pham *et al*., 2007 Ambert-Balay *et al*., 2008 Sdiri-Loulizi *et al*., 2008 Reuter *et al*., 2009a Yang *et al*., 2009 Kaikkonen *et al*., 2010
Kutya (*Canis familiaris*)	(Canine kobuvírus?)	AN211D/USA (JN387133) US-PC0082/USA (JN088541)	USA USA	Li et al., 2011a Kapoor et al., 2011
Egér (*Peromyscus crinitus*)	(Murine kobuvírus?)	M-5/USA/2010 (JF755427)	USA	Phan et al., 2011
Szarvasmarha (*Bos taurus*)	*bovine kobuvírus* (***Aichivírus B***)	U-1 (AB084788)	Japán Thaiföld Magyarország Belgium	Yamashita *et al*., 2003 Khamrin *et al*., 2008 Reuter *et al*., 2009b Mauroy *et al*., 2009
Juh (*Ovis aries*)	hasonló a *bovine kobuvírus*-hoz	TB3-HUN (GU245693)	Magyarország	Reuter *et al*., 2010a
Sertés (*Sus scrofa domestica*) Vaddisznó (*Sus scrofa*)	*porcine kobuvírus* (***Aichivírus C***)	S-1-HUN (EU787450) WB1-HUN (JX177612)	Magyarország Kína Thaiföld Japán Dél-Korea Magyarország	Reuter *et al*., 2008, 2009c, 2010b Yu *et al*., 2009 Khamrin *et al*., 2009 Khamrin *et al*., 2010 Park *et al*. 2010 Reuter et al., 2013
	részleges 3D szekvencia; hasonló a *bovine kobuvírus*-hoz	H023/2009/JP (HM01065)	Japán	Khamrin *et al*., 2010
Denevér?	"bat kobu-szerű vírus" (részleges szekvencia)	TM001k (HM228881)	USA	Li *et al*., 2010

14. táblázat. Kobuvírusok az első kimutatások sorrendjében az eddig ismert/lehetséges gazdafajokban 2012 közepéig.

A porcine kobuvírus endémiásan jelen van a sertésfarmokban, és a vírus a fécesszel ürül. Ugyanakkor először sikerült kobuvírus RNS-t (porcine kobuvírus) vérszérumból kimutatni, mely igazolhatja a (passzív vagy aktív) virémia lehetőségét is, illetve növeli a vírus potenciális átviteli útjainak/formáinak számát is. A virémia cáfolhatja Yamashita és munkatársainak feltételezését, hogy a bovine kobuvírust azért sikerült 2003-ban a szövettenyésztő médiumból kimutatniuk, mert az anyagok szarvasmarha fécesszel kontaminálódtak (Yamashita et al., 2003). Sokkal inkább valószínű, hogy a virémia folytán a borjúsavó eleve tartalmazta a kobuvírust. A porcine kobuvírus kórokozó képessége azonban jelenleg nem ismert. Jelentős eredménynek tekinthető, hogy a porcine kobuvírus példáján az első esetben sikerült a „picornavirológiában" azt leírni, hogy egy vírus nemzetségen belül a vírusfajok eltérő típusú IRES struktúrával rendelkezhetnek. A porcine kobuvírus esetén ez azt jelenti, hogy az IRES szerkezet nem a nemzetségtárs Aichi vírushoz és bovine kobuvírushoz áll közel, hanem az ugyancsak IV-es típusú („*h*epacivírus/*p*estivírus-szerű") IRES-sel rendelkező hepatitis C vírushoz (*Hepacivírus*), pestivírusokhoz (*Flaviviridae*), valamint más nemzetségekbe tartozó picornavírusokhoz (avian encephalomyelitis vírus, duck hepatitis vírus 1, porcine teschovírus, stb.). Ennek jelentőségét talán jelen pillanatban is még alábecsüljük. Pedig ez annak a bizonyítéka lehet, hogy jelen van a különböző vírusnemzetségek, víruscsaládok között is a rekombináció (jelen esetben ez a IV-es típusú IRES-t érinti), melynek az lehet a következménye, hogy a moduláris kódoló és nem kódoló régiók egymástól függetlenül cserélődhetnek és más-más evolúciós órával jellemezhetők. A porcine kobuvírus IRES eddig nem ismert jelenségre mutatott fényt a picornavírusok körében, példává vált, melyet igen rövid időn belül már nem kivételnek, hanem általános jelenségnek valószínűsítenek (Sweeney et al., 2012)! Ez a picornavírusok taxonómia és diagnosztikai problémáinak növekedésén túl új megvilágításba helyezheti a vírusfaj és gazdafaj problémakörét, összefüggéseit is. Pl. milyen típusú picornavírus IRES, mely gazdafajokban

fordul/fordulhat elő? (Megjegyzés: észre kell vennünk, hogy a IV-es típusú IRES-t eddig csak sertés és madár gazdafajokból kimutatott picornavírusokból lehetett azonosítani…). A későbbiekben megbeszélendő hungarovírusokban észlelt nem kódoló és kódoló régiók felépítése ugyancsak előre nem várt kombinációval jellemezhető, támogatva a moduláris régiók elvét.

A porcine (sertés) kobuvírust (*Aichivírus C* néven) az ICTV 2013. februárjában elfogadta a *Kobuvírus* nemzetség harmadik vírusfajának az Aichi vírus (*Aichivírus A*) és a bovine kobuvírus (*Aichivírus B*) mellett.

● A bovine kobuvírust eddig csak Ázsiában (Japán és Thaiföld) mutatták ki (Yamashita et al., 2003; Khamrin et al., 2008). A bovine kobuvírus hazai (európai) kimutatása azt jelzi, hogy a bovine kobuvírus is földrajzilag kiterjedten és általánosan jelen lehet a szarvasmarha állományokban. Ugyanakkor a kóroki szerepe (pl. a gastroenteritisekben) nem egyértelmű. Vizsgálatainkkal először sikerült kobuvírust (bovine kobuvírus) nem az eredetileg leírt gazdaállatból (azaz szarvasmarhából), egyben egy új gazdaállatból, juhokból kimutatni. A bovine kobuvírushoz nagyon hasonló kobuvírus (lényegében azonos faj) kimutatása juhokból több kérdést is felvet. Lehetséges-e, hogy a bovine kobuvírus két állatfajban (szarvasmarha és juh) is jelen van (esetleg mindkettőben kórokozó), vagy az egyik állatban való jelenléte a természetben bekövetkező kontamináció eredménye. Az egy vírusfaj, két gazdaállat felállást támogatja, hogy a bovine kobuvírust magas arányban találtuk meg a klinikailag egészséges juhokban; a juhokban talált bovine kobuvírus jobban eltér az eddig ismert bovine kobuvírusoktól, mint azok egymástól (valójában a juhban talált kobuvírus egy bovine kobuvírus „szublineage”); a két kérődző gazdafaj szoros evolúciós rokonságban van egymással; valamint, hogy a hasonló vírussal való fertőződés lehetősége a két gazdafaj között más vírusokkal (bluetongue vírus; foot-and-mouth vírus; adenovírus, ovine herpesvírus 2-es típus) ismert (Thiry, 2007). (Talán nem véletlen adalék a juhok „olvasztótégely” szerepére a

rekombináns ovine enterovírus is.) Ugyanakkor a természetes fekális-orális kontaminációt és a passzív vírusürítést sem lehet kizárni, hisz a vizsgált juh farm mellett szarvasmarha telep is működik. Ez tovább bonyolítja azt a kérdést, hogy az egyes kobuvírus fajok valójában milyen széles gazdafaj spektrummal rendelkeznek. Hasonló tartási körülmények között kimutattak bovine kobuvírus szekvenciát sertésben is (Khamrin et al., 2010).

- Jelenleg nagyon kevés humán parechovírus (HPeV) részleges vagy teljes szekvenciáját ismerjük. A 16 prototípusból is csak 8 (HPeV1-8) szekvencia érhető el nyilvánosan. Retrospektív molekuláris vizsgálatokkal sikerült bizonyítani a humán parechovírusok (HPeV1 és HPeV4) hazai jelenlétét „enterovírus”-szerű cytopathiás hatást mutató, 1990 és 2004 között archivált szövetkultúrákból. Az elmúlt évtizedekben valószínűleg sokszor kerülhetett arra sor, hogy vírusizolálás során a HPeV-ok az „enterovírus”-szerű sejtkárosító hatást mutató vírusok nagy kalapjába kerültek, és mélyebb elemzés hiányában nem kerültek elkülönítésre, felismerésre. Tekintettel arra, hogy a tenyésztéses módszerek jóval kevésbé érzékenyek, mint a molekuláris módszerek, és függenek a HPeV típusától (Benschop et al., 2008a/b) is, a valódi prevalenciát és genotípus eloszlást az eredményekből nem lehet levonni. Viszont a relatíve hosszú vizsgált időszak (11 év a baranyai minták esetén) lehetőséget ad a domináns HPeV1 genetikai változatainak és/vagy változásának nyomon követésére egy adott földrajzi régióban. Az izolálás éve szerint 3 HPeV1 klasztert lehetett jól elkülöníteni. A vizsgált időszak hossza és a klaszterek nukleotid szekvenciáinak összehasonlítása alapján valószínűbb, hogy a HPeV1 evolúcióját (genetikai drift) sikerült észlelni az adott klaszterbe tartozó vírusok járványos fellobbanásával. Vizsgálatunkban bizonyítható a HPeV-ok szerepe a gyermekkori gastroenteritises megbetegedésekben és a központi idegrendszert érintő kórképekben. Irodalmi ritkaságként eddig összesen 3 eset ismert, amikor 10 éves életkor felett mutatták ki a HPeV-t (Harvala et al., 2009a). Az ismert életkori kockázati csoporton kívüli két, 24 és 42 éves, tüneteket mutató

betegünk HPeV-fertőzöttsége figyelemre méltó észlelet, jelezheti, hogy az életkori határ nem merev. Bizonyításra vár a HPeV kóroki szerepe a „stomatitis aphthosa”-szerű kórképekben is. Minden bizonnyal a HPeV-ok okozta klinikai kórképek spektruma még nem tejesen ismert. Azonban már a meglévő ismeretek is elégségesek ahhoz, hogy a HPeV-okhoz kapcsolható megbetegedések – különösen a súlyos lefolyású kórképek - bekerüljenek a klinikusok (elsősorban az újszülött-, csecsemő- és gyermekorvosok) gondolkodásába és szükség/gyanú esetén legyenek elérhetők a klinikai laboratóriumi és járványügyi laboratóriumi diagnosztikai módszerek is.

● Először sikerült porcine teschovírust (PTV) a házi sertésen kívül, egészséges vadmalacokban kimutatni és teljes genomját meghatározni. A PTV endémiásan jelen lehet vaddisznókban is. A vaddisznókból kimutatott PTV a PTV-9-es szerotípushoz áll a legközelebb, melyet – érdekes módon - eddig csak egyszer írtak le házi sertésből 1994-ben (Auerbach et al., 1994). A vaddisznóból azonosított PTV azonban a PTV-9-el is csak távoli rokonságban van, ezért valószínűsíthető, hogy új szerotípusról (PTV-13) van szó. A jelenleg a házi sertésekben ismert PTV szerotípusoktól minden bizonnyal különböző PTV kimutatása éppen arra hívja fel a figyelmet, hogy a teschovírusokat sem ismerjük eléggé. A házi sertésekre potenciálisan veszélyt jelentő további PTV szerotípusok is cirkulálhatnak például vaddisznókban. A vaddisznók könnyen lépik át az országhatárokat, közvetlen kapcsolatba kerülhetnek fogékony házi sertésekkel és - a HEV, FMDV, SVDV stb. (Meng et al., 2009) mellett - a PTV-ok (egyik?) potenciális rezervoárjai is lehetnek. Többek között ezért is szükséges figyelmet szentelni a cirkuláló vírusok valódi sokszínűségének felderítésére, időbeni azonosítására a vadvilágban is, hogy epidemiológiai alapinformációhoz jussunk az esetlegesen felbukkanó kórokozó időbeni megelőzésére.

● A madarak - a korábban feltételezetteknél - talán potenciálisan fontosabb szereplők a fertőző betegségek terjesztésében. Az evolúciós eredetük (a dinoszauruszok

leszármazottainak tekinthetők), elterjedtségük, faji gazdagságuk (több mint 10000 madárfaj ismert), kiterjedt, kontinenseket érintő vándorlásuk és az, hogy számtalan fajuk szoros közelségben él más állatokkal és az emberekkel az ismert és eddig ismeretlen vírusok (és általában a mikrobák) ideális rezervoárjává és terjesztő forrásává teszik őket, melyet érdemes mélyebben tanulmányozni. Ezzel szemben meglepően kevés, összesen 8 picornavírust ismertünk madarakban, azokat is elsősorban házi kacsákból mutatták ki. Ezek az avian encephalomyelitis vírus (*Tremovírus* genus) (Marvil et al., 1999), az avian sapelovírus (korábban duck picornavírus TW90A, *Sapelovírus* genus) (Tseng et al., 2007) és a duck hepatitis A vírus (*Avihepatovírus* genus) (Kim et al., 2006). Ezen kívül a közelmúltban 2 különböző turdivírust azonosítottak rigókban (*Turdidae* madárcsalád) (Woo et al., 2010), a turkey hepatitis vírust pulykákban (Honkavuori et al., 2011) és két pigeon (galamb) picornavírust (A és B) galambokban (Kofstad et al., 2011), melyek többsége az eddigi picornavírus nemzetségekbe nem besorolható. Ennek alapján várható, hogy további picornavírusokat lehet majd madarakból kimutatni, de az nem, hogy ezt a kobuvírusokra tervezett primerekkel is sikerül elérni, mint például esetünkben fürjekből. A legnagyobb eltérések a picornavírus genomok között az 5’UTR, a 3’UTR, az L-protein és a 2A fehérjék között tapasztalható, mely a quail picornavírus esetén is jellemző. A quail picornavírus 5’UTR bár a IV-es típusú (*h*epacivírus/*p*estivírus-szerű) HP IRES-sel jellemezhető jelentős szerkezeti eltéréseket és új, konzervatív motívumokat találtunk az RNS-ben és a lehetséges másodlagos szerkezetében. A IV-es típusú IRES-hez képes jelentősen hosszabb a III-as domén. E struktúra fontosságát alátámasztja, hogy a csúcsi/apikális részén egy 20 nt-ból álló konzervatív szekvenciát találtunk, mely másodlagos szerkezete egy ”8”-ast formáz. A 20 nt-ból álló szekvencia fontosságát pedig az jelzi, hogy összehasonlítva további 4 picornavírus 5’UTR régiójában is megtaláltuk, melyek közül 4-et madarakból (kacsa, pulyka, galamb és fürj) mutattak ki (az ötödik a seal picornavírus). Annak ellenére, hogy ezek a „madár eredetű”

picornavírusok akár 4 különböző picornavírus nemzetségbe tartozhatnak, mégis mindegyik 5'UTR régiójában megtalálható ez a 20 nt hosszú konzervatív szakasz. Talán nem elhamarkodott feltételezés, hogy e valójában ismeretlen funkciójú, konzervatív szekvenciasornak fontos szerepe lehet egyes „avian-eredetű" picornavírusok transzlációjában. Az L-protein ugyancsak egyedi a quail picornavírus esetén. Különböző hosszúságú L-protein található az aphthovírusok, cardiovírusok, erbovírusok, kobuvírusok, sapelovírusok, senecavírusok és teschovírusok esetében. Szerepük többnyire nem ismert, ha igen, eltérő funkció kapcsolható az egyes picornavírusok esetében (Racaniello, 2007). Öt cystein-gazdag régiót és ismétlődő szekvenciát találtunk a quail picornavírus L-proteinben. Analógiák alapján, mind a cystein (C)-histidin (H) katalítikus aminosav pár, mely a foot-and-mouth disease vírus L-proteinben egy papain-szerű thiol proteáz aktív központja (autokatalítikus proteolítikus aktivitása van) (Gorbalenya et al., 1991), mind potenciálisan egy az encephalomyocarditis vírus L-proteinben levő, transzlációban szerepet játszó cink-kötő fehérjedomén (C-H-C-C) (Chen et al., 1995) megtalálható/felismerhető a quail picornavírusban. Ez a komplex szerkezet/funkció az L-proteinben az egyik lehetséges magyarázat arra, hogy 2A fehérje (melynek ugyancsak szerepe van a proteolítikus fehérje hasításokban és/vagy az RNS replikációban más picornavírusoknál) a quail picornavírus esetén igen rövid, csak 11 aminosav hosszúságú. (A picornavírusoknál 9 és 305 aminosav között van a 2A fehérje hossza). A 2A protein szerepét a quail picornavírus esetén nem sikerült meghatározni. Az ICTV szabályokat figyelembe véve a quail picornavírus vírusfaj, és a határán áll egy elkülöníthető picornavírus nemzetségnek (taxonómiai besorolása folyamatban). Bár a filogenetikai elemzéssel a quail picornavírussal egyidőben leírt 2 galamb picornavírus (a pigeon picornavírus A és B) rokonságot mutat (43. ábra), de a P1, P2 és P3 régióban az egymáshoz való aminosav azonossága csak 34-35-43%. A házi fürj tenyésztett állat, mind a húsa, mind a tojása megtalálható kereskedelmi forgalomban is, közvetlen emberi

fogyasztásra kerül. Nagyon valószínű, hogy számos, jelenleg még nem ismert további picornavírus cirkulál madarakban; akár elképzelhető „avian” eredetű picornavírus csoport(ok) létezése is. Az mindenesetre figyelemre méltó, hogy a fürj és galamb picornavírus filogenetikailag rokonságot mutat az *Enterovírus* és a *Sapelovírus* nemzetségekkel, előbbiben igen fontos humán kórokozókkal. Hogy a quail picornavírusnak van-e zoonótikus potenciálja jelenleg nyitott kérdés, mint ahogy nem ismert a vírus biológiája, földrajzi és faji elterjedtsége, pathogenezise és klinikai szerepe sem a természetben.

- Virális metagenomika és pyroszekvenálás módszereivel egy új picornavírus fajt sikerült nagyüzemi körülmények között tenyészetett pulykákban azonosítani, majd a teljes genom szekvenciáját és az 5’ UTR másodlagos szerkezetét meghatározni. A turkey (pulyka) picornavírus a P3 és 3’UTR régiókban magas nt azonosságot mutatott az ezzel egyidőben csirkékből és pulykákból az Egyesült Államokban kimutatott részleges szekvenciákkal (3219 nt illetve 1020 nt), melyet Farkas és mtsai „gallivirus”-nak kereszteltek el (Farkas et al., 2012). Feltételezzük, hogy ugyanarról az új picornavírus faj kimutatásáról lehet szó a két kontinensen. A turkey/M176/2011/HUN teljes genomjának szekvencia és filogenetikai elemzése alapján a legközelebbi rokon, a 2010-ben, rigókban kimutatott (Woo et al., 2010), jelenleg nemzetségbeli besorolás nélküli, turdivírus 1. Ugyanakkor, ez a rokonság igen távoli, az ICTV *Picornaviridae* Study Group definíciója szerint a turkey (pulyka) picornavírus („gallivírus”) egy új picornavírus nemzetség - egy újabb avian eredetű picornavírus - első képviselője lehet. Az új picornavírus nemzetség végleges elismerése „Gallivírus” néven folyamatban van. A vírusgenom 5’UTR IRES-ének másodlagos szerkezete a II-es típusú picornavírus IRES szerkezetére hasonlít. A *Cardiovírus* nemzetségbe tartozó encephalomyocarditis vírussal (EMCV) összehasonlítva számos rokon szerkezet, konzervatív nt motívum és transzkripciós faktor kötőhely ismerhető fel benne, melyből talán e vírusok közös transzkripciós faktor (eIF4G/eIF4A, ITAFs: PTB) (Yu et al., 2011) használatára és

transzlációs mechanizmusára következtethetünk. Ugyanakkor a cardiovírusokban a C és D domén közötti 80 és 250 nt hosszú poly(C) cytidine traktus (Racaniello, 2007) – melynek hossza a virulenciával is kapcsolatban van - a turkey (pulyka) picornavírusban nincs jelen. Madár (avian) eredetű picornavírusból a II-es típusú IRES-t még nem azonosították. A turkey/M176/2011/HUN 3'UTR másodlagos szerkezetének vizsgálata ugyancsak érdekes megfigyelésre vezetett. A 3'UTR másodlagos szerkezete többszörös hajtűkanyarokkal („stem-loops") jellemezhető, melyek közül egy 48 nt hosszú „súlyzó-szerű" alakot mutató szakasz kiemelendő. Az összehasonlító vizsgálatok alapján ez a struktúra két másik picornavírus nemzetség tagjainak 3'UTR régiójában is felismerhető, és a nukleotid sorrendjeik - különösen a „súlyzó-szerű" forma alsó hurkának nukleotidja - egymással jól megfeleltethetők. Bár a funkcióját nem ismerjük, de az hogy e konzervatív motívumok és struktúra több picornavírus nemzetség tagjaiban is jelen van, a fontosságára utal talán e vírusok replikációjában. Ugyancsak kérdés a turkey (pulyka) picornavírus kóroki szerepe is. Vizsgálataink alapján a vírust mind a 8 vizsgált hazai pulyka farmon ki lehetett mutatni. A vírus általános jelenléte az egészséges és különböző tüneteket mutató pulykák fécesz mintájában hazánkban és az Egyesült Államokban (Farkas et al., 2012) jelzi a vírus (valószínűleg világszerte) endémiás jelenétét és cirkulációját a pulyka farmokban. A vírus egészséges pulykákból való kimutathatósága nem jelenti azt, hogy kizárható a vírus kóroki szerepe például a fejlődési visszamaradásban („stunting" szindróma), enterális tünetekkel járó vagy egyéb megbetegedésekben. Hasonló lehet a helyzet ahhoz, ahogy más kórokozó enterális vírusok (turkey astro-, rota- és reovírus) is kimutathatóak egészségesnek látszó pulykákból, baromfiakból is (Pantin-Jackwood et al., 2007; Pantin-Jackwood et al., 2008; Day et al., 2010). Az is elképzelhető, hogy a vírus más kórokozókkal történt társfertőzés esetén játszik szerepet. A turkey (pulyka) picornavírus fertőzés és a kóroki szerepének egyértelmű bizonyítása különböző megbetegedésekben, további részletes vizsgálatokat, állatkísérleteket

igényelnek. Ennek tisztázása azért is fontos, hisz a pulyka emberi fogyasztásra tartott, nagyüzemi tartású, fontos hús-állat. Egyértelmű kóroki tényező esetén gazdasági károkkal is számolhatunk. Természetesen a turkey (pulyka) picornavírus esetén is érvényes, mint újabb felismert madár (avian) eredetű picornavírus, a quail (fürj) picornavírusoknál már megfogalmazottak. A vírus zoonótikus potenciálja, biológiája, földrajzi és faji elterjedtsége, pathogenezise nem ismert és tovább erősíti azt a feltételezést, hogy számtalan, jelenleg még nem ismert madár eredetű picornavírus létezhet házi- és vadon élő madarakban is.

● A kobuvírusok konzervatív régiójára tervezett primerpárral egy új picornavírus nemzetség (eredetileg javasolt név „Hungarovírus”; az ICTV által javasolt konszenzusos név: „Hunnivírus”) két tagját sikerült két háziállatfajban, szarvasmarhában és juhokban kimutatni, majd a teljes genetikai állományaikat meghatározni. A két vírusgenom a VPg+5’UTR$^{IRES-II}$[L/1A-1B-1C-1D-2A$^{NPG\downarrow P}$/2B-2C/3A-3B^{VPg}-3C^{pro}-3D^{pol}]3’UTR-poly(A) képlettel jellemezhető és valószínűleg egy vírusfaj két genotípusáról/szerotípusáról („hunnivirus A1 és A2”) lehet szó. A hungarovírusok érdekessége, hogy genomja a picornavírusok genomjának moduláris felépítésére lehet újabb példa, hisz az 5’UTR szekvenciák és az RNS másodlagos szerkezete a humán parechovírusokra (HPeV, *Parechovírus* nemzetség), a kódoló régió aminosav sorrendje a porcine (sertés) teschovírusokra (PTV, *Teschovírus* nemzetség) hasonlít inkább. Mindkét hungarovírus II-es típusú IRES-sel rendelkezik de az, hogy a hungarovírusok a kódoló régiókban az egyébként IV-es típusú IRES-sel rendelkező porcine teschovírushoz, az 5’UTR IRES régióban a II-es típusú IRES-sel rendelkező humán parechovírus 3-as (HPeV3) típusához hasonlítanak mindenképpen meglepőnek mondható. Az eddig ismert 16 humán parechovírus (illetve az 5’UTR parechovírus genomrész) közül, eddig csak majmokból azonosítottak a HPeV1 és HPeV6 szekvenciákat állatokból, Kínában (Shan et al., 2010). Másrészt, a HPeV3 a humán parechovírusok között több szempontból is „kakukktojásnak” számít. A többi parechovírus típushoz képest feltűnően ritkább a rekombináció körükben

(Benschop et al., 2008b; Benschop et al., 2010), ugyanakkor súlyosabb kórképekkel kapcsoltak: életet veszélyeztető, szepszis-szerű szindrómát és encephalitist is okoznak csecsemőkben (Harvala et al., 2009b). Az hogy a hungarovírusok IRES-e a HPeV3-ok IRES-éhez áll a legközelebb felveti, hogy potenciálisan evolúciós rokonságban állnak egymással és, hogy talán a HPeV3 esetén rekombinációs partnereket könnyebben lehetne a nem-humán picornavírusok körében találni. A hungarovírusok genomjának mozaikos genetikai mintázata azt mutatja, hogy a hungarovírusok, a humán parechovírusok és a porcine teschovírusok (vagy további, eddig még ismeretlen picornavírus felmenők) közeli evolúciós kapcsolatban állnak egymással, és a nem kódoló RNS régió moduláris rekombinációja megtörténhetett közöttük a múltban. Ennek következményei lehetnek a gazdaszervezeti váltás és spektrum. E megfigyelés fényében további vizsgálatok szükségesek a gazdafajok és e három picornavírus nemzetség genetikai sokszínűségének és közös eredetének tanulmányozására, bizonyítására. A klinikailag tünetmentes, 21 napnál fiatalabb szarvasmarhák és juhok a bélsárral ürítették a hungarovírust, azaz e fontos házi állatok a hungarovírus rezervoárjai lehetnek. A gazdafaj spektrum mellett azonban a hungarovírusok kórokozó képessége sem ismert. A hungarovírusokhoz a kódoló régióban legközelebb álló porcine teschovírusok a sertésekben többnyire tünetmentes fertőzést okoznak, és csak ritkán, de akkor jelentős morbiditással és mortalitással járó kórképekkel járhatnak (pl.: teschovírus encephalitis – Teschen betegség) (Alexandersen et al., 2012). Bár a hungarovírusok új picornavírus nemzetséget alkotnak, és így jelentősen eltérnek a már ismer picornavírusoktól, de a moduláris genom, nevezetesen hogy egyes genom részei humán és állategészségügyi szempontból is fontos picornavírusokhoz (HPeV, illetve PTV) hasonlítanak, mindenképpen izgalmas kérdéseket vet fel a virulencia, pathogenitás, sejttropizmus (receptorhasználat) és a fajok közötti lehetséges átlépés területein is. A leggyakrabban alkalmazott Vero sejtkultúrán sejtkárosító hatást, illetve vírusreplikációt nem lehetett kimutatni. További epidemiológiai és molekuláris vizsgálatok

szükségesek a hungarovírusok (azaz „hunnivírusok”) incidenciájának, diverzitásának, biológiájának, földrajzi elterjedtségének és klinikai jelentőségének feltárásához szarvasmarhák, juhok és további fajok körében.

Az elmúlt néhány évben a picornavírusok körében történt jelentős változásokat a 65. ábra foglalja össze. A filogenetikai ábra a 2013. februárjától hivatalos 17 picornavírus nemzetség és a potenciális – de még el nem fogadott - picornavírus nemzetségek (http://www.picornaviridae.com/) filogenetikai elemzését mutatja a Laboratóriumunkban azonosított legfontosabb (köztük nemzetségalkotó) vírusfajok megjelölésével.

65. ábra. A 2013. februártól hivatalos 17 (*dőlt betűk*) és a potenciális – de az ICTV által még el nem fogadott - picornavírus nemzetségek (macskakörmök között) filogenetikai elemzése a P1 régió aminosav sorrendje alapján (neighbor-joining módszer, MEGA5), a Laboratóriumunkban azonosított fontosabb (köztük nemzetségalkotó) vírusfajok megjelölésével (●).

A változások olyan jelentősek, hogy a picornavírusok alap definícióját is érintik! 2012-ig a picornavírusok egyik általános elfogadott közös jellemzője volt, hogy kódolt polyprotein csak egy nyílt leolvasó keretben (ORF) kódolódik. 2012-ben azonban kutyák fécesz mintájából olyan új picornavírus fajt (*Cadicivírus A*, *Dicipivírus* nemzetség) fedeztek fel (65. ábra), melynek genomja a P1 és a P2/P3 régiók között egy IRES-sel rendelkező intergenetikus régiót (IGR) is tartalmaz [VPg+5'UTR^{IRES}[1A-1B-1C-1D]IGR^{IRES}[2A-2B-2C/3A-3B^{VPg}-3C^{pro}-3D^{pol}]3'UTR-poly(A)], így a szerkezeti és nem szerkezeti fehérjék két ORF-ben kódolódnak (Woo et al., 2012). Ez az eddig dicistrovírusokra jellemző tulajdonság tovább növeli az eddig ismert legnépesebb víruscsalád, a picornavírus család sokszínűségét és közelebb vihet minket e vírusok közös evolúciójának megértéséhez.

(Megjegyzés a picornavírusokhoz: a szerzőt az a megtiszteltetés érte 2011-ben, hogy meghívták a Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), *Picornaviridae* Munkacsoportjába (*Picornaviridae* Study Group, PSG): ICTV Member 1590. http://www.ictvonline.org/subcommittee.asp?committee=50)

Hepatitis E vírus (*Hepeviridae*)

● A vizsgálataink bizonyítják a HEV jelenlétét és cirkulációját emberben és egyes állatfajokban hazánkban (Közép-Európában). Az eredmények alapján emberben az ismeretlen eredetű hepatitisek közel 10%-át a HEV okozhatja. Ugyancsak először számoltunk be hazánkban a HEV kimutatásáról házi állattól (sertés) és egyes vadállattól (őz és vaddisznó) származó mintákból. A vírus hazai elterjedtsége, a fertőzött állatok magas aránya, beleértve a humán esetek gyakoriságát is, a HEV endémiás jelenlétét bizonyíthatja az országban.

Az utazáshoz kötött (Indiából importált), 1-es genotípusú humán HEV fertőzésen kívül minden további vírus-szekvencia a HEV 3-as genotípusába tartozott függetlenül attól, hogy emberi vagy állati fertőzésből származott-e. 2-es és 4-es genotípusú HEV-t nem

mutattunk ki. Japánon kívül ez az első alkalom, hogy a vírust őzből (Tei et al., 2003), illetve sorrendben harmadik alkalom, hogy vaddisznóból is sikerült leírni (Tei et al., 2003; Martelli et al., 2008).

A HEV faji határokon keresztüli átvitele állatról-emberre (illetve fordítva) jelenleg az egyik legfontosabb kérdés HEV biológiájával kapcsolatban (Yazaki et al., 2003; Banks et al., 2004; Takahasi et al., 2004; Mizuo et al., 2005; Inoue et al., 2006). A vizsgálataink 6 pontban támogatják a zoonózis lehetőségét: 1. az utazáshoz kapcsolható HEV-fertőzést ki lehetett zárni; 2. magas arányban találtunk HEV fertőzött házi és vadon élő állatokat (állati rezervoár); 3. csak a 3-as genotípusú HEV volt kimutatható az endémiás emberi és az állati fertőzésekből; 4. miközben a 3-as genotípusú „kvázispecies” HEV nagy genetikai diverzitását lehetett felrajzolni, a humán fertőzésekből kimutatott vírusok a sertések vírusaihoz álltak genetikailag a legközelebb; 5. azonos vírusszekvenciát lehetett kimutatni humán és őz fertőzéséből; 6. sertéshúskészítmény és nem kellően hőkezelt sertéshús elfogyasztása volt a HEV fertőzés legvalószínűbb forrása 5 emberi HEV fertőzésnek. Továbbá, a házi és kereskedelmi célú disznóölés/disznóvágás és a közkedvelt „disznótoros” termékek fogyasztása hagyományosan elsősorban a téli hónapokhoz kötött az országban. Az évben két halmozódást észleltünk a fertőzések számában. Lehetséges (a hosszú inkubációs időt is figyelembe véve), hogy az első halmozódás (decemberben) a „frissen” vágott sertésekből készült termékek elfogyasztásához köthető, míg a második csúcs (április-május) a tél végi, új vágás, vagy a nyár közeledte miatt a korábbról megmaradt hústermékek elfogyasztásához köthetőek. Azt is figyelembe kell venni, hogy hepatitis E fertőzést minden szezonban és minden hónapban találtunk. Mindezek azt valószínűsítik, hogy a sertésekkel való kapcsolat (állatgondozás a farmon) és az élelmiszerbiztonsági követelményeknek nem megfelelően elkészített és a nem kellően hőkezelt sertés-húskészítmények (hurka, kolbász, nyers sonka stb.) elfogyasztása a HEV-fertőzések egyik legfontosabb forrásai lehetnek hazánkban.

Meg kell jegyezni, hogy számos anekdota szól arról, hogy a szabadon tartott háztáji házi sertések gyakran közeli – köztük párzási - kapcsolatba kerülhetnek vaddisznókkal. Ebben a helyzetben, lehetőség van a HEV átvitelére fekális-orális, de akár vér útján is. A sertés és a vaddisznókból származó HEV-ok nagy genetikai hasonlósága alátámasztja a vírus természetes átvitelének lehetőségét e két állatfaj között.

Öt pár, egymással potenciálisan összefüggő humán hepatitis E fertőzést lehetett meghatározni. Három pár esetében családtagok voltak érintve, ezekben az esetekben a laboratóriumi diagnózis ELISA módszerrel történt. Két-két esetben a kapcsolatot az azonos vírus-szekvencia jelenti. A klinikai tünetek 3 pár esetében 15 napon belül jelentkeztek. Sajnos anamnesztikus adatok a fertőzések állati eredetéről nem állnak rendelkezésünkre. Bár a közös fertőző forrás (például élelmiszer?) nagyon valószínű, a retrospektív adatgyűjtés néhány év távlatából értelemszerűen nem vezethetett értékelhető eredményre.

A HEV-fertőzés gyakorisága valószínűleg továbbra is alábecsült. Csak a klinikai tüneteket mutató, heveny hepatitisben szenvedő betegeket vizsgáltuk, akiknél HEV IgM típusú ellenanyagot lehetett kimutatni. Ez az ellenanyag típus HEV esetén viszonylag rövid ideig (1 hónap) van jelen a keringésben (Reuter et al., 2006b). A vizsgált populáció 18,4% rendelkezett HEV elleni ellenanyagokkal. Ez a szeropozitivitási arány megegyezik egy dél-baranyai sertésfarmon dolgozók HEV IgG szeropozitivitási arányával (4/27; 14,8%) viszont több, mint a dél-dunántúli hasonló betegcsoporton elvégzett szeropozitivitási vizsgálatunkkal kapott érték (28/264; 10,6%). Statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk négy életkori kategóriában, mely jelezhet eltérő kitettséget (kockázatot) a HEV-fertőzéssel szemben. Elsősorban az idősebb életkor (>50 év) és a férfi nem jelent magasabb rizikót a megbetegedésre. További vizsgálatok szükségesek a pontos rizikó faktor(ok) azonosításához és meghatározásához. Összehasonlításképpen, a vizsgált régióban és időtartam alatt kevesebb

hepatitis A (N=72), mint HEV-fertőzés (N=116) került felismerésre, mely e vírus jelentőségét tovább növeli Dél-Kelet Magyarországon.

A 3-as genotípusú HEV-ok nagy genetikai sokszínűséget (diverzitást) mutatnak. A GenBankban elhelyezett HEV-okkal azonos nukleotid szekvenciát egyik emberi eredetű 3-as genotípusú vírusnál sem találtunk, 6 vírus esetében a rokonság kisebb, mint 95%. A HEV-ok sokszínűsége és a minden bizonnyal az egyes földrajzi régiókra jellemző genetikai vonalaik megléte a jelenleg alkalmazott módszerek érzékenységére is kihathat mind a molekuláris, mind a szerológiai laboratóriumi diagnosztikai módszerek tekintetében (Drobeniuc et al., 2010).

A filogenetikai elemzések szerint a HEV-ok földrajzi régionként (országonként) jól elkülöníthetőek, adott vidékről származó HEV-ok filogenetikailag közeli rokonságban állnak egymással, míg az izolálás eredete (gazdaszervezet) szerint ez az elkülönítés nem tapasztalható. Ez is azt támogatja, hogy a HEV-ok átlépik a faji határokat és a HEV-ok genetikailag egy adott földrajzi régióra jellemzőek. A HEV egy újonnan felismert endémiás kórokozó a fertőzéses eredetű hepatitisek körében hazánkban (is). A házi sertések, és egyes vadon élő állatok a HEV rezervoárjai. A állati közvetlen kontaktus, valamint a nyers vagy nem kellően hőkezelt állati eredetű húskészítményeket tartalmazó élelmiszerek fogyasztása az egyik legvalószínűbb forrása a szórványos HEV fertőzéseknek. A 3-as genotípusú HEV a faji határokat átlépve zoonózissal és élelmiszerek közvetítésével okoz emberi fertőzéseket hazánkban, melynek közvetlen klinikai, közegészségügyi, állategészségügyi és élelmiszerbiztonsági következményei vannak.

Astrovírusok (*Astroviridae*)

● Az elmúlt években már-már úgy tűnt, hogy az emberi astrovírusok jelentőségét és kóroki szerepét sikerült már részleteiben megismernünk. Az első hazai emberi astrovírus járvány is a klasszikus képnek felelt meg, hisz a mindeddig leggyakoribbnak tartott 1-es genotípusú, klasszikus humán astrovírust mutattuk ki klasszikus gastroenteritis kórformából. Az elmúlt három évben azonban több olyan új eredmény született, mely azt sugallja, hogy a tudásunk az astrovírusokkal kapcsolatban korántsem teljes. Ez érinti az astrovírusok sokféleségét, hisz több új, a klasszikus astrovírusoktól eltérő astrovírus fajt (MLB1-HAstV; HAstV-VA1; HMO-HAstV-ok) sikerült emberben kimutatni (Finkbeiner et al., 2008; Finkbeiner et al., 2009; Kapoor et al., 2009). Ezek gyakorisága, jelentősége még nem ismert, hiszen a klasszikus astrovírusok (HAstV1-8) kimutatására eddig alkalmazott eljárásokkal nem azonosíthatók. Ez azt jelenti, hogy emberben akár több astrovírus faj is jelen lehet, mely minden bizonnyal növelheti az astrovírusok jelentőségét a virális gastroenteritisekben. Másrészről megjegyezhető, hogy a gastroenteritisen kívül más kórképekben is szerepe lehet az astrovírusoknak speciális esetekben. 2006-ban egy 28 hónapos gyermek bélbetüremkedéséből (Jakab et al., 2007) klasszikus humán astrovírust, 2010-ben, egy 15 éves agammaglobulinémiában szenvedő gyermek végzetes kimenetelű encephalitiséből az MLB1-HAstV astrovírus kóroki szerepét lehetett igazolni (Quan et al., 2010). A terápiásan előidézett vagy szerzett immunhiányos állapotok pedig hajlamosítanak súlyosabb és hosszabb ideig tartó astrovírus-fertőzésre. Az is figyelemre méltó, hogy az elmúlt három évben nem csak emberben, hanem számos – korábban gazdaként sem ismert – állatfajról derült ki, hogy astrovírusnak, illetve egyszerre több astrovírus fajnak is gazdája lehet. A denevér (Chu et al., 2008; Zhu et al., 2009), pulyka (Fu et al., 2009), oroszlánfóka (Li et al., 2011b) mellett házi sertésben és juhban is további új astrovírus fajokat sikerült azonosítani, vaddisznóból pedig elsőként kimutatni és a teljes genomját meghatározni. Az astrovírus jelen van – endémiásan –

vaddisznókban is, így ezek az állatok is lehetnek az astrovírus rezervoárjai. 1980 és 2011 között 1, 2011-től jelenleg már öt – egymástól jelentősen különböző - astrovírus fajt (PAstV1-5) ismerünk házi sertésekben, valamint kettőt juhokból. Érdemes külön megjegyezni, hogy az újonnan leírt 5-ös típusú sertés astrovírus (Shan et al., 2011) a juh astrovírus 2-vel (OAstV2) egy filogenetikai ágon helyezkedik el. Ez jól példázza, hogy nem ismerjük még elég jól egy adott astrovírus lehetséges gazdáját és gazdafaj-spektrumát és további vizsgálatok szükségesek a vétlen fertőződés vagy a valós vírusfertőzés elkülönítésére az egyes lehetséges gazdákban. Másrészt az, hogy egy adott gazdafajt több egymástól különböző astrovírus faj is fertőzhet, jelentheti azt, hogy ezek akár egymástól független evolúciós eredetűek is lehetnek. Ezek az eredmények előrevetítik, hogy az astrovírusok – a teljes sokszínűségének és gazdafaj-spektrumának ismeretében – képesek lehetnek a faji határok átlépésére.

Ahogy egyre több új astrovírus genomja válik ismertté, úgy finomodnak az ismereteink az astrovírusok genomjának jellegzetességeivel kapcsolatban is. Vizsgálatinak azt mutatják, hogy az astrovírusok ORF1b/ORF2 régiójának határa, az ORF2 promoter régiója az UUUGGAGNGGNGGACCNAAN$_{4\text{-}11}$AUGNC nukleotid képlettel jobban leírható. Hasonlóan az astrovírus genom ORF2/3'UTR határának nukleotidsorrendje és szerkezete is sokszínűbb és összetettebb, mint azt korábban gondoltuk (Jonassen et al., 1998). Bár az s2m szekvencia motívum és másodlagos RNS szerkezet funkciója nem ismert – mint utóbb kiderült - jelen van a mamastrovírusok, az avastrovírusok (madarak astrovírusai) mellett, az equine (ló) rhinovírusokban, a coronavírusokban és a dog (kutya) norovírusban is (Jonassen et al., 1998; Chu et al., 2008; Kapoor et al., 2009). Ugyanakkor az s2m nincs jelen két (a humán MLB1 és denevér astrovírus AFCD337) újonnan leírt astrovírusban (Finkbeiner et al., 2008; Chu et al., 2008). A három általunk leírt új astrovírus faj (PAstV4, OAstV2 és WBAstV1) egyike sem követi az s2m régió klasszikus „szabályait". A PAstV4-ben és a WBAstV1-ben az s2m szekvencia egyáltalán nem található, az OAstV2-ben bár jelen van, de a transzlációban

nem vesz részt, és a stop kodon nem a struktúra csúcsán helyezkedik el. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az s2m fontos, de nem univerzális jellegzetessége az astrovírusoknak, és az ORF2 kapszid fehérjét záró stop kodon különböző pozíciókban lehet az egyes s2m motívummal rendelkező astrovírusokban is.

Új, +ssRNS genomú vírus a *Picornavirales* rendben

Egy új, - potenciálisan burok nélküli – pozitív, egyszálú, dicistronos RNS genomú vírust (Halastavi árva RNS vírus) sikerült kimutatni és teljes genetikai állományát részletesen meghatározni édesvízi pontyok (*Cyprinus carpio*) bélsártartalmaiból. Ez az első eset, hogy dicistronos vírust édesvízi közösségből azonosítottak. A vírus a *Picornavirales* rendbe tartozik, de az eddig ismert víruscsaládoktól eltérő jellegzetességeket mutat. A vírus lehetséges gazdaszervezete, az alacsony nukleotid/aminosav hasonlóság, a lehetséges egyedi UTR/IGR-IRES szerkezetek és az AU/CG arányok miatt egyértelműen nem sorolható be a hozzá talán legközelebb álló *Dicistroviridae* családba sem, melyek gazdaszervezete a mai tudásunk szerint az ízeltlábúak. Egy vírus gazdaszervezetének meghatározása egy mindenevő (pl.: ponty, ember stb.) bélsár mintájából nem könnyű. Hisz a vírus származhat az elfogyasztott táplálék bármelyikéből. A nukleotid összetétel elemzés (NCA) egy – jelenleg nem megmagyarázott – megfigyelés matematikai algoritmusának számítógépes felhasználására épül, mely lehetőséget ad – a módszer korlátjai mellett is - egy vírus gazdaszervezetének jó esélyű (95%-os) behatárolására. A vizsgálataink arra utalnak, hogy a Halastavi árva RNS vírus talán egy új dicistronos víruscsalád első tagja, gazdája talán egy halfaj, amely amennyiben bebizonyosodik, akkor az első igazolása lehetne egy dicistronos vírus fertőzésének gerinces gazdaélőlényben.

A +ssRNS genomú vírusok világa az új molekuláris módszerek fényében

A dolgozatban leírt új +ssRNS vírusok sikeres azonosításának – kezdetben rajtunk kívül álló – véletlen módszertani oka volt: a primerek specificitása, azaz inkább aspecificitása. Olyan adott vírusok genomrészeire specifikusnak hitt primerekkel (p289/p290, UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F, stb.) dolgoztunk, melyekről a használat során kiderült, hogy addig ismeretlen vírusok kimutatására is alkalmasak. Tulajdonképpen ennek a megfigyelésnek a tudatos használatával sikerült később számos új állatfajban több, korábban nem ismert +ssRNS vírust azonosítani. Az első lépés a p289/p290 jelű általános calicivírus primer volt, mely a porcine kobuvírus (és egy új sertés astrovírus) kimutatásához vezetett. De ilyen a humán enterovírusok 5'UTR nem kódoló régiójára tervezett szűrő-primerpárunk (Non-human Enterovirus-5'UTR-R/F) is, mellyel a dicistronos RNS genomú vírust (Halastavi árva RNS vírus) sikerült kimutatni. De a legjobb példa erre az általunk ezt követően a kobuvírusok konzervatív 3C/3D régiójára tervezett UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F primerpár, mely a kobuvírusok (Aichi, bovine kobuvírus, porcine kobuvírus) mellett a quail (fürj) picornavírus, a bovine hungarovírus, az ovine hungarovírus és az EV-C109 azonosítását is lehetővé tette. Ez a primer az eredeti szándékokkal ellentétben – bár kimutatja - kevésbé specifikus a kobuvírusokra, viszont jóval általánosabban használható picornavírusokra, akár új picornavírusok azonosítására is. Ráadásul, míg a p289/p290 primerpár esetén eltérő hosszúságú PCR-termékek keletkeznek calicivírusok és porcine kobuvírus esetén, az UNIV-kobu-R-UNIV-kobu-F primerek esetében a különböző picornavírus nemzetségekbe tartozó picornavírus fajoknál a PCR-termék hosszúsága egyezik. Azaz a PCR-termék mérete alapján - szekvencia meghatározás nélkül - nem lehet megmondani, hogy milyen picornavírusról lehet szó. A háttérben a +ssRNS vírusok genetikai jellemzői, ismert, illetve eddig nem ismert esszenciális konzervatív nukleotid motívumok húzódnak meg, melyek éppen azt bizonyítják, hogy érdemes e vírusokról komplexen gondolkodni. További, – jelenleg meghatározás alatt

levő - új vírusokat is sikerült e primerrel kimutatni, és elképzelhető, hogy az UNIV-kobu-R-UNIV-kobu-F primerek használatával további új vírusok leírása történhet meg. Hasonlóan ehhez, a terveink szerint a parechovírusok és hungarovírusok feltárt közös, konzervatív 5'UTR IRES régiójára tervezett, az eltérő méretű PCR-termék alapján egyben diszkrimináló primerpár akár új, II-es típusú IRES-sel rendelkező picornavírusok kimutatására is képes lehet.

A +ssRNS vírusok egy másik részét (nebovírus, porcine teschovírus, turkey gallivírus, ovine astrovírus, wild boar astrovírus) virális metagenomikai (Delwart, 2007; Djikeng et al., 2008; Kapoor et al., 2008; Victoria et al., 2009), pyroszekvenálási és bioinformatikai módszerek alkalmazásával sikerült előzetesen ígéretesnek ítélt mintákból azonosítani. E nagyműszer- és munkaigényes, és jelenleg is költséges, de modern, robosztus szekvencia-független nukleinsav amplifikációs és szekvenáló módszerek azt teszik lehetővé, hogy környezeti, illetve előzetesen nem manipulált biológiai mintákból a kapsziddal védett virális nukleinsavak (RNS és/vagy DNS) relatív arányának növelésével - a gazda genom arányához képest – bepillantást nyerjünk az adott minta potenciális vírusösszetételébe. Ez azt jelenti, hogy egy mintából – kellő víruskoncentráció esetén - akár több (sok), különböző víruscsaládba tartozó vírus is egyidejűleg kimutatásra kerülhet. Ez történt példaként a vaddisznó bélsár mintákból, ahol 4 különböző vírust (porcine kobuvírus, porcine teschovírus, porcine astrovírus és porcine enterovírus) mutattunk ki párhuzamosan ugyanazokból a mintákból. (De hasonlóan több – eddig a legtöbb 7 - új vírus egyidejű jelenléte igazolható szalakóta (*Coracias garrulus*), pulyka és hal akár egyetlen bélsár mintájában is. Ezek meghatározása folyamatban van.) A virális szekvencia felismerésének alapja, a GenBank adatbázisában mindenkor elérhető virális nukleotid és aminosav szekvenciákhoz (és elsősorban a konzervatív motívumokhoz) való hasonlóság mértéke. Ezért egy már ismert vírus akár több ezer darabból álló (csaknem teljes) genomszekvencia leolvasása is

megtörténhet a kiindulási mintából, viszont egy új, még ismeretlen szekvenciájú vírus felismerése, amikor maximum 1-4 db 100-200 nukleotid hosszú szekvencia áll csak a GenBank összehasonlítást követően rendelkezésre, nehéz. Ilyenkor, ha a szekvencia jól ismert, esszenciális aminosav motívumot is kódol, akkor bízhatunk abba, hogy az eddigiektől eltérő, új vírusra találtunk. Ez történt a virális metagenomikai módszerrel azonosított vírusaink esetén is. Azonban akár aspecifikus RT-PCR reakcióval, akár virális metagenomikai módszerekkel sikerült is az új virális szekvencia darabot beazonosítanunk, mindig az új vírus teljes genetikai állományának (nukleotid sorrendjének) meghatározására törekedtünk. Hisz csak a teljes virális genom meghatározásával tudjuk pontosan összehasonlítani, jellemezni és megfelelően besorolni a vírusokat, és csak így lehet időtálló(bb) taxonómiát is kialakítani. Ellenkező esetben, attól függően, hogy milyen régiót vizsgálunk – a korábban írtaknak megfelelően - fals eredményt („misidentification”), téves osztályozást („misclassification”) és téves következtetést („misinterpretation”) vonhatunk le a vírusunk eredetére, természetére vonatkozóan.

A virális metagenomika eredményei bizonyítják az egyidejű és többszörös virális társfertőzések gyakoriságát egy adott (akár tüneteket nem mutató) gazdában. Ennek felismerése fontos következményekkel járhat: bővíti és finomítja az ismereteinket (különösen a házi haszonállatok esetében). Ez arra utal, hogy csak a pontos genomszintű mikrobiális háttér ismeretében dönthető el, hogy az adott körülmények között mi tekinthető kórokozónak (kórokozóknak), opportunistának, a virális flóra alkotójának, vagy ártalmatlan átutazónak az adott szervezetben. E komplex ismeret hatással lehet a kórképek elkülönítésére, pathogenezisükre, a fertőzés forrásának felismerésére, a kórokozó átvitelére, valamint a megelőzésének kérdéseire is. Másrészről az új, burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS genomú vírusok kimutatása és meghatározása elvezethet az egyes víruscsaládok tagjainak valódi genetikai sokszínűségének, evolúciójának és egymáshoz való evolúciós rokonságuk

mélységének megértéséhez. Ismereteket szerezhetünk továbbá a fajok közötti határok átlépése és átléphetősége, és a zoonózis/humanózis kérdéseinek pontosabb feltárásához is. A vizsgált víruscsaládok ismert vírusnemzetségeinek (vírus diverzitás) és az ismert gazdafajok (gazdafaj spektrum) jelenleg ismert (állapot: 2012. tavasza) összefüggésének összefoglalására vállalkozik a 15. táblázat, mely jelöli Laboratóriumunk hozzájárulását is az ismeretek bővüléséhez.

Jelenleg is több új RNS vírusfaj/nemzetség (például picornavírusok, astrovírusok, picobirnavírus, reovírus stb.) meghatározása és közlése van folyamatban Laboratóriumunkból. Ilyen a pulyka (turkey) avisivírus (65. ábra), mely egy új picornavírus nemzetség („Avisivírus” = Avihepatovírus sister-clade vírus) első képviselője a *Picornaviridae* családban (Boros et al., 2013. nyomtatásban). Vagy a pigeon (galamb) mesivírus („Mesivírus” = Megrivírus sister-clade vírus) (Phan et al., 2013. nyomtatásban) és a szalakótából (*Coracias garrulus*) kimutatott picornavírus („Kunsagivírus” = Kunság földrajzi névből) (Boros et al., 2013. nyomtatásban), melyek ugyancsak egy-egy új picornavírus nemzetség első tagjai a *Picornaviridae* családban (65. ábra). Az első kobuvírus kimutatása madárból (szalakóta, *Coracias garrulus*) is ilyen. Ez utóbbit is az „univerzális” kobuvírus primerrel (UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F) sikerült RT-PCR módszerrel azonosítani, majd összesen három (3/6; 50%) szalakóta egyed fécesz mintájából kimutatni. De sikerült még szalakótákból 3 új astrovírus fajt is azonosítani, és a mosavírust (új picornavírus faj és nemzetség) az Egyesült Államokat követően (Phan et al., 2011) Európában kimutatni. Érdekes hozadéka a metagenomikai eredményeknek hazai pontyok bélsár mintájából egy potenciálisan új, – szegmentált RNS genomú - seadornavírus (*Reoviridae*) faj (Balaton vírus) európai azonosítása és meghatározása (Reuter et al., 2013. nyomtatásban). E vírus BSL-3 besorolású rokonai (pl.: Banna vírus) eddig kizárólag Dél-Kelet Ázsiában voltak ismertek, mint szúnyogok által terjesztett, encephalitist okozó ágensek emberben ...

15. táblázat. Egyes burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS genomú vírusok (a táblázat sorai) összefüggése az eddig vizsgált gazdafajokkal (oszlopok).

(A táblázat a *Caliciviridae* és a *Hepeviridae* család nem minden nemzetségét tartalmazza. Állapot: 2012. tavasza

VÍRUS-CSALÁD	VÍRUS NEMZETSÉG	humán	majom	sertés	szarvasmarha	juh	ló	kecske	macska	oroszlán	kutya	vaddisznó	őz, szarvas	nyúl	denevér	patkány	egér	vadászgörény	delfin	fóka	pulyka	kacsa	csirke	fürj	galamb	szalakóta
Astroviridae	*Mamastrovírus*	> 3		5		2									> 1		X									
	Avastrovírus																									
Caliciviridae	*Norovírus*																									
	Sapovírus																									
Picornaviridae	*Salivírus (új)*																									
	Aquamavírus (új)																									
	Cosavírus (új)																									
	Dicipivírus (új)																									
	Megrivírus (új)																									
	Avihepatovírus																									
	Tremovírus																									
	Senecavírus																									
	Hepatovírus																									
	Erbovírus																									
	Aphthovírus																									
	Cardiovírus																									
	Kobuvírus																						?			
	Parechovírus																									
	Enterovírus			3		2																				
	Sapelovírus											?														
	Teschovírus																									
	„Hunnivírus”																									
	„Gallivírus”																									
	„Unassigned”																								?	
Hepeviridae	*Hepevírus*								?																	

igazolt vírusfaj az adott gazdaszervezetben

részben vagy egészben általunk igazolt vírusfaj

X a vírusgenom nem ismert

? kimutatása szóbeszéd/anekdota

A vírusfertőzések csak egy (minden bizonnyal kis része) jár „szemmel” érzékelhető klinikai elváltozásokkal, és valószínűleg számtalan, még nem ismert vírus és vírus-variáns jó (akár kölcsönösen előnyös) evolúciós adaptációban „él” a gazdaszervezetével. (Csak összehasonlításként: friss vizsgálatok szerint az emberi szervezet a ~22.000 saját fehérje kódoló génje mellett egyedenként további ~8 millió – a gazdaszervezetet minden pillanatban befolyásoló - bakteriális gént is hordoz magán, mely minimum 10.000 különböző mikrobafajtól – ez a mikrobiom – származik.) (http://www.nih.gov/news/health/jun2012/nhgri-13.htm). Konzervatív becslések szerint körülbelül 100 millió vírusfaj (ezen belül 1 millió gerinces vírusfaj) létezhet a földi bioszférában (Witzany, 2012). Az ICTV 2013. februári, legújabb kiadványa azonban összesen csak 2480 elfogadott vírusfajt tart nyilván (http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4440.aspx). Jelen ismereteink nagysága (azaz inkább kicsisége) és mélysége (azaz inkább felületessége) a vírusokkal kapcsolatban alázatra int. Nem kérdés, hogy csak most kezdjük megsejteni a vírusok valódi jelentőségét, sokszínűségét („virosphera”) a különböző gazdasejtekben, gazdaszervezetekben és a bioszférában. Hiba, ha a figyelmünk lankad, vagy elterelődik a fertőző betegségekről és a mikrobákról…

A természet értő leírása vezet a természet megismeréséhez. Bőven van még mit felfedeznie a jelen és leendő virológus nemzedékeinek …

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Calicivírusok

► A humán calicivírusok (norovírusok, sapovírusok) hazai diagnosztikájának megteremtése, a norovírusok prospektív, folyamatos, országos, molekuláris epidemiológiai nyomon követése az ismeretlen eredetű, nem bakteriális gastroenteritis járványok körében hazánkban 1998 és 2013 között. A norovírus járványok epidemiológiai, klinikai jellegzetességeinek elemzése, leírása, vezető szerepének igazolása a hazai gastroenteritis járványok és a kórházi járványok körében. A norovírusok genotipizálása, gyakorisága, a norovírusok, ezen belül a domináns, drift mutáns GII.4 norovírus és rekombináns norovírusok evolúciójának nyomon követése hazánkban. A norovírus járványok molekuláris epidemiológiai összefüggéseinek (trendek, epidemiológia, a genotípusok és átvitel, genotípus és helyszín, élelmiszer eredetű fertőzések kapcsolatának) vizsgálata nemzetközi (Európa, 4 kontinens) adatfeldolgozás keretében. A norovírus (GII.4) pandémiás szerepének igazolása.

► Állati eredetű norovírusok (szarvasmarha norovírus, sertés norovírus) első hazai kimutatása és elemzése molekuláris biológiai módszerekkel szarvasmarhákból és sertésekből.

► Sapovírusok első hazai kimutatása és molekuláris epidemiológiai jellemzése szórványos gyermekkori gastroenteritisekből és gastroenteritis járványból hazánkban. A sertés sapovírusok prevalenciája, molekuláris epidemiológiai vizsgálata hazánkban és Európában. Új sertés sapovírus genocsoportok leírása.

► A nebovírus első hazai kimutatása, molekuláris vizsgálata és teljes genomjának meghatározása szarvasmarhából.

Picornavírusok

► Két új sertés enterovírus genotípus (EV-G3 és EV-G4) kimutatása és teljes genomjának meghatározása sertésekből és vaddisznókból.

► Az első természetes, állatfajok közötti (interspecies) rekombináns enterovírus - bovine/porcine enterovírus (EV-G5) - kimutatása, teljes genomjának meghatározása és nyomon követése bárányokból.

► A rekombináns humán enterovírus 109 (EV-C109) második (Európában első) kimutatása és teljes genomjának meghatározása gyermekkori légúti fertőzésből.

► A hepatitis A vírus (HAV) molekuláris epidemiológiája hazánkban, 2003 és 2013 között. A hepatitis A vírus genotipizálása és összehasonlító elemzése szórványos, endémiás, importált és járványos megbetegedésekből. Egy hepatitis A járvány kialakulásának és kiterjedésének molekuláris nyomon követése, új epidemiológiai és járványügyi következtetések levonása.

► Egy új – az ICTV által elfogadott - kobuvírus faj, a sertés kobuvírus (ma *Aichivírus C*) leírása sertésekből, a vírus teljes genomjának meghatározása, elemzése, a vírus egyedi, evolúciós szempontból jelentős 5'UTR/IRES másodlagos szerkezetének meghatározása. A sertés kobuvírus molekuláris epidemiológiája, nyomon követése, endémiás jelenléte és evolúciója sertések körében. A kobuvírus virémia első leírása. A sertés kobuvírus kimutatása és teljes genomjának meghatározása vaddisznókból.

► A szarvasmarha kobuvírus (*Aichivírus B*) első európai kimutatása szarvasmarhákból és első kimutatása juhokból. A vírus teljes genomjának meghatározása juhból.

► Az Aichi vírus (*Aichivírus A*) kimutatása gyermekkori gastroenteritisből hazánkban.

► A humán parechovírusok első kimutatása, meghatározása és molekuláris epidemiológiája gyermekkori gastroenteritisekből, központi idegrendszert érintő betegségekből származó mintákból hazánkban. Humán parechovírusok kimutatása új életkori és klinikai kórképekben.

► A sertés teschovírus (PTV) kimutatása és teljes genomjának első meghatározása vaddisznókból.

► Egy új picornavírus faj/nemzetség („Unassigned”) kimutatása, teljes genomjának és 5’UTR/IRES részének meghatározása fürjekből. A fürj picornavírus molekuláris epidemiológiája fürjekben.

► Egy új picornavírus faj/nemzetség („Gallivírus”) kimutatása, teljes genomjának és 5’UTR/IRES részének meghatározása pulykákból. A pulyka gallivírus molekuláris epidemiológiája, endémiás jelenléte különböző pulykafarmokon élő klinikai tünetet mutató és klinikailag tünetmentes pulykákban.

► Egy új picornavírus faj/nemzetség („Hunnivírus”) két tagjának kimutatása, teljes genomjainak és 5’UTR/IRES részeinek meghatározása, elemzése szarvasmarhákból és juhokból. A hungarovírusok molekuláris epidemiológiája szarvasmarhákban és juhokban.

Hepevírusok

► A hepatitis E vírus (HEV) első hazai kimutatása, genetikai elemzése, prevalenciája és molekuláris epidemiológiája hazánkban és összehasonlító elemzése Európában. A hepatitis E vírus fertőzés igazolása hepatitisben szenvedő betegekből, sertések, vaddisznók és őzek mintáiból. A hepatitis E vírus 3-as genotípusának endémiás, élelmiszer közvetítette zoonótikus terjedésének hazai bizonyítása. A hepatitis E vírus okozta fertőzések klinikai és epidemiológiai jellegzetességének leírása.

Astrovírusok

► Humán astrovírus okozta gastroenteritis járvány első hazai igazolása, a járvány klinikai és epidemiológiai jellegzetességeinek leírása, a vírus teljes genomjának meghatározása.

► Három új, állati eredetű astrovírus kimutatása és teljes genomjainak meghatározása sertés, juh és vaddisznó mintákból.

Picornavirales rend

► Egy új, dicistronos +ssRNS genomú vírusfaj/nemzetség („Halastavi árva RNS vírus”) kimutatása, teljes genomjának meghatározása és elemzése édesvízi pontyok bélsár mintáiból.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Doktori értekezésemet mesteremnek, Dr. Szűcs György egyetemi magántanár, osztályvezető főorvos Úrnak ajánlom. Iskolás kíváncsiságom a vírusok rejtélyes világának megismerésére a Főorvos Úr kezei között formálódott át és érett meg arra, hogy a tudományos kutató lehessek. Köszönettel tartozom a 15 éves önzetlen segítségéért, töretlen támogatásáért, a szakmai ismeretek és a könyvekből nem megtanulható szemlélet és gyakorlati fogások átadásáért és a megelőlegezett belém vetett bizalomért. Köszönettel tartozom, hogy világos igazodási pontokat határozott meg a számomra, melyek minden körülmény között megkönnyítik a helyes út megtalálását.

Köszönettel tartozom azoknak a hazai és külföldi Kollégáknak, számuk 220-250 között lehet - akikkel a kutatások során összehozott a sors és közvetlen szakmai kapcsolatba kerülhettem. Köszönöm, hogy fantáziát láttak az együttműködésekben és hittek a közös munka - néha talán távolinak tűnő - gyümölcseiben. Név szerint köszönöm Dr. Új Mária, Dr. Bíró Hunor, Dr. Kecskeméti Sándor, Dr. Kiss István, Dr. Farkas Tibor, Dr. Berke Tamás, Dr. Krisztalovics Katalin, Dr. Fodor Domonka, Dr. Kátai Andrea, Dr. Egyed László, Dr. Nemes Csaba, Dr. Forgách Petra, Dr. Kapusinszky Beatrix, Dr. Vollain Mária, Dr. Blenda Böttiger, Dr. Erwin Duizer, Dr. Joukje Siebenga, Dr. Linda Verhoef, Dr. Nick Knowles és Dr. Peter Simmonds együttműködését. Külön köszönöm azoknak a Kollégáknak a segítségét, akikkel egy kézirat társ-szerzőségéig nem jutottunk el, de mégis fontos rész szerepet töltöttek be egy-egy munka elkészítésében.

Köszönöm aktív külföldi tanulmányútjaim senior kutatóinak a lehetőséget, hogy befogadtak Laboratóriumukba, és a munkáimhoz biztosították a szükséges és igen drága infrastruktúrát. Köszönöm Dr. David Matson és Dr. Xi Jiang (CPR, Norfolk, USA), Dr. Marion Koopmans, Dr. Harry Vennema (RIVM, Bilthoven, Hollandia) és Dr. Eric Delwart (BSRI és UCSF, San Francisco, USA) segítségét.

Az értekezésben bemutatott kutatómunkában tanítványaim és jelenlegi kollegáim fontos szerepet töltöttek be. Szorgalmas, odaadó és kitartó munkájukért külön köszönettel tartozom időrendben Pankovics Péternek, Boldizsár Ákosnak és Dr. Boros Ákosnak. Köszönöm a Laboratórium munkatársnőinek - Bosnyákné Vörös Andrea (Andi), Elekes Károlyné (Olga), Glöckler Józsefné (Gertrúd), Krikler Vilmosné (Csilla) és Dr. Mestyánné Szentmiklósi Zsuzsanna (Zsuzsa) - hogy évtizedes tapasztalataikra építve, szorgalmas munkájukkal nap, mint nap biztos vállon viszik a rutin laboratóriumi diagnosztikai munka dandárját a közvetlen betegellátás szolgálatában, és így lehetőséget adtak a számomra a kutatói kalandozásokra.

Végül köszönöm szüleimnek a lehetőséget és a támogatást, feleségemnek, Dr. Reuterné Török Tímeának, és gyermekeimnek, Reuter Rékának és Reuter Ákosnak, a megértést és türelmet, hogy elviselik, hogy a kutatómunka nem délután 16:00h óráig tart …

JEGYZÉKEK

IRODALOMJEGYZÉK

Abed Y, Boivin G. Human parechovirus infections in Canada. Emerg Infect Dis, 2006;12:969-975.

Abed Y, Wolf D, Dagan R, Boivin G. Development of a serological assay based on a synthetic peptide selected from the VP0 capsid protein for detection of human parechoviruses. J Clin Microbiol, 2007;45:2037-2039.

Alexandersen S, Knowles NJ, Dekker A, Besham GJ, Zhang Z, Koenen F. Picornaviruses. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed), Diseases of swine, 10th ed. 2012, Wiley-Blackwell, Ames, IA, 587-620. ISBN: 978-0-8138-2267-9

Almeida JD, Craig CR, Hall TE. Multiple viruses present in the faeces of a scouring calf. Vet Rec, 1978;102:170-171.

Ambert-Balay K, Lorrot M, Bon F, Giraudon H, Kaplon J, Wolfer M, Lebon P, Gendrel D, Pothier P. Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. J Clin Microbiol, 2008;46:1252–1258.

Auerbacher J, Prager D, Neuhauss S, Loss U, Witte KH. Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of two new serotypes. Zentralbl Veteinarmed B, 1994;81:277-282.

Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology, 1983;20:23-31.

Banks M, Bendall R, Grierson S, Heath G, Mitchell J, Dalton H. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. Emerg Infect Dis 2004;10:953-955.

Benschop KS, Thomas X, Serpenti C, Molenkamp R, Wolthers K. High prevalence of human parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. J Clin Microbiol, 2008a;46:3965-3970.

Benschop KS, Williams CH, Wolthers KC, Stanway G, Simmonds P. Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. J Gen Virol, 2008b;89:1030-1035.

Benschop KS, de Vires M, Minnaar RP, Stanway G, van der Hoek L, Wothers KC, Simmonds P. Comprehensive full-lenght sequence analyses of human parechoviruses: diversity and recombination. J Gen Virol, 2010;91:145-154.

Blom N, Hansen J, Blaas D, Brunak S. Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: discovering cellular targets by neural networks. Protein Science, 1996;5:2203-2216.

Bonning BC, Miller WA, Dicistroviruses. Annu Rev Entomol, 2010;55:129-150.

Boros Á, Pankovics P, Simmonds P, Reuter G. Novel positive-sense, single-stranded RNA (+ssRNA) virus with di-cistronic genome from intestinal content of freshwater carp (*Cyprinus carpio*). PLoS One, 2011;6:e29145.

Boros Á, Pankovics P, Knowles NJ, Reuter G. Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep. J Gen Virol, 2012;93:1941-1951.

Bridger JC. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. Vet Rec, 1980;107:532-533.

Burián Zs, Szabó H, Székely Gy, Gyurkovits K, Pankovics P, Farkas T, Reuter G. Detection and follow-up of torque teno midi virus ("small anelloviruses") in nasopharyngeal aspirates and three other human body fluids in children. Arch Virol, 2011;156:1537-1541.

Caracappa S, Vesco G, Iannizzotto G, Guercio V, Knowles NJ. Isolamento ed identificazione di enterovirus suini in Sicilia. Arch Vet Ital, 1985;36:167-170.

Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). Arch Virol, 2010;155:133-146.

Chen H-H, Kong W-P, Roos RP. The leader peptide of Theilers's murine encephalomyelitis virus is a zinc-binding protein. J Virol, 1995;69:8076-8078.

Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. J Med Virol, 1979;4:249-254.

Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S. Sapporo virus: history and recent findings. J Infect Dis, 2000;181(S2):303-308.

Chironna M, Lopalco P, Prato R, Germinario C, Barbuti S, Quarto M. Outbreak of infection with hepatitis A virus (HAV) associated with a foodhandler and confirmed by sequence analysis reveals a new HAV genotype IB variant. J Clin Microbiol 2004;42:2825-2828.

Chu DK, Poon LL, Guan Y, Peiris JS. Novel astroviruses in insectivorous bats. J Virol, 2008; 82:9107-9114.

Clarke IN, Estes MK, Green KY, Hansman GS, Knowles NJ, Koopmans MK, Matson DO, Meyers G, Neill JD, Radford A, Smith AW, Studdert MJ, Thiel H-J, Vinjé J. *Caliciviridae* - In: Virus taxonomy: calssification and nomenclature of viruses: ninth report of the International committee on Taxonomy of Viruses. Ed.: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Elsevier, San Diego, 2012; pp 977-986.

Culley AI, Lang AS, Suttle CA. High diversity of unknown picorna-like viruses in the sea. Nature, 2003;424:1054-1057.

Culley AI, Lang AS, Suttle CA. The complete genomes of three viruses assembled from shotgun libraries of marine RNA virus communities. Virol J 2007;4:69.

Cunha JB, de Mendonca MCL, Miagostovich MP, Leite JPG. First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America. Res Vet Sci, 2010;89:126-129.

Day J, Ballard LL, Duke MV, Scheffler BE, Zsak L. Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. Virol J, 2010;7:313.

Delwart EL. Viral metagenomics. Rev Med Virol, 2007;17:115-131.

Deng Y, Batten CA, Liu BL, Lambden PR, Elschner M, Gunther H, Otto P, Schnurch P, Eichhorn W, Herbst W, Clarke IN. Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. J Clin Microbiol, 2003;41:2300-2305.

Di Martino BD, Di Profio FD, Martella V, Ceci C, Marsilio F. Evidence for recombination in neboviruses. Vet Microbiol, 2011;153:367-372.

Djikeng A, Halpin R, Kuzmickas R, DePasse J, Feldblyum J, Senamalay N, Afonso C, Zhang X, Anderson NG, Ghedin E, Spiro DJ. Viral genome sequencing by random priming methods. BMC Genomics, 2008;9:5.

Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson GA, Spiro DJ. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. PLoS One, 2009;4:e7264.

D'Mello F, Jervis SM, Edwards PM, Oliver SL, Bridger JC. Heterogeneity in the capsid protein of bovine enteric caliciviruses belonging to a new genus. Virology 2009;387:109-116.

Duizer E, Pielaat A, Vennema H, Kroneman A, Koopmans M. Probabilities in norovirus outbreak diagnosis. J Clin Virol, 2007;40:38-42.

Drobeniuc J, Meng J, Reuter G, Greene-Montfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z, Kamili S, Teo CG. Serologic assay specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. Clin Infect Dis, 2010;51:e24-27.

Emerson SU, Anderson D, Arankalle A, Meng XJ, Purdy M, Schlauder GG, Tsarev SA. Hepevirus. In: Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Szerk.: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Elsevier/Academic Press, London, UK, 2004, 851-855.

Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. In: Knipe DM, Howley PM (ed) Fields Virology, 5th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pp 3047-3058.

Epinfo. Étel által terjesztett tömeges gastroenteritis járvány. 2001;8(20):2-5.

Epinfo. Az Országos Epidemiológiai Központ módszertani levele a 2009. évi védőoltásokról. 2009;16: 1. különszám. (2009. március 20.)

Epinfo. Hepatitis A járvány Budapesten, 2012-2013. 2013;20(7-8):69-73.

Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of *Caliciviridae*. J Virol, 2008;82:5408-5416.

Farkas T, Fey B, Hargitt E, Parcells M, Ladman B, Murgia M, Saif Y. Molecular detection of novel picornaviruses in chickens and turkeys. Virus Genes, 2012;44:262-272.

Fastier LB. A new feline virus isolated in tissue culture. Am J Vet Res, 1957;18:382-389.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. Science, 1973;182:1026-1028.

Finkbeiner SR, Kirkwood CD, Wang D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated a child with acute diarrhea. Virol J, 2008;5:117.

Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D, Virgin HW, Anderson LJ, Vinjé J, Wang D, Tong S. Identification of a novel astrovirus (Astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. J Virol, 2009;83:10836-10839.

Fiore AE, Wasley A, Bell BP. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization. Recommendations of the advisory committee on immunisation practices (ACIP). MMWR, 2006;55:1-23.

Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of Virology, 3rd ed., ASM Press, Washington, 2009.

Flynn WT, Saif LJ, Moorhead PD. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. Am J Vet Res, 1988;49:819-825.

Frank C, Walter J, Muehlen M, Jansen A, van Treeck U, Hauri AM, Zoellner I, Rakha M, Hoehne M, Hamouda O, Schreier E, Stark K. Major outbreak of hepatitis A associated with orange juice among tourists, Egypt, 2004. Emerg Infect Dis, 2007;13:156-158.

Fu Y, Pan M, Wang X, Xu Y, Xie X, Knowles NJ, Yang H, Zhang D. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. J Gen Virol, 2009;90:1104-1108.

Ghazi F, Hughes PJ, Hyypiä T, Stanway G. Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). J Gen Virol, 1998;79:2641-2650.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Lai MM. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. FEBS Lett, 1991;288:201-205.

Goyer M, Aho LS, Bour JB, Ambert-Balay K, Pothier P. Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006-2007. Arch Virol, 2008;153:1171-1174.

Green KY. *Calicivirdae*. In: Knipe DM, Howley PM (ed) Fields Virology, 5th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pp 949-980.

Guo M, Chang KO, Hardy ME, Zhang Q, Parwani AV, Saif LJ. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. J Virol, 1999;73:9625-9631.

Guo M, Hayes KO, Cho V, Parwani V, Lucas LM, Saif LJ. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. J Virol, 2001a;75:9239-9251.

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, 2001b;146:479-493.

Günther H, Otto P, Heilmann P. Diarrhea in young calves. Determination of the pathogenicity of a bovine coronavirus and an unidentified icosahedral virus. Arch Exp Veterinärmed, 1984;38:781-792.

Han MG, Smiley JR, Thomas C, Saif LJ. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. J Clin Microbiol, 2004;42:5214-5224.

Hansman GS, Takeda N, Katayama K Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Genetic diversity of sapovirus in children, Australia. Emerg Infect Dis, 2006;12:141-143.

Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T. Sapovirus in water, Japan. Emerg Infect Dis, 2007;13:133-135.

Harvala H, Simmonds P. Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. J Clin Virol, 2009a;45:1-9.

Harvala H, Robertson I, Chieochansin T, McWilliam Leitch EC, Templeton K, Simmonds P. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as determined by direct typing of cerebrospinal fluid samples. J Infect Dis, 2009b;199:1753-1760.

Hassine-Zaafrane M, Kaplon J, Sdiri-Loulizi K, Aouni Z, Pothier P, Aouni M, Ambert-Balay. Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses detected in central-eastern Tunisia. Arch Virol, 2012;157:1599-1604.

Hellen CUT, de Breyne S. A distinct group of hepacivirus/pestivirus-like internal ribosomal entry sites in members of diverse Picornavirus genera: evidence for modular exchange of functional noncoding RNA elements by recombination. J Virol, 2007;81:5850-5863.

Herring AJ, Gray EW, Snodgrass DR. Purification and characterization of ovine astrovirus. J Gen Virol, 1981;53:47-55.

Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. In: Knipe DM, Howley PM (szerk.): Fields Virology, 5. kiadás, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2007, pp 911-947.

Honda E, Kimata A, Hattori I, Kumagai T, Tsuda T, Tokui T. A serological somparison of 4 Japanese isolates of porcine enteroviruses with the international reference strains. Jpn J Vet Sci, 1990;52:49-54.

Honkavuori KS, Shivaprasad HL, Briese T, Street C, Hirschberg DL, Hutchison SK, Lipkin WI. Novel picornavirus in turkey poults with hepatitis, California, USA. Emerg Infect Dis, 2011;17:480-487.

Indik S, Valicek L, Smid B, Dvorakova H, Rodak L. Isolation and partial characterization on a novel porcine astrovirus. Vet Microbiol, 2006;117:276-283.

Inoue J, Takahashi M, Ito K, Shimosegawa T, Okamoto H. Analysis of human and swine hepatitis E virus (HEV) isolates of genotype 3 in Japan that are only 81-83% similar to reported HEV isolates of the same genotype over the entire genome. J Gen Virol, 2006;87:2363-2369.

Jakab F, Péterfai J, Verebely T, Meleg E, Bányai K. Human astrovirus infection associated with childhood intussusception. Pediatr Int, 2007;49:103-105.

Jiang X, Graham DY, Wang WM, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. Science, 1990;250:1580-1583.

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 Methods, 1999;83:145-154.

Jiang X, Espul C, Zhong WM, Cuello H, Matson DO. Characterization of a novel human caliciviruses that may be a naturally occurring recombinant. Arch Virol, 1999b;144:2377-2387.

Jonassen CM, Jonassen TO, Grinde B. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and equine rhinovirus. J Gen Virol, 1998;79:715-718.

Jonassen CM, Jonassen T, Saif Y, Snodgrass D, Ushijima H, Shimizu M, Grinde B. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. J Gen Virol, 2001;82:1061-1067.

Jonassen CM, Jonassen TTO, Sveen TM, Grinde B. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. Virus Res, 2003;91:195-201.

Kaikkonen S, Räsänen S, Rämet M, Vesikari T. Aichi virus infection in children with acute gastroenteritis in Finland. Epidemiol Infect, 2010;138:1166–1171.

Kaku Y, Sarai A, Murakami Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses. J Gen Virol, 2001;82:417-424.

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 nonbacterial gastroenteritis. J Virol, 1972;10:1075-1081.

Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. J Infect Dis, 2000;181(S2):S295-S302.

Kaplon J, Guenau E, Asdrubal P, Pothier P, Ambert-Balay K. Possible novel nebovirus genotype in cattle, France. Emerg Infect Dis, 2011;17:1120-1123.

Kapoor A, Victoria J, Simmonds P, Slikas E, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, Sharif S, Alam MM, Angez M, Wang C, Shafer RW, Zaidi S, Delwart E. A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:20482-20487.

Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P, Zaidi SZ, Delwart E. Multiple novel astrovirus species in human stool. J Gen Virol, 2009;90:2965-2972.

Kapoor A, Simmonds P, Lipkin WI, Zaidi S, Delwart E. Use of nucleotide composition analysis to infer hosts for three novel picorna-like viruses. J Virol, 2010;84:10322-10328.

Kapoor A, Simmonds P, Dubovi, EJ, Qaisar N, Henriquez JA, Medina J, Shields S, Lipkin WI. Characterization of a canine homolog of human Aichivirus. J Virol 2011;85:11520-11525.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Bovine kobuvirus from cattle with diarrhea. Emerg Infect Dis, 2008;14:985-986.

Khamrin P, Maneekarn N, Kongkaew A, Kongkaew S, Okitsu S, Ushijima H. Porcine kobuviruses in piglets, Thailand. Emerg Infect Dis, 2009;15:2075–2076.

Khamrin P, Maneekarn N, Hidaka S, Kishikawa S, Ushijima K, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of kobuviruses in stool samples collected from healthy pigs in Japan. Infect Genet Evol, 2010;10:950-954.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus Taxonomy, Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of ICTV. Elsevier Academic Press, London, 2012.

Kim HJ, Cho HS, Cho KO, Park NY. Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. J Vet Med B, 2006;53:155-159.

Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, Lindberg AM, Kwon JH, Kim JH, Kim SJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family *Picornaviridae*. J Gen Virol, 2006;87:3307-3316.

Knowles NJ, Buckley LS, Pereira HG. Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes. Arch Virol, 1979;62:201-208.

Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg M, Minor PD, Pallansch MA, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R. Taxonomy of *Picornaviridae*: current situation and future proposals. XVth EUROPIC 2008, Sitges, Barcelona.

Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg M, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R. *Picornaviridae*. In: Virus taxonomy: calssification and nomenclature of viruses: ninth report of the International committee on Taxonomy of Viruses. Ed.: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Elsevier, San Diego, 2012; pp 855-880.

Koelle K, Cobey S, Grenfell B, Pascual. Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans. Science, 2006;314:1898-1903.

Kofstad T, Jonassen CM. Screening of feral and wood pigeons for viruses harbouring a conserved mobile viral element: characterization of novel astroviruses and picornaviruses. PLoS One, 2011;6:e25964.

Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. The ancient virus world and evolution of cells. Biology Direct, 2006;1:1-27.

Koonin EV, Wolf YI, Nagasaki K, Dolja VV. The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. Nat Rev Microbiol, 2008;6:925-939.

Kouba V. Teschen disease (*Teschovirus encephalomyelitis*) eradication in Czechslovakia: a historical report. Vet Med Czech, 2009;54:550-560.

Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nuclei acids Res, 1987;15:8125-8148.

Kristensen DM, Mushegian AR, Dolja VV, Koonin EV. New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. Trends in Microbiology, 2009;18:11-19.

Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, Zell R. Sequencing of porcine enterovirus group II and III reveals unique features of both virus group. J Virol, 2002;76:5813-5821.

La Gall O, Christian P, Fauquet CM, King AMQ, Knowles NJ, Nakashima N, Stanway G, Gorbelenya AE. *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. Arch Virol, 2008;153:715-727.

Lang AS, Culley AI, Suttle CA. Genome sequence and characterization of a virus (HaRNAV) related to picorna-like viruses that infects the marine toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*. Virology, 2004;320:206-217.

L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier E, Lamontagne AM, Ouardani M, Lacroix G. Genomic charaterization of swine caliciviruses representing a new genus of *Caliciviridae*. Virus Genes, 2009;39:66-75.

Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, Delwart E. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. J Virol, 2010;84:6955–6965.

Li L, Pesavento PA, Shan T, Leutenegger CM, Wang C, Delwart E. Viruses in diarrhetic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. J Gen Virol, 2011a;92:2534-2541.

Li L, Shan T, Wang C, Côté C, Kolman J, Onions D, Gulland FMD, Delwart E. The fecal viral flora of California sea lions. J Virol, 2011b;85:9909-9917.

Loeffler F, Frosch P. Report of the commission for research on foot-and-mouth disease. Zentrabl Bacteriol parastenkunde Infektionkrankh, 1898;23:371-391.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J Virol, 1999;73:152-160.

Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, Buesa J, Schreier E, Reacher M, Brown D, Gallimore C, Bottiger B, Svensson L, Hedlund K-O, Thorven M, von Bonsdorff C-H, Maunula L, Poljsak-Prijatelj M, Reuter G, Szűcs Gy, Melegh B, van Duynhoven Y, Koopmans M: Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. The Lancet 2004; 363: 682-688.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, Brown DW, Edmunds WJ, Sarangi J. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. Emerg Infect Dis, 2004b;10:1827-1834.

Lu L, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonozis. Rev Med Virol, 2006;16:5-36.

Luo Z, Roi S, Dastor M, Gallice E, Laurin MA, L'Homme Y. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. Vet Microbiol, 2011;149:316-323.

Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M, Vischi F, Alric L, Vinel JP, Izopet J. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. J Med Virol, 2004;74:419-424.

Martella V, Bányai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Mari V, Saif L, Costantini V, De Grazia S, Pezzotti G, Lavazza A, Bounavoglia C. Genetic heterogeneity of porcine enteric caliciviruses identified from diarrhoeic piglets. Virus Genes, 2008;36:365-373.

Martelli F, Caprioli A, Zengarini M, Marata A, Fiegna C, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Delogu M, Ostanello F. Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (Sus scrofa scrofa) population in Italy. Vet Microbiol, 2008;126:74-81.

Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuvre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics, 2010;26:2462-2463.

Martinez MA, Alcala AC, Carruyo G, Botero L, Liprandi F, Luder JE. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. Vet Microbiol, 2006;116:77-84.

Marvil P, Knowles NJ, Mockett AMA, Britton P, Brown TDK, Cavanagh D. Avian ncephalomyelitis virus is a picornavirus and is most closely related to hepatitis A virus. J Gen Virol, 1999;80:653-662.

Matsuura K, Inoshima Y, Kameyama K, Murakami K. Esablishment of a novel ovine kidney cell line for isolation and propagation of viruses infecting domestic cloven-hoofed animal species. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2011;47:459-463.

Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Thys C, Thys E. Molecular detection of kobuviruses and recombinant noroviruses in cattle in continental Europe. Arch Virol, 2009;154:1841−1845.

McMurrow M. Vaccine preventable deaths and the global immunization vision and strategy, 2006-2015. MMWR Weekly, 2006;55:511-515.

Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1997;94:9860-9865.

Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, Emerson SU, Purcell RH. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries, J Clin Microbiol, 2002;40:117-122.

Meng XJ, Lindsay DS, Sriranganathan N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. Phil Trans R Soc B, 2009;364:2697-2707.

Méndez E, Arias CF. *Astroviridae*. In: Knipe DM, Howley PM (ed) Fields Virology, 5th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pp 981-1000.

Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. J Med Virol, 2005;76:341-349.

Nagasaki K, Tomaru Y, Katanozaka N, Shirai Y, Nishida K, Itakura S, Yamaguchi M. Isolation and characterization of a novel singel-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. Appl Environ Microbiol, 2004;7:704-711.

Nagy B, Nagy Gy, Meder M, Mocsári E. Enterotoxigenic *Escerichi coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. Acta Vet Hung, 1996;44:9-19.

Nakashima N, Ishibashi J. Identification of the 3C-protease-mediated 2A/2B and 2B/2C cleavage sites in the non-structural polyprotein precursor of a dicistrovirus lacking the NPGP motif. Arch Virol, 2010;155:1477-1482.

Nyrén P. The history of pyrosequencing. Methods Mol Biol, 2007;373:1-14.

Oh DY, Silva PA, Hauroeder B, Deidrich S, Cardodo DD, Schreier E. Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. Arch Virol, 2006;151:1199–1206.

Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, El-Attar L, Gallimore C, Brown DW, Green J, Bridger JC. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. J Virol, 2003;77:2789-2798.

Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family *Caliciviridae*. Virol, 2006a;350:240-250.

Oliver SL, Batten CA, Deng Y, Elschner M, Otto P, Charpilienne A, Clarke IN, Bridger JC, Lambden PR. Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses. J Clin Microbiol, 2006b;44:992-998.

Otto PH, Clarke IN, Lambden PR, Salim O, Reetz J, Liebler-Tenorio EM. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. J Virol, 2011;85:12013-12021.

Pang XL, Zeng SQ, Honma S. Effect of rotavirus vaccine on Sapporo virus gastroenteritis in Finnish infants. Pediatr Infect Dis J, 2001;20:295-300.

Pankovics P, Szabó H, Székely Gy, Gyurkovits K, Reuter G. Detection and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus type A and B strains in childhood respiratory infections in Hungary. Orv Hetil, 2009;150:121-127.

Pantin-Jackwood MJ, Spackman E, Day JM, Rives D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. Avian Dis, 2007;51:674-680.

Pantin-Jackwood MJ, Day JM, Jackwood MW, Spackman E. Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. Avian Dis, 2008;52:235-244.

Park S, Jeong C, Kim HH, Park SH, Park SJ, Hyun BH, Yang DK, Kim SK, Kang MI, Cho KO. Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea. Vet Microbiol, 2007;124:125-133.

Park S, Jeong C, Park SJ, Kim HH, Jeong YJ, Hyun BH, Chun YH, Kang MI, Cho KO. Molecular detection and characterization of unclassified bovine enteric caliciviruses in South Korea. Vet Microbiol, 2008;130:371-379.

Park SJ, Kim HK, Moon HJ, Song DS, Rho SM, Nguyen VG, Park BK. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their relationship with diarrhea. Arch Virol, 2010;155:1803-1811.

Pham NTK, Khamrin P, Nguyen TA, Kanti DS, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. J Clin Microbiol, 2007;45:2287–2288.

Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. The fecal viral flora of wild rodents. PLoS Pathog 2011;7:e1002218.

Pohl Ö, Brojnás J, Rusvai E, Ördög K, Siska I, Faludi G, Kapusinszky B, Csohán Á, Mezey I, Berencsi Gy. A hepatitis A vírus iránti védettség változása a magyar lakosságban 20 év alatt: változások az aktív és passzív védelemben. Focus Medicinae, 2001;4:3-11.

Pringle CR. Virus taxonomy. Arch Virol, 1999;144:421-429.

Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E virus. In: Fields virology, 4th edition. Szerk.: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2001, pp 3051-3061.

Quan P-L, Wagner TA, Briese T, Torgerson TR, Hornig M, Tashmukhamedova A, Firth C, Palacios G, Baisre-De-leon A, Paddock CD, Hitchison SK, Egholm M, Zaki SR, Goldman JE, Ochs H, Lipkin WI. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinaemia. Emerg Infect Dis, 2010;16:918-925.

Racaniello VR. *Picornaviridae*: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (ed) Fields Virology, 5th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pp 795-838.

Rajan E, Shattock AG, Fielding JF. Cost-effective analysis of hepatitis A prevention in Ireland. Am J Gastroenterol, 2000;95:223-226.

Reuter G, Szabó H, Székely Gy, Gyurkovits K, Szűcs Gy. First detection of human metapneumovirus in a child with respiratory syndrome in Hungary. Orv Hetil, 2006a;147:2299-2302.

Reuter G, Fodor D, Kátai A, Szűcs Gy. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Hungary. J Clin Virol, 2006b;36:100-102.

Reuter G, Boldizsár Á, Kiss I, Pankovics P. Candidate new species of *Kobuvirus* in porcine hosts. Emerg Infect Dis, 2008;14:1968-1970.

Reuter G, Boldizsár Á, Papp G, Pankovics P. Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptomes in Hungary. Arch Virol, 2009a;154:1529-1532.

Reuter G, Egyed L. Bovine kobuvirus in Europe. Emerg Infect Dis, 2009b;15:822-823.

Reuter G, Boldizsár Á, Pankovics P. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in genus *Kobuvirus*, family *Picornaviridae*. Arch Virol, 2009c;154:101-108.

Reuter G, Boros Á, Pankovics P, Egyed L. Kobuvirus in domestic sheep, Hungary. Emerg Infect Dis, 2010a;16:869-870.

Reuter G, Kecskeméti S, Pankovics P. evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary. Emerg Infect Dis, 2010b;16:696-698.

Reuter G, Boros Á, Pankovics P. Kobuviruses – a comprehensive review. Rev Med Virol, 2011;21:32-41.

Reuter G, Nemes C, Boros Á, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. Porcine kobuvirus in wild boars (*Sus scrofa*). Arch Virol, 2013;158:281-282.

Reyes GR, Purdi MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. Science, 1990;247:1335-1339.

Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis H, Isomura S, Ito K, Ishuzu T, Moritsugu Y, Lemon SM. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographic regions. J Gen Virol, 1992;73:1365-1377.

Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science, 1998;281:363-365.

Saif LJ, Bohl EH, Thiel KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm-virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. J Clin Microbiol, 1980;12:105-111.

Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. J Med Virol, 1999;57:243-251.

Schlauder GG, Dawson G. Hepatitis E virus. In: Manual of Clinical Microbiology, Szerk: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH. ASM Press, Washington, USA, 2003, pp. 1495-1511.

Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E. Animal noroviruses. Vet J, 2008;178:32-45.

Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khelifi H, De Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K, Hassine M, Guédiche MN, Aouni M, Pothier P. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. J Clin Microbiol, 2008;46:1349–1355.

Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E. The fecal virome of pigs on a high-density farm. J Virol, 2011;85:11697-11708.

Shan TL, Wang CM, Cui L, Delwart E, Yuan CL, Zhao W, Guo W, Dai XQ, Yu Y, Hua XG. Human parechovirus infections in monkeys with diarrhea, China. Emerg Infect Dis, 2010;16:1168-1169.

Shen Q, Zhang W, Yang S, Yang Z, Chen Y, Cui L, Zhu J, Hua Y. Recombinant porcine norovirus identified from piglet with diarrhea. BMC Vet Res, 2012;8:155

Shimizu M, Shirai J, Narita M, Yamane T. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. J Clin Microbiol, 1990;28:201-206.

Shirai Y, Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. Appl Environ Microbiol, 2008;74:4022-4027.

Snodgrass DR, Gray EW. Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhea. Arch Virol, 1977;55:287-291.

Snodgrass DR, Angus KW, Gray EW, Menzies JD, Paul G. Pathogenesis of diarrhea caused by astrovirus infections in lambs. Arch Virol, 1979;60:217-226.

Smiley JR, Chang KO, Haves J, Vinjé J, Saif LJ. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. J Virol 2002;76:10089-10098.

Smiley JR, Hoet AE, Tråvén M, Tsunemitsu H, Saif LJ. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. J Clin Microbiol, 2003;41:3089-3099.

Smith AW, Boyt PM. Caliciviruses of ocean origin: a review. J Zoo Wildlife Med, 1990;21:3-23.

Smith SL, Rahman M, Schapendonk CME, van Leeuwen M, Faruque ASG, Haagmans BL, Endtz HP, Osterhaus ADME. Calicivirus from novel recovirus genogroup in human diarrhea, Bangladesh. Emerg Infect Dis, 2012;18:1192-1195.

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.

Sweeney TR, Dhote V, Yu Y, Hellen CU. A distinct class of internal ribosomal entry site in members of the Kobuvirus and proposed Salivirus and Paraturdivirus genera of the *Picornaviridae*. J Virol, 2012;86:1468-1486.

Svraka S, Vennema H, van der Veer B, Hedlund KO, Thorhagen M, Siebenga J, Duizer E, Koopmans M. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. J Clin Microbiol, 2010;48:2191-2198.

Tai V, Lawrence JE, Lang AS, Chan AM, Culley AI, Suttle CA. Characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). J Phycol, 2003;39:343-352.

Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. Virology 2004;330:501-505.

Takao Y, Nagasaki K, Mise K, Okuno T, Honda D. Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infectious to a marine fungoid protist, *Shizochytrum* sp. (Thraustochytriaceae, labyrinthulea) Appl Environ Microbiol, 2005;71:4516-4522.

Takao Y, Mise K, Nagasaki K, Okuno T, Honda D. Complete nucleotide sequence and genome organization of a single-stranded RNA virus infecting the marine fungoid protist Schizochytrium sp. J Gen Virol, 2006;87:723-733.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Steche G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 2011;28:2731-2739.

Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet, 2003;362:371-373.

Thiry E. Clinical virology of ruminants. Paris: Wolters-Kluwer, 2007.

Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Chaetoceros socialis*. Appl Environ Microbiol, 2009;75:2375-2381.

Tse H, Chan WM, Li KSM, Lau SKP, Woo PCY, Yuen KY. Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. PLoS One, 2012;7:e34987.

Tseng CH, Tsai HJ. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus. Virus Res, 2007;129:104-114.

Yamashita T, Kobayashi S, Sakae K, nakata S, Chiba S, Ishihara Y, Isomura S. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. J Infect Dis 1991;164:954–957.

Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S, Utagawa E. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi virus) in Japan. J Clin Microbiol 1993;31:2938–2943.

Yamashita T, Sakae K, Kobayashi S, Ishihara Y, Miyake T, Mubina A, Isomura S. Isolation of cytopathic small round virus (Aichi virus) from Pakistani children and Japanese travelers from Southeast Asia. Microbiol Immunol, 1995;39:433-435.

Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa N, Takeda N, Miyamura T, Yamazaki S. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the *Picornaviridae* associated with acute gastroenteritis in humans. J Virol 1998;72:8408–8412.

Yamashita T, Ito M, Kabashima Y, Tsuzuki H, Fujiura A, Sakae K. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. J Gen Virol 2003;84:3069–3077.

Yang S, Zhang W, Shen Q, Yang Z, Zhu J, Cui L, Hua XG. Aichi virus strains in children with gastroenteritis, China. Emerg Infect Dis 2009;15:1703–1705.

Yazaki Y, Mizuo H, Takahasi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotunda Y, Okamoto H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. J Gen Virol, 2003;84:2351-2357.

Yin Y, Tohya Y, Ogawa Y, Numazawa D, Kato K, Akashi H. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. Arch Virol, 2006;151:1749-1759.

Yozwiak NL, Skewes-Cox P, Gordon A, Saborio S, Kuan G, Balmaseda A, Ganem D, Harris E, DeRisis JL. Human enterovirus 109: a novel interspecies recombinant enterovirus isolated from a case of acute pediatric respiratory illness in Nicaragua. J Virol, 2010;84:9047-9058.

Yu J-M, Jin M, Zhang Q, Li HY, Li DD, Xu ZQ, Li JS, Cui SX, Yang SH, Liu N, Duan ZJ. Candidate porcine Kobuvirus, China. Emerg Infect Dis 2009;15:823–825.

Yu Y, Abaeva IS, Marintchev A, Pestova TV, Hellen CUT. Common conformational changes induced in type 2 picornavirus IRESs by cognate trans-acting factors. Nucleic Acids Res, 2011;39:4851-4865.

Wang Q-H, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. Emerg Infect Dis, 2005a;12:1874-1881.

Wang Q-H, Han MG, Funk JA, Bowman G, Janies DA, Saif LJ. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. J Clin Microbiol, 2005b;43:5963-5972.

Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fuji M. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. Emerg Infect Dis, 2007;13:889-895.

Widdowson MA, Jasper WJM, van der Poel WHM, Verschoor F, de Roda Husman AM, Winter HL, Zaaijer HL, Koopmans M. Cluster of cases of acute hepatitis associated with hepatitis E virus infection acquired in The Netherlands. Clin Infect Dis, 2003;36:29-33.

Widdowson MA, Rockx B, Schepp R, van der Poel WHM, Vinjé J, van Duynhoven YT, Koopmans MP. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in The Netherlands. J Med Virol, 2005;76:119-128.

Wigand R, Sabin AB. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. Arch Gesamte Virusforsch, 1961;11:224-247.

Wise AG, Monroe SS, Hanson LE, Grooms DL, Sockett D, Maes RK. Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigen and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups. Virus Res, 2004;100:165-177.

Withers MR, Correa MT, Morrow M, Stebbins ME, Seriwatana J, Webster WD, Boak MB, Vaughn DW. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. Am J Trop Med Hyg, 2002;66:384-388.

Witzany G. Viruses: essential agents of life. Springer, 2012. ISBN9789400748996.

Wolf S, Reetz J, Otto P. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. Arch Virol, 2011;156:1143-1150.

Woo PC, Lau SK, Huang Y, Lam CS, Poon RW, Tsoi HW, Lee P, Tse H, Chan ASL, Luk G, Chan KH, Yuen KY. Comparative analysis of six genome sequences of three novel picornaviruses, turdiviruses 1, 2 and 3, in dead wild birds and proposal of two novel genera, *Orthoturdivirus* and *Paraturdivirus*, in *Picornaviridae*. J Gen Virol, 2010;91:2433-2448.

Woo PC, Lau SK, Choi GK, Huang Y, Teng JL, Tsoi HW, Tse H, Yeung ML, Chan KH, Jin DY, Yuen KY. Natural occurrence and characterization of two internal ribosome entry site elements in a novel virus, canine picodicistrovirus, in the picornavirus-like superfamily. J Virol, 2012;86:2797-2808.

Woode GN, Bridger JC. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. J Med Microbiol 1978;11:441-452.

Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Jiang DDS, Chang JH, Yang JY, Wu HS. Acute gastroenteritis caused by GI.2 sapovirus, Taiwan, 2007. Emerg Infect Dis, 2008;14:1169-1171.

van der Poel WHM, Vinjé J, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MPG. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. Emerg Infect Dis, 2000;6:36-41.

van der Poel WHM, Vershoor F, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, de Roda Husman AM. Hepatitis E virus sequences in swine in the Netherlands are closely related to sequences in humans in the Netherlands. Emerg Infect Dis, 2001;7:970-976.

van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, Swanink C, Koopmans M, van der Avoort H. Prevalence of human parechovirus in The Netherlands in 2000 to 2007. J Clin Micorbiol, 2008;46:2884-2889.

van Hemert FJ, Lukashov VV, Berkhout B. Different rates of (non-)synonymous mutations in astrovirus genes; correlation with gene function. Virol J, 2007;4:25.

Vennema H, De Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Virol, 2002;25:233-235.

Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, Harris J, Johnsen C, Kroneman A, LeGuyader S, Lim W, Maunula L, Meldal H, Ratcliff R, Reuter G, Schreier E, Seibenga J, Vainio K, Vennema H, Varela C, Koopmans M: Norovirus outbreaks on cruise ships associated with the emergence of new variants: a summer prediction of a high winter epidemic. Emerg Infect Dis, 2008;14:238-243.

Verhoef LPB, Kroneman A, van Duynhoven Y, Boshuizen H, van Pelt W, Koopmans M: H. Vennema, E. Duizer (the Netherlands); D. Brown, B. Adak, J. Gray, J. Harris, M. Iturriza (United Kingdom); K.-H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Kuusi (Finland); B. Böttiger, K.

Mølbak, G. Falkenhorst, C. Johnsen (Denmark); K.-O. Hedlund, Y. Andersson, M. Thorhagen, M. Lysén, M. Hjertqvist (Sweden); P. Pothier, E. Kohli, K. Balay, J. Kaplon, G. Belliot, S. Le Guyader (France); A. Bosch, A. Dominguez, J. Buesa, A. Sanchez Fauquier, G. Hernández-Pezzi (Spain); G. Szücs, G. Reuter, K. Krisztalovics (Hungary); M. Poljsak-Prijatelj, D. Barlic-Maganja, A. Hocevar Grom (Slovenia); F. Ruggeri, I. Di Bartolo (Italy); E. Schreier, K. Stark, J. Koch, M. Höhne (Germany); M. Lynch, B. Foley, P. McKeown, S. Coughlan (Ireland); K. Vainio, T. Bruun (Norway). Selection tool for foodborne norovirus outbreaks. Emerg Infect Dis, 2009;15:31-38.

Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, Naeem A, Zaidi S, Delwart E. Metagenomic analysis of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. J Virol 2009; 83:4642-4651.

Vinjé J. Molecular detection and epidemiology of human caliciviruses. Thesis. RIVM, Bilthoven, The Netherlands, 1999. ISBN:90-393-2268-6

Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birsch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm M. Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. J Virol, 2001;75:1620-1631.

Zhu HC, Chu DK, Liu W, Dong BQ, Zhang SY, Zhang JX, Li LF, Vijaykrishna D, Smith GJ, Chen HL, Poon LLM, Peiris JSM, Guan Y. Detection of diverse astroviruses from bats in China. J Gen Virol, 2009;90:883-887.

Zucker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res, 2003;31:3406-3415.

SCIENTOMETRIA
(Az MTA V. Orvostudományi Osztály szabályai szerint, 2013. október 15.)

Az összes közlemény összesített impakt faktora: 182,1

PhD fokozat megszerzése előtti közlemények impakt faktora: **5,258**

PhD fokozat megszerzése utáni közlemények impakt faktora: **176,842**

Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: **113,668**

(A pályázathoz szorosan nem kapcsolódó közlemények impakt faktora: **13,648**)

Idézettség:

Összes idézetek száma: **1532**

Független idézetek száma: **1196**

Első és utolsó szerzős közlemények, független idézetek száma: **548**

H-index (klasszikus): **23**

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Ph.D. fokozat megszerzése előtt (2000-2002)

1. **Reuter G**, Kátai A, Kálmán M, Szűcs Gy: Humán calicivírus fertőzés első magyarországi igazolása.
   Orvosi Hetilap. 2000. 38, 2071-2074. (Impakt faktor: **0**)
2. **Reuter G**, Szűcs Gy: Humán calicivírusok - az akut virális gastroenteritis megbetegedések és járványok gyakori kórokozói.
   Infektológia és Klinikai Mikrobiológia. 2000. 3-4, 93-99. (Impakt faktor: **0**)
3. **Reuter G**, Kucsera S, Somogyi Gy, Lencsés Gy, Szűcs Gy: Humán calicivírus-járvány kórházi osztályon.
   Orvosi Hetilap. 2001. 9, 459-463. (Impakt faktor: **0**)
4. **Reuter G**, Farkas T, Berke T, Jiang X, Matson DO, Szűcs Gy: Sapporo-szerű vírusok ismeretlen kóreredetű szórványos gastroenteritisekben.
   Orvosi Hetilap. 2002. 7, 351-354. (Impakt faktor: **0**)
5. Szűcs Gy, **Reuter G**: Mit kell tudni a humán calicivírusokról?
   Magyar Orvos 2002. 2. 49-50. (Impakt faktor: **0**)

6. Farkas T, Berke T, **Reuter G**, Szűcs Gy, Matson DO, Jiang X: Molecular detection and sequence analysis of human caliciviruses from acute gastroenteritis outbreaks in Hungary.
Journal of Medical Virology 2002. 67, 567-573. (Impakt faktor: **2,629**)

7. Reuter G, Szűcs Gy: Humán calicivírusok ("Norwalk-szerű vírusok") okozta gastroenteritis járványok gyermekközösségekben Magyarországon, 1998-2001.
Gyermekgyógyászat 2002. 53, 427-435. (Impakt faktor: **0**)

8. Reuter G, Farkas T, Berke T, Jiang X, Matson DO, Szűcs Gy: Molecular epidemiology of human calicivirus acute gastroenteritis outbreaks in Hungary, 1998 to 2000.
Journal of Medical Virology 2002. 68, 390-398. (Impakt faktor: **2,629**)

9. Reuter G, Szűcs Gy: Új eredmények a hazai és nemzetközi humán calicivírus kutatásban.
Therapia Antimicrobialis 2002. 10, 11-15. (Impakt faktor: **0**)

Ph.D. fokozat megszerzése után (2003-2013)

10. Reuter G, Szűcs Gy: "Norwalk-szerű vírusok" kimutatására alkalmas EIA kitek.- Összehasonlító vizsgálatok és első tapasztalatok.
Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2003. 1, 27-28. (Impakt faktor: **0**)

11. Reuter G, Jiang X, Szűcs Gy: A norovírusok vezető kóroki szerepe a kórházi (nosocomialis) gastroenteritis járványokban Magyarországon.
Orvosi Hetilap 2003. 33, 1611-1616. (Impakt faktor: **0**)

12. Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, Buesa J, Schreier E, Reacher M, Brown D, Gallimore C, Bottiger B, Svensson L, Hedlund K-O, Thorven M, von Bonsdorff C-H, Maunula L, Poljsak-Prijatelj M, **Reuter G**, Szűcs Gy, Melegh B, van Duynhoven Y, Koopmans M: Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant.
The Lancet 2004. 363, 682-688. (Impakt faktor: **21,713**)

13. Reuter G: Calicivírus járványok Magyarországon, 1998-2002.
Epinfo 2004. 9, 81-88. (Impakt faktor: **0**)

14. Reuter G, Szűcs Gy: Endémiás hepatitis E fertőzések a fejlett országokban? – Szaporodó ismeretek a hepatitis E vírusról és a hepatitis E fertőzésről.
Orvosi Hetilap 2004. 51, 2555-2561. (Impakt faktor: **0**)

15. Reuter G, Vennema H, Koopmans M, Szűcs Gy: Új, rekombináns norovírus (GGIIb/Hilversum) megjelenése és kimutatása nem-bakteriális gastroenteritis járványokban hazánkban.
Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2004. 2, 55-59. (Impakt faktor: **0**)

16. Reuter G, Krisztalovics K, Vennema H, Koopmans M, Szűcs Gy: Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks – emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary.
Journal of Medical Virology 2005. 76, 598-607. (Impakt faktor: **2,52**)

17. Reuter G: Hepatitis E vírus és hepatitis E fertőzés. (felkért)
Infekció és Infekciókontroll 2005. 2, 133-142. (Impakt faktor: **0**)

18. Szűcs Gy, **Reuter G**, Matson DO: Norovírusok (humán calicivírusok) kórházakban és ápolási intézményekben. (felkért)
Magyar Epidemiológia 2005. 2, 135-146. (Impakt faktor: **0**)

19. Reuter G, Juhász Á, Kosztolányi L, Lefler É: Hepatitis A vírusok molekuláris kimutatása és elemzése két 2004 évi észak-kelet magyarországi járványból
Orvosi Hetilap 2005. 146 (44), 2257-2262. (Impakt faktor: **0**)

20. Fodor D, Kátai A, **Reuter G,** Maszárovics Z, Menyhárt É: Endémiás hepatitis E megbetegedések Csongrád megyében.
Orvosi Hetilap 2005. 146 (45), 2311-2315. (Impakt faktor: **0**)

21. Reuter G, Fodor D, Kátai A, Szűcs Gy: Hepatitis E vírus molekuláris kimutatása nem importált heveny hepatitisből – A hepatitis E vírus potenciálisan új, humán genetikai vonalának azonosítása Magyarországon.
Orvosi Hetilap 2005. 146 (47), 2389-2394. (Impakt faktor: **0**)

22. Reuter G, Vennema H, Koopmans M, Szűcs Gy: Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types.
Journal of Clinical Virology 2006. 35, 84-88. (Impakt faktor: **2,63**)

23. Reuter G, Fodor D, Kátai A, Szűcs Gy: Identification of a potential novel hepatitis E virus strain in Hungary.
Journal of Clinical Virology 2006. 36, 100-102. (Impakt faktor: **2,63**)

24. Reuter G, Bíró H, Szűcs Gy: Sertés enterális calicivírus (PEC) kimutatása molekuláris módszerrel Magyarországon.
Magyar Állatorvosok Lapja 2006. 8, 486-491. (Impakt faktor: **0,155**)

25. Reuter G, Juhász Á, Kosztolányi L, Lefler É, Fekete Zs: Co-circulation of genotype IA and new variant IB hepatitis A virus in outbreaks of acute hepatitis in Hungary – 2003/2004
Journal of Medical Virology, 2006. 78, 1392-1397. (Impakt faktor: **2,779**)

26. Reuter G, Juhász Á, Kosztolányi L, Lefler É, Fekete Zs: Hepatitis A vírusok molekuláris kimutatása és elemzése két 2004. évi észak-kelet magyarországi járványból.
Focus Medicinae 2006. 2, 3-8. (felkért másodközlés) (Impakt faktor: **0**)

27. Reuter G, Fodor D, Kátai A, Szűcs Gy: Hepatitis E vírus molekuláris kimutatása nem importált heveny hepatitisből – A hepatitis E vírus potenciálisan új, humán genetikai vonalának azonosítása Magyarországon.
Focus Medicinae 2006. 2, 9-13. (felkért másodközlés) (Impakt faktor: **0**)

28. Fodor D, **Reuter G,** Kátai A, Maszárovics Z, Menyhárt É: Hepatitis E fertőzések és a hepatitis E vírus molekuláris genetikai azonosítása Magyarországon.
Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2006. 2, 45-48. (Impakt faktor: **0**)

29. Krisztalovics K, Böröcz K, **Reuter G**: A calicivírus cirkuláció erősödése 2006 novemberében Magyarországon.
Epinfo 2006. 47, 610-611. (Impakt faktor: **0**)

30. Kroneman A, Vennema H, Harris J, **Reuter G**, von Bonsdorff C, Hedlund K, Vainio K, Pothier P, Koch J, Koopmans M, Schreier E, Böttiger B, Jackson V. Increase in norovirus activity reported in Europe.
Eurosurveillance, 2006. 11(12), E061214.1 (Impakt faktor: **0**)

31. Krisztalovics K, **Reuter G**, Szűcs G, Csohán Á, Böröcz K. Increase in norovirus circulation in Hungary in October – November 2006.
Eurosurveillance, 2006. 11(12), E061214.2 (Impakt faktor: **0**)

32. Reuter G, Bíró H, Szűcs Gy: Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary.
Archives of Virology, 2007. 152, 611-614. (Impakt faktor: **1,839**)

33. Reuter G, Pankovics P, Stefler D, Löveyné Móricz Á, Varga E, Kiss G, Szűcs M, Fekete Zs, Szűcs Gy: Hepatitis A-járvány a Dél-Dunántúlon: molekuláris összefüggések, epidemiológiai következtetések – 2006.
Orvosi Hetilap, 2007. 148, 1023-1031. (Impakt faktor: **0**)

34. Haagsman A, **Reuter G**, Duizer E, Nagy Gy-né, Herremans T, Koopmans M, Szűcs Gy: Seroepidemiology of hepatitis E virus in non-A, non-B, non-C hepatitis in Hungary
Journal of Medical Virology, 2007. 79, 927-930. (Impakt faktor: **2,831**)

35. Kroneman A, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, Itturiza M, Böttiger B, Molbak K, Johnsen C, von Bonsdorff CH, Maunula L, Kuusi M, Pothier P, Gallay A, Schreier E, Koch J, Szücs Gy, **Reuter G**, Kisztalovics K, Lynch M, McKeown P, Foley B, Coughlan S, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Vainio K, Isakbaeva E, Poljsak-Prijatelj M, Hocevar Grom A, Bosch A, Buesa J, Sanches Fauquier A, Hernandéz-Pezzi G, Hedlund KO and Koopmans M: Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for Foodborne Viruses
Journal of Public Health, 2008. 30, 82-90. (Impakt faktor: **1,109**)

36. Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, Harris J, Johnsen C, Kroneman A, LeGuyader S, Lim W, Maunula L, Meldal H, Ratcliff R, **Reuter G**, Schreier E, Seibenga J, Vainio K, Vennema H, Varela C, Koopmans M: Norovirus outbreaks on cruise ships associated with the emergence of new variants: a summer prediction of a high winter epidemic
Emerging Infectious Diseases, 2008. 14, 238-243. (Impakt faktor: **6,449**)

37. Reuter G: Hepatitis A vírus-fertőzés
Orvosi Hetilap, 2008. 149: 360-362. (felkért összefoglaló) (Impakt faktor: **0**)

38. Reuter G, Pankovics P, Szűcs Gy: Genetic drifts of norovorius genotype GII4 in 7 consecutive epidemic seasons in Hungary
Journal of Clinical Virology, 2008. 42, 135-140. (Impakt faktor: **3,32**)

39. Reuter G, Pankovics P, Egyed L: Szarvasmarha-norovírusok (calicivírus) molekuláris kimutatása hazánkban
Magyar Állatorvosok Lapja, 2008. 7, 387-390. (Impakt faktor: **0,088**)

40. Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, Iturriza M, Böttiger B, Falkenhorst G, Johnsen C, von Bonsdorff CH, Maunula L, Kuusi M, Pothier P, Gallay A, Schreier E, Höhne M, Koch J, Szücs G, **Reuter G**, Krisztalovics K, Lynch M, McKeown P, Foley B, Coughlan S, Ruggeri F, Di Bartolo I, Vainio K, Isakbaeva E, Poljsak-Prijatelj M, Hocevar Grom A, Zimsek-Mijovski J, Bosch A, Buesa J, Sanchez Fauquier A, Hernandéz-Pezzi G, Hedlund KO, Koopmans M: Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1-7-2001 to 30-6-2006.
Journal of Clinical Microbiology, 2008. 46, 2959-2965. (Impakt faktor: **3,945**)

41. Reuter G, Pankovics P, Szűcs Gy: A GII4 genotípusú norovírus genetikai evolúciója (drift) és pandémiás potenciálja – Hét hazai járványszezont felölelő tanulmány a calicivírus járványok epidemiológiájának molekuláris szintű megértéséhez.
Infektológia és Klinikai Mikrobiológia, 2008. 15, 43-47. (Impakt faktor: **0**)

42. Reuter G, Boldizsár Á, Kiss I, Pankovics P: Candidate new species of *Kobuvirus* in porcine hosts.
Emerging Infectious Diseases, 2008. 12, 1968-1970. (Impakt faktor: **6,449**)

43. Reuter G, Boldizsár Á, Pankovics P: Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, member of a new species in genus *Kobuvirus*, family *Picornaviridae*
Archives of Virology, 2009. 154, 101-108. (Impakt faktor: **1,909**)

44. Reuter G, Fodor D, Forgách P, Kátai A, Szűcs Gy: A hepatitis E vírus molekuláris epidemiológiája hazánkban: endémiás, élelmiszer közvetítette zoonózis
Orvosi Hetilap, 2009. 150(9), 415-421. (Impakt faktor: **0**)

45. Reuter G. Új, gyorsdiagnosztikus vizsgálati módszer megjelenése és szerepe a norovírus-járványok diagnosztikájában.
Epinfo, 2009. 6, 59-60. (Impakt faktor: **0**)

46. Reuter G, Fodor D, Forgách P, Kátai A, Szűcs Gy: Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary
Journal of Clinical Virology, 2009. 44, 277-281. (Impakt faktor: **3,124**)

47. Reuter G, Pankovics P, Egyed L: Molecular detection of genotype 1 and 2 bovine noroviruses in Hungary
Veterinary Record, 2009. 165 (18), 537-538. (Impakt faktor: **1,504**)

48. Reuter G, Egyed L. Bovine kobuvirus in Europe.
Emerging Infectious Diseases, 2009. 15, 822-823. (Impakt faktor: **6,794**)

49. Reuter G, Boldizsár Á, Kiss I, Kecskeméti S, Pankovics P: Sertés kobuvírus: egy új vírusfaj leírása a *Picornavidae* család *Kobuvírus* nemzetségében.
Magyar Állatorvosok Lapja, 2009. 131, 459-461. (Impakt faktor: **0,2**)

50. Siebenga J, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee B, Pang X-L, Ho E, Lim W, Choudekar A, Broor S, Helperin T, Banu N, Hewitt J, Greening G, Miao J, Duan Z-J, Lucero Y, O'Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff R, White P, Iritani N, **Reuter G**, Koopmans M: Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007
Journal of Infectious Diseases, 2009. 200, 802-812. (Impakt faktor: **5,865**)

51. Verhoef LP, Kroneman A, van Duynhoven Y, Boshuizen H, van Pelt W, Koopmans M; Foodborne Viruses in Europe Network (The Netherlands, the UK, Finland, Denmark, Sweden, France, Spain, Hungary (**Reuter G**), Slovenia, Italy, Germany, Ireland and Norway). Selection tool for foodborne norovirus outbreaks.
Emerging Infectious Diseases, 2009. 15, 31-38. (Impakt faktor: **6,794**)

52. Pankovics P, Kugler Z, Kátai A, **Reuter G**: Sapovírus (GI2) okozta gastroenteritis járvány első hazai igazolása – nemzetközi epidémia részjelensége?
Orvosi Hetilap, 2009. 150, 1223-1229. (Impakt faktor: **0**)

53. Reuter G, Boldizsár Á, Papp G, Pankovics P. Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary
Archives of Virology, 2009. 154, 1529-1532. (Impakt faktor: **1,909**)

54. Forgách P, Nowotny N, Erdélyi K, **Reuter G,** Szűcs Gy, Bakonyi T. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary
Veterinary Microbiology, 2010. 143, 106-116. (Impakt faktor: **3,256**)

55. Reuter G, Zimšek-Mijovski J, Poljšak-Prijatelj M, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Kantala T, Maunula L, Kiss I, Kecskeméti S, Halaihel N, Buesa J, Johnsen C, Hjulsager CK, Larsen LE, Koopmans M, Böttiger B. Incidence, diversity and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe
Journal of Clinical Microbiology, 2010. 48, 363-368. (Impakt faktor: **4,22**)

56. Reuter G, Kecskeméti S, Pankovics P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary
Emerging Infectious Diseases, 2010. 16, 696-698. (Impakt faktor: **6,859**)

57. Boros Á, Új M, Pankovics P, **Reuter G**. Detection and characterization of human parechoviruses in archived cell cultures in Hungary.
Journal of Clinical Virology, 2010. 47, 379-381. (Impakt faktor: **4,023**)

58. Reuter G, Boros Á, Pankovics P, Egyed L. Kobuvirus in domestic sheep, Hungary.
Emerging Infectious Diseases, 2010. 16, 869-870. (Impakt faktor: **6,859**)

59. Verhoef L, Vennema H, van Pelt W, Lees D, Boshuizen H, Henshilwood K, Koopmans M, collaborators: Böttiger B, Mølbak K, Johnsen C, von Bonsdorff KH, Maunula L, Kuusi M, Pothier P, Balay K, Kaplon J, Belliot G, Le Guyader S, Schreier E, Stark K, Koch J, Höhne M, Szücs G, **Reuter G**, Krisztalovics K, Lynch M, Foley B, McKeown P, Coughlan S, Duizer E, Kroneman A, van Duynhoven Y, Vainio K, Nygard K, Kapperud G, Poljsak-Prijatelj M, Barlic-Maganja D, Hocevar Grom A, Ruggeri F, Di Bartolo I, Bosch A, Dominguez A, Buesa J, Sanchez Fauquier A, Hernández-Pezzi G, Hedlund KO, Andersson Y, Thorhagen M, Lysén M, Hjertqvist M, Brown D, Adak B, Gray J,

Harris J, Iturriza M. Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks.
Emerging Infectious Diseases, 2010. 16, 617-624. (Impakt faktor: **6,859**)

60. Forgách P, Boncz A, Erdélyi K, Lőrincz M, Molnár B, Zentai J, Szűcs Gy, **Reuter G**, Bakonyi T. A hepatitis E vírus – irodalmi áttekintés és hazai helyzet állatorvos szemmel/Hepatitis E virus – literature review and situation in Hungary from veterinary point of view.
Magyar Állatorvosok Lapja, 2010. 132, 237-248. (Impakt faktor: **0,3**)

61. Drobeniuc J, Meng J, **Reuter G**, Green-Monfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z, Kamili S, Teo C-G. Serologic assays specific to IgM antibodies against hepatitis E virus: pan-genotypic evaluation of performances.
Clinical Infectious Diseases, 2010. 51(3), e24-27. (Impakt faktor: **8,186**)

62. **Reuter G**, Pankovics P, Boros Á. Identification of a novel astrovirus in domestic pig in Hungary.
Archives of Virology, 2011. 156, 125-128. (Impakt faktor: **2,111**)

63. Pankovics P, Boros Á, Rovács M, Nagy E, Krisztián E, Vollain M, **Reuter G.** Humán astrovírus okozta gastroenteritis járvány első hazai igazolása
Orvosi Hetilap, 2011. 152(2), 45-50. (Impakt faktor: **0**)

64. **Reuter G**, Boros Á, Pankovics P. Kobuviruses – a comprehensive review
Reviews in Medical Virology, 2011. 21, 32-41. (Impakt faktor: **7,2**)

65. Yilmaz H, Kocazeybek B, Ozkul AA, Turan N, **Reuter G**, Bostan K, Yilmaz A, Altan E, Uyunmaz G, Karaköse AR, Muratoglu K, Elevli M, Helps C. Frequency and phylogeny of norovirus in diarrheic children in Istanbul, Turkey.
Journal of Clinical Virology, 2011. 51(3), 160-164. (Impakt faktor: **3,969**)

66. Boros Á, Pankovics P, **Reuter G.** Characterization of a novel porcine enterovirus in domestic pig in Hungary
Infection, Genetics and Evolution, 2011. 11, 1096-1102. (Impakt faktor: **3,128**)

67. Reuter G, Új M, Pankovics P, Kolozsi T, Mihály I, Liptai Z, Boros Á. A humán parechovírusok klinikai jelentősége és első hazai azonosítása
Orvosi Hetilap, 2011. 152(25), 1007-1012. (Impakt faktor: **0**)

68. Boros Á, Pankovics P, Simmonds P, **Reuter G**. Novel positive-sense, single-stranded RNA (+ssRNA) virus with di-cistronic genome from intestinal content of freshwater carp (*Cyprinus carpio*).
PLoS One, 2011. 6(12), e29145 (Impakt faktor: **4,092**)

69. Reuter G, Pankovics P, Delwart E, Boros Á. Identification of a novel species of astrovirus in domestic sheep in Hungary.
Archives of Virology, 2012. 157, 323-327. (Impakt faktor: **2,03**)

70. Pankovics P, Boros Á, **Reuter G**. Novel picornavirus in domesticated common quail (*Coturnix coturnix*) in Hungary.
Archives of Virology, 2012. 157, 525-530. (Impakt faktor: **2,03**)

71. Boros Á, Nemes Cs, Pankovics P, Bíró H, Kapusinszky B, Delwart E, **Reuter G**. Characterization of a novel porcine enterovirus in wild boars in Hungary.
Archives of Virology, 2012. 157, 981-986. (Impakt faktor: **2,03**)

72. **Reuter G**, Nemes Cs, Boros Á, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. Astrovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Hungary
Archives of Virology, 2012. 157(6), 1143-1147. (Impakt faktor: **2,03**)

73. Boros Á, Pankovics P, Knowles NJ, **Reuter G.** Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep.
Journal of General Virology, 2012. 93, 1941-1951. (Impakt faktor: **3,127**)

74. Boros Á, Nemes C, Pankovics P, Kapusinszky B, Delwart E, **Reuter G**. Porcine teschovirus in wild boars in Hungary.
Archives of Virology, 2012. 157, 1573-1578. (Impakt faktor: **2,03**)

75. Pankovics P, Boros Á, Szabó H, Székely Gy, Gyurkovits K, **Reuter G**. Human enterovirus 109 (EV109) in acute paediatric respiratory disease in Hungary
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2012. 59(2), 285-290. (Impakt faktor: **0,646**)

76. Boros Á, Nemes C, Pankovics P, Kapusinszky B, Delwart E, **Reuter G**. Identification and complete genome characterization of a novel picornavirus in turkey (*Meleagris gallopavo*).
Journal of General Virology, 2012. 93, 2171-2182. (Impakt faktor: **3,127**)

77. **Reuter G,** Pankovics P, Knowles NJ, Boros Á. Two closely related novel picornaviruses in cattle and sheep in Hungary from 2008 to 2009, proposed as members of a new genus, in family *Picornaviridae*.
Journal of Virology, 2012. 86 (24), 13295-13302. (Impakt faktor: **5,076**)

78. **Reuter G**, Nemes C, Boros Á, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. Porcine kobuvirus in wild boars (*Sus scrofa*)
Archives of Virology, 2013. 158, 281-282. (Impakt faktor: **2,03**)

79. Pankovics P, Boros Á, Nemes C, Delwart E, **Reuter G**. Nebovírus (*Caliciviridae*) első hazai kimutatása hasmenéses borjú bélsármintájából/First detection of nebovirus (*Caliciviridae*) in fecal sample of diarrhoeic cattle calf in Hungary
Magyar Állatorvosok Lapja, 2013. 135, 12-17. (Impakt faktor: **0,146**)

80. Boros Á, Nemes C, Pankovics P, Kapusinszky B, Delwart E, **Reuter G**. Genetic characterization of a novel picornavirus in turkeys (*Meleagris gallopavo*) distinct from turkey gallivirus and megrivirus and distantly related to the members of the genus *Avihepatovirus*.
Journal of General Virology, 2013. 94, 1496-1509. (Impakt faktor: **3,127**)

81. Boros Á, Kiss T, Kiss O, Pankovics P, Kapusinszky B, Delwart E, **Reuter G**. Genetic characterization of a novel picornavirus distantly related to the marine mammal-infecting aquamaviruses in a long-distance migrant bird species, European Roller (*Coracias garrulus*)
Journal of General Virology, 2013. 94, 2029-2035. (Impakt faktor: **3,127**)

82. Phan TG, Vo NP, Boros Á, Pankovics P, **Reuter G**, Wang C, Deng X, Poon LLM, Delwart E. The viruses of wild pigeon droppings.
PLoS One, 2013. 8(9):e72787 (Impakt faktor: **3,73**)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Palya V, Glávits R, Dobos-Kovács M, Ivanics É, Nagy E-né, Bányai K, **Reuter G**, Szűcs Gy, Dán Á, Benkő M: Reovirus identified as cause of disease in young geese.
Avian Pathology 2003. 32, 129-138. (Impakt faktor: **1,271**)

2. Palya V, Glávits R, Dobos-Kovács M, Ivanics É, Nagy E-né, Bányai K, **Reuter G**, Szűcs Gy, Dán Á, Benkő M: Növendék ludak reovírus okozta betegsége.
Magyar Állatorvosok Lapja 2003. 125, 406-414. másodközlés (Impakt faktor: **0,089**)

3. Bányai K, Jakab F, **Reuter G**, Bene J, Új M, Melegh B, Szűcs Gy: Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak.

Archives of Virology 2003. 148, 2281-2291. (Impakt faktor: **1,876**)

4. Reuter G, Szabó H, Székely Gy, Gyurkovits K, Szűcs Gy: Humán metapneumovírus első hazai kimutatása gyermekkori légúti fertőzésből.
Orvosi Hetilap 2006. 48, 2299-2302. (Impakt faktor: **0**)

5. Reuter G, Meleg E, Kiss G, Albert N, Fekete Zs, Szűcs Gy: Adenovírus 8-as típusa okozta járványos keratoconjunctivitis molekuláris diagnosztikája
Orvosi Hetilap, 2007. 148, 1311-1315. (Impakt faktor: **0**)

6. Pankovics P, Szabó H, Székely Gy, Gyurkovits K, **Reuter G**: A légúti óriássejtes vírus A és B típusának molekuláris kimutatása és epidemiológiája gyermekkori légúti fertőzésekben/Molecular detection and epidemiology of respiratory syncytial virus types A and B in childhood respiratory infections
Orvosi Hetilap, 2009. 150, 121-126. (Impakt faktor: **0**)

7. Pankovics P, Szabó H, Székely Gy, Gyurkovits K, **Reuter G**: Detection and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus type A and B strains in childhood respiratory infections in Hungary
Clinical and Experimental Medical Journal, 2009. 3, 87-97. (Impakt faktor: **0**)

8. **Reuter G.** A XXI. század első influenza pandémiája – virológiai háttér.
Magyar Epidemiológia, 2010. 7(2-3), 69-81. (Impakt faktor: **0**)

9. Burián Zs, Szabó H, Székely Gy, Gyurkovits K, Pankovics P, Farkas T, **Reuter G**. Detection and follow-up of Torque teno midi virus ("small anelloviruses") in nasopharyngeal aspirates and other three human secretes in children
Archives of Virology, 2011. 156, 1537-1541. (Impakt faktor: **2,111**)

10. Tuzankina AI, Tóth B, Kobeleva YM, Erdős M, Kiseleva NN, Bolkov MC, **Reuter G**, Maródi L. Neuronal injury mediated by CD8+ T lymphocytes in patients with X-linked agammaglobulinemia and progressive neurodegenerative disease.
Allergy (European Journal of Allergy and Clinical Immunology), 2011. 66(12), 1617-1618. (Impakt faktor: **6,271**)

11. Horváth KB, Pankovics P, Battyáni Z, Kálmán E, **Reuter G**. Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes carcinoma valószínű kóroka/Probable etiological role of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma
Orvosi Hetilap, 2013. 154, 102-112. (Impakt faktor: **0**)

12. **Reuter G**, Boros Á, Delwart E, Pankovics P. Novel seadornavirus (*Reoviridae*) related to Banna virus in Europe.
Archives of Virology, 2013. 158, 2163-2167. (Impakt faktor: **2,03**)

KÖNYVFEJEZETEK

1. Reuter G, Jakab F, Bányai K, Szűcs Gy: Gastroenteritist okozó vírusok. Humán astrovírusok. Humán enterális adenovírusok. Humán calicivírusok (norovírusok, sapovírusok). Rotavírusok. Feltételezetten gastroenteritist okozó egyéb vírusok. Orvosi Molekuláris Virológia. Szerkesztő: Berencsi György, Convention Budapest Kft., 2005. 22-39.

2. Reuter G: *Caliciviridae* - Humán calicivírusok: norovírusok, sapovírusok. Klinikai és Járványügyi Virológia. Szerkesztő: Takács Mária, Vox Medicina Kiadói Kft., Budapest, 2011. 233-238. ISBN: 9789639740204

3. **Reuter G**: *Picobirnaviridae*; Picobirnavírusok. Klinikai és Járványügyi Virológia. Szerkesztő: Takács Mária, Vox Medicina Kiadói Kft., Budapest, 2011. 423-424. ISBN: 9789639740204

4. Reuter G: *Picornaviridae*. Kobuvírusok. Klinikai és Járványügyi Virológia. Szerkesztő: Takács Mária, Vox Medicina Kiadói Kft., Budapest, 2011. 443-444. ISBN: 9789639740204

5. Reuter G: *Picornaviridae*. Parechovírusok. Klinikai és Járványügyi Virológia. Szerkesztő: Takács Mária, Vox Medicina Kiadói Kft., Budapest, 2011. 445-446. ISBN: 9789639740204

6. Reuter G: Orthomyxovírusok, Influenza vírusok. Az Orvosi Mikrobiológia Tankönyve. Szerkesztő: Pál Tibor, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2012. 223-228. ISBN: 9789632263533

7. Reuter G: Calicivírusok és egyéb gastrointestinális vírusok. Humán calicivírusok (norovírus és sapovírus); Astrovírus, Enterális adenovírusok, Feltételezetten gastroenteritist okozó egyéb vírusok. Az Orvosi Mikrobiológia Tankönyve. Szerkesztő: Pál Tibor, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2012. 253-255. ISBN: 9789632263533

8. Reuter G: Hepatitis E vírus. Az Orvosi Mikrobiológia Tankönyve. Szerkesztő: Pál Tibor, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2012. 255-256. ISBN: 9789632263533

9. Reuter G, Knowles N. Chapter 32, Porcine astroviruses. Diseases of Swine, 10th edition, Editors: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA 2012. pp 487-489. (*English*) ISBN: 9780813822679

10. Knowles N, **Reuter G**. Chapter 34, Porcine caliciviruses. Diseases of Swine, 10th edition, Editors: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA 2012. pp 493-500. (*English*) ISBN: 9780813822679

11. Reuter G, Németh K, Tompity T, Ember I. A fertőző betegségek részletes epidemiológiája. Népegészségügyi Orvostan, Szerkesztők: Ember István, Kiss István, Cseh Károly, Dialóg Campus Kiadó, Budapest 2013. 227. XII. 2.1. ISBN: 9789636425111