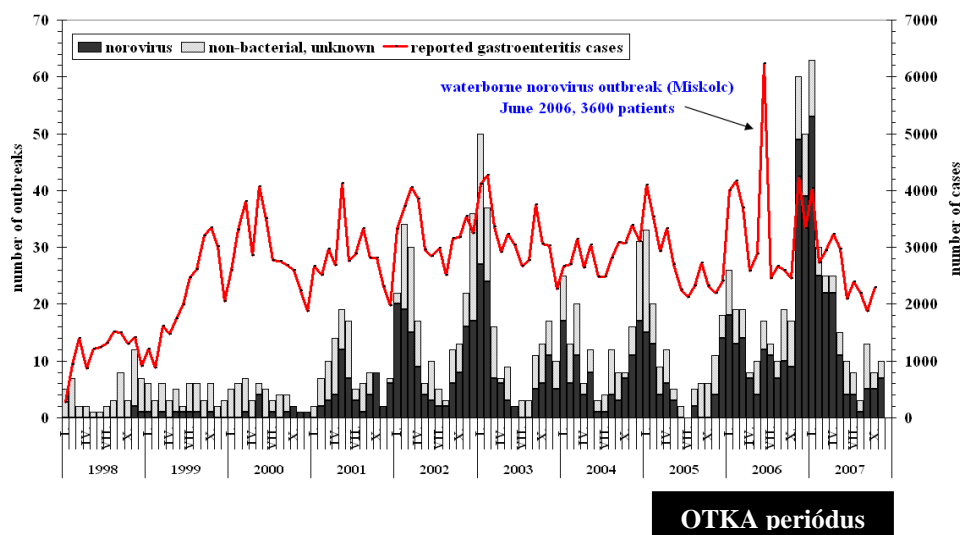


Az OTKA F048433 számú „Magyarországi gastroenteritis járványokból kimutatott calicivírusok molekuláris szintű elemzése” című pályázat összefoglalója (zárójelentés)

A calicivírus vizsgálataink a 2005 évben, a témában elfogadott nemzetközi pályázatokkal egészültek ki. Ezek az EU 6. Keretprogramja által támogatott „*Enteric Virus Emergence, New Tools*” nevű (EVENT, SP22-CT-2004-502571) és az EU DG-SANCO „*Prevention of emerging (food-borne) enteric viral infections: diagnosis, viability testing, networking and epidemiology*”nevű (DIVINE-NET, 20033213) pályázatok. Az egy Konzorciumot alkotó 2 pályázat tagjai Európa 10 országának (Hollandia, Anglia, Svédország, Franciaország, Németország, Finnország, Spanyolország, Dánia, Szlovénia és Magyarország) 1-1 laboratóriuma. A hazai vizsgálatok így beépültek a Konzorcium céljain keresztül az élelmiszerekkel, enterális úton terjedő vírusok, így a calicivírusok (norovírusok, sapovírusok), a hepatitis A és E vírusok európai molekuláris epidemiológiai vizsgálatába 2005-2008 között. A Konzorcium az éves munkaértekezletét nagy sikerrel 2007. szeptember 27-28.-án Pécsen tartotta – szervezésünkben – 13 országból 42 európai kutató részvételével.

A norovírusok járványügyi diagnosztikai vizsgálatának kiépítése, a szakmai javaslataink alapján, 2005-ben kezdődött el az 5 regionális ÁNTSZ laboratóriumban hazánkban, mely az elmúlt 3 évben sikeresen együttműködött e téren. A szűrővizsgálat az ismeretlen eredetű, nem bakteriális gastroenteritis járványok székletmintáiból antigén kimutató ELISA kitéekkel a regionális laboratóriumok végezték, a molekuláris genetikai vizsgálatok a Konzorcium és az általunk kidolgozott metodikákkal Pécsen történt. A hagyományos reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR) módszer mellett a real-time PCR (LightCycler) módszert is kidolgoztuk a norovírusok kimutatására. Laboratóriumunkban, a fent említett külföldi pályázati forrásból, 2006-ban beszerzésre került egy kapilláris szekvenátor készülék (ABI PRISM 310, Genetic Analyser), melynek segítségével – a korábbi lassú és körülményes bérvizsgálat helyett - a minták beérkezését követően 4 munkanapon belül szekvencia-eredményhez jutunk. A gyors, genetikai szintű vírusazonosítás és elemzés következtében a norovírusok nyomon követése „valós-idejű”, nem szenved késedelmet. A Laboratóriumunk azonnal jelezni képes a vírus és az epidemiológiai helyzet változásait és a lehetséges járványügyi összefüggéseket a hazai és nemzetközi társszerveknek. Az együttműködésnek köszönhetően egyben korszerű, nagy értékű, saját tulajdonú berendezéshez jutott a Laboratórium.

A három év alatt (2005. január 1. – 2007. december 31.) összesen 720 ismeretlen eredetű, nem bakteriális gastroenteritis járványt regisztráltunk. Összesen 259 (36%) (64/104/91) járvány esetén történt RT-PCR vizsgálat. Humán calicivírust (norovírust) 253 járványból mutattunk ki RT-PCR módszerrel. Összesen 232 (57/87/88) RT-PCR-pozitív járványból történt nukleotid sorrend meghatározás. 2005 és 2007 között, ahogy 2001 óta a hazai járványügyi statisztikákban minden évben, a norovírusok voltak a leggyakoribb kórokozók a gastroenteritis járványokban hazánkban.



A járványok többsége különböző kórházi osztályokon kitört nosocomialis calicivírus járvány (57%) volt. Szociális és időotthonokban a járványok 21,7%-a, gyermekközösségekben (óvoda, iskola) a járványok 21,2%-a történt. Egyéb előfordult járvány helyszínek: szálloda, fürdőzők, kollégium, tábor, börtön, gyártelep és település. Leggyakoribb átviteli mód a közvetlen kontaktus volt.

A Konzorcium web-alapú adatbázisán (<http://www.eufoodborneviruses.co.uk>) keresztül több esetben történt járványügyi riasztás Európában, amikor élelmiszer közvetítette norovírus járvány terjedése merült fel. Értesítést kaptak az illetékes hazai járványügyi hatóságok is. Egy dániai calicivírus járványt Kelet-Európából importált bogyósgyümölcs közvetítette, ritkán előforduló norovírus okozott, mellyel teljesen megegyező vírusszekvenciát csak egy hazai járványhoz kapcsolhatóan sikerült kimutatni. 2006. nyarán és november végén elsőként jeleztük a norovírus járványok számának megszorodását hazánkban, így Európában. A Stockholmban székelő Európai Járványügyi Központ (ECDC) az események összefoglalására kért fel bennünket (lsd: közleményjegyzék). Felmerült, hogy a norovírusok cirkulációjában, megindításában jelentős szerepe lehet az európai folyókon egyre népszerűbb, jelentős forgalmat lebonyolító turistahajó forgalomnak (lsd: közleményjegyzék). E hajókon mind a turisták mind a legénység nemzetközi, időlegesen alkot a populáció zárt közösséget, gyorsan váltják egymást az utazók a hajók szennyezett fedélzetén, az „exotikus” körülményeket biztosító utazás számos higiénés problémát felvet, nincs kidolgozott protokoll a megfelelő higiénés körülmények biztosítására, számos országot felkeresnek kikötéskor stb. így ideális körülményeket teremt ez a fajta utazási típus a norovírusok szóródására.

A norovírus genotípusok megoszlása a hazai járványokban 2004. június és 2007. december között a következő volt gyakoriság szerint: GII4 (82%), GIIb (9,7%), GI4 (1,6%), GI-1 (1,6%), GII2 (1,2%), GII7 (1,2%), GI6 (1,2%), GIúj (0,8%), GII1 (0,4%), GI3 (0,4%), GIúj (0,4%). Két új (GI és GII genocsoportba tartozó) vírus-genotípust sikerült kimutatni. A járványok döntő többségét (82%) viszont a GII4 genotípusba tartozó vírusok okozták. Az egyes genotípusok eltérő epidemiológiai jellegzetességet mutatnak. A GII4 vírus szignifikánsan gyakrabban jelentkezik a kórházi nosocomialis és időotthoni járványokban, és elsősorban közvetlen kontaktus útján terjed. A ritkábban kimutatott GI-es norovírus genotípusokat gyakran élelmiszer és vízeredetű járványokból sikerült kimutatni és gyakran gyermekközösségek érintettek.

Az elmúlt 7 norovírus szezonból (2000/2001-től 2006/2007) 6-ban a GII4 genotípus volt domináns genotípus a járványokban. A GII4 genotípus genetikai elemzésével 4 kiemelt epidémiás GII4 variáns (GII4-2000; GII4-2002; GII4-2004; GII4-2006b) megjelenését sikerült azonosítani hazánkban, melyek 2-2 szezonon keresztül szerepet játszottak a hazai

norovírus járványok számának kiugrásában és az epidémiákban. Az egyes GII4 variánsok váltásai időben gyorsan és variáns szinten teljesen bekövetkezett – az új variáns minden esetben teljesen kiszorította a korábban cirkuláló variánst. A 4 variáns csoportból összesen 12 hazai, reprezentatív GII4 variáns összefüggő RNS-polimeráz (ORF1) és kapszid (ORF2) régiójának (2340 hosszú) nukleotid sorrendjét határoztuk meg és hasonlítottuk össze. A vizsgálatokhoz saját tervezésű primereket használtunk. Az egyes GII4 variánsokra jellemző mutációkat (drift) sikerült leírni, melyek aminosav változásokkal is együtt jártak. A GII4-2002 variáns megjelenésétől kezdve a GII4 variánsokban egy triplet (aminósav) inzerció is található az antigenitásért felelős kapszid régióban. A norovírus GII4 variánsok evolúciós változása kísértetiesen hasonlít az influenza drift jelenségéhez és a molekuláris genetikai változások magyarázatot adnak/adhatnak a norovírus járványok epidemiológiájához. Egyben az eredmények arra utalnak, hogy - a korábbi kutatások eme ellentmondásos területen - valamilyen szintű populációs immunitás kialakulásával kell számolni. Úgy tűnik az adatok alapján, hogy nem a genotípus váltás játszik elsődleges szerepet a norovírus járványok kialakulásában, hanem a GII4 genotípus folyamatos genetikai változása az, mely az ismételt epidémiák kialakulásához vezet. Ez azt jelenti, hogy egy sikeres diagnosztikum vagy oltóanyag előállításának alapfeltétele a GII4 genotípusról megszerzett ismeretek.

2007 év közepén meghívásos alapon, megalakult – Laboratóriumunk részvételével - a „Global molecular epidemiology of GII-4 variants 2001-2007” munkacsoport, melyben a világ 15 calicivírus molekuláris kimutatásával foglalkozó laboratóriumának 1-1 kutatója vesz részt a világ 5 kontinenséről. A munkacsoport célja, hogy bizonyítsa, hogy a GII4 norovírusok variánsai az elmúlt években minden kontinensen jelen voltak – azaz pandémiát okoztak – és hogy kiderítse, a GII4 pandémiák forrását, mozgását, terjedésének sebességét és epidemiológiai jellegzetességeit. Az eredmények összegzésének tervezett időpontja 2008 első félévére, publikálása 2008 végére várható. Az előzetes, közös eredmények megerősítik a GII4 norovírusok fent említett variánsainak (GII4-2000; GII4-2002; GII4-2004; GII4-2006b) pandémiás terjedését a világon az elmúlt években.

Az elmúlt évek kiemelkedő járványügyi eseménye volt a miskolci ivóvízjárvány 2006. júniusában. Összesen több, mint 3600 regisztrált betegről tudunk (kb. 65 ezer exponált személy). A járvány kialakulásában az extrém időjárási viszonyok játszottak szerepet, de az eset felhívta a figyelmet a vízbázisok sérülékenységére és arra, hogy a fertőtlenítési eljárások nem számolnak a virális kórokozókkal. Miskolc karsztvíz-bázisa a heves esőzések miatt fekáliával szennyeződött, mely a vezetékes vízvezeték hálózatot is szennyezte. A járvány mintáiból a GII4-2006b norovírus volt kimutatható. A nagyszámú betegben felamplifikálódott GII4-2006b vírus az adatok alapján meghatározó hatással volt a 2006/2007 évi hazai norovírus cirkulációra, a terjedése a molekuláris eszközökkel követhető volt, és oka lehetett a 2006. novemberi hazai járványcsúcsnak is (62 regisztrált járvány egy hónap alatt, melyeket a GII4-2006b vírus okozott!). Az adatok alapján feltételezhető, hogy a norovírus járványok epidemiológiáját jelentős mértékben befolyásolják a járványügyi katasztrófák is. Jelen esetben a katasztrófa a hazai norovírus cirkulációt időben felgyorsította és egyben fel is erősítette azt.

A calicivírusok újonnan felismert jellegzetessége, hogy rekombinációra is képesek. Hazánkban 2000 óta - más országokkal ellentétben - 2007-ben is folyamatosan nyomon követhető volt a többszörösen rekombináns norovírus (GIIB-Hilversum) cirkulációja elsősorban a gyermek-populációkban. E rekombináns norovírus variáns a GII4 vírus után a második leggyakrabban (10%) kimutatott norovírus volt a hazai járványokban. A rekombináció a nyílt leolvasó keretek határánál, a nem-strukturális (ORF1) és strukturális (ORF2) génszakaszok kapcsolódásánál következik be. A GIIB-Hilversum rekombináns vírus többszörös promiszkuitás jellemzi. A korábban nem ismert szekvenciát mutató ORF1 régió 4 különböző – korábban ismert - ORF2 génszakasszal kapcsolódva hozott létre 4 féle jelenleg ismert rekombináns variánst. 2006-ban a GIIB/GII2, 2007-ben a GIIB/GII3 rekombináns vírus

epidemiás hazai terjedését lehetett bizonyítani. A rekombináció és a vírus hazai epidemiás terjedésének leírására referenciaként tekintenek és szerepel a legújabb kiadású Fields Virology kötetében is.

Az állati calicivírusok kimutatása érdekében összesen 9 sertés és 6 szarvasmarha állományból történt mintavételezés, összesen több mint 500 állattól korcsoportok szerint. Tíz esetben sertés sapovírust („porcine enteric calicivirus” – PEC), 1 esetben sertés norovírust (GII) mutattunk ki bélsármintákból. Mindkét calicivírus nemzetség sertésekből való kimutatásáról másodikként számoltunk be Európában. Négy esetben szarvasmarha norovírust (GIII) találtunk, 3 vírus a GIII/2, 1 a GIII/1 genotípusba tartozik (Izd: közleményjegyzék). Az utóbbi vírus ~2500 nukleotid hosszú RNS-polimeráz-kapszid régiójának nukleotid sorrend meghatározása is megtörtént tervezett primerekkel – így ez a második ismert teljes kapszid genom a GIII/1 típusban. A calicivírusokat fiatal – néhány hetes – állatokból mutattuk ki, a sertés sapovírusok esetében az állatok gastroenteritis tüneteit is mutatták. A sertés sapovírus esetén az adatok arra utalnak, hogy fertőzött telep esetén endémiás az átfertőződés és gazdasági károkkal is lehet számolni (elmaradó súlynövekedés, pusztulás, felesleges antibiotikum használat). A humán calicivírusokhoz a legközelebbi genetikai hasonlóságot a sertés norovírus esetén találtunk. A zoonózis lehetősége vélhetően e kórokozó esetén a legnagyobb.

A korábban a calicivírusok közé tartozó hepatitis E vírust számos állati (sertés, szarvas, őz és vaddisznó) mintából és humán hepatitis megbetegedésből sikerült molekuláris módszerekkel kimutatni. 116 esetben az emberi fertőzés diagnózisa IgM pozitív eredményen alapult, 13 esetben a hepatitis E vírus szekvencia meghatározása is megtörtént. Az esetek klinikai, epidemiológiai és járványtani leírása is megtörtént. Az eredmények bizonyítják a hepatitis E vírus hazai endémiás jelenlétét (HEV 3-as genotípus) és a zoonózis (fertőzött élelmiszerek) útján történő terjedését. Az ismeretlen eredetű (non-A-C) heveny hepatitisek 10%-ban a hepatitis E vírus jelenlétével számolhatunk hazánkban.

Megtörtént a calicivírus génbank és adatbázis felállítása Laboratóriumunkban. Megoldott az elmúlt évekből összegyűjtött calicivírus tartalmú széklet és RNS minták szakszerű tárolása. Reprezentatív, referencia mintagyűjteményt állítottunk össze, többféle szempont szerint. Külföldi laboratóriumok (Hollandia, Szlovénia, Törökország stb.) kérték a segítségünket referencia anyagok biztosításában, illetve a norovírus diagnosztika megteremtéséhez.

A spanyol Certest-Biotec cég 2007 februárjában megkereste laboratóriumunkat egy egyszerűen használható, immunkromatográfiás norovírus gyorseszteszt kifejlesztésében való közreműködéshez, mely igen hasznos lehetne a járványügyi munkában. A diagnosztikai teszt alapját a hazai reprezentatív válogatott norovírus törzsek adják. A teszt kifejlesztése folyamatban van. A hosszabb távra tervezett közös munka részeként a spanyol cég felkérését elfogadva EU FP7-es pályázatot adtunk be. Az EU FP6 EVENT projekt résztvevői – Laboratóriumunkkal együtt - ugyancsak szeretnék folytatni az európai norovírus molekuláris epidemiológiai munkát, kiegészítve többek között a norovírusok élelmiszerekből való kimutatásának problémakörének vizsgálatára (élelmiszerbiztonság) és EU FP7-es pályázatot adott be.

A vizsgálataink eredményei 10 angol nyelvű, 3 magyar nyelvű közleményben és 2 könyvfejezetben jelentek már meg vagy jelennek meg a közeljövőben. További angol nyelvű cikkek publikálása folyamatban van a témában. Az eredmények angol és magyar nyelvű előadások formájában hazai és nemzetközi konferenciákon, továbbképzéseken (egyetemi, közegészségügyi-járványügyi) is elhangzottak. A hazai eredmények a 3. Nemzetközi Calicivírus Világkonferencián (2007. november 10-13; Cancun, Mexikó) is bemutatásra kerültek. A Laboratóriumunk 2005. szeptembere óta hivatalosan is a „Gastroenteritist okozó Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriuma”.

A norovírus okozta járványok több éven keresztül, folyamatosan végzett molekuláris epidemiológia vizsgálata új ismereteket tárt fel a norovírus járványok epidemiológiai jellegzetességeiről (gyakoriság, terjedési módok és genotípusok kapcsolata, korcsoportok és genotípus kapcsolata, genotípus eloszlás, járványügyi katasztrófa hatása stb.) és a norovírusok genetikai állományának és antigenitásának változásairól. Új ismereteket szereztünk a calicivírusok kimutatásával sertések és szarvasmarhák körében. A vizsgálatok bizonyították a norovírusok vezető szerepét a hazai gastroenteritis járványok kórokozói körében és összekapcsolódva a nemzetközi vizsgálatokkal a vírus pandémiás potenciálját. A norovírus – és elsősorban a GII4 genotípus - rendkívül gyors és sikeres genetikai evolúciója hátterében az influenza vírusoknál már ismert „drift” jelensége húzódik. Előrevetítve, hányással és hasmenéssel járó norovírus fertőzés/járvány szám emelkedésének legvalószínűbb oka egy új norovírus GII4 genetikai/antigén variáns megjelenése a populációban. A norovírus/calicivírus léte ma hazánkban általánosan ismert az epidemiológusok körében. A kórokozó ismerete mellett a molekuláris eredményekből levonható új információk további segítséget adnak a közvetlen járványügyi munkában és hozzájárulhatnak a hosszú távú prevenció, a vakcina előállításának sikeréhez is.