

**Humán Rotavírusok Cirkulációjának Vizsgálata
Magyarországon**

doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Szűcs György

Pécsi Orvostudományi Egyetem

Pécs, 1997

**"Fertőző betegségek molekuláris pathogenezeise" doktori program
Programvezető: Prof. Dr. Emődý Levente**

"Infectious disease is one of the few genuine adventures left in the world. The dragons are all dead... About the only sporting proposition that remains unimpaired by the relentless domestication of a once free-living human species is the war against those ferocious little fellow creatures, which ... waylay us in our food and drink and even in our love."

- Hans Zinsser, mikrobiológus, 1934.

Ajánlom mindazon kollégáimnak és barátaimnak, akik az elmúlt évek során kitartóan ösztönöztek, és bíztak benne, hogy e munka végül mégis csak meg fog születni.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Anyagok és módszerek	14
1. Székletminták	14
2. Rotavírus kimutatása latex agglutinációs (LA) teszttel	14
3. Rotavírus kimutatása ELISA módszerrel	14
4. Rotavírus G-szerotípusok meghatározása monoklonális savókkal ELISA vizsgálati rendszerben	15
5. Rotavírusok RNS genomjának székletből történő közvetlen kimutatása; elektroferotipizálás	15
6. Kontrollként használt vírus és virális RNS	16
7. Elektronmikroszkópos vizsgálat	16
8. Rotavírus tenyésztése szövettényészetben	16
9. Rotavírus antigének kimutatása indirekt immunofluoreszcens módszerrel	17
10. Kórházi- és betegadatok	17
11. Statisztikai analízis	17
Eredmények	18
1. A rotavírus RNS genomjának kimutatása	18
2. A rotavírusok monoklonális ellenanyagokkal végzett szero- tipizálása.....	25
3. Humán rotavírus izolálása szövettényészetben	26
4. Rotavírusok cirkulációjának epidemiológiai jellemzői	28
5. Hazai és nemzetközi együttműködés kiépítése	30
Megbeszélés, új eredmények	32
Köszönetnyilvánítás	34
Irodalom	35
Megjelent közlemények, előadások összefoglalói	42

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ALT	alanin-aminotranszferáz
ÁNTSZ	Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat
BNO	betegségek nemzetközi osztályozása (kódlista)
BSA	bovin szérumalbumin
CDC	Centers for Disease Control (USA)
CTAB	cetil-trimetilammónium-bromid
DAKO	(Dakopatts) immunszerológiai készítményeket előállító dán cég
EDTA	etiléndiamintetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fötális bovin szérum
FITC	fluoresceinizotiocianát
G típus	“glikoprotein” típus
Genetron	1,1,2-triklor-trifluoretán
GITC	guanidin izotiocianát
HA	hidroxiapatit
KÓJÁL	Közegészségügyi és Járványügyi Állomás
LA	latex-agglutináció
LH	laktalbumin hidrolizátum
MA-104	embrionális rhesusmajom veséjéből kialakított stabil sejtvonal
MEM	minimum essential medium
MTA	Magyar Tudományos Akadémia
NCDV	Nebraska Calf Diarrhea Virus
NIH	National Institute of Health (USA)
O.D.	optikai denzitás
OKI	Országos Közegészségügyi Intézet
P típus	“proteáz-érzékeny” típus
PBS	foszfáttal pufferezett sóoldat
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polietilén-glikol
POTE	Pécsi Orvostudományi Egyetem
RNS	ribonukleinsav
SA11	simian rotavírus (simian agent 11)
SCIDS	severe combined immunodeficiency syndrome
SDS	nátriumdodecilszulfát (nátriumlaurilszulfát)
SZOTE	Szegedi Orvostudományi Egyetem
VP1...7	vírusprotein 1...7
WHO	World Health Organization

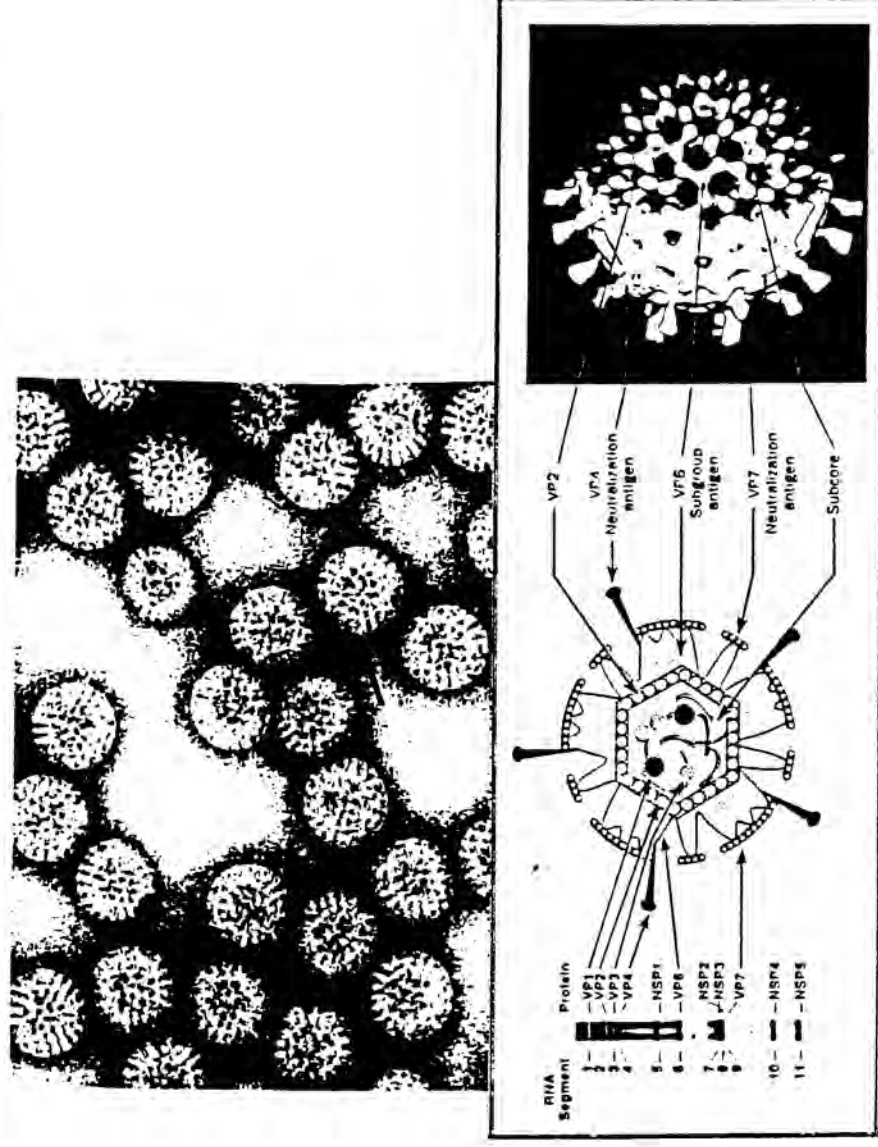
BEVEZETÉS

Az elmúlt több mint két évtized alatt, a rotavírusok emberi betegséggel kapcsolatos első leírása (2, 15), valamint újszülöttek és fiatal gyermekek hasmenéseinek fő etiológiai okaként való azonosítása óta, jelentős haladás történt a vírus megismerésében, molekuláris biológiájának feltárásában, az általa okozott betegség pontosabb leírásában (11, 13, 25, 47). A rotavírus capsid-struktúrájára, genom-felépítésére és szaporodási stratégiájára nézve sok hasonlóságot mutat az emlősök reovirusaival, és ezért a Reoviridae családon belül önálló genusként klasszifikálták (35).

A rotavírusok peplonnélküli, meglehetősen nagy enterális vírusoknak tekinthetők (~ 70 nm), és jellegzetes, küllős kerékre (latin: rota) emlékeztető a morfológiájuk elektronmikroszkópos vizsgálattal (4). A legújabb krioelektronmikroszkópos és számítógépes struktúra-analízissel végzett vizsgálatok már csaknem 40 Å feloldással mutatták meg a vírus 3-dimenziós szerkezetét (45). A 11 szegmensekből álló duplafonali RNS genom minden egyes szegmense egy-egy vírusfehérjét kódol (13)(1. ábra). Részletes vizsgálatokkal meghatározták az egyes szegmensekben a bázisok sorrendjét is, különös figyelmet fordítva a felszíni antigéneket kódoló 4-es, és az egyes törzsektől függően a 7-es, 8-as vagy 9-es szegmensekre. Több rotavírus törzssel történő együttes fertőzés esetén a vírusok génszegmensei kicserélődhetnek, újra rendeződhetnek, és úgynevezett "reassortansok" jelenhetnek meg. Ilyen "reassortans" törzsek laboratóriumi körülmények között is létrehozhatók, és fontos alapját képezik a rotavirus vakcina előállításának. A természetben megjelenő "reassortans" rotavírusokra is bőven van példa a hasmenéssel járó gyermekekből izolált szokatlan tulajdonságú törzsek elemzése alapján (5). Az egyes rotavirus törzsekre jellemző az RNS szegmensek poliakrilamid-gélelektroforézissel vizsgálható migrációs elhelyezkedése (elektroferotípus), mely molekuláris epidemiológiai vizsgálatokat, illetve antigéntől független rotavirus azonosítást tesz lehetővé (12).

A virion három burokkal rendelkezik: egy külső és egy belső capsiddal és a "core"-ral (13). Hat strukturális, a virion felépítésében résztvevő fehérjét ismerünk, amelyek közül különösen a külső burkot alkotó VP4-es és VP7-es fehérjék fontosak. A VP4-esnek a fertőzőképesség biztosításához hasítódnia kell, míg a másik glikozilált formában van jelen. A belső capsidot a VP6-os fehérje képezi, a "core"-t pedig a VP2-es. A genom- szegmensek a "core"-on belül helyezkednek el. A VP4-es és a VP7-es fehérjék a neutralizáló antigének; a természetes fertőzést vagy immunizálást követően a velük szemben termelődő ellenanyagok közömbösítik, neutralizálják a vírust. A VP6 a fő csoport-specifikus antigén, aminek kimutatásán alapulnak a rotavirus diagnosztikára kifejlesztett kereskedelmi tesztek. Öt nem-strukturális fehérjét is ismerünk, melyek a vírus szaporodásának egyes fázisaiban jutnak szerephez.

A kezdeti vizsgálatok azt mutatták, hogy az összes rotavírus, amit a különböző állatokból izoláltak, egy közös antigénnel (VP6) rendelkeznek. Azonban újabbban az egyre növekvő számú izolátum pontos vizsgálata igazolta, hogy



1. ábra. A rotavírusok morfológiája, külső és belső szerkezeti felépítése. Felül ép capsiddal rendelkező rotavírusok elektronmikroszkópos képe látszik. Az alsó kép bal oldalán az RNS genom-szegmentek elektroforézis utáni elhelyezkedése, az általuk kódolt fehérjék elnevezése és - elhelyezkedésük látszik (M.K. Estestől kapva és engedélyével mutatva).

vannak olyan vírustörzsek is, amelyek alapvető morfológiai és biokémiai jellemzői ugyan azonosak, de nem rendelkeznek a közös antigénnel (3, 53). Ezeket az atípusos rotavírusokat több állatfajból, és magából az emberből is izolálták. Kiderült róluk, hogy eltérő, egymással szerológiai vizsgálatban keresztreakciót nem adó antigéncsoportokba tartoznak. Hét antigéncsoportot (A-tól G-ig) különböztetünk meg (8). Az A, B és C csoportba tartozó rotavírusok emberi fertőzéseket okoznak, míg a D, E, F, G csoportba tartozók csak állatok infekcióival voltak kapcsolatban (1. Táblázat). A humán B csoportú rotavírust először 1982-ben észlelték Kínában, ahol koleraszerű megbetegedéseket okozott a legkülönbözőbb életkorú populációban. Az elvégzett szerológiai vizsgálatok arra utaltak, hogy ez a B csoportú vírus akkortájt frissen került be az emberbe. Eddig még B

csoportú rotavírust Európában vagy Észak Amerikában, természetesen kapott fertőzésben, nem mutattak ki. Viszont kisebb, C csoportú rotavírus okozta járványokat mind gyermekek, mind felnőttek között már észleltek a világ több részén (23, 25). Úgy látszik, hogy az emberi B és C csoportú rotavírus fertőzések valójában háziállatokról áttejedő zoonózisok. Döntően csak az A csoportba tartozó rotavírusoknak van valódi humán jelentősége, mert ezek okozták szinte a világon a gyermekek gastrointestinalális megbetegedéseinek többségét.

1. Táblázat. Rotavírusok klasszifikációja.

klasszifikáció	emberben		állatban
Csoport (Group; VP6 határozza meg)	A	+++*	+++
	B	++	++
	C	+	++
	D	-	+
	E	-	+
	F	-	+
	G	-	+
Alcsoport	I	+	+++
(Subgroup; VP6 határozza meg; csak az A csoportban fordul elő)	II	+++	+
	I+II	-	+
	non-I, non-II	-	+

* +++ = nagyon gyakori, ++ = gyakori, + = ritka, - = nem talált

Az A csoportú rotavírusok convalescens vagy hiperimmun savókkal végzett neutralizációs vizsgálatok eredményei alapján szerotípusokba sorolhatók (44). Genetikailag különböző törzsekkel és monoklonális savókkal végzett vizsgálatokkal igazolható volt, hogy a fő szerotípus-tulajdonságot a VP7 fehérje határozza meg. A különböző VP7 antigéntípusokat a VP7 glikoprotein után G típusoknak hívjuk. Jelenleg 14 G típust írtak le humán és állati izolátumok alapján. Ebből 10 G típust emberből izoláltak, és a G2, G9 és G12 állatokban nem is fordult elő (2. Táblázat).

A VP4 antigéntípusok elkülönítése nehezebb. Gén-szekvencia adatok alapján 20 genotípust feltételezünk, ami bizonyos antigénspecifitásnak is megfelel. A VP4 antigénekben megfigyelhető különbségek alapján P típusokról beszélünk. A VP4 fontos a természetes infekcióban, mert valószínűleg egy haemagglutinin tulajdonságú kötőfehérje, proteáz-érzékeny (= P típus; hasítás növeli a vírus infektivitását), és speciés-specifikus. Kilenc P típust sikerült eddig emberből izolálni. A VP4 antitestek bizonyos keresztneutralizációt mutatnak. - A VP4 és VP7 neutralizációs antigének kevert fertőzésekben egymástól függetlenül szeregálódhatnak, és így nagyszámú antigénkombináció jöhet létre. A G és P típusok vizsgálatának nagy jelentősége van, különösen a rotavírus vakcina kifejlesztése, végső összetétele szempontjából.

2. Táblázat. Rotavírus G és P típusok* előfordulása emberben és állatokban.

G (szero) típus	ember	állat (species)	P		ember	állat (species)
			(geno) típus ^o	(szero) típus ^o		
1	+	tehén	1	6		tehén, majom
2	+		2		-	majom
3	+	majom, kutya, macska, nyúl, egér, sertés	3	5	+	majom, kutya, macska
4	+	sertés	4	1B	+	
5	+	sertés, ló	5	7		tehén
6	+	tehén	6	2A 2B	+	sertés sertés
7		csirke, pulyka, tehén, galamb tehén	7	9		
8			8	1A	+	
9	+		9	3	+	macska
10	+	tehén, birka	10	4	+	
11		sertés	11	8	+	tehén
12	+		12			ló
13		ló	13	3B	+	
14		ló	14		+	sertés birka
			15			egér
			16	10		tehén, galamb
			17			ló
			18			
			19			sertés
			20			egér

* Dr. Mary K. Estestől kapott információ alapján.

^o A P genotípus és szerotípus közötti biológiai összetettség csak részben ismert.

A klinikai manifesztációja az emberi rotavírus fertőzésnek a vékonybél infekciójának elsődleges következménye. A rotavírus a vékonybél villusait borító enterocyták litikus infekcióját okozza. A hasmenéshez ebben a vírusfertőzésben sokkal gyakrabban társul hányás, magas láz, és dehidráció, mint egyéb virális enteropathogének okozta infekcióban (50). A betegség rendszerint 12 óra és 4 nap között kezdődik a vírusexpozíció után és általában 4-8 napig tart. Átmeneti emelkedés figyelhető meg a máj-enzimek szintjében (az ALT akár kétszerese lehet a normál értéknek) a rotavírus hasmenéssel korházba kerülő gyermekek kétharmadánál (27). Ez az átmeneti májfunkció zavar még súlyosbíthatja a gyakran megfigyelhető anorexiát, hányást és letargiát a betegeknel. A rotavírus okozta megbetegedés spektruma szélesebb lehet mint amit a gastroenteritis önmagában magyarázhat. Immunológiaiilag károsodott szervezetben (AIDS, SCIDS, diGeor-ge szindróma) rotavírus replikációt lehetővé tehet találni a májban és a vesékben is (17). Rotavírust több extraintestinalis helyen is ki tudtak mutatni: légúti szekrécióban (55) és liquorban is meningoencephalitis esetén (66), de ezek a megfigyelések még megerősítésre szorulnak. Sok egyéb kérdés is megválaszolatlan jelenleg, mint például az életkorral esetleg összefüggő vírusreceptorok megjelenése a gazdasejteken, vagy milyen gének és hogyan játszanak közre a virulencia különbségekbe, vannak-e specifikus, az extraintestinalis terjedést elősegítő vírusmutációk, stb. A pathogenezis vizsgálata sok fontos információt fog még hozni a rotavírus fertőzés következtében a szervezetben fellépő kölcsönhatásokról, reakciókról.

A rotavírusok a hagyományos szövettényészeti módszerekkel nem szaporíthatók, és ez még inkább igaz a humán rotavírus törzsekre. Nagy áttörést jelentett a rotavírus tenyésztésében annak felismerése, hogy proteáz-kezelés, tripszin szükségessége a vírus fertőzőképességének biztosításához (56, 65). Mivel még így is csak bizonyos szövetkultúrák alkalmazása mellett és hosszú adaptálás után várható siker, a rotavírus tenyésztése ma is csak kutatási célokkal történik. Elsősorban a populációban keringő vírusok szerotípusainak, új variánsainak pontos jellemzéséhez van szükségünk erre a módszerre. A betegek székletében nagyon nagyszámú víruspartikula lehet jelen (10^9 - 10^{11} fizikai partikula / g széklet), ami a rotavírusok elektronmikroszkópos vizsgálattal történő felfedezéséhez hozzá is járult. Ez a módszer ma is gyorsdiagnosztikai lehetőség, noha számtalan, főleg immunológiai alapú és kereskedelemben is kapható teszt (ELISA, latex agglutináció) biztosítja ma az A csoportba tartozó rotavírusok direkt kimutathatóságát. Kutatási szinten a G és P szerotípusokat és az alcsoportba tartozást is meg lehet határozni monoklonális savókat alkalmazó ELISA vizsgálattal (64). A rotavírusok nukleinsavának kimutatása, sőt a szerotípus azonosítása is ma már elvégezhető a polimeráz láncreakcióval (PCR) (19). Mégis, az "electropherotyping", az RNS genom-szegmentek poliakrilamid gélben történő vizsgálata a legegyszerűbb, még ha nem is tekinthető általános diagnosztikai módszernek. Ezzel az összes csoportba - A-tól C-ig - tartozó humán rotavírus kimutatható, az izolátumok egyértelműen azonosíthatók, valamint a törzsek cirkulációja is követhető.

A humán rotavírusok a világon mindenütt előfordulnak. Minden populációs vizsgálat azt mutatta, hogy ez a vírus a leggyakoribb oka a gyermekek súlyos, dehidrációval járó gastroenteritisének, ahol 20-50 %-a az eseteknek kórházi ellátást kíván (24). Szerológiai felmérések alapján tudjuk, hogy csaknem az összes gyermek megfertőződik rotavírussal életének első 3-4 éve alatt. Követéssel vizsgálataktól is igazolták, hogy a rotavírussal életének első 3-4 éve alatt. Követéssel (20, 51). A fejlődő országokban a rotavírus fertőzés következtében 870.000 halálesetet jegyeztek fel öt éves kor alatt, ami az összes hasmenéses betegségben meghaltak körülbelül negyed részét jelenti. Az Egyesült Államokban is 40-125 haláleset fordul elő évente rotavírus fertőzés miatt; ráadásul e vírusfertőzés több mint 1 milliárd dollár kiadást jelent, amiből 500 millió csak az orvosi ellátás maga (18). Más adatok szerint 3.075.000 megbetegedés, 775.000 orvosi vizit, és 104.000 kórházi felvétel van évente kapcsolatban a rotavírus fertőzéssel ebben az országban (36). Noha a fejlődő világban a fiatal gyermekek között előforduló összes hasmenéses eset alig 10 %-áért felelős a rotavírus, ezek az esetek különösen súlyosak. A hasmenéssel kórházba kerülő gyermekek egyharmadát jelentik, és igen magas a mortalitás. Évente 500.000-nél több halálesetet tulajdonítanak a rotavírus infekciónak a világon. Jól ismertek a kisgyermek intézményekben (bölcsőde, óvoda) a rotavírus okozta járványok, mint az a tény is, hogy a nosocomialis infekciónak - főleg a csecsemő- és gyermekosztályokon - a rotavírus a leggyakoribb oka. Csecsemőotthonokban endémiásan, nosocomialis cirkuláció formájában is jelen lehet a rotavírus. Mivel erősen fertőző, és a környezetben meglehetősen stabil, ezért zárt környezetben a fogékony személyek gyorsan és kivétel nélkül megfertőződnek. A fertőzés és a betegség előfordulása kifejezett szezonalitást mutat. A hidegebb téli időszakban ugrik meg az esetek száma mindenütt a világon. Kivételt csak az Egyenlítő körüli 10. északi-déli szélességi

fok közötti terület képez, ahol egész évben magas a rotavírus fertőzések előfordulása. Mivel a betegség egyformán érinti az iparilag fejlett és a fejlődő országokat, a higiénés és egészségügyi körülmények javításának csak limitált hatása van a betegség lefolyására. A rotavírus fertőzés ugyan kezelhető rehidrációs terápiával, de a legjobb stratégiának kezdettől a betegség megelőzésének immunizálással történő biztosítása látszik.

A rotavírus vakcina szükségessége már kezdettől fogva előtérbe került, ahogy a vírus okozta jelentős morbiditási, mortalitási adatok és ápolási költségek ismerté váltak (14, 52). A vakcina kidolgozását a 70-es években megkezdték, nem sokkal a vírus felfedezése után. Az első vakcinák állati rotavírusokat tartalmaztak, és nem bizonyultak hatásosnak. A magyarázat is megvolt, amikor kiderült, hogy több humán szerotípus létezik, és az első infekciókkal szemben szerotípus specifikus ellenanyagválasz indukálódik. Noha a rotavírus vakcina fejlesztésén dolgozó kutatók ma is számos megoldással kísérleteznek: állati rotavírussal, humán-állat rotavírus "reassortansokkal", attenuált humán rotavírussal, rotavírus virion alegegységekkel, vagy éppen a vírusantigéneket expresszáló vektorokkal, a legeredményesebbek eddig azok a tetravalens vakcinák, amelyekben humán-állat (majom vagy bovin) "reassortans" vírusokat használnak. A jól szaporítható állati rotavírusba viszik bele, pontosabban: kicserélik bennük a szerotípus (G típus) specifikus adó géneket a legfontosabb humán szerotípusokból származókkal. A világ több részén végzett kiterjedt hatásossági vizsgálatok szerint ezek az orális, a jelenlegi oltási sémákba jól illeszthető vakcinák 80%-ban csökkentik a betegség súlyosságát, és 50%-ban a hasmenéses tüneteket (34, 67). Az Egyesült Államok néhány államában 1997-től tömegoltások indulnak, és várható, hogy a szükséges epidemiológiai felmérések, vírusvizsgálatok, költség-számítások után Európában is sor fog kerülni a rotavírus vakcina bevezetésére.

Magyarországon először az állatorvosok végeztek vizsgálatokat a rotavírusok jelenlétének igazolására az állatállományokban. Egy nagyüzemi gazdaság borjúnevelőjében újszülött borjak hasmenéses eseteiből már 1977-ben elektronmikroszkópos vizsgálattal igazolni sikerült a rotavírusok jelenlétét a bélsárban. Sőt, főcstejmentesen nevelt két újszülött borjút a baktérium-mentesített bélsárszuszpenzióval sikeresen fertőzni is lehetett (29). Két év múlva a fertőzött vékonybélartalomból a vírust is izolálták borjúvese-sejttenyésztésben. A citopatógén vírus az immunofluoreszcens próbával és immun-elektronmikroszkópos vizsgálattal a bovin referens törzssel, a Nebraska Calf Diarrhea Vírussal (NCDV) mutatott azonosságot (30). A 80-as évek második felére egy rotavírus-E.coli kombinált vakcina is kifejlesztésre került Rotacol néven (31). Mocsári és munkatársai 1982-ben, 13 megye 44 nagyüzemi sertésnevelő gazdasága közül, szerológiai vizsgálattal 41-ben találtak rotavírus fertőzött állományt. A vizsgálatok azt mutatták, hogy az állatok az elválasztás után fertőződnek a vírussal (37). Igazán Nagy Béla nevéhez fűződik az állati hasmenések átfogó etiológiai vizsgálata Magyarországon, melyek során, elsősorban elektronmikroszkópos vizsgálatokkal adatokat szolgáltatott a tehének, sertések, kecskék, bárányok és csirkék rotavírus fertőzöttségéről az egyéb kórokozók mellett (38, 39, 40).

Az első humán anyagból elektronmikroszkóppal kimutatott rotavírusokról, a Szegedi Orvostudományi Egyetemről (SZOTE) Nagy Erzsébet számolt be a Magyar Mikrobiológiai Társaság 1979-ben Budapesten tartott kongresszusán (41). Az abakteriális csecsemőkori akut gastroenteritisek etiológiai vizsgálata során később ugyanez a kutatócsoport 36 %-ban talált rotavírust az 1979 április és május havában hasmenéssel kezelt 50 csecsemő székletmintájában (16). Négy koraszülött esetében is sikerült a vírust kimutatni (6), majd leírásra került az első rotavírus járvány Hódmezővásárhelyen, ahol 1983 első öt hónapjában hányással, hasmenéssel a kórház fertőző osztályára felvett 43 csecsemő és gyermek székletmintáiból 30 esetben sikerült a rotavírust elektronmikroszkópos vizsgálattal kimutatni (28). Egy év múlva Ajkáról egy 17 hónapos gyermek halálát, illetve súlyosan exsiccalt testvérének kórházi felvételét követő székletmintavizsgálat, és a harmadik testvérnél kimutatható IgM típusú ellenanyag megjelenése, majd eltűnése igazolja az első családi rotavírus halmozódást (1). A Fővárosi László Kórház és az Országos Közegészségügyi Intézet közös vizsgálatai, amiket 1984-1985 -ben illetve 1992-ben már ELISA és latex agglutinációs víruskimutatási módszerekkel végeztek a kórház csecsemő- és kisded osztályán, valamint a légúti osztályon, 30-33 % -ban igazolták a rotavírus fertőzést. Megfigyelték azt is, hogy a rotavírus infekció többször vezetett exsiccatiohoz és szignifikánsan gyakrabban társult légúti megbetegedés is hozzá, mint egyéb kórokozók esetében (1, 33).

Az 1980-as évek elején megjelennek azok a közlemények, amelyekben a kutatók a rotavírus RNS genomjának székletből történő közvetlen kimutatásáról számolnak be (9, 43, 48, 49). A módszer egyszerűnek látszik, és olyan információk gyűjtését teszi lehetővé, amikkel egyik korábbi vizsgálati eljárás sem tudott szolgálni. Például lehetőség van az addigra megismert különböző antigencsoportba tartozó vírusok kimutatására, molekuláris szintű epidemiológiai vizsgálatokra, stb. Ezekben az években állítják elő a kutatók az A csoportba tartozó rotavírusok szerotípus meghatározásához szükséges monoklonális savókat, amikkel - mind a mai napig csak kísérleti szinten - a szerotípusok földrajzi elterjedésének vizsgálata megkezdődik. Erőfeszítések történnek a humán rotavírus törzsek tenyésztetőségének fokozására is az egyes törzsek részletes fizikai, kémiai, immunológiai és genetikai vizsgálhatósága érdekében.

A rotavírus kutatással személyesen akkor kerültem kapcsolatba, amikor 1981-ben Professor Joseph L. Melnick, a virológia egyik legismertebb és elismertebb személyisége ösztöndíjat biztosított számomra a Houstonban (Texas, U.S.A.) lévő Baylor Orvosi Egyetemen működő Virologiai és Epidemiológiai Intézetében. A két éves tanulmányút során az intézetben dolgozó, a rotavírus kutatásban élenjáró Professor Mary K. Estes munkacsoportjában olyan molekuláris módszereket sajátíthattam el, amik részben vagy egészen újjak voltak. Első helyen szerepelt közöttük a teljesen új információkat adó "electropherotyping", elektroferotípezálás, a rotavírus RNS genom-szegmentjeinek poliakrilamidgélben történő vizsgálata (12). Dr. Estes hazatértem után is támogatta munkámat, sőt 1987-ben egy évre újra velem, és az azóta a humán calicivírusok, illetve a Norwalk és Norwalkszerű vírusok kutatásában elért sikerek miatt világszerte ismertté vált két munkatársával, Dr. David O. Matsonnal és Dr. Xi Jianggal

dolgozhattam együtt. Ekkor tanultam meg a rotavírusok szerotipizálását, és kaptam meg azokat a diagnosztikai anyagokat, amikkel hazatértem után Európának ezen a felén úttörőnek számító vizsgálatokba kezdhettem.

Értekezésemben sorra veszem azokat a célokat, amiknek megválaszolására a reális lehetőséget a fentebb említett módszerek laboratóriumomba történő bevezetése szolgáltatta.

Célom volt:

- I./ 1./ a rotavírus 11 szegmentből álló RNS genomjának székletből történő közvetlen kimutatásának hazai bevezetése, mivel csak ez a módszer adott lehetőséget, hogy a célok közé kerülhessen:
 - 2./ a nem az A csoportba tartozó humán rotavírusok kimutatása,
 - 3./ a rotavírusok molekuláris szintű epidemiológiai vizsgálata (domináns törzsek - elektroferotípusok évi és évenkénti változásának követése),
 - 4./ nosocomialis infekciók felismerése,
 - 5./ több rotavírussal történt együttes fertőzés lehetőségének igazolása,
 - 6./ szerotípusra jellemző elektroferotípus megjelenésének felismerése,
 - 7./ állatok között fellépő rotavírus fertőzések epidemiológiai összefüggéseinek kimutatása.
- II./ Monoklonális ellenanyagokkal, általam összeállított ELISA rendszerben vizsgálni kívántam, hogy
- 1./ az A csoportba tartozó rotavírusok hogyan oszlanak meg a legfontosabbnak tartott négy szerotípus (G típus) szerint,
 - 2./ kimutatható-e különbség a szerotípusok évenkénti megjelenésében,
 - 3./ észlelhető-e Magyarországon belül a rotavírus szezonokban a szerotípusoknál földrajzi megoszlási eltérés,
 - 4./ vannak-e "kevert", több szerotípussal történt fertőzések, és
 - 5./ találni-e "nem tipizálható", feltehetőleg más, a négy leggyakoribb szerotípusba nem tartozó törzseket; ha igen, mi ezek gyakorisága.
- III./ Szövettenyésztésben meg akartam kísérlni a
- 1./ humán rotavírus kitenyésztését, és az izolátum(ok) elektroferotípusának és szerotípusának meghatározását,
 - 2./ igazolni akartam, hogy rotavírus-pozitív székletmintákból a rotavírus tenyésztésére kidolgozott technika alkalmazásával nyert izolátumok elektroferotípus vizsgálata fontos a Reoviridae családba tartozó más vírusok kizárására,
- IV./ Longitudinális vizsgálattal epidemiológiai adatokat kívántam gyűjteni a
- 1./ rotavírus fertőzések magyarországi szezonaritásáról,
 - 2./ vírusúrtó gyermekek kormegoszlásáról,
 - 3./ felnőttek között klinikai tünetekkel járó megbetegedések előfordulásáról,
 - 4./ rotavírus infekció hazai nagyságrendjéről, jelentőségéről.

- V. / Célom volt hazai és nemzetközi kooperáció kiépítése, ami lehetővé teszi a
- 1./ hazai adatok felhasználását a rotavírus vakcina esetleges itthoni bevezetésének távlati tervezéséhez,
 - 2./ legújabb vizsgálati eljárásokhoz való hozzájutást (pl. PCR) nemzetközi kooperáció keretében,
 - 3./ laboratórium hazai referens és jegyzett európai vizsgálóhelylé választását a rotavírusok vizsgálatára.

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Székletminták.

Az 1982-1996 időszak alatt közel 13.000, 86 %-ban öt éves kor alatti gastrointestinális tünetekkel (BNO kód: 008.6, 008.8, 009.0 - 009.3 és 558.9 (68)) észlelt gyermek székletmintájának vizsgálatára került sor. A székletmintákat Baranya megye területéről főleg a Baranya Megyei Kerpel-Frónius Gyermekkorház Fertőző Osztályáról, a Pécsi Orvostudományi Egyetem Gyermekklinikájának gastroenterológiai egységéből, Pécs város gyermekorvosaitól, illetve a Mohácsi, Siklósi, Szigetvári és Komlói kórház gyermekosztályairól kaptuk. Székletmintákat bocsátott rendelkezésemre a Szegedi Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Központi Klinikai Mikrobiológiai Laboratóriuma, a Csongrád Megyei KÖJAL (később ANTSZ) Vírus Laboratóriuma is. A legtöbb székletminta a Fővárosi Szent László Kórház Vírus Laboratóriumával való együttműködés keretében jutott hozzánk. A vizsgálatok kezdetén az Országos Közegészségügyi Intézet Vírus Osztályától is kaptam rotavírust tartalmazó székletszuszpenziókat további analízisre. A kapott mintákat igyekeztünk folyamatosan feldolgozni, és a vírusstartalmúak maradékait a tárolókapacitás korlátai mellett $-20\text{ }^{\circ}\text{C}^{\circ}$ -on megőrizni.

Állati rotavírusok kimutatására az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézetéből, Dr. Nagy Bélától, és az AKA-HYB Kft.-nél dolgozó Dr. Bíró Hunor állatorvos kollégától kaptam borjú- illetve malacbélsárt.

2. Rotavírus kimutatása latex agglutinációs (LA) teszttel (22)

Kimutatás elve: ~ 330 nm átmérőjű műanyag latex szemcsék az A csoportú rotavírus csoport-specifikus antigénje (VP6) ellen termelt ellenanyaggal vannak bevonva. Ha a vizsgálati anyag legalább 10^8 rotavírust tartalmaz, a vírus mint antigén az ellenanyaghoz kötődve a latex szemcsék összecsapódását, agglutinációját okozza. (Kevesbé érzékeny mint az ELISA vizsgálat.)
Kivitelezés: kereskedelemben beszerezhető kittel (Rotalex® kit, Orion Diagnosztika, Espoo, Finland) és a mellékelt leírás alapján végeztem. A vizsgálandó székletmintákat Rotalex pufferral történő hígítás (1:9) után intenzíven szuszpendáltam Vortex típusú keverőn, majd 3.000 fordulattal, 10 percig tartó centrifugálás után a felülszót használtam fel. A kithoz mellékelt fekete mezőjű kartonlapon végeztem a vizsgálatot: a felülszóból 50-50 μl -t cseppentettem a bal és jobb oldali kör alakú fekete mezőre, és az egyikhez "Rotalex Latex Reagenst" (A csoport-specifikus anititesttel bevont latex szemcséket), a másikhoz pedig "Control Latex Reagenst" (nem-immunsavóval bevont latex szemcséket) cseppentettem. A reagenseket a vizsgálandó székletsuszpenzió-cseppel összekevertem a kithoz mellékelt keverőpálcát használva. A kartonlapocska körkörös mozgatása mellett pozitív esetben a "Rotalex Latex Reagenst" kapott keverékben két percen belül agglutinációt lehetett megfigyelni. A vizsgálatot csak akkor értékeltem, ha a kithen lévő pozitív kontroll-minta is agglutinációt adott, illetve a "Control Latex Reagenssel" nem kaptam agglutinációt.

3. Rotavírus kimutatása ELISA módszerrel.

Vizsgálataim egy részében kereskedelmi forgalomban lévő, az A csoportú rotavírusok kimutatására kifejlesztett ELISA kitéket használtam a gyártó vizsgálati útmutatásának betartásával (Dakopatts, Glostrup, Dánia). Az esetek többségében a kit komponenseit megvásárolva, azokkal magam készítettem el a vizsgálati rendszert a következőkben leírtak szerint. Polivinilklorid anyagú, lapos fenekű vályúlatokkal készült mikrotitráló lemezek (Dynatech) két-két sorába felváltva 50-50 μl , karbonát-bikarbonát pufferben (0.1M, pH 9.8) készült, 1:50 hígítási normál és anti-rotavírus nyúlászót (DAKO X904 és B218) mértem be a lemez érzékenyítéséhez. A lemezeket éjszakán át, nedveskamrában $4\text{ }^{\circ}\text{C}^{\circ}$ -on tartottam, majd másnap az érzékenyítő

folyadékot leszívtam, és az esetleg még meglévő szabad kötfelületet blokkoltam vályulatonként 200 µl 5%-os laktalbumin hidrolizátummal (LH, GIBCO; PBS-ben készítve), 37 C°-on 2 óra hosszat. A blokkoló oldat leszívása után a vályulatokat 0.05% Tween-20 -at tartalmazó PBS-sel (PBS-Tween) kétszer megmostam, majd bemértém a blokkolás alatt a következők szerint előkészített székletmintákat: PBS-ben készült 10%-os székletszuszpenziókból, amiket már korábban Genetronnal a székletmintáknál leírt módon extraháltam, 1:4-es hígítást készítettem 0.1% Tween-20-at, 0.01 M Na₂-EDTA-t tartalmazó PBS-sel. Az így meghígított székletszuszpenziókból 50-50 µl-t mértem be két normál nyúlsvóval illetve két anti-rotavírus nyúlsvóval érzékenyített vályulatba, majd a lemezt 37 C°-on két óra hosszat inkubáltam. A vizsgálati anyagok kirázással történt eltávolítása után ötször mostam a lemezt PBS-Tween mosófolyadékkal, és ezután rögtön minden vályulatba 50 µl peroxidázal jelölt anti-rotavírus nyúlsvó (DAKO P219) 1:250 hígítását mértem be. A hígítás 2% LH-ot tartalmazó PBS-Tween oldattal készült. Az újabb 2 óra hosszat tartó, 37 C°-on végzett inkubáció, és a korábbi módon végrehajtott ötszöri mosás után a vályulatokat egyszer szubsztrát-pufferrel (0.1M citromsav-0.2M Na₂HPO₄, pH 6.0) öblítettem. A 70 µl szubsztrát-oldatot (30 ml szubsztrát-pufferben 16 mg o-feniléndiamint (Sigma) oldottam fel, amihez közvetlenül a bemérés előtt 10 µl H₂O₂-ot adtam) mértem be minden vályulatba, és sötétben, szobahőn, 30 percig hagytam a színreakciót kialakulni, amit végül 70 µl 2N sósavval állítottam le. A leolvasást 492 nm hullámhosszon végeztem. Pozitívnak - rotavírus tartalmazónak - tekintettem a mintát, ha a korábban megvizsgált, biztosan negatív tiz székletminta O.D. átlaga plusz a háromszoros standard deviáció értékét vagy ennél magasabbat mértem. Minden lemezben negatív kontroll minták (O.D. értékük kisebb volt 0.100-nál), és az SA11 vírus mint pozitív kontroll (O.D. értéke elérte vagy meghaladta az 1.000 -et) szerepelt.

4. Rotavírus G-szerotípusok meghatározása monoklonális savókkal ELISA vizsgálati rendszerben (62).

Genetronnal, a korábban leírt módon extrahált 10 %-os székletszuszpenziókat monoklonális savókkal vizsgáltam a rotavírus kimutatásánál leírtak szerint. Az alábbi módosításokra került sor: a lemezek érzékenyítésére a KU-4 (G1), S2-2G10 (G2), YO-IE2 (G3), és az ST-2G7 (G4) G-típus-specifikus monoklonális savókat használtam, a VP6 és VP7 csoportspecifikus determinánsokra pedig a 631-7-54 és a 60-F2D4 monoklonális savókat alkalmaztam. A blokkoló és hígító oldatban a LH-ot 1% BSA-ra és FBS-ra (Sigma) cseréltem ki, szubsztrátként pedig a peroxidáz enzim hatására stabil zöld színt adó ABTS-t (Sigma; 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonsav) diammoniumsó) használtam, és a színreakció erősségét 414 nm-en mértem. Pozitívnak fogadtam el a reakciót, ha az előzetesen minden monoklonális savóra megvizsgált 20 negatív minta O.D. értékének átlaga és háromszoros standard deviáció fölött volt a mért minta O.D. értéke. Egy G-típust akkor vettem elfogadottnak, ha a reakciót egy monoklonális savóval úgy kaptam, hogy a mért érték legalább kétszerese volt a többi monoklonális savóval kapott reakcióénak. Azok a minták, melyek a VP6-specifikus monoklonális savóval nem reagáltak "VP6-negatív" jelzést kaptak G1, G2, G3, G4, vagy "VP7-negatív" megjelölést kaptak a vizsgálati minta, ha a fenti megszorítások mellett a megfelelő G típus-specifikus illetve a közös VP7 specifikus savókkal reagált. "Kevert" (mixed) mintát több mint egy G típus-specifikus savóval való reakció esetén definiáltam, és nem tipizálhatónak tekintettem egy mintát, ha a közös VP7 savóval kaptam reakciót, de a típus-specifikusak egyikével sem.

5. Rotavírusok RNS genomjának székletből történő közvetlen kimutatása; elektroferotipizálás.

Roger és munkatársai (48), valamint Nicolas és munkatársai (43) leírása alapján, kisebb módosításokkal, végeztem a bemutatott vizsgálatokat 1986-ig. Székletmintákból, a korábban leírtak szerint PBS-sel 10%-os szuszpenziókat készítettem, azokat azonos térfogatú Genetronnal kétszer extraháltam. A vizes fázisban lévő, részlegesen tisztított víusból 1% nátriumlaurilszulfát (SDS) segítségével az RNS-t kiszabadítottam, a jelen lévő fehérjéket pedig fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1) keverékkel extraháltam. Az RNS-t abszolút alkohollal kicsaptam (-20 C°, éjszakán át), és az ülepitő centrifugálást (10.000g, 15 perc, 4 C°) követően beszáritottam. A nukleinsavmintákat 50-200 µl Laemmli-féle mintapufferben (32) feloldottam, majd 10% -os, 0.75 mm vastag poliakrilamid lapgéleken futtattam 15 mA áramerősséggel, a

Laemmli-féle puffer (32) alkalmazásával SDS jelenlétében. Hús órán át szobahőn történő futtatás után a géleket ethidium bromiddal festettem, és ultraviola-fénnyel (254 nm) való megvilágítás mellett értékeltem és fényképeztem az RNS szegmentek elhelyezkedését. Belső standardként minden gélben az SA11 simian rotavírusból izolált RNS-t is futtattunk. Az 1980-as évek közepétől az ethidium bromid festést az ultraérzékeny ezüstoffestéssel helyettesítettük Herring leírását követve (21), amelyik - tisztított duplaszálú RNS esetén - 300-400 pg érzékenységet mutatott egy szegmentre számolva. Ugyancsak ettől az időtől vezettem be egy egyszerűsített kimutatási lehetőséget (10), ahol a 10%-os székletszuszpenzió 20 µl-éhez 10 µl redukáló puffert mérve (2% SDS, 5M urea, 20% glicerinnel, 4% merkaptotanol Tris-glicin pufferben, pH 8.3), majd a keverék 3-5 percig 68 °C-ra való melegítését követően azt rögtön futtatni lehetett a fenti Laemmli-féle gélben, de itt a puffer SDS-t nem tartalmazott. Ezüstoffestéssel a módszer hasonlóan érzékeny volt a rotavírus RNS szegmentek kimutatására. Végül 1994-től egy olyan módszert használok (54), ahol a virális RNS tisztítása során meg tudok szabadulni enzimtermészeti inhibitoroktól, amiket a későbbre tervezett PCR vizsgálatok miatt el kell távolítanom mintáimból. A módszer lényegét az erős fehérje-denaturáló és ribonukleáz-gátló guanidín izotiocianát (GITC) alkalmazása, a hidroxipapit (HA) adszorpció, valamint az inhibitorok eltávolítását biztosító cetiltrimetilammonium-bromid (CTAB) kezelés jelenti. A székletből közvetlenül 200 µl 4M GITC-ben készítem szuszpenziót, amit 16,000 g-vel 3 percig centrifugálok. A pelletet kétszer megmostam 100-100 µl 4M GITC-vel, és a három szuper-natant egyesítettem. 50 µl HA-ot (Sigma) adtam a szuper-natanshoz, 10 percig szobahőn ráztam a szuszpenziót az RNS adszorbeálása érdekében. Az RNS-sel fedett HA kristályokat háromszor 1-1 ml 10 mM-os kálium-foszfát (KP) oldattal (pH 6.8) mostam (10.000 g, 1-1 percig), majd az RNS-t kétszer 200 µl 200 mM koncentrációjú KP-tal eluáltam. Az RNS-t végül 65 µl 5% CTAB, 40 µl 5M NaCl, és 40 µl EDTA, pH 7.0, keverékkel precipitáltam 56 °C-on 30 percig tartó inkubációt alkalmazva, aminek végén a precipitátumot pelletáltam (16.000 g, 5 perc). Az RNS-t a precipitátumból vízzel oldottam ki, majd abszolút alkohol-NaCl-dal -20 °C-on újra kicsaptam. A maradék detergens- és foszfátszennyezést 70 %-os jéghideg alkohollal történő mosással távolítottam el az RNS pelletből, amit végül megszáritottam, majd 40 µl vízben oldottam fel a gélben való futtatáshoz.

6. Kontrollként használt vírus és virális RNS.

SA11 simian rotavírust a fenti leírás szerint szaporítottam. Ez a vírus szolgált pozitív kontrollként az egyes tesztekben, illetve belőle készült a virális RNS kivonása polietilénlikollal (PEG 6000) végzett előzetes koncentráció után (46).

7. Elektronmikroszkópos vizsgálatok.

Kétszer Genetronnal extrahált székletszuszpenziókat a sejtenyészetre való fertőzés előtt, és hígítatlan szövetkultúra médiumot a vírusenyésztes után vizsgáltam ezzel a módszerrel a rotavírusok számára, az üres, valamint a "single-shell" és "double-shell" partikulák arányának meghatározására. Egyrészt az agar-pseudoreprika módszert alkalmaztam (26, 42), amelynél a vírustartalmú folyadékot agar-korong felszínére rétegeztem, amelybe a folyadék beszivárgott felszínre hagyva a vírusokat (koncentrált és tisztítási lépés). Ezután egy nirocellulóz oldatot (Parlodion; Polyscience, Inc.) cseppentettem a mintára, és a felesleg leitatása után 10 perc alatt kialakult filmet 1% foszforwolframsavval (pH 7.0) festettem 20-30 másodpercig. A megfestett nitrocellulózhártyát gridre téve JEOL JEM-100CX vagy Zeiss EM10 transzmissziós elektronmikroszkóppal (80 kV) vizsgáltam 35-40 ezres nagyítással. Más esetekben a vizsgálati anyagot Parafilmre cseppentettem és erre tettem rá a 300 mesh carbon-formvar bevonatú rézgridet, amin a mintát 1% uranyl acetáttal festettem 15-30 másodpercig, majd 5-6 desztilláltvízcseppen történő átvitelrel kimostam a felesleges festéket a vizsgálat előtt.

8. Rotavírus tenyésztése szövettenyésztésben (56, 65)

Feltétel: kellő számú ($>10^8$ / ml) teljes genomu, ép capsidu ("double-shell") vírust tartalmazó minta. A fertőzőképesség biztosítása a VP4 felszíni fehérje proteolitikus hasításával (tripszinkezelés), valamint rotavírusra permisszív szövettenyésztet és forgódobos inkubálási lehetőség.

Kivitelezés:

8.1. A rotavírúst tartalmazó székleletminta előkészítése.
PBS (0.01M, pH 7.2) vagy Tris-HCl pufferben (0.01M, pH 7.5) kb. 20 %-os szuszpenziót készítem a székletből, centrifugáltam (1.500 fordulat, 10 perc), majd a felülúszót azonos volumenű Genetronnal (1,1,2 triklorotrifluoretán; Fluka, Serva) kétszer extraháltam a felülúszókat megőrizve. Az így kapott és egyesített felülúszót antibiotikummal (100 U/ml Penicillin + 0.1 mg/ml Streptomycin vagy 50 µg/ml Gentamicin) kezeltem 37 °C-on 60 percig, majd acetil-tripszin hozzáadása (Sigma; 10 µg/ml) után az inkubációt 30 percig a fenti hőmérsékleten folytattam.

8.2. Sejtenyésztés és annak fertőzésre való előkészítése.
MA-104 sejtekből (embrionális rhesus majomveséből kialakított stabil sejtvonal) készült kémcsőtenyészeteket használtam a 67-98 passzálás között. A sejteket 10% fötális bovin savót (Sigma és Sebak) tartalmazó Parker-199 tápfolyadékban (Sigma és OKI) tenyésztettem a sejtréteg ("monolayer") 90-100 %-os kialakulásáig. Közvetlenül a fertőzés előtt a növesztő, savót tartalmazó tápfolyadékot eltávolítottam. A sejtréteget kétszer savómentes médiummal mostam a tripszin-inhibitorokat tartalmazó savómaradék eltávolítása érdekében.

8.3. Fertőzés.

A sejtrétegről a mosófolyadékot pipettával leszívom, majd 100 µl antibiotikum- és tripszinkézelést kapott székletsuszpenziót mértem a sejtekre, amit azokon egyenletesen szétfolyattam. Az adszorpciót 37 °C-on 60 percig végeztem úgy, hogy 20 és 40 perc után az inokulátumot a cső mozgatásával újra szétrétegeztem a sejteken. Az adszorpciós idő letelte után a sejtréteget egyszer savómentes Eagle's MEM tápfolyadékkal (Sigma; 1 ml/cső) lemostam. Fenntartó tápfolyadékként olyan savómentes Eagle's MEM -et mértem a csövekbe 1 ml/cső volumemben, ami 1 µg/ml acetil-tripszint tartalmazott. Az inkubációt 4 napig 37 °C-on, forgódobon végeztem. A negyedik napon a fertőzött sejteket a tápfolyadékkal együtt háromszor fagyasztottam és olvasztottam (-70 °C és 37 °C), majd háromszor 30 másodpercig ultrahangoztam vízfürdőben (Branson). Az így kapott szuszpenziót újra tripszinnel kezeltem a korábbi módon, és friss MA-104 sejtenyészetet fertőztem. Ezt a passzálsnak nevezett lépést három naps időközrel még kétszer megismételtem, majd a kapott szuszpenziót rotavírus-tartalomra LA-val, ELISA-val vizsgáltam.

9. Rotavírus antigének kimutatása indirekt immunofluoreszcens módszerrel.

Alkalmanként a harmadik fertőzésből a fagyasztás-olvasztás-ultrahangos feltárás előtt a sejteket leválasztottam a tenyésztőcső faláról, PBS-sel megmostam, és tárgylemezre cseppentve a sejteket hagytam a cseppet teljesen szobahőn beszáradni. Acetonban szobahőn 15 percig történő fixálás után standard immunofluoreszcens módszert alkalmaztam. Az immunofluoreszcens vizsgálathoz anti-rotavírus nyúlsvót és FITC-jelölt anti-nyúlsvót használtam (DAKO B218 és F205), 30-40 percig 37 °C-on történt inkubálásokkal, és háromszori PBS-ben történt mosással, a rotavírus indukálta antigének kimutatásához.

10. Kórházi- és betegadatok

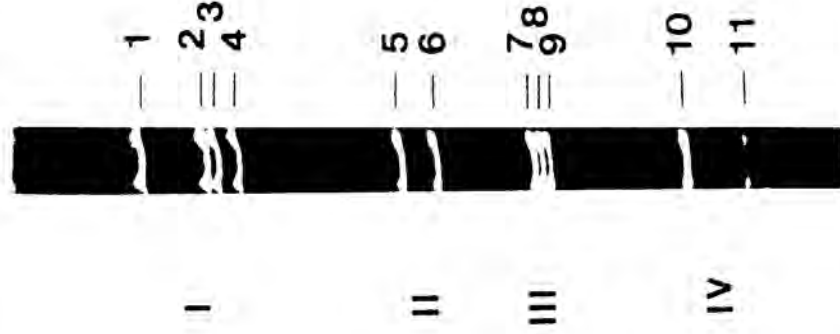
A rutin vizsgálati beküldőpapírokon kapott adatok mellett a kooperáló kollégák a klinikai tünetekre, azok időtartamára, a betegség súlyosságára (láz, dehidráció, stb.), az életkorra is szolgáltatottak információt. A László Kórház számára külön "rotavírus" beküldőpapírt szerkesztettem. Minden esethalmozódás észlelésekor igyekeztem személyesen felvenni a kapcsolatot az érintett egészségügyi intézettel, kollégával, és megbeszélni a szükséges adatszolgáltatást. A számítógépes nyilvántartások elterjedésével mód volt célzott lekérdezésre a BNO kódok alkalmazásával (001-009 kódok a fertőző enterális betegségekre, 558-as kód a nem-infektív gastroenteritisekre). Saját számítógépes programot dolgoztunk ki a laboratóriumban az Epi Info (6-os verzió) mikrokomputer-program (7) alkalmazásával gastroenterális beteganyag nyilvántartására, a vizsgálatok rögzítésére, és az adatok analizésére.

11. Statisztikai analízis.

A statisztikai vizsgálatokat az Epi Info statisztikai programcsomag segítségével végeztem (7).

EREDMÉNYEK

A célkítűzések sorrendjében úgy mutatom be vizsgálataim eredményeit,



2. ábra. A rotavírus RNS genom-szegmentjeinek migrációs profilja.

A rotavírusra jellemző 11 szegment négy csoportban helyezkedik el (I.-IV.), amit az ethidium bromiddal végzett festés és 254 nm hullámhosszú ultraviolett fényrel való megvilágítás után a poliakrilamid gélben látni lehet (Hu/Pécs/592/83 jelzésű izolátum).

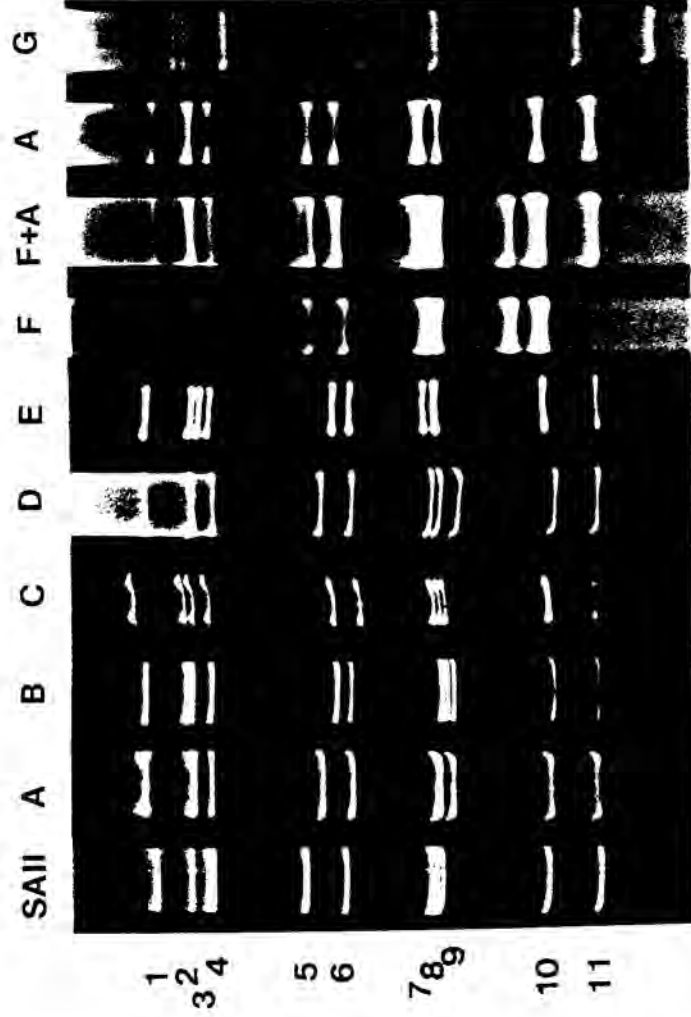
hogy csak a lényeges adatokat emelem ki azoknál a vizsgálatoknál, amelyek csatolt közlemények formájában mellélélve vannak, és igyekszem bővebben bemutatni az eddig még nem publikált eredményeket.

1. A rotavírus RNS genomjának kimutatása.

1.1. 1982-83 évben, 18 akut gastroenteritisben megbetegedett csecsemő és kisgyermek közül 12 székletéből sikerült a rotavírus RNS genom-szegmentjeit kimutatnom a virális RNS székletből történt közvetlen extrakciójával (57). A 2. ábra jól mutatja a négy csoportban elhelyezkedő 11 szegmentet (ami a rotavírusokra abszolút jellemző), és azok egymáshoz viszonyított migrációját. Az ábrán lévő Hu/Pécs/592/83 jelzésű izolátum az első Pécsről kimutatott és elektrotipi-

zált rotavírus, és egyúttal ez volt az első hazai genomszintű kimutatása a humán rotavírusoknak. Az A csoportba tartozó rotavírusoknál az 1-4 szegment, az 5-6 szegment, a 7-9 szegment, és a 10-11 szegment fut egymáshoz közel.

1.2. A négy szegment-csoporton belül azonban az egyes szegmentek a törzsekre jellemző, nagy variációt mutató migrációs különbségekkel rendelkezhetnek, és ezen alapul a *vírusok molekuláris epidemiológiai vizsgálatának lehetősége* (58). A 3. ábra jól érzékelteti Magyarországon három, egymástól csaknem 200 km-re lévő területéről, azonos időszakból összegyűjtött rotavírus-pozitív szék-

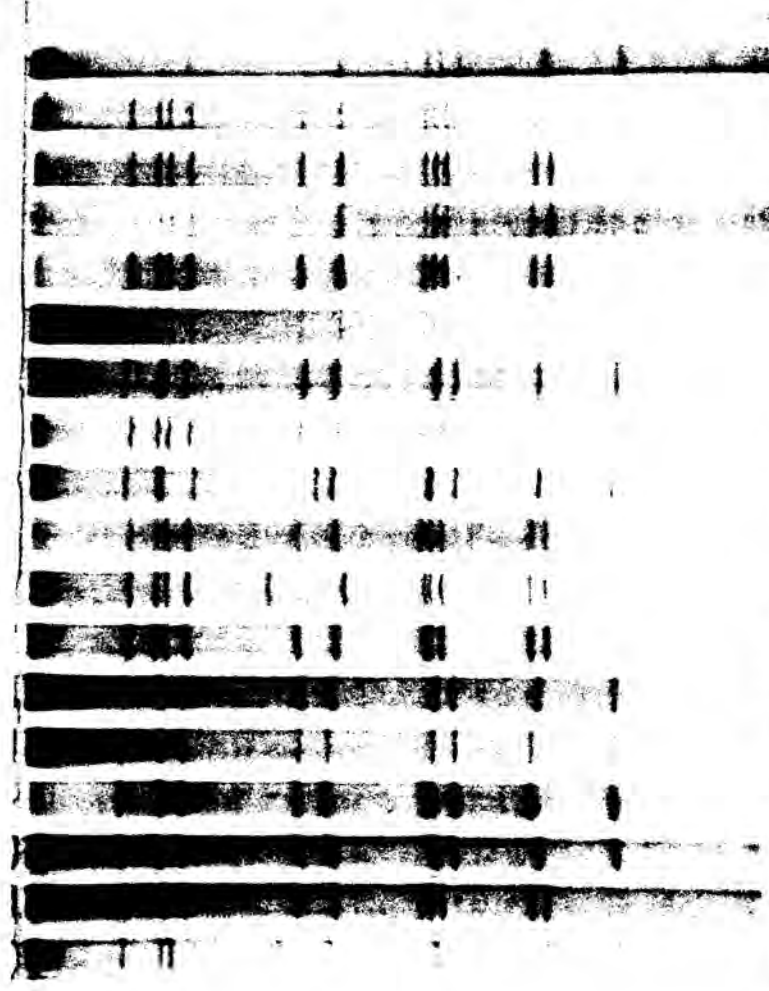


3. ábra. Rotavírus elektroferotípusok egy időszaktól az ország három területéről.

Az A-E jelzésű mintákban az RNS szegmentek migrációja megegyezik az SA11 "long" elektroferotípuséval, míg az F jelzésű izolátum esetében a 10. és 11. szegment rövid, "short" vándorlást mutat. A G jel alatt lévő rotavírus C csoportú rotavírusra jellemző migrációs profilu. Az F és A izolátumok szegment-migrációs különbségeit kevert mintában lehet jól észlelni (F+A).

letmintákban található elektroferotípusok változatosságát. Legalább hét különböző elektroferotípust tudtam megkülönböztetni. A belső standardként futtatott SA11 simian rotavírusból extrahált RNS jó referencia, különösen a 10. és 11. szegmentek futásának meghatározásához. Az SA11 e két szegmentjének migrációs képét "long" elnevezéssel jellemzi az irodalom, és minden A csoportba tartozó rotavírusról, melynek a 10. és 11. szegmentje a gélben hasonló magasságban helyezkedik el, "long" elektroferotípusúnak nevezünk. Ez a domináns típus szerte a világon. Az "F" jelzésű izolátum 10. és 11. szegmentje viszont a "short", rövid migrációs képnek felel meg. Az ilyen törzsek sokkal ritkábbak. Különös szerencsének fogható fel, hogy már kezdeti vizsgálataim során a nem-A csoportba tartozó, "G" pozícióban lévő rotavírus RNS-ének jellegzetes migrációs képét sikerült megtalálnom. Ezek a különbségek valódiak, amit igazol,

hogy egy gélben, azonos körülmények között vizsgálva is észlelhetők, illetve kérdéses minták összekeverése esetén "extracsíkok" formájában jelennek meg a migrációs különbségek. Ebben a vizsgálatban a 21 RNS-pozitív mintában, 11 Pécsről és Budapestről gyűjtött vírus azonos elektroferotípusú volt, míg négy szegedi mintában eltérő elektroferotípust mutattunk ki, melyek a másik két városban nem fordultak elő a vizsgált kevés anyagban. A két "short" elektroferotípust is egyedül csak a budapesti székletmintákból sikerült kimutatni. Ezek az *első hazai vizsgálatok, ahol igazolni sikerült az egy időszokban az orszádg különböző területein cirkuláló rotavírusok genomszintű heterogenitását.*

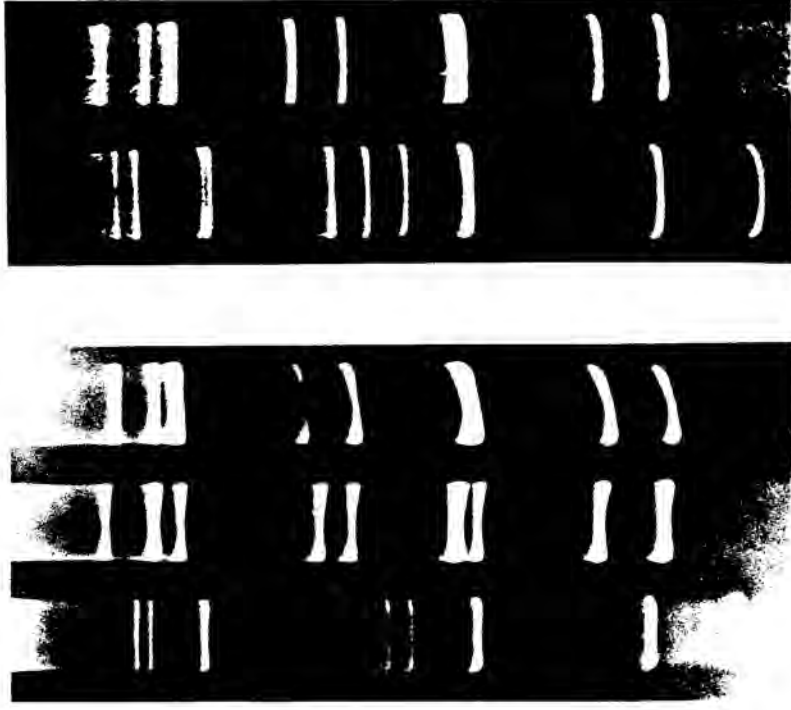


4. ábra. "Short" és "long" elektroferotípusú rotavírusok az 1995/96. évi epidémiás szezonban. A "rövid" migrációt mutató 10. és 11. szegmentű törzsek, egy kivételével (balról a 8.), ahol az 5. szegment feltűnően lassan vándorolt, azonos profilúak.

1.3. Egy 18 hónapra kiterjedő elektroferotípus vizsgálat során (61) bebizonyosodott, hogy noha hét különböző RNS migrációs képet mutató rotavírus cirkulált Baranya megyében, igazán csak két elektroferotípus volt domináns. Még érdekesebb megfigyelés volt, hogy a domináns törzsek cirkulációja egymáshoz képest eltolódást mutatott. *Ez a járványügyi szempontból is fontos rotavírus cirkulációs törzsváltás az első ilyen hazai megfigyelés.*

Kiegészíti ezeket a vizsgálatokat az 1995-1996. évi rotavírus epidémiás szezonban megfigyelt jelenség. Míg az előző években mind Budapesten, mind Baranya megye területén csak "long" elektroferotípusú törzsek lehetett észlelni, a jeltett időszakban megjelentek a "short" RNS migrációs profilú törzsek (4. ábra). Először csak Budapesten, de 1996. második felében már Baranyában is észlel-

tük őket. Mivel nagy valószínűséggel ez a jelenség szerotípusváltásra is utal (lásd később), várható volt, hogy átmenetileg az ilyen RNS profilú rotavírus törzsek száma szaporodni fog, amit jelenleg is észlelek még.



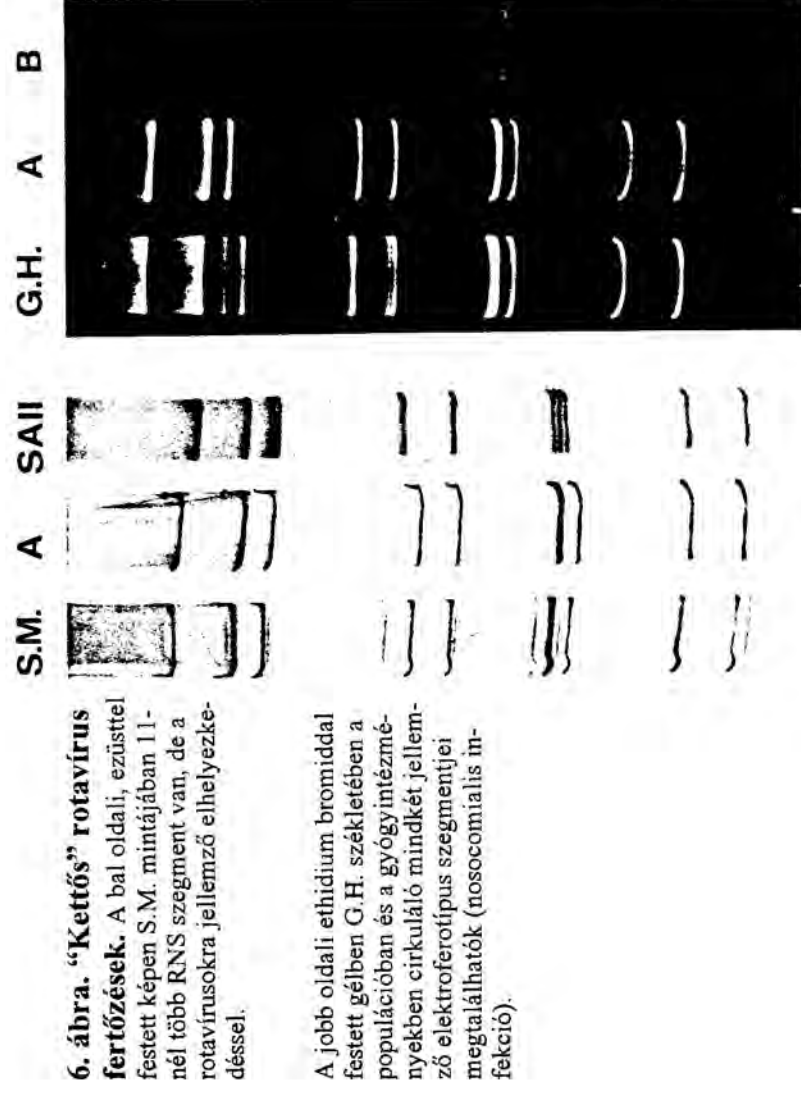
5. ábra. C csoportú rotavírusok RNS genomjának migrációs profilja.

Mindkét képen a bal oldali pozícióban egy-egy C csoportba tartozó rotavírus szegmentképe látszik a mellettük lévő A csoportú rotavírusok genom profiljával összehasonlíthatóan. A C csoportú vírusoknál a 7. szegment közel vándorol a 6.-hoz, és a 2., 3., 4., és 5. szegment gyorsabban fut. Különösen a 10. és 11. szegmentre jellemző ez a gyors vándorlás a megfelelő A csoportú rotavírus-szegmentekhez képest.

1.4. A rotavírus RNS genomjának vizsgálata teszi csak lehetővé - az elektronmikroszkópos vizsgálat mellett, és a 90-es években megjelenő PCR technikán túl - a nem-A csoportba tartozó rotavírusok kimutatását. A közel másfél évtized alatt végzett elektroferotipizálás során összesen öt esetben sikerült C csoportba tartozó rotavírust humán székletmintákban találnunk egymással sem időben, sem helyileg nem kapcsolódó esetekben (59). Az 5. ábra szemlélteti azokat a jellegzetes szegment-migrációs különbségeket, amik ezeket a vírusokat az A csoportba tartozó rotavírusoktól jól megkülönböztetik. A jobb oldali képen, az SA11 rotavírus RNS szegmentjeinek migrációs profiljával összevetve, a C csoportú izolátum szegmentképén a legfeltűnőbb, hogy a 7. szegment lasabban vándorol és közelebb marad a gyorsabban futó 5. és 6. szegmenthez, valamint a 10. és 11. szegment tovább vándorol a gélben az SA11 hasonló szegmentjeinek futási pozíciójához képest. A bal oldali képen a C csoportba tartozó

rotavírus mellett két humán A csoportba tartozó rotavírus szegmentképe látszik. Megfigyelhető, hogy egyes szegmentek nagyon közel vagy éppen együtt futnak az alkalmazott vizsgálati körülmények között. A C csoportba tartozó izolátumnál a 3. és 4. szegment, valamint a 8. és 9. szegment fut együtt, míg az A csoportú rotavírusoknál a 2. és 3., a 7. és 8., illetve a 7., 8. és 9. RNS szegment vándorol együtt. Kevesebb minta felvitele és hosszabb méretű gélben való elektroforézis esetén várható, hogy az "együtfutás" megállapítás helyett a "nagyon közel" szerepelne. *E vizsgálatok alapján, mind a mai napig, csak hazánkból ismert C csoportba tartozó rotavírus a közép-kelet-európai régióban.*

1.5. "Kevert" vagy "kettős" rotavírus fertőzést sikerült kimutatni a virális RNS vizsgálatával (60). Ez az egyetlen módszer ilyen esetek felismerésére. Korábban is tudtuk, hogy az első életévekben, akár klinikai tüneteket is okozva, több rotavírus fertőzést kaphatunk, de ezeket úgy képzeltük, hogy egymást követően történnek. A rotavírus törzsekre jellemző RNS szegmentek migrációs különbségei viszont igazolták, hogy ugyanabban a klinikai esetben akár két különböző elektroforotípusú vírus is jelen lehet. A 6. ábra bal oldalán, ezüstoffestéssel kimutatva, az SA11 simian rotavírusból izolált kontroll RNS mellett egy A csoportú humán rotavírus RNS szegmentképe látszik. Ennek a vírusnak a 2. és 3.



szegmentje együtt futott, a 7. és 8. pedig nagyon közel ("A" pozícióban lévő izolátum). Ugyanakkor az S.M. jelzésű, 15 hónapos gyermekből izolált virális

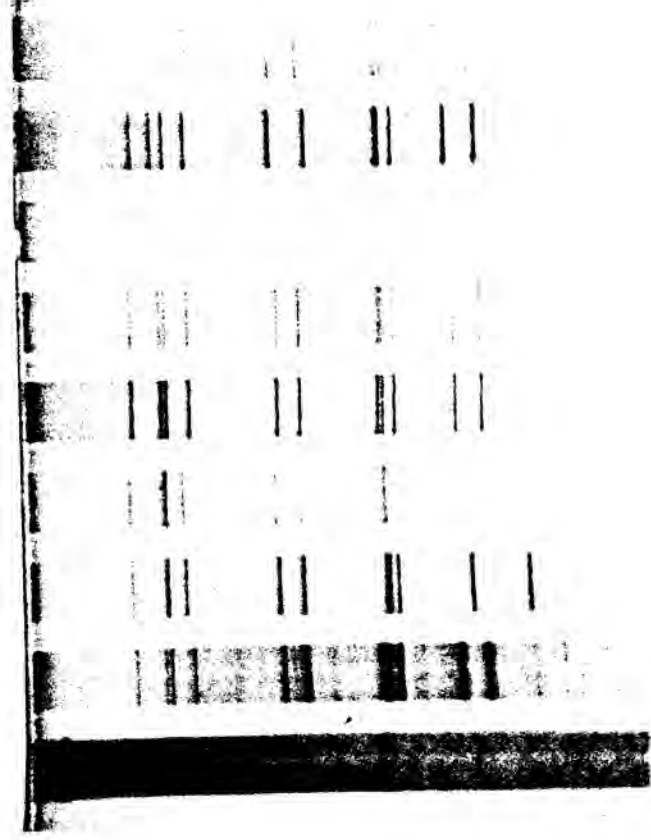
RNS képe 8 extracsíkot mutat a rotavírusra jellemző eloszlásban, az erősebben festődő "A" mintának megfelelő szegmenteken felül. Az intenzitásbeli különbség jelzi, hogy az egyik vírus mennyisége kevesebb a székletmintában. Ezt magyarázhatom egyrészt azzal, hogy a kevesebb virális RNS oka az, hogy a vírus korábban vagy éppen a vizsgálat előtt fertőzte a gyermeket, de az sem zárható ki, hogy sok üres, nukleinsavát veszített rotavírus van jelen ennél a törzsnél.

1.6. A 6. ábra jobb felén, az ethidium bromiddal festett rotavírus RNS szegmenteik analízise felvetette a nosocomialis infekció igazolásának lehetőségét. A vizsgálati időszakban Pécs város területén az "A" és "B" jelzésű elektroferotípusok dominanciája volt jellemző, és érdekes módon a POTE Gyermekklinikáján izolált törzsek RNS szegmentjei az "A" migrációs képet mutatták, míg a Gyermekkórházból azonos időben kapott mintákból a "B" RNS profil volt kiemelhető. G.H. 2 hónapos leánysecsemő gyermekkorházi közvetlen felvételekor valószínűleg az "A" elektroferotípussal volt fertőzve, és a felvételt követő harmadik napon végzett virológiai vizsgálat szerint már üríti a Gyermekkórházban akkor cirkuláló törzset is. Tudva, hogy a rotavírus fertőzés inkubációs ideje körülbelül három nap, ezért 72 órával a kórházi felvételt követően fellépő rotavírus ürítést nosocomialis eredetűnek tartják a szakemberek. A fentiakat át gondolva, G.H. esetében a nosocomialis infekciót valószínűsíti, hogy a székletből kimutatott virális RNS extraszegmentek a kórházban jelen lévő elektroferotípusra jellemző pozícióban található.

1.7. Sikerült nekem is igazolnom, hogy a "short" elektroferotípus az esetek túlnyomó többségében kettes szerotípusú törzseket jelent. A 7. ábra négy olyan rotavírusizolátum RNS szegmentképét mutatja, ahol a 10. és 11. szegment vándorlási sebessége elmaradt a "long" elektroferotípusokat reprezentáló három jól látható, és a bal szélen kevésbé kivehető izolátum hasonló szegmentjeinek vándorlási pozíciójától. Mivel az irodalomban egyedül a "short" elektroferotípusoknál figyelték meg, hogy a legtöbb ilyen RNS migrációs profilú törzs a 2-es szerotípusba tartozik, ezt a megfigyelést ellenőrizni akartam. A megfigyelést alá tudtam támasztani, mert ezeket a törzseket a szerotípus meghatározására kifejlesztett, monoklonális tipizáló savókat alkalmazó ELISA vizsgálattal mind 2-es szerotípusúnak találtam. Hangsúlyoznom kell azonban, hogy az elektroferotípus önmagában nem alkalmas a szerotípus meghatározására, hiszen a szerotípus nem a "short" profilt jelentő gének által kódolt.

1.8. Az állatorvoskollégák kérésére megkíséreltem borjú- és malacbélsárból a rotavírusok kimutatását, elsősorban a virális RNS extrakciójával és annak poliakrilamid gélben történő futtatásával. A már elővizsgálatokkal rotavírust tartalmazó 24 borjúbélsárból 8 esetben tudtam a vizsgálatok elvégzéséhez elegendő virális RNS-t nyerni, és 4 különböző elektroferotípust kimutatni. A 8. ábra különböző állományokból származó malacoktól kapott bélsárból izolált rotavírusok RNS-ének elektroferotípezálási eredményét mutatja. A kódoltan, és egyszerűen kapott minták vizsgálata bizonyította, hogy a három állattartó telepen különböző rotavírus törzsek voltak felelősek a malacok között észlelt hasmenésekért. Az eltérő helyen tartott állományokban három különböző elektroferotípust sike-

rült kimutatni. Ez hasznos információ volt, és csak ezzel a vizsgálattal lehetett bizonyítani az eltérő rotavírusok cirkulációját. A malacoktól kapott bélsármintákat a humán vizsgálatokra előállított latex agglutinációs teszttel (Rotalex) is megnéztük, ami kevesebb mint egy órában belül igazolta az A csoportba tartozó rotavírusok jelenlétét. Vagyis ez a teszt alkalmas állatállományoknál gyors



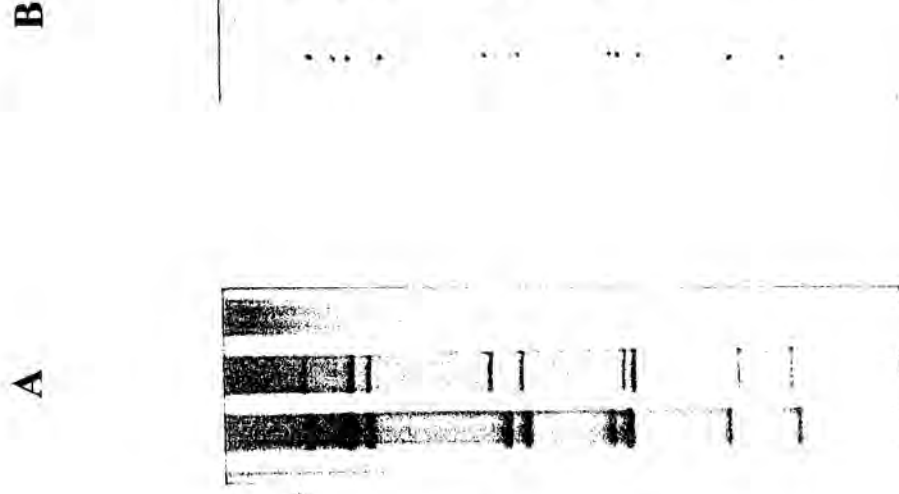
7. ábra. "Short" elektroferotípusú és 2-es szerotípusú rotavírusok.

Noha kisebb különbségek észlelhetők a négy "short" elektroferotípus között (8. pozícióban a 2. és 3. szegment jobban elkülönül, és az 5. és 6. szegment is távolabb van egymástól a többi izolátum hasonló szegmentjeinek pozícióihoz hasonlítva), mind a négy rotavírus 2-es szerotípusúnak bizonyult a tipizáló ELISA vizsgálattal.

helyszíni vizsgálatok elvégzésére - hangsúlyozva, hogy csak az A csoportba tartozó rotavírusokat jelzi, és nem mutatja ki a sertések hasmenéseiben szintén gyakran előforduló B, C, és a ritkábban észlelt E csoportba tartozókat, valamint a borjaknál is gyakori B csoportú rotavírusokat. *Hazánkban, tudomásom szerint, elektroferotípus kimutatása állati rotavírus fertőzésekben még nem történt a fenti vizsgálatokon kívül.*

7. ábra. Malacbelsőből kimutatott rotavírusok elektroferotípusai.

Három, egymástól földrajzilag távol fekvő sertéslelepről gyűjtött, kódoltan kapott malacbelsősről vizsgálata három eltérő elektroferotípusú rotavírusról mutatott. Különbség figyelhető meg a 2. és 3. szegmentek vándorlásában, a 4. és 5. szegmentek migrációjában, de a III. csoportba tartozó 7.-8.-9. szegment egymáshoz viszonyított pozíciójában is. Az ezüsfestéssel kimutatott szegmentek közül az "A" kép második helyén lévő rotavírus 10. és 11. szegmenyjének migrációja is eltér a többi izolátumétól igazolva, hogy különböző törzsek voltak az állatállományokban.



(Dr. Bíró Hunor állatorvos kolléga hozzájárulásával közölt adatok.)

2. A rotavírusok monoklonális ellenanyagokkal végzett szerotipizálása.

Összesen 1285 rotavírusról tartalmazó székletmintát vizsgáltunk meg, amikből 1215 esetben (95%) sikerült a G szerotípust meghatározni (62). Baranya megyéből 1984-1992 években gyűjtött 367 minta, míg a Fővárosi Szent László Kórházból 1988-1992 évek között laboratóriumomba lehozott 918 minta vizsgálata alapján sikerült az alábbi megfigyeléseket tennem.

2.1. A szerotípusok megoszlásának vizsgálata azt mutatta, hogy a sikeresen tipizált 1215 rotavírus törzs közül 81%-ban volt jelen a G1-es szerotípus, míg G2-es, G3-as és G4-es szerotípusokat csak 4, 1 és 5 %-ban találtam.

2.2. A baranyai nyolc és a budapesti négy rotavírus szezon során minden esztendőben, egyet kivéve, a G1-es szerotípus volt a domináns, noha 41-től 100 %-ig változott az aránya a többi G szerotípushoz képest. Baranya megyében az 1987-1988-as rotavírus szezonban emelkedni kezdett a G4-es szerotípusok száma, és egyetlen kivételként - a következő szezonban ez vált dominánssá, de csak ebben a földrajzi régióban. A budapesti székletanyagban 1988-1989 és 1990-1991 években több G2 szerotípust is észleltünk, de ez nem volt szignifikáns. *Vizsgálataim először igazolták a közép-kelet-európai régióból, hogy észlelhető különbség a szerotípusok évenkénti megjelenésében, és a szerotípusok földrajzi megoszlásában is.*

2.3. Egy százalékban sikerült kimutatnom több szerotípust egy-egy székletmintában (mint "kevert" fertőzést) igazolva így is a több rotavírussal egyszerre megvalósuló fertőzések tényét.

2.4. A nem-tipizálható törzsek először 1987-1988-as rotavírus szezonban jelentek meg Baranya megyében, majd az ezt követő két szezonban arányuk elérte a 15 illetve a 23 %-ot, amit már szignifikáns emelkedésnek találtam ($p < 0.001$). A nem-tipizálható rotavírusok száma 1989-1990 és 1990-1991 években a László Kórházból kapott anyagban is magasabb volt (16 és 6 %). Az ilyen nem-tipizálható vírusok mindig felvetik, hogy a G1-G4 szerotípusba nem tartozó, más szerotípusú rotavírusok voltak az adott időszakokban a rotavírus fertőzések kiváltó okai a vizsgált esetekben.

3. Humán rotavírus izolálása szövettanészetben.

3.1. Nyolc rotavírust tartalmazó székletmintából kíséreltem meg a vírus izolálását. A vírusokat előzetesen elektroferotipizáltam és meghatároztam a szerotípust. Továbbá elektronmikroszkóppal megvizsgáltam a Genetronnal kezelt mintákat, hogy megtudjam a partikulaszámot, illetve a nukleinsavat tartalmazó "double shell" (ds) virionok arányát, az "üres" vagy csak egy burkot tartalmazó "single shell" (ss) partikulákhoz viszonyítva. Az összes minta legalább 10^8 partikulát tartalmazott milliliterenként, de háromnál a vírusszám 10^{10-11} volt. Három minta kivételével a ds-partikulák aránya meghaladta a 90 %-ot. Az MA-104 szövetre történt fertőzést követően, és az ismételt passzálásokból is minden esetben immunofluoreszcens próbában, anti-SA11 kecskesavót használva igyekeztem felfedezni a rotavírus-pozitív sejteket. Ez végül a 3. passzálásban járt sikerrel két mintánál. Egy mohácsi és egy pécsi kisgyermektől *1987-ben gyűjtött székletmintákból sikerült kitenyésztenem - és tudomásom szerint mindeddig még nem megismételtem - az első magyarországi humán rotavírusokat.* A sikeres tenyésztést az ELISA és elektronmikroszkópos vizsgálat is igazolta; utóbbi módszerrel az egyik tenyésztet felüliszóójában 10^{7-8} /ml partikula, míg a másikéban 10^6 /ml vírus volt. A kitenyésztett két rotavírus elektroferotípusa megegyezett az

eredeti székletmintákból nyert virális RNS-ek szegmentképeivel és G szerotípusuk is azonos volt (G1).

3.2. Fontos megfigyelés volt, hogy tíz, elektronmikroszkóppal és/ vagy gélelektroforézissel, valamint Rotalex és ELISA vizsgálatokkal rotavírusokat tartalmazó székletmintákból az MA-104 sejtenyésztésben, tripszinkézéssel, 3 - 10 passzálást követően citopatogén vírusokat sikerült izolálni. (Nyolc minta Sze-



9. ábra. Reovírus RNS genom-szegmentek migrációs profiljai.

Az első pozícióban lévő rotavírus genom-szegmentjeinek pozícióihoz hasonlítva feltűnő, hogy a reovírusok szegmentjeinek vándorlási sebessége ugyanazon feltételek mellett sokkal lassúbb. Két izolátum elektroferotípusa eltér a többitől (7. és 11. helyen lévőek), főleg a II. csoportban található 3 szegment miatt. (Ezeket nem tudtuk azonosítani, de elektroferotípusuk alapján a 3-as szerotípusra hasonlítanak.)

gedről származott, és mind az eredeti székleteket, mind a "rotavírus"-nak jelölt izolátumokat megkaptam, két székletminta pedig pécsi eredetű volt.) Amikor a kitenyészített vírusokkal rotavírus-specifikus ELISA rendszerben nem kaptunk reakciót, és fertőzött sejteket anti-SA11 polivalens immunsavóval immunofluoreszcens módszerrel vizsgálva, szintén nem láttunk rotavírus indukálta antigéneket, még felmerült, hogy nem-A csoportú rotavírusokat sikerült kitenyésztenünk. Végül az izolátumok nukleinsavának vizsgálata mutatta meg, hogy reovírusok nőttek ki a rotavírus-pozitív székletmintákból. Ezt nemcsak a jellegzetes, 10 szegmentből álló genom migrációs profilja, hanem a vírusok humán vörösvértesteket agglutináló tulajdonsága is alátámasztotta. Azt is megfigyelhettem, hogy a két, egymástól majdnem 150 kilométerre lévő helyen izolált reovírusok eltérő elektroferotípust mutattak. Feltételeztük, hogy a székletmintákban eredetileg alacsony számban jelen lévő reovírusok a tenyésztés során gyorsabban nőttek, és megakadályozták a lassabban adaptálódó rotavírusok szaporodását. *Ez volt az első hazai reovírus elektroferotípezálás, mely nélkül az izolátumok azo-*

nosítása aligha lett volna lehetséges immunsavóok hiányában. (Fél év múlva, az OKI-ból kapott 1-es szerotípust neutralizáló immunsavóval végzett neutralizációs próbában négy izolátum 1-es szerotípusúnak bizonyult.)

4. Rotavírusok cirkulációjának epidemiológiai jellemzői.

4.1. *Meg tudtam erősíteni, hogy a rotavírusok cirkulációja hazánkban is szezonalitást mutat (62).* A 3. Táblázat adataiból látszik, hogy Baranya megyében - négy rotavírus epidémiás szezonban - az esetek halmozódása december-március hónapok közé esett, januári (1989/1990), februári (1988/1989 és 1990/1991), márciusi (1991/1992) csúcsokkal.

3. Táblázat. Rotavírus-pozitív székletminták előfordulása hónapok szerint Magyarországon két földrajzi régiójában és négy rotavírus epidémiás szezonban (1988-1991).

Epidémiás szezon*	Hónap				Összes pozitív / évi összes pozitív (%)		
	Nov.	Dec.	Jan.	Febr.		Márc.	Ápr.
Baranya megye							
1988/1989	5 ^o	20	51	68 [†]	38	12	102/132 (77)
1989/1990	10	88	90	84	40	29	231/267 (87)
1990/1991	14	6	41	68	48	11	87/101 (86)
1991/1992	7	31	19	32	44	18	78/ 86 (91)
Budapest							
1988/1989	21	24	25	38	25	19	150/212 (71)
1989/1990	20	43	45	46	33	25	512/727 (70)
1990/1991	29	25	36	38	43	24	439/695 (63)
1991/1992	6	14	39	40	43	32	252/328 (77)

* Az epidémiás szezon minden év november 1-től a következő év április 30.-ig tart.

^o Száralékban kifejezve az ELISA és/vagy RNS vizsgálattal rotavírus-pozitív minták száma a hónapban megvizsgált összes székletmintában.

[†] Az epidémiás csúcsidőszak vastagon van szedve.

Látszik az is, hogy Budapesten az epidémiás szezonok csúcsa szintén a februári és márciusi hónapokra esett a vizsgált időszakban, de az is egyértelmű, hogy egy hamarabb induló és hosszabb ideig tartó esethalmozódás jellemzi a fővárosi rotavírus epidémiát. Az is jellemző, hogy az éves összes rotavírus-pozitív eset 85 illetve 69 %-a, a négy év átlagát nézve, a novembertől ápriliséig tartó epidémiás időszakokra esett.

4.2. Mintegy 3267 akut gastroenteritisben szenvedő gyermek életkorának vizsgálata azt mutatta, hogy a hazánkban is a 6 hónap - 2 év közötti korosztályokban fordul elő a legtöbb, klinikai tünetekkel járó rotavírus infekció (4. Táblázat).

4. Táblázat. Rotavírus infekció gyermekek között hét korcsoportban.

Korcsoport	Vizsgált székletminták száma	Rotavírus-positív minták száma (%)
0 - 5 hónap	722	130 (18)
6 - 11 hónap	590	183 (31)
1 év	756	272 (36)
2 év	508	168 (33)
3 év	414	112 (27)
4 év	74	14 (19)
≥ 5 év ismeretlen	96	13 (12)
Összesen:	3267	915 (28)

Még a három évesek között is magas a rotavírus fertőzést mutatók száma, de hat hónapnál fiatalabbak között is 18 %-ban lehetett kimutatni klinikai tüneteket okozó rotavírus infekciót.

4.3. 1995-ben a Fővárosi Szent László Kórházból hozott székletminták vizsgálata során nyolc esetben klinikai tünetekkel járó rotavírus fertőzéseket sikerült kimutatnom. A még nem publikált esetek felhívták a figyelmet, hogy idősebb korban (egy 16 éves beteg kivételével a többiek 50 évnél idősebbek voltak) is manifesztálódhat a rotavírus fertőzés. Az elektroferotipizálás azt mutatta, hogy egy kivételével a február- március hónapban gyűjtött minták azonos RNS szegment-migrációs profillal rendelkeztek. Részletesebb epidemiológiai és virológiai vizsgálattal tisztázni tudtam, hogy U.H. nyugdíjas (szül. idő: 1911.04.04) , aki 1995. február 27-től március 9-ig feküdt a kórházban többszöri hányás és vizes székletürítés, 37,8 °C láz miatt, albérióket tartott. Az albériók másfél éves kisgyermekének hasmenése volt négy nappal korábban, mint ahogy az idős hölgy megbetegedett. T.I.-né, nyugdíjas (szül. idő: 1943.02.04.) U.H. betegársa; egy szobában feküdtek. Őt nem gastroenterális panaszokkal vették fel március 6.-án, de 4 nap után hirtelen láza lesz, hasmenés lép fel. A betegek ápolásában részt vevő nővérek közül két személynél igen intenzív, fél óránként jelentkező vizes hasmenés lépett fel február 29.-én illetve március 6.-án, amit hasi görcsök és láz (> 38 °C) kísért. Minden esetben az elvégzett bakteriológiai és parazitológiai vizsgálatok negatívak voltak, de a rotavírust ki lehetett mutatni. Az elektroferotipizálás alapján a kimutatott rotavírus törzsek azonosnak bizonyultak. - *Ez az első hazai, felnőttek között virológiai vizsgálattal megerősített rotavírus infekció-halmozódás (nosocomialis összefüggésekkel).*

4.4. Vizsgálatokat végeztem budapesti és szegedi kollégáim segítségével az ország három területén előforduló rotavírus fertőzések nagyszámban történő meghatározására a kórházi felvételi és laboratóriumi nyilvántartások felhasználásával (63). 1993. január és 1996. december között 9.182 14 évnél fiatalabb gyermek került kórházba gastroenterális infekcióval, akik közül 1.946 (21%) esetben sikerült a rotavírust kimutatni. A legtöbb (90%) rotavírus-positív esetet a ≤ 4 éves korosztályban találtam. A kapott eredmények extrapolálásával és a demográfiai adatok segítségével körülbelül 5.000 kórházi kezelést igénylő rotavírus

okozta megbetegedéssel lehetett számolni a vizsgált időszak alatt (18.6 felvétel / $1.000 \leq 4$ éves gyermek / év). Ha a Baranya megyei Kerpel-Frónius Gyermekórház Fertőző Osztályán kapott 6.783 forint átlagos napi ápolási költséget veszem figyelembe, és 5.000 kórházi ápolást igénylő rotavírus infekcióval, valamint gyermekenként a vizsgálatoknál kapott 8 napos átlagos ápolási idővel számolok, akkor az így kapott *40.000 kórházi nap költsége* közel *271 millió forint!* Ez az érték valószínűleg még magasabb, mert nem minden esetben történt rotavírus kimutatás az általunk vizsgált egészségügyi egységekben sem minden gastroenterális fertőzésben szenvedő gyermeknél, és az átlagos napi ápolási költségek is több intézményben magasabbak a számításhoz használt forrásnál. Jelenleg is folyó, pontosabb adatokat adó, és aktuális összegekkel számoló vizsgálatunk biztosan elő fogják segíteni e vírusfertőzés járványügyi és pénzügyi jelentőségének jobb megítélhetőségét.

5. Hazai és nemzetközi együttműködés kiépítése.

5.1. Az itt bemutatott eredmények is demonstrálják, hogy mind a hazai humán egészségügyi, mind pedig az állatorvosi terület sok kiváló munkatársát sikerült az évek során megnyernem a rotavírusok magyarországi cirkulációjának jobb megismerését célzó vizsgálataimhoz. Különösen értékes a Fővárosi Szent László Kórház Virologiai Laboratóriumában és a Szegedi Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Központi Klinikai Mikrobiológiai Intézetében dolgozó kollégákkal ezen a téren csaknem tizenöt évre visszanyúló munkakapcsolatom. Ma ez biztosítja, hogy a jövőben esetleg bevezetésre kerülő rotavírus vakcina indokoltságát már adatokkal tudjuk majd támogatni.

5.2. Az évek során sikerült biztosítanom, hogy a rotavíruskutatás vezető képviselőitől nemcsak módszereket, de fontos diagnosztikai anyagokat kaphak vizsgálataimhoz. Jelenleg a CDC Gastroenterológiai Részlegének vezetője (Roger I. Glass), az NIH Enterális Betegségek Programjának vezetője (Dennis R. Lang), a Norfolkban lévő Gyermekgyógyászati Kutatóközpont neves munkatársa (David O. Matson), a WHO Vakcina Kutatás és Fejlesztés Osztályának igazgatója (Bernard Ivanoff), valamint a londoni Közegészségügy Laboratóriumi Szolgálat egyik igazgatója (David Brown) segíti munkámat. Rajtuk keresztül reális esélyem van arra, hogy a legkorszerűbb diagnosztikai anyagokhoz, eljárásokhoz, módszerekhez folyamatosan hozzájutunk a jövőben is.

5.3. A múlt év végén, egyedül a közép-kelet-európai országok közül, laboratóriumom tagja lett a "The Epidemiology and Burden of Rotavirus Infection and the potential cost benefit of Rotavirus Vaccine in Europe" címmel az Európai Közösséghez benyújtott projectnek. Összesen tíz európai laboratórium, köztük mi, vesz majd részt ebben a két évre tervezett prospektív vizsgálatban, amelyen belül a legkorszerűbb víruskimutatói és nukleinsav vizsgálati technikák standardizáltak, központi szervezéssel kerülnek alkalmazásra a kitűzött feladat megvalósítása érdekében.

Magyarországon belül is ma már - az Országos Közegészségügyi Intézet szakmai jóváhagyásával - laboratóriumom referens vizsgálólhelye a gastroenteritist okozó vírusoknak az ország egész területére.

MEGBESZÉLÉS, ÚJ EREDMÉNYEK

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

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

1. A humán rotavírusok RNS genom-segmeneteinek székletből történő közvetlen kimutatása először Magyarországon e vizsgálatok keretében történt meg.
2. A virális RNS-segmentek analízisével, az elektroferotipizálás bevezetésével sikerült molekuláris epidemiológiai vizsgálatokat végezni. Meg lehetett határozni a rotavírus törzsek heterogenitását, egyes törzsek időszakokra jellemző túlsúlyát.
3. Először sikerült kimutatni nem-A csoportba tartozó rotavírusokat.
4. Nosocomialis infekciókat lehetett igazolni gyermekek és felnőttek között a kimutatott rotavírusok elektroferotipusainak vizsgálatával.
5. Először sikerült kimutatni több eltérő elektroferotipusú vírussal egyszerre fennálló fertőzést ugyanazon betegen.
6. Sikerült itthon is igazolni, hogy a "short" elektroferotipus legtöbbször 2-es szerotípusnak felel meg.
7. Először végeztünk Magyarországon bovin és sertés bélsárból közvetlen rotavírus RNS-analízist, és igazoltunk epidemiológiai összefüggéseket ezzel a módszerrel sertésállományokban.
8. A korábban még soha nem végzett szerotípus (G típus) meghatározás alapján először igazoltuk mind négy leggyakoribb szerotípus hazai előfordulását.
9. Szerotípusok megjelenésében földrajzi különbséget tudtunk feltárni egy rotavírus szezonon belül.
10. Több szerotípussal történt fertőzéseket sikerült igazolnunk.
11. Valószínűsíteni sikerült, hogy a legismertebb GI-4 szerotípuson felül más szerotípusok jelenlétével is számolni kell a rotavírus infekciókban.
12. Először sikerült szövettanban kitenyésztetni humán rotavírust hazai székletmintákból.
13. Reovírusok kimutatását és azonosítását genom-vizsgálattal mi végeztünk először hazánkban.
14. A rotavírus fertőzések szezonális megjelenéséről először szolgáltatunk több évre kiterjedő vizsgálatok alapján adatokat.
15. Nagyszámú anyagon először elemeztük az egyes korcsoportok érintettségét a klinikai tünetekkel járó rotavírus fertőzésekben.

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

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

Az eredmények részbeni publikálása hozzájárult ahhoz, hogy a magyarországi rotavírus cirkulációra vonatkozó adatok nemzetközi figyelmet kaptak. Ez egy részt a laboratórium európai rotavírus surveillance vizsgálatokba való meghívását jelentette, másrészt a virológia "Bibliájának" számító Fields' Virology-ban való idézettséget hozta magával, de biztosította azt is, hogy az itt bemutatott munka egy nem lezárt, hanem tovább folyó kutatás sok éves első időszakának tekinthető csak.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet kívánok mondani a név szerint itt hely hiányában fel sem sorolható számtalan hazai és külföldi kollégának, kolléganőnek, barátoknak, akik önzetlen segítsége, támogatása nélkül e munkákról most nem tudtam volna beszámolni. Külön ki kell emelnem Dr. Pácsa Sándort, aki a virológia iránti érdeklődésemet felkeltette, valamint Dr. Dömök István és Joseph L. Melnick személyét, akik nélkül aligha kerültem volna be a rotavírusokkal foglalkozók nemzetközi csapatába. Mégis igazán közvetlen munkatársaimnak, Dr. Új Máriának, néhai Dr. Kende Miklósnak, néhai Németh Istvánnénak, Nagy Gyulánénak és Preisz Magdolnának tartozom elsősorban köszönettel, hogy laboratóriumomban az évek folyamán megadták a legnagyobb segítséget, jelentősen hozzájárulva az itt bemutatott eredményeim eléréséhez.

IRODALOM

1. Bazsika A, Szarka E, Pintér S, Mikola I. Rotavírus okozta gastroenteritisek családi halmozódása. Orvosi Hetilap 126: 1653-1655 (1985).
2. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in the epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 2: 1281-1283 (1973).
3. Bridger JC. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses, and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. Vet Rec 107: 532 (1980).
4. Caul EO, Appleton H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. J Med Virol 9: 257-265 (1982).
5. Das M, Dunn SJ, Woode GN, Greenberg HB, Rao CD. Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 rotavirus. Virology 194: 374-379 (1993).
6. Deák J, Nagy E, Nagy A. Koraszülöttek rotavírus fertőzése. Magyar Pediáter 17: 371-372 (1983).
7. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Burton H, Brendel KA, Smith DC. Epi Info, version 6: a word processing, database, and statistics system for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (1994).
8. Desselberger U. Towards rotavirus vaccines. Rev Med Virol 3: 15-21 (1993).
9. Dimitrov DH, Graham DY, Lopez J, Muchnik G, Velasco G, Stenback WA, Estes MK. RNA electropherotypes of human rotaviruses from North and South America. Bull World Health Organ 62: 321-329 (1984).

10. Dolan KT, Twist EM, Horton-Slight P, Forrer C, Bell LM, Plotkin SA, Clark HF. Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. *J Clin Microbiol* 21: 753-758 (1985).
11. Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. Rotaviruses: A Review. *Curr Top Microbiol Immunol* 105: 123-184 (1983).
12. Estes MK, Graham DY, Dimitrov DH. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog Med Virol* 29: 1-22 (1984).
13. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53: 410-449 (1989).
14. Fifth rotavirus vaccine workshop: current issues and future developments. Glass, R.L., Compans, R., Lang, D. (G. Eds.). Atlanta, GA, September 1995. *J Infect Dis* 174 (Suppl. 1): S1-126 (1996).
15. Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2: 1497 (1973).
16. Földes J, Nagy E, Menyhárt É. Abakteriális csecsemőkori akut gastroenteritisek etiológiai vizsgálata. *Gyermekgyógyászat* 33: 220-227 (1982).
17. Gilger MA, Matson DO, Conner ME, Rosenblatt HM, Finegold MJ, Estes MK. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr* 120: 912-917 (1992).
18. Glass RI, Kilgore PE, Holman RC, Jin S, Smith JC, Woods PA, Clarke MJ, Ho MS, Gentsch JR. The epidemiology of rotavirus diarrhoea in the United States: Surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis* 174 (Suppl. 1): S5-11 (1996).
19. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang Z-Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28: 276-282 (1990).
20. Gurwith M, Wenman W, Hinde D, Feltham S, Greenberg H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J Infect Dis* 144: 218-224 (1981).
21. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 16: 473-477 (1982).

22. Hughes JH, Tuomari AV, Mann DR, Hamparian VV. Latex immunoassay for rapid detection of rotavirus. *J Clin Microbiol* 20: 441-447 (1984).
23. Jiang B, Dennehy PH, Spangenberg S, Gentsch JR, Glass RI. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis* 172: 45-50 (1995).
24. Kapikian AZ, Flores J, Hoshino Y. Rationale for the development of a rotavirus vaccine for infants and young children. In *Progress in Vaccinology*, Talwar GP, ed. New York: Springer-Verlag, pp 151-180 (1989).
25. Kapikian AZ, Chanock RN. Rotaviruses. In: *Virology*. Fields BN, Knipe DN, Chanock RN, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B (Eds.). Raven Press, New York, NY, pp. 1353-1404 (1990).
26. Katz D, Straussman Y, Shahar A. A simplified microwell pseudoreplica for the detection of viruses by electron microscopy and immunoelectron microscopy. *J Virol Method* 9: 185-192 (1984).
27. Kovacs A, Chan I, Hotrakitya C, Overturf G, Portnoy B. Serum transaminase elevations in infants with rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 5: 873-877 (1986).
28. Kovács J, Deák J, Nagy E, Földes J. Rotavírus okozta gastroenteritis járvány Hódmezővásárhelyen 1983 tavaszán. *Gyermekgyógyászat* 35: 301-306 (1984).
29. Köves B, Belák S, Berencsi Gy, Palya V. Rotavírus-fertőzöttség előfordulása újszülött borjakban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 32: 208-211 (1977).
30. Köves B. Citopatogén rotavírus izolálása újszülött borjakkól. *Magyar Állatorvosok Lapja* 34: 450-452 (1979).
31. Köves B, Nagy B, Kulcsár Á. Rotacol vaccina. Rotavirus-E.coli kombinált vakcina kifejlesztése újszülött borjak hasmenése ellen. *Állatorvosi Közlemények* 4: 251-260 (1989).
32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).

33. Lakos A, Koller M, Szarka E, Csik M, Vanda K, Pohl Ö. Rotavírus fertőzés légúti és enterális gyermekosztályon. Orvosi Hetilap 126: 2969-2972 (1985).
34. Lang DR, Glass RI, Compans RW. Summary of the fifth rotavirus vaccine workshop. J Infect Dis 174: S3-4 (1996).
35. Mathews REF. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses. The Hague, September 1978. Intervirology 11: 133-135 (1979).
36. Matson DO, Estes MK. Impact of rotavirus infection at a large pediatric hospital. J Infect Dis 162: 598-604 (1990).
37. Mocsári E, Horváth I, Kudron E. Serological survey on rotaviral antibody in the Hungarian swine population by optimized counter-current immunoelectrophoresis (CCIEP). Acta Vet Hung 30: 59-64 (1982).
38. Nagy B. The use of negative contrast electron microscopy in the diagnosis of viral enteric infections of domestic animals. Ann Immunol Hung 26: 63-72 (1986).
39. Nagy B. Borjak és malacok enterális fertőzéseinek kóroktana és specifikus megelőzése. Doktori értekezés, Budapest, (1992).
40. Nagy B, Nagy Gy, Meder M, Mocsári E. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. Acta Vet Hung 44: 9-19 (1996).
41. Nagy E., Földes J, Menyhárt É, Deák J. Rapid diagnostic methods in Virology. I. Electron microscope studies of the human reovirus-like agents of infantile gastroenteritis. Acta Microbiol Acad Sci Hung 27: 225 (1980). Abstract.
42. Nakata S, Petrie BL, Calomeni EP, Estes MK. Electron microscopy procedure influences detection of rotaviruses. J Clin Microbiol 25: 1902-1906 (1987).
43. Nicolas JC, Lourenco MH, Marchal S, Cohen J, Scherrer R, Bricout F. Description of a very simplified method for rotavirus dsRNA extraction. Ann Virol (Inst Pasteur) 134E: 135-139 (1983).

44. Nomenclature of human rotaviruses: designation of subgroups and serotypes.
Bull World Health Organ 62: 501-507 (1984).
45. Prasad BVV, Wang GJ, Clerx JPM, Chiu W. Three-dimensional structure of rotavirus.
J Mol Biol 199: 269-275 (1988).
46. Ramia S, Sattar SA. Rotavirus concentration from cell culture harvests: trypsin treatment followed by hydroextraction.
Appl Environ Microbiol 40: 1133-1135 (1980).
47. Ramig RF. Rotaviruses. Ramig RF (Ed.). Springer-Verlag, New York, NY, (1994).
48. Rodger SM, Holmes IH. Comparison of genomes of simian, bovine and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates.
J Virol 30: 839-846 (1979).
49. Rodger SM, Bishop RF, Birch C, McLean B, Holmes IH. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid.
J Clin Microbiol 13: 272-278 (1981).
50. Rodriguez WJ, Kim HW, Arrobbio JO, Brandt CD, Chanock RM, Kapikian AZ, Wyatt RG, Parrott RH. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human rotavirus-like agent in infants and young children.
J Pediatr 91: 188-193 (1977).
51. Rodriguez WJ, Kim HW, Brandt CD, Schwartz RH, Gardner MK, Jeffries B, Parrott RH, Kaslow RA, Smith JJ, Kapikian AZ. Longitudinal study of rotavirus infection and gastroenteritis in families served by a pediatric medical practice: clinical and epidemiologic observations.
Pediatr Infect Dis J 6: 170-176 (1987).
52. Rotavirus. In: State of the world's vaccines and immunization. World Health Organization (Ed.), Geneva, pp. 112-114 (1996).
53. Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs.
J Clin Microbiol 12: 105-111 (1980).
54. Santos N, Gouvea V. Improved method for purification of viral RNA from fecal specimens for rotavirus detection.
J Virol Method 46: 11-21 (1994).

55. Santosham M, Yolken RH, Quiroz E, Detection of rotavirus in respiratory secretions of children with pneumonia. *J Pediatr* 103: 583-585 (1983).
56. Sato K, Inaba Y, Shinozaki T, Fujii R, Matumoto M. Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch Virol* 69: 155-160 (1981).
57. Szűcs Gy, Kende M, Új M. Rotavírus-fertőzés igazolása a vírus-RNS székletből történő kimutatásával. *Orvosi Hetilap* 125: 2177-2179 (1984).
58. Szűcs G, Kende M, Új M, Deák J, Koller M, Szarka E, Csík J. Different electrophoretotypes of human rotaviruses in Hungary. *Acta Virol* 31: 369-373 (1987).
59. Szűcs G, Kende M, Új M. Atypical human rotaviruses in Hungary. *Ann Inst Pasteur/ Virol* 138: 391-395 (1987).
60. Szűcs Gy, Kende M, Új M, Varga L, Rajkai I. "Kevert" rotavírus-fertőzések kimutatása vírus-RNS vizsgálattal. *Orvosi Hetilap* 128: 255-257 (1987).
61. Szűcs Gy, Kende M, Új M. Shift in genomic molecular patterns of human rotaviruses over an eighteen-month period in Hungary. *Intervirology* 28: 110-113 (1987).
62. Szűcs G, Matson DO, Új M, Kukán E, Mihály I, Jelenik Z, Estes MK. Group A rotavirus G type prevalence in two regions of Hungary. *Arch Virol* 140: 1693-1703 (1995).
63. Szűcs G, Új M, Mihály I, Deák J. Burden of human rotavirus-associated cases in three geographic regions of Hungary. *Acta Paediatr Suppl* (felkért közleményként benyújtva; 1997)
64. Taniguchi K, Urasawa S, Urasawa T. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J Gen Virol* 66: 1045-1053 (1985).
65. Urasawa T, Urasawa S, Taniguchi K. Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiol Immunol* 25: 1025-1035 (1981).
66. Ushijima H, Xin K-Q, Nishimura S, Morikawa S, Abe T. Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR. *J Clin Microbiol* 32: 2893-2897 (1994).

67. Vesikari T, Joensuu J. Review of rotavirus vaccine trials in Finland. *J Infect Dis* 174: S81-87 (1996).
68. World Health Organization. International classification of diseases: 9th revision. Geneva: WHO (1977).

MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

ELŐADÁSOK ÖSSZEFOGLALÓI

SZUCS GYÖRGY DR.,
KENDE MIKLÓS DR.
ÉS UJ Mária DR.

Rotavírus-fertőzés igazolása a vírus-RNS székletből történő kimutatásával

Baranya megyei Közegészségügyi és Jóraványügyi Állomás, Pécs,
(főigazgató: Kishonti Tibor dr.)
Virologiai Laboratórium

A szerzők székletmintákból közvetlenül izolálták a rotavírus duplafonálú ribonukleinsavát (RNS) elektroforézissel történő analízishez. A 18 vizsgálati minta közül, melyeket 1982—83-ban akut gastroenteritisben megbetegedett csecsemőktől és kisgyermekektől gyűjtöttek, 12 tartalmazott rotavírus-RNS-t. A polyacrylamid gélben végzett elektroforézis lehetővé tette a rotavírus duplafonálú RNS-szegmentjeinek elkülönítését és a törzsek közötti különbségek kimutatását. Az egyszerűsített RNS kivonási technika gyors, egyszerű és reprodukálható módszernek bizonyult a human rotavírus-fertőzés igazolására.

A reovírus családba tartozó human rotavírust elektronmikroszkópos vizsgálatokkal 1973—74-ben fedezték fel (3, 12, 13, 22). Akik a vírust a duodenumbiopsiás anyagaiban látták, „orbivíruszerűnek”, míg, akik a székletből készült kivonatok negatív festésével észlelték, „reovíruszerűnek” írták le. A „duovírus” (5) és az „infantile gastroenteritis vírus” (24) elnevezést is használták, míg végül a „rotavírus” (13) megjelölés lett a hivatalos és általános (10). Számos vizsgálat bizonyította, hogy mind a mérsékelt, mind a trópusi zónában a human rotavírus a csecsemők és kisgyermekek akut gastroenteritisének a fő oka (1, 4, 8, 16, 19, 20).

A rotavírus-fertőzés igazolása elsősorban elektromikroszkópos vizsgálatlalt történik (6, 16, 27), mivel a vírus szövettényésztése ma még körülményes (2, 28, 29). Specifikus antiszérumokat igénylő módszereket („counter-immunoelectroosmophoresis”, komplementkötés, immunfluoreszcenciás vizsgálat, RIA, ELISA stb.) is kidolgoztak a vírus kimutatására, de ezek nem teszik lehetővé a legújabbban felfedezett, az ismert közös antigént nem tartalmazó törzsek felismerését (7). Új lehetőséget biztosított a rotavírus-fertőzés kimutatására az a felismerés, hogy a vírus duplafonálú, szegmentált ribonukleinsavakból áll.

Kulcsszavak: rotavírus, RNS, elektroforézis.

Rövidítések:

RNS = ribonukleinsav

RIA = radioimmunoassay

ELISA = enzime-linkéd immunosorbent assay

Orvosi Hetilap 1984. 125. évfolyam, 36. szám

Diagnosis of rotavirus infection by detecting viral RNA from faeces. Rotaviral double stranded ribonucleic acid (RNA) extracted directly from faecal specimens were used for electrophoretic analysis. Of 18 samples collected from infants and young children with acute gastroenteritis in 1982—83, 12 contained rotaviral RNA. Polyacrylamide gel electrophoresis permitted the separation of rotaviral double stranded RNA segments and made it possible to distinguish different isolates. The simplified technique for RNA extraction provides a rapid, simple and reproducible method for diagnosing of human rotavirus infection.

savát (RNS-ét) közvetlenül a székletből is izolálni lehet. A vírus (és különböző törzsei) kimutathatók, illetve megkülönböztethetők a genom-szegmentek migrációs rátájának különbsége alapján, amikor az extrahált vírus-RNS-t polyacrylamid gélben elektroforézizáljuk (17, 18, 23).

Közleményünkben beszámolunk a rotavírus-RNS kimutatásáról székletmintákból, utalunk a módszer előnyeire a klinikai gyakorlatban, értékeire helyét a többi vizsgálmódszer között.

Anyag és módszer

Vizsgálatunk céljára 1982—83. évben a laboratóriumunkba érkező, rutinvirológiai vizsgálatokkal negatívnak bizonyuló székletmintákból 18-at megőriztünk. Ezek a minták fél—3 éves csecsemőktől, illetve kisgyermekektől származtak, akik akut gastroenteritistünetekkel — hányás, hasmenés, láz (esetleg pharyngitis tünetek is) — kerültek észlelésre. Elektromikroszkópos vizsgálatlalt igazolt, rotavírust tartalmazó székletmintákat is vizsgáltunk. Ezeket az OKI Víruskutató Osztálya és a Szegedi Orvostudományi Egyetem Klinikai Mikrobiológiai Laboratóriuma bocsátotta rendelkezésünkre. A vizsgálati anyagokat feldolgozásig —70 °C-on tároltuk.

A székletből a rotavírus-RNS kivonását Roger és mtsai (26), valamint Nicolas és mtsai (23) módszere alapján, kisebb módosításokkal végeztük: A székletmintából foszfátpufferrel (pH: 7,2) kb. 10%-osra készített szuszpenziót kétszer azonos térfogatú trichlorotrifluorethannal (Geneiron 113, Fluka, Svájc) extraháltak. A vizes fázisban lévő részlegesen tisztított vízből 1% nátriumlaurilszulfát- (SDS) kezeléssel az RNS-t kiszabadítottuk, majd a mintából a fehérjéket fenol-kloroform-izooamillalkohol (25:24:1) keverékkel

extraháltak. Az RNS-t abszolút alkohollal kicsaptuk, és az üleptő centrifugálást követően liofilizással be-száritottuk, végül pedig 50–200 μ l Laemmli-féle min-tapufferben (21) oldottuk fel. Az RNS-minták vizsgá-latát 10%-os polyacrylamid lapékban végeztük a Laemmli-féle Tris-glicin (pH: 8.3) puffer alkalmazá-sával (21), konstans 15 mA áramerősség mellett. Húsz órán át szobahőn futattuk a mintákat, majd ethidium-bromiddal történő festés után a géleket ultraviola-fény (254 nm) adó lámpa alatt értékeltük, illetve fény-zív mintákon felül, belső standardként még simian rotavírusból (SA11) izolált RNS-t is futtattunk a ge-nom-szegmentek migrációjának összehasonlíthatósága érdekében.

Eredmények

A betegek nemét, korát, a mintavétel dátumát és a kapott eredményeket *táblázatban* foglaltuk össze.

A 18 széletmintát 11 fiútól és 7 leánytól származott. Összesen 12 esetben sikerült a rotavírus RNS-szeg-mentjét kimutatnunk: 5 leány és 7 fiú széletében. A pozitív esetekben az átlagéletkor 1,5 év volt 3,5 hónapos és 3 éves szélső értékekkel.

A gélekről készült *ábrán* tüp'ettük fel a Hu/Pécs/592/83 vírus RNS-képét, amelyik tökéletesen elkü-lönítve mutatja a 11 genom-szegmentet. Jól megfi-gyelhető, hogy a szegmentek — amelyeknek elfo-gadott számozását is ábrázoltuk — a rotavírusra jellemző négy csoportban (I–IV.) helyezkednek el.

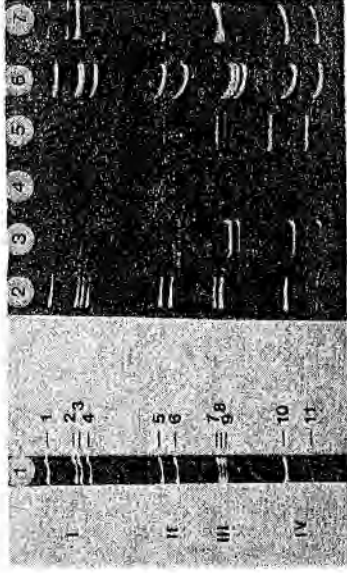
Az *ábra* másik fele négy izolátum, valamint az SA11 pozitív kontrollminta RNS-képén keresztül érzékel-teti a törzsek közötti, genom-szinten jelentkező kü-lönbségeket. — A Hu/Pécs/571/83 human rotavírus-nál a 8–9. szegment nem vált szét, míg a Hu/Pécs/703/83 törzsnél a 7. és 8. szegment vándorolt együtt. A 2. és 3. szegment a human törzsek közül háromnál együtt, illetve nagyon közel futott, szemben az SA11 vírusra jellemzőnek leirt 3–4. szegmentek

A beteganyagban a rotavírus-RNS előfordulása a mintavétel időpontja, az életkor és a nem szerint

Mintavétel időpontja	Életkor (hónap)	É	Rotaví-rus-RNS	Vírusjelzése
82. 03. 10.	12	nő	—	Hu/Pécs/163/82
82. 03. 10.	18	nő	+	
82. 03. 15.	5	ffi	+	
82. 03. 22.	(7)	ffi	+	Hu/Pécs/184/82
83. 10. 21.	16	ffi	+	Hu/Pécs/557/83
83. 10. 24.	5	ffi	+	
83. 10. 27.	24	ffi	+	
83. 11. 01.	36	nő	—	Hu/Pécs/571/83
83. 11. 09.	3,5	nő	+	Hu/Pécs/592/83
83. 11. 23.	4	ffi	—	
83. 11. 23.	7	ffi	+	Hu/Pécs/640/83
83. 11. 23.	18	nő	+	Hu/Pécs/645/83
83. 11. 28.	9	nő	+	Hu/Pécs/659/83
83. 12. 08.	24	nő	+	Hu/Pécs/703/83
83. 12. 12.	5	ffi	—	
83. 12. 12.	36	ffi	+	Hu/Pécs/708/83
83. 12. 12.	15	ffi	+	Hu/Pécs/709/83
83. 12. 13.	28	ffi	+	Hu/Pécs/711/83

■ A mintában, a polyacrylamid gélben végzett elektroforézist követően, a rotavírusra jellemző RNS-szegmentek jelen van-nak (+) vagy hiányoznak (—).

□ *Rodger és Holmes* (25) után



Rotavírusok RNS-szegmentjeinek képei a vizsgálati anyagok polyacrylamid gélben végzett elektroforézise után, ethidium bromid festést követően.

1. Hu/Pécs/592/83 törzs, jelölve a négy csoportban elhe-lyezkedő 11 szegment, 2. Hu/Pécs/571/83 törzs, 3. Hu/Pécs/703/83 törzs, 4. negatív (83. 12. 12., 5. hónapos), 5. Hu/Pécs/708/83 törzs, 6. Hu/Pécs/709/83 törzs, 7. SA11 kontrollminta

közeli vagy együttvándorlásával. Az azonos kísé-leti körülmények ellenére észrevehető, hogy a 10–11. szegmentek vándorlási sebességében is különbö-zés van; elsősorban a Hu/Pécs/708/83 törzs 10–11. szegmentje futott lassabban a gélben. A beteg-anyagokból izolált preparátumok képe, az ismert különbségeket figyelembe véve, megegyezik a si-mian rotavírusból kivont RNS-minta szegmentké-pével. Azonos szegmenteloszlást észleltünk az elekt-ronmikroszkóppal rotavírust tartalmazó minták futtatásakor is (nem mutatott adat).

Megbeszélés

A rotavírus okozta gastroenteritis az egész vilá-got érintő probléma. A betegség elsősorban a cse-csemőket, fiatal gyermekeket érinti, de rotavírusok fertőzhetik az emlősök és madarak fiatal példá-ryainak jelentős részét is (10). A fertőzéssel járó magas morbiditás és mortalitás csak fokozza azt a törekvést, hogy olyan módszerek álljanak rendelkezésünkre, melyekkel ez a vírusfertőzés hamar ki-mutatható.

A molekuláris módszerek előretörésével a rota-vírus-fertőzés diagnosztizálása a virális RNS szék-letből történő kimutatásával az elmúlt 3–4 eszten-dőben fokozottan előtérbe került (1, 9, 17, 18, 27). Különösen hasznosnak bizonyult ez a módszer a ví-rus gyermekközösségekben, kórházi egységekben való szóródásának követésére (14, 27). Mivel az el-járás már a nukleinsav-szinten jelentkező külön-b-ségeket jelzi, finomabb differenciálási lehetőséget biztosít az egyes törzsek között, mint a szerológiai módszerek, ahol csak fehérje szinten jelentkező bi-zonyos módosulások felismerése válik lehetővé. Ez pedig nem mindig követi a genomban már bekö-vetkezett változásokat.

Napjainkban négy szerológiai csoport létezik a human rotavírusokon belül (29), de az intenzív vizs-gálatok biztosan újabb csoportokat fognak feltárni. Erre utal, hogy újabban, éppen az elektronmikrosz-kópos és az RNS-kimutatás segítségével, olyan hu-man rotavírusokat találtak a kutatók, melyek az is-mert szerológiai csoportokba nem tartoznak, hiány-

zik a már ismert típusokban megtalálható — emberi vagy állati eredetűktől függetlenül meglevő — közös antigénjük, és így a szerológiai eljárásokban reakciót nem adnak (7). Noha a reovírus családba tartozó vírusok mind duplafonálú RNS-t tartalmaznak, és nukleinsavuk szegmentáltak, a gyakorlatban problémát nem jelentenek a rotavírus-RNS kimutatásban. A rotavírus 11 szegmentje, és főleg, hogy ezek elektroforézist követően jellegzetes elhelyezkedéssel négy csoportban láthatók a gélben, szinte probléma nélküli vírus-azonosítást biztosít. A szegmensek egymáshoz való viszonya — egybeesések, relatív vándorlási sebességük stb. —, a vírus-törzsek közötti finom különbségekre utal (elektroforétikusok) (25). Ez teszi lehetővé, hogy a törzsek szóródását, új vírusörzs megjelenését stb. követhessük, vagyis molekuláris szinten végezhesünk epidemiológiai vizsgálatokat (11, 15).

Beteganyagunkban a 12 vírusörzs kimutatása igazolta a módszer alkalmazhatóságát. Az RNS-szegmensek jól felismerhetők voltak, elhelyezkedésük pedig jellegzetesnek bizonyult. A vizsgálatokba bevont rotavírusok tartalmazó mintákból készült RNS-preparátumok képei megerősítették, hogy rotavírusokat izoláltunk. A 12 vírusörzs közelebb, néha csak a minták együttfuttatása esetén felismerhető különbségeket mutatott. Ez nem is meglepő, hiszen esetünk térben és időben izoláltak voltak. Az észlelt különbségek valódiaknak mondhatók, hiszen azok a minták azonos gélben történt futtatásánál is fennálltak. Mivel szerológiai vizsgálatokat nem végeztünk, nem tudjuk, hogy törzseink közös vagy különböző szerocsoportba tartoztak-e eltérő elektroforétikus ellenére.

A vizsgálatok legolcsóbb — általunk is használt — egyszerű formájában kb. 1 g székletmennyiség az optimális kiindulási anyag. Ilyen esetben a módszer érzékenysége, főleg ha az etidium bromid festés helyett az egyre jobban terjedő ezüstfestési eljárást alkalmazzuk, megközelíti az elektronmikroszkópos vizsgálat (14). Az ismertített módszer mégsem a klinikai diagnosztika terén nyújt újat, hiszen itt az elektronmikroszkópos vizsgálatok vagy az ELISA-eljárás (különösen monoklonális ellenanyagok használatával) egyszerűbben kielégítheti az igényeket, hanem járványügyi szempontból biztosít új lehetőséget. Alkalmazása lehetővé teszi, hogy egy adott járványban, egy adott közösségben a vírusörzsek szóródását, az új törzsek megjelenését nyomon követhessük, és ezzel elősegítsük az epidemiológiai preventív intézkedéseket.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Deák Judit dr.-nak (Szegedi OTE, Klinikai Mikrobiológiai Laboratórium) és Kollár Miklós dr.-nak (OKI, Víruskutató Osztály) a rotavírus tartalmazó székletmintáikért.

IRODALOM: I. Arista, S. és mtsai: Electrophoretotypes of human rotaviruses isolated in Palermo, Italy. Ann. Virol. (Inst. Pasteur), 1983, 134E, 549. — 2. Birch, C. J. és mtsai: Replication of human rotavirus in cell culture. J. Med. Virol. 1983, 11, 241. — 3. Bishop, R. F.

és mtsai: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet, 1973, II, 1281. — 4. Bryden, A. S. és mtsai: Rotavirus enteritis in the West Midlands during 1974. Lancet, 1975, II, 241. — 5. Davidson, G. P. és mtsai: Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. Lancet, 1975, I, 242. — 6. Deák J., Nagy E. és Nagy A.: Koraszülöttek rotavírus okozta gastroenteritise. Magyar Pediatr (közlés alatt). — 7. Dimitrov, D. H. és mtsai: Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants. Infect. Immun. 1983, 41, 523. — 8. Espejo, R. T., Calderon, E., Gonzalez, N.: Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. J. clin. Microbiol. 1977, 6, 502. — 9. Espejo, R. T. és mtsai: Comparison of human rotaviruses isolated in Mexico City and in Santiago, Chile, by electrophoretic migration of their double-stranded ribonucleic acid genome segments. Infect. Immun. 1980, 30, 342. — 10. Estes, M. K., Palmer, E. L., Obijeski, J. F.: Rotaviruses: A review. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1983, 105, 123. — 11. Estes, M. K., Graham, D. Y., Dimitrov, D. H.: The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. Prog. med. Virol. 1984, 29, 1. — 12. Flewett, T. H. és mtsai: Virus particles in gastroenteritis. Lancet, 1973, II, 1497. — 13. Flewett, T. H. és mtsai: Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet, 1974, II, 61. — 14. Follett, E. A. C., Desselberger, U.: Cocirculation of different rotavirus strains in a local outbreak of infantile gastroenteritis: monitoring by rapid and sensitive nucleic acid analysis. J. Med. Virol. 1983, 11, 39. — 15. Forster, J., Pastor, S.: Epidemiology of human rotaviruses as determined by electrophoresis of genome RNA. Eur. J. Clin. Microbiol. 1983, 2, 141. — 16. Földes J., Nagy E. és Menyhárt E.: A bakteriális csecsemőkori akut gastroenteritisek etiológiai vizsgálata. Gyermekgyógyászat, 1982, 33, 220. — 17. Kalica, A. R. és mtsai: Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. Virology, 1976, 74, 86. — 18. Kalica, A. R. és mtsai: Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. Virology, 1978, 87, 247. — 19. Kapikian, A. Z. és mtsai: Human reovirus-like agent associated with 'winter' gastroenteritis. New Engl. J. Med. 1976, 294, 965. — 20. Komno, T. és mtsai: Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in Japanese infants: fecal shedding and serologic response. J. Infect. Dis. 1977, 135, 259. — 21. Laermli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Lond.) 1970, 227, 680. — 22. Middleton, P. J. és mtsai: Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. Lancet, 1974, I, 1241. — 23. Nicolas, J. C. és mtsai: Comparison of 4 different rapid techniques of rotavirus dsRNA extraction. Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 1983, 134E, 135. — 24. Petric, M., Szymanski, M. T. és Middleton, P. J.: Purification and preliminary characterization of infantile gastroenteritis virus (orbivirus group). Intervirology, 1975, 5, 233. — 25. Rodger, S. M., Holmes, I. H.: Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. J. Virol. 1979, 30, 839. — 26. Rodger, S. M. és mtsai: Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. J. clin. Microbiol. 1981, 13, 272. — 27. Rodriguez, W. J. és mtsai: Use of electrophoresis of RNA from human rotavirus to establish the identity of strains involved in outbreaks in a tertiary care nursery. J. Infect. Dis. 1983, 149, 34. — 28. Sato, K. és mtsai: Isolation of human rotavirus in cell culture. Arch. Virol. 1981, 69, 155. — 29. Wyatt, R. G. és mtsai: Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. J. clin. Microbiol. 1983, 18, 310.

(Szűcs György dr., Pécs, Pf. 47., 7601.)

DIFFERENT ELECTROPHORETYPES OF HUMAN ROTAVIRUSES IN HUNGARY

*G. SZÜCS, M. KENDE, M. UJ, J. DEÁK, M. KOLLER, E. SZARKA, M. CSIK

Laboratory of Virology, Public Health Station, Kőjál, H-7623 Pécs, ¹Central Laboratory of Clinical Microbiology, University Medical School, Szeged, ²Department of Virology, National Institute of Hygiene, Budapest, Hungary

Received November 25, 1986

Summary. — Polyacrylamide gel electrophoresis of rotaviral double-stranded ribonucleic acid (RNA) extracted directly from faecal specimens collected in three different parts of Hungary was applied to characterize and distinguish 21 randomly selected viral isolates. This technique made it possible to define 7 different electrophoretotypes. Of the isolates 11 exhibited an identical 'long' electrophoretic migration pattern. "Short" RNA pattern was found in two cases, and one atypical rotavirus was also revealed. This is the first description of rotavirus RNA electrophoretotypes in Hungary.

Key words: human rotavirus; electrophoretotype; RNA; electrophoresis; Hungary

Introduction

Rotaviruses are known as a major cause of acute gastroenteritis in infants and young children. Since the rotaviral infections have been recognized all over the world, several diagnostic methods for detection of rotavirus infection have been developed. Recently, polyacrylamide gel electrophoresis provides a simple, suitable method of separating and distinguishing rotaviral isolates on the basis of 11 segments of their double-stranded ribonucleic acid (RNA) extracted directly from faecal specimens. In addition, the analysis of the migration pattern of genomic RNA segments seems to be one of the best procedures for molecular characterization of this important virus group (Estes *et al.*, 1984).

In the present paper, we report the use of RNA gel electrophoresis to identify human rotaviruses and describe their electrophoretotypes from infants and young children admitted to hospitals located three different parts of Hungary during 1982—1983.

* Whom the requests for reprints should be addressed to.

Materials and Methods

Faecal samples. During 1982 and 1983 faecal samples taken from children (all aged 4 years or younger) with symptoms of acute gastro enteritis in three different provinces of Hungary were collected and routinely analysed with EM and/or ELISA. Approximately 10% rotavirus-positive stool suspensions prepared in PBS (pH 7.3) were received from virus laboratories in Budapest (9 samples) and Pécs (10 samples), respectively, and 750 μ l of trichlorotrifluoroethane (Genetron 113, Fluka, Switzerland) extracted positive materials were sent from the laboratory in Szeged (7 samples). Supernatants of each suspension after centrifugation at $5000 \times g$ for 15 min and extracted samples were stored for 6–12 months at -20°C . Of the 26 rotavirus-positive specimens, 21 yielded sufficient viral RNA for visualization on polyacrylamide gels.

Extraction of viral nucleic acid. The extraction of viral RNA directly from faecal specimens was performed according to techniques described by Rodger *et al.* (1981) and Nicolas *et al.* (1983) with minor modifications. Briefly, 1.5–2.0 ml of supernatants were extracted twice with Genetron 113. After centrifugation at $2000 \times g$ for 20 min the liquid phases were saved. All extracted samples were mixed with an equal volume of extraction medium (0.02 mol/l EDTA and 2% SDS in 0.01 mol/l Tris-HCl buffer, pH 7.5), incubated 15 min at 50°C and then extracted twice with water-saturated phenol-chloroform isomyl-alcohol (25 : 24 : 1). The aqueous phases were precipitated with 2 volumes of absolute ethanol at -70°C for 2 hr. The RNA was then pelleted, dried, resuspended in 20–100 μ l of Laemmli's sample buffer (Laemmli, 1970). Simian rotavirus SA11 viral RNA was purified from viruses cultured in MA-104 cells.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Samples after boiled for 2 min were loaded on to 10% polyacrylamide slab gels (with 4% stacking gels) using the Laemmli discontinuous buffer system. Electrophoresis was performed at room temperature for 18 hr at constant 20 mA. RNA visualization in gels was obtained by staining with ethidium bromide at a concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and photographed under UV light of 254 nm wavelength. For comparison, samples were coelectrophoresed in the same lane. SA11 viral RNA was included in all gels as an internal reference.

Results

In 26 samples received from three distinct parts of the country (about 200 km from each other), rotaviruses were detected by electron microscopy and/or ELISA prior to the determination of electrophoretotypes. Of the Genetron extracted samples from laboratory in Szeged and of faecal suspensions from laboratory Budapest 3 and 2, respectively, did not yield sufficient viral RNA for visualization in polyacrylamide gels. Seven different electrophoretotypes were observed and designated as A, B, C etc. according to the resolution of the RNA segments (Fig. 1). Three readily identifiable features of RNA patterns based on the relative migration of segments 10 and 11 were resolved and referred to as 'long' (from A to E), 'short' (F) and 'atypical' (G) comparing to the migrations of corresponding segments of SA11 (Espejo *et al.*, 1979 and Kalica *et al.*, 1981).

Of 'long' patterns, 5 distinct electrophoretotypes were identified. Comigration of segments 2 and 3 and of 7 and 8 was designated as A. With the patterns A 11 rotaviruses were found, 4 and 7 of samples from Budapest and Pécs, respectively. All specimens collected in Szeged contained a single electropherototype referred to as B. Segments 2 and 3 moved very close to each other but 7, 8 and 9 were clearly separated. Very similar pattern was observed in one sample from Pécs where the migration of segments 7, 8 and 9 was identical, but segments 2 and 3 did not comigrate (pattern C). The pattern designated D showed comigration of segments 2 and 3 and separatedly

migrating segments 7, 8 and 9. A faster migration of segment 9 was observed in this single case. There was one rotaviral RNA with comigration of segments 8 and 9 and with segments 2, 3 and 4 which were well resolved and were approximately in equal distance from each other (pattern E).

Using of the RNA-pattern of simian rotavirus SA11 as an internal reference, two "short" electrophoretotypes (pattern F) were observed in samples received from Budapest. Differences between the RNA migration patterns designated "short" and that of isolates with the "long" pattern A were confirmed by coelectrophoresis. There was one sample of pattern G with atypical rotavirus profile. Migration of the segments was characteristic, namely, one of the segments 7, 8, 9 was heavier and migrated close to segment 6 showing an atypical 4 : 3 : 2 : 2 segment distribution as compared to the pattern 4 : 2 : 3 : 2 of conventional rotaviruses (e.g. group A rotaviruses with patterns A-E, F and SA11). Furthermore, segments 10 and 11 migrated faster than the corresponding segments of SA11. This virus showed rotavirus morphology by direct electron microscopy but its antigen(s) did not react in ELISA.

Discussion

Many different human rotavirus RNA electrophoretotypes have been described all over the world (Arista *et al.*, 1983; Buitenwerf *et al.*, 1983; Dimitrov *et al.*, 1984; Forster *et al.*, 1983; Ushijima *et al.*, 1984). Various investigators have attempted to make arbitrary classification systems based on the major variations within RNA gene classes (Espejo *et al.*, 1980; Kalica *et al.*, 1981; Lourenco *et al.*, 1981), however, Espejo drew attention of shifts in the electrophoretic pattern under different performance conditions (Espejo and Puerto, 1984). For convenience, we designated our electrophoretotypes according to Espejo (1979) and Kalica *et al.* (1981), who divided human rotaviruses due to the mobility of their segment 10 as related to segment 11 into "long" and "short" types. With respect to the strict electrophoretic identity, coelectrophoresis was done in viral RNA preparations with patterns observed as different in the first separation in gel.

In our cases there were no relationships between patients and hospitals. Samples were collected from different individuals and from different places. Only faecal samples from Szeged were taken from children with association of an outbreak of rotavirus diarrhoea in a nursery room. We succeeded to identify seven different electrophoretotypes among the 21 samples. Patterns A were found in 11 faecal specimens from Budapest and Pécs. The 4 rotaviral RNA with the pattern B originated from Szeged, all other patterns were observed in single cases. The two "short" patterns, which were found less frequently all over the world and considered typical of serological subgroup 1 of human rotaviruses, were detected in samples from two distinct cases in Budapest. Finally, a human rotavirus was isolated with viral RNA segments of different size classes. It was undetectable by ELISA but was morphologically identical to other rotaviruses. Similar isolates were reported from different countries and different designations (e.g. pararotavirus, group B

rotavirus, atypical rotavirus) were proposed to distinguish them (Dimitrov *et al.*, 1983; Espejo *et al.*, 1983; Hung *et al.*, 1984). According to Flewett, this type of atypical rotaviruses belongs to a distinct group recently classified as group C (Flewett *et al.*, 1984).

To our knowledge this study has been the first attempt to reveal different electrophoretotypes of human rotaviruses in Hungary. Although randomly selected and limited to a few rotavirus-positive faecal specimens, our results are in good accordance with data in the literature about the considerable heterogeneity of human rotaviruses. Nevertheless, it is necessary to analyse a larger number of viral strains in Hungary to receive a more complete information on the circulation and epidemiology of these different rotaviruses.

Acknowledgment. The authors are grateful to Mrs. M. Németh for the skilful technical assistance.

References

- Arista, S., Nicolas, J. C., Giovannelli, L., and Chiarini, A. (1983): Electrophoretotypes of human rotaviruses isolated in Palermo, Italy. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 134 E, 549-556.
- Buitenwerf, J., Mulwijk-van Alphan, M., and Schaap, G. J. P. (1983): Characterization of rotaviral RNA isolated from children with gastroenteritis in two hospitals in Rotterdam. *J. med. Virol.* 12, 71-78.
- Dimitrov, D. H., Estes, M. K., Rangelova, S. M., Shindarov, L. M., Melnick, J. L., and Graham, D. Y. (1983): Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants. *Infect. Immun.* 41, 523-526.
- Dimitrov, D. H., Graham, D. Y., Lopez, J., Muchnik, G., Velasco, G., Stenback, W. A., and Estes, M. K. (1984): RNA electrophoretotypes of human rotaviruses from North and South America. *Bull. World. Hlth. Org.* 62, 321-329.
- Espejo, R. T., Calderon, E., Gonzalez, N., Salomon, A., Martuscelli, M., and Romero, P. (1979): Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City 1977. *J. infect. Dis.* 139, 474-477.
- Espejo, R. T., Muñoz, O., Serafin, F., and Romero, P. (1980): Shift in the prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences. *Infect. Immun.* 27, 351-354.
- Espejo, R. T., Puerto, F., Soler, C., and Gonzales, N. (1983): Characterization of human parrotavirus. *Infect. Immun.* 44, 112-116.
- Espejo, R. T., and Puerto, F. (1984): Shifts in the electrophoretic pattern on the RNA genome of rotaviruses under different electrophoretic conditions. *J. virol. Meth.* 8, 293-299.
- Estes, M. K., Graham, D. Y., Dimitrov, D. H. (1984): The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Progr. med. Virol.* 29, 1-22.
- Flewett, T. H., Beards, G. M., Sanders, R. C., and Hall, C. J. (1984): New diarrhoea viruses of man, in 'Abstracts Sixth Intern. Congr. Virology', Sendai, Japan, Sept. 1-7, p. 212.
- Hung, T., Chen, G., Wang, C., Yao, H., Fang, Z., Chao, T., Chou, Z., Ye, W., Chang, X., Den, S., Liang, X., and Chang, W. (1984): Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet* 1, 1139-1142.
- Kalica, A. R., Greenberg, H. B., Espejo, R. T., Flores, J., Wyatt, R. G., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1981): Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroup 1 and 2. *Infect. Immun.* 33, 958-961.
- Læmmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227, 680-685.
- Lourenco, M. H., Nicolas, J. C., Cohen, J., Scherrer, R., and Bricout, F. (1981): Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 132 E, 161-173.
- Nicolas, J. C., Lourenco, M. H., Marchal, S., Cohen, J., Scherrer, R., and Bricout, F. (1983): Description of a very simplified method for rotavirus dsRNA extraction. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 134 E, 135-139.

Rodger, S. M., Bishop, R. F., Birch, C., McLean, B., and Holmes, I. H. (1981): Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. clin. Microbiol.* 13, 272-278.

Ushijima, H., Kim, B., Tajima, T., Araki, K., Yoshino, K., Shinozaki, T., and Fujii, R. (1984): Epidemiology of rotavirus infection in Tokyo during two winter seasons, as revealed by analysis of recovered viral RNA. *Eur. J. Pediatr.* 142, 71-72.

Explanation to Figure (Plate LIV):

Fig. 1. Representative electrophoretotypes of 21 human rotaviruses isolated in three different parts of Hungary. Direction of the run and numbering of the segments is from the top to the bottom. Seven different patterns can be distinguished by RNA electrophoresis (slots A, B, through G). Rotaviruses with "short" pattern and with an "atypical" migration pattern can be seen in slots F and G, respectively.

Szűcs, G. *et al.* (pp. 369-373)

PLATE LIV

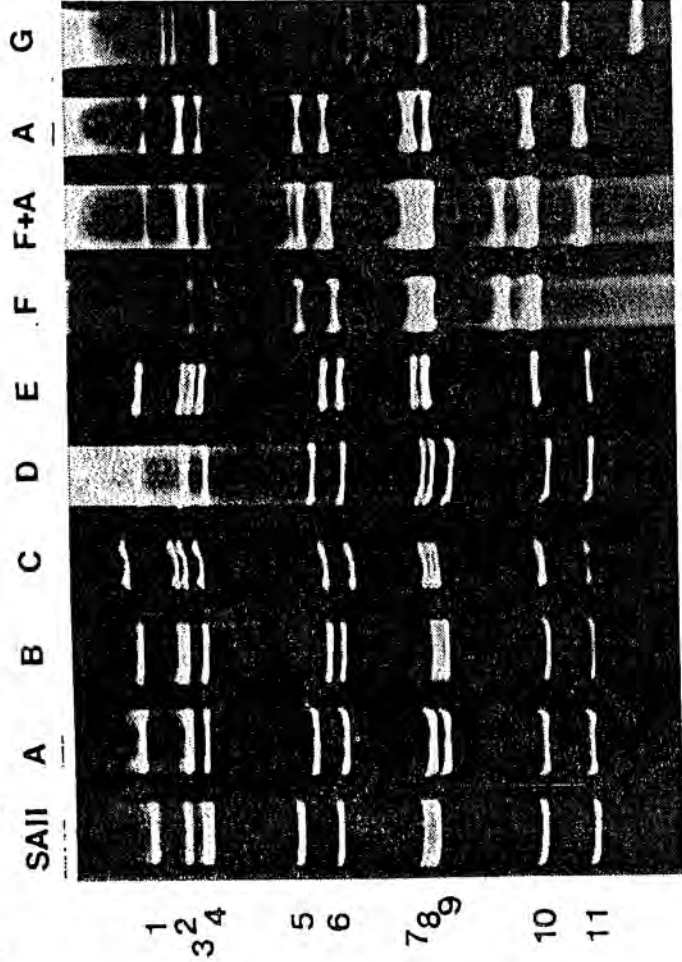


Fig. 1

ATYPICAL HUMAN ROTAVIRUSES IN HUNGARY

by G. Szüics, M. Kende and M. Uj

*Laboratory of Virology, Public Health Station,
Szabadság u. 7., H-7623 Pécs (Hungary)*

SUMMARY

Of 105 human rotaviruses, two atypical, antigenically distinct rotaviruses (pararotaviruses) were isolated in Hungary. A 4-year old boy and a 3½-year old girl, both with gastroenteritis, vomiting and moderate fever, shed these viruses. Electrophoretic patterns of viral RNA extracted from the two faecal specimens appeared to be related to patterns of group C rotaviruses.

KEY-WORDS: Rotavirus, Pararotavirus, Infantile gastroenteritis; RNA, Electrophoretotypes, Hungary.

INTRODUCTION

Human rotaviruses with unusual RNA electrophoretic patterns have been reported in Australia [13], France [10], Bulgaria [5], Mexico [6], Netherlands [4], China [8], England [7], Italy [1], Argentina [14] and recently in South Africa [2]. Different terms have been suggested, such as pararotavirus [3], group B rotavirus [5] and atypical rotavirus [8]. All these rotavirus isolates were morphologically identical to the prototype virus, and only 6 strains from Johannesburg, South Africa contained the common group A antigen and were detectable by the current ELISA test. When viral RNA was analysed by PAGE and electrophoretotypes were characterized, three different patterns could be observed. Isolates reported in China and in South Africa shared apparently different electrophoretotypes which were easily distinguishable from all others. Electrophoretotyping is currently a useful tool for revealing these viruses.

Here we report the first two atypical, antigenically distinct rotaviruses detected by RNA gel electrophoresis in Hungary.

MATERIALS AND METHODS

Patients.

One of the samples containing rotaviruses with an unusual pattern was obtained from a male child, aged 4, admitted on March 11, 1982 to the «László» Hospital for Infectious Disease in Budapest, Hungary. The child had diarrhoea with moderate fever and vomiting. A faecal sample was taken on the first day of admission. Rotavirus was detected by EM, but rotavirus antigens were undetectable by the ELISA test using the double sandwich technique in the Department of Virology, National Institute of Public Health, Budapest. Approximately 20 % of the stool suspension was stored at -70°C and received for electrophoretotyping in October, 1983.

The second child, a $3\frac{1}{2}$ -year old girl, was admitted on May 25, 1984 with a diagnosis of gastroenteritis, vomiting and bronchitis to the Department of Pediatrics, University Medical School, Pécs. A stool sample was taken on the second day. The ELISA test for rotaviruses («Rotavirus ELISA Kit», Dakopatts) was negative, but the presence of this virus was proven by EM. The faecal sample was stored at -20°C for 10 days before testing for the electrophoretotype.

Analysis of viral RNA.

A technique previously described by Rodger *et al.* [12] and Nicolas *et al.* [11] was used to extract viral RNA from the 10-20 % faecal suspensions. Electrophoresis in polyacrylamide gels (10 % with 4 % stacking gel) was performed at 20 mA for 18 h with the Laemmli discontinuous buffer system [9]. The gels were stained for 1 h with ethidium bromide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and were photographed. Simian rotavirus SA11 RNA was included as a standard in gels.

RESULTS

The two virus strains recovered from children in 1982 and 1984, when analysed by polyacrylamide gel electrophoresis, exhibited completely different migration patterns from those of human rotavirus strains which had been isolated up to then in Hungary (fig. 1); 9 and 10 bands of RNA were identified clearly for the two samples, respectively, but from the intensity of the bands after staining, it was suggested that 3-4 segments and 8-9 segments were co-migrating in the first case and 8-9 segments were also not resolved in the sample taken from the girl. In a comparison of distribution of segments in four size groups of «typical» rotaviruses, these two patterns exhibited different positions of the segments. Migration of all segments except for segments 2, 7, 8 and 9 were faster, showing an «extra-long» profile. Nevertheless, segment 2 and segment 7 ran very close to segments 1 and 6, respectively, under our electrophoretic conditions.

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay.
EM = electron microscopy.

PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis.

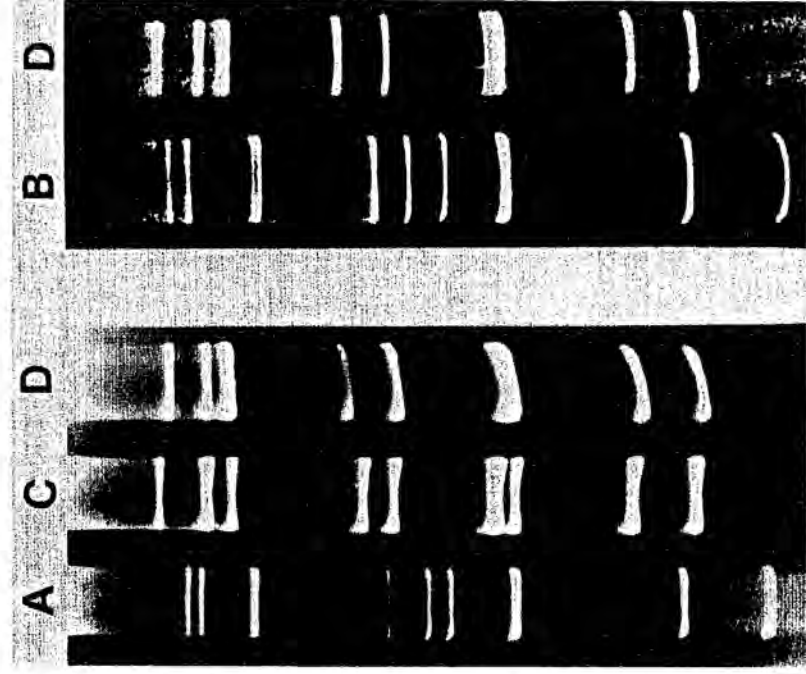


FIG. 1. — RNA electrophoretic migration patterns of two Hungarian atypical human rotaviruses (A and B) and of «typical» human rotavirus (C).

Simian rotavirus SA11 genomic RNA were included as controls (D).

In both cases, rotavirus particles were observed by EM in stool samples, and results of ELISA tests («Rotazyme kit», Abbott and «Rotavirus ELISA kit», Dakopatts) applying guinea-pig and rabbit anti-rotavirus sera, respectively, against conventional rotavirus group-specific antigen(s), were negative.

DISCUSSION

To date, three types of unconventional rotaviruses based on their electrophoretic pattern have been reported in different geographic area of the world [2, 5, 10, 13]. Isolates from neonates in South Africa share the common group A antigen [2], unlike the other atypical, antigenically distinct human rotaviruses. Of them, strains described in adults in China [8] also differ from

all others in migration of their segments. According to Flewett, the majority of atypical rotaviruses represent a distinct group classified as group C [7], in which one of segments 7, 8 and 9 is heavier and migrates close to segment 6. Recently described atypical human rotaviral strains in China and South Africa are not included in this group.

These two independent isolates of human rotaviruses are the first demonstration of the presence of antigenically distinct atypical rotaviruses (pararotaviruses) in Hungary. A prevalence of this electrophoretype appears to be rare. From October, 1983 to December, 1984, 105 rotaviruses with many distinct electrophoretic patterns were isolated, but only these two viruses shared a characteristic atypical electrophoretype. RNA profiles of our two viruses are very similar to the others reported thus far; however, some minor differences can be observed in migration of segments 3 and 4, and 8 and 9. Unfortunately, no additional samples were available for further analysis. Applying less samples and using silver staining, we assume that all 11 RNA segments would be resolved. It must also be noted that clinical symptoms and duration of disease were no different from those of cases caused by «typical» rotaviruses.

Nevertheless, the real prevalence and medical significance of these agents cannot be assessed at this time. The low frequency of detection may be due partly to the fact that many laboratories routinely use only the ELISA test for screening rotaviruses. Without electrophoretotyping, the prevalence and real role of these viruses in the aetiology of gastroenteritis remain unknown. Therefore, further investigations are important to evaluate the clinical, serological and epidemiological significance of these distinct human rotaviruses.

RÉSUMÉ

MISE EN ÉVIDENCE DE ROTAVIRUS ATYPIQUES EN HONGRIE

Lors d'une enquête qui a permis d'isoler en Hongrie 105 rotavirus humains nous avons mis en évidence deux rotavirus atypiques, ne possédant pas l'antigène du groupe A (pararotavirus). Ce virus a été excrété par un garçon de quatre ans et par une fille de trois ans et demi, tous les deux étant atteints de gastroentérite avec fièvre et vomissements. Le profil électrophorétique de l'ARN viral extrait de ces deux échantillons de selles semble indiquer que ces «isolats» peuvent être rattachés au rotavirus du groupe C.

MOTS-CLÉS: Rotavirus, Pararotavirus, Gastroentérite infantile; ARN, Electrophoretotypes, Hongrie.

ACKNOWLEDGEMENT

We wish to express our thanks to Drs M. Koller, E. Szarka and M. Csik, Department of Virology, National Institute of Public Health, Budapest for supplying us with faecal samples, and Mrs M. Németh for excellent technical assistance.

REFERENCES

- [1] ARISTA, S., GIOVANNELLI, L. & TITONE, L., Detection of an antigenically distinct human rotavirus in Palermo, Italy. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, 1985, **136 E**, 229-235.
- [2] BESSELAAR, T.G., ROSENBLATT, A. & KIDD, A.H., Atypical rotavirus from South African neonates. *Arch. Virol.*, 1986, **87**, 327-330.
- [3] BOHL, E.H., SAIF, L.J., THEIL, K.W., AGNES, A.G. & CROSS, R.F., Porcine parrotavirus: detection, differentiation from rotavirus and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J. clin. Microbiol.*, 1982, **15**, 312-319.
- [4] BUITENWERF, J., MUIJLWIJK-VAN ALPHEN, M. & SCHAAP, G.J.P., Characterization of rotaviral RNA isolated from children with gastroenteritis in two hospitals in Rotterdam. *J. med. Virol.*, 1983, **12**, 71-78.
- [5] DIMITROV, D.H., ESTES, M.K., RANGELOVA, S.M., SHINDAROV, L.M., MELNICK, J.L. & GRAHAM, D.Y., Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants. *Infect. Immun.*, 1983, **41**, 523-526.
- [6] ESPEJO, R.T., PUERTO, F., SOLER, C. & GONZALEZ, N., Characterization of a human parrotavirus. *Infect. Immun.*, 1984, **44**, 112-116.
- [7] FLEWETT, T.H., BEARDS, G.M., SANDERS, R.C. & HALL, C.J., New diarrhoea viruses of man, in «Abstracts Sixth Intern. Congr. Virology», Sendai, Japan, Sept. 1-7, 1984, p. 212.
- [8] HUNG, T., CHEN, G., WANG, C., YAO, H., FANG, Z., CHAO, T., CHOU, Z., YE, W., CHANG, X., DEN, S., LIONG, X. & CHANG, W., Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*, 1984, **I**, 1139-1142.
- [9] LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, 1970, **227**, 680-685.
- [10] NICOLAS, J.C., COHEN, J., FORTIER, B., LOURENCO, M.H. & BRICOUT, F., Isolation of a human parrotavirus. *Virology*, 1983, **124**, 181-184.
- [11] NICOLAS, J.C., LOURENCO, M.H., MARCHAL, S., COHEN, J., SCHERRER, R. & BRICOUT, F., Description of a very simplified method for rotavirus dsRNA extraction. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 1983, **134 E**, 135-139.
- [12] RODGER, S.M., BISHOP, R.F., BIRCH, C., McLEAN, B. & HOLMES, I.H., Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. clin. Microbiol.*, 1981, **13**, 272-278.
- [13] RODGER, S.M., BISHOP, R.F. & HOLMES, I.H., Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhoea in an infant. *J. clin. Microbiol.*, 1982, **16**, 724-726.
- [14] SORRENTINO, A., SCODELLER, E.A., BELLINZONI, R., MUCHNIK, G.R. & LA TORRE, J.L., Detection of an atypical rotavirus associated with diarrhoea in Chaco, Argentina. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1986, **80**, 120-122.

SZÜCS GYÖRGY DR.,
KENDE MIKLÓS DR.,
UJ MÁRIA DR.,
VARGA LEVENTE DR.
és RAJKAI IRÉN DR.

„Kevert” rotavírus-fertőzések kimutatása vírus-RNS vizsgálattal

Baranya megyei Közegészségügyi és Járványügyi Állomás, Pécs
Virologiai Laboratórium
Baranya megyei Gyermekkorház Pécs Fertőző Osztály

A szerzők egy 2 (G. H.) és egy 15 (S. M.) hónapos gyermek székletmintájából közvetlenül izolálták a rotavírus duplafonali ribonukleinsavát elektroforézissel történő analízishez. Mindkét vizsgálati mintában az elektroforétípusok elemzése „kevert” vagy „kettős” rotavírus-fertőzést valósítottak. A vizsgálati időszakban cirkuláló rotavírus-törzsek elektroforétípusainak és a kevert szegmenseknek az összehasonlítása alapján felmerült a nosokomális-infekció lehetősége is. A szerzők kiemelik, hogy jelenleg csak a virális RNS vizsgálata biztosítja a kevert rotavírusfertőzések felismerését.

Reveal of mixed rotavirus infection by analysing viral RNA. Rotaviral double stranded ribonucleic acid (RNA) extracted directly from faecal specimens of a two month-old (G. H.) and a 15-month-old (S. M.) infants were used for electrophoretic analysis. Of both samples, „mixed” or „dual” infections were supported by electrophoretic pattern analysis. Comparing electrophoretotypes of actually cocirculating rotaviruses to the mixed electrophoretic patterns, the possibility of a sequential nosocomial infection could not be excluded. Recently viral RNA electrophoretotyping may provide the single approach by which mixed rotaviral infections can be revealed.

Napjainkban a csecsemő és gyermekkori gastroenteritisek hátterében igen gyakran rotavírus-fertőzések állnak (1, 3, 10). A fertőzések pontos járványügyi követését nehezíti, hogy a körülményes tenyésztéshetőségen felül a leggyakrabban izolált rotavírusok morfológiai és biokémiai tulajdonságaikat tekintve hasonlítanak egymásnak, a rotavírus-fertőzések molekuláris epideemiológiai tanulmányozását (5). A módszer azon a tényen alapszik, hogy a rotavírusok genomjában a duplafonali RNS 11 különböző szegment formájában van jelen, melyek elektroforétikus mobilitása a különböző izolátumokban gyakran eltérő, és így az egyes törzsek mint rotavírus elektroforétikusok sikeresen elkülöníthetők (4, 11, 17). A módszer bevezetése a víruskimutatáson és törzszonosításon túl azt is lehetővé teszi, hogy a klinikai és klasszikus virológiai gyakorlatban nem észlelhető több rotavírus-törzssel egy időben vagy pár napos eltolódással fellépő kevert, kettős fertőzések felismerése is megtörténjen (6, 8, 11, 13, 15, 16). Segítségként jelent az eljárás az epidemiológusnak is a nosokomális rotavírus infekciókban a vírusszóródás követezésénél (14, 16).

Közleményünkben — a hazai irodalomban először — két olyan esetet ismertettünk, melyekben a laboratóriumunkban rutinszerűleg végzett és már közölt (17) rotavírus-RNS székletből történő közvetlen kimutatása során a szegmentanalízis „kettős” rotavírus-fertőzést igazolt.

Kulcszavak: rotavírus, RNS, elektroforézis, elektroforétípus, „kettős” fertőzés

Főddátélek: RNS — ribonukleinsav, ELISA — enzimes linked immunosorbent assay, SDS — sodium dodecyl sulfate/nátriumlaurylszulfát)

Anyag és módszer

Életismertetés: I. S. M. 15 hónapos leánygyermekben 1984. 03. 07-én hőemelkedés mellett hányás lép fel, majd két nap múlva, amikor gyermekosztályra kerül, már magas láza van (39 C°). Továbbra is hány, és napi 6–8 vizes székletet ürít. Exacerbációja miatt adott infúzióra hányása megszűnik, de 03.12-re újra magas láz jelentkezik, immélték hányásokkal és váltózássalul gyakori híg székletürítéssel. Másnap kerül áthelyezésre a Megyei Gyermekkorház Fertőző osztályára, ahol már csak hőemelkedés van és négy nap alatt székletürítése is normalizálódik. Metabolikus acidózisának megszüntetése után, jó általános állapot mellett, 03.18-án vörtemék székletének virológiai vizsgálata, miután a bakteriológiai és parazitológiai vizsgálatok eredményei negatívák voltak. Betegségének fellézésétől számított 13. napon gyógyultan távozik.

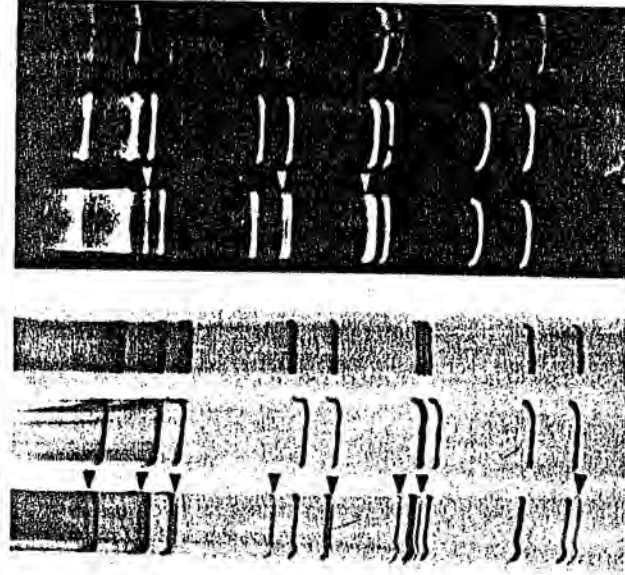
I. G. H. 2 hónapos leánycsecsemő közvetlenül kerül felvételre a Megyei Gyermekkorház Fertőző osztályára 1984. 08. 19-én három napja tartó hasmenéssel. Otthon diétára állapots nem javult, és felvételkor is 6–8 alkalommal spriccevala híg, vizes, néha zöldes székletet ürít. Az anyhán anémias csecsemőn fizikális vizsgálati kisse gázosabb has észlelhető. Láttalan, nincs étvágya, keveset alszik. Öt napon keresztül ürít gyakori, időnként véres székletet. Az elvégzett bakteriológiai és parazitológiai vizsgálatok eredményei negatívák. Virologiai székletvizsgálat 08. 21-én történik. Diétára és négy napig adott Polymyxin tablettá edására tünetei megszűnnek és a 9. ápolási napon távozik.

Víruskimutatás. ELISA eljárással (Dakopatts, Dánia) a rotavírus jelenlétének igazolása után a székletekből a vírus-RNS-t extraháltuk a korábban leírt módszer szerint (17). Röviden: a székletmintákból foszfátpufferrel (pH 7.2) körülbelül 10%-osra készített székletuszpenziumokat trichloro-otrifluor-énaul (Genetron 113, Fluka, Svájc) extraháltuk, majd centrifugálást követően a vizes fázisban levő részlegesen tisztított vírus-szennyező felhártyákat fémol-kloroform-izomilalkohol (25:24:1) keverékkel extraháltuk, végül a tisztított RNS-t alkohollal kicsaptuk. Szárlást követően a Laemmli-féle mintapufferben feloldott RNS-mintákat 10%-os polyacrylamid lapjékékben vizsgáltnak 20 óráig 15 mA áramerősséggel történő futtatás után. Laemmli módszere szerint (9). Ezútszerűsítés (7) vagy etidium bromiddal ultrahálygáshoz (254 nm) alatt történő kimutatás. Helyre fényképezés után elemeztük a rotavírus genom-szegmenteket. Beslő standardként minden esetben sirinam rotavírusból (SA11) izolált RNS-t is futtattunk a gélekben.

Eredmények

A széketmintákból preparált virális RNS elektroforézist követően jól kivehetővé váltak a rotavírusra jellemző szegmentscikok (Ábra).

S.M. A S.A.II G.H. A B



Rotavírusok RNS-szegmentsképei poliacrylamid gélben végzett elektroforézis után. ezüstoffestést (S. M., A., S.A.II) és ethidium bromid festést (G. H., A, B) követően. S. M. és G. H. esetében extra-szegmentscikok láthatók A és B a vizsgálati időszakban cirkuláló rotavírusok elektroforézisait, míg az S.A.II a kontrollként szolgáló simian rotavírus szegmentsképét mutatja.

Ezüstoffestéssel az ábra bal szélén látható az S. M. vizsgálati anyagából izolált rotavírus/ok szegmentsképe. Megfigyelhető, hogy az egyidőben más betegkekből izolált domináns rotavírus törzs (A) szegmentsjéhez képest több extra-csik van jelen mind a négy szegmentscsoportban. Ezek kissé halványabbak, de jól kivehetőek. Ha feltételezzük, hogy az S. M. mintában két különböző törzs van jelen, úgy az erősebb festést mutató törzs elektroforézisa a domináns „A” törzsével azonos (2. és 3. szegment együtt fut, a 7. és 8. szegment pedig nagyon közel), addig a gyengébb intenzitással festődő törzs 1. és 2. (3.), valamint 5., 7. (8.) és 9. szegmentje lassabban vándorol a gélben. A 10. szegment együtt fut a másik törzs 10. szegmentjével. Másrészt viszont a 4., 6. és 11. szegment futása gyorsabb.

Összehasonlításként a simian rotavírus RNS-képe négy csoportban elhelyezkedve, és egymástól jól elkülönülve látható a rotavírusokra jellemző 11 szegmentscik.

Az ábra jobb oldalán a G. H. széketminta vizsgálatából preparált minta gélelektroforézise és ethidium bromiddal történt festése után két tisztán kivehető extra-szegmentscikot látnunk. A II alapszegment közül a 2. és 3. együtt vándorolt, a 4. pedig távolabb. Az egyik extra-csik az első szegmentscsoportban látható a 3. és 4. szegment között, míg a másik extra-szegment a második csoportban, a 6. szegmenthez egészen közel lát-

szik. A 7. szegmentnél is valószínű egy extra-csik, de lehet, hogy csak a 7. és 8. alapszegment együttfutását észleljük az intenzívebb festődés illetve vastagabb szegmentscik mögött.

G. H. mintájának képe mellett az „A” preparátum a Gyermekklinikáról egyidőben izolált rotavírus RNS-szegmentsképét mutatja, míg a „B”-vel jelölt rotavírus-szegmentskép a szintén azonos időben, de a Gyermekkorházából izolált rotavírusok elektroforézisának reprezentánsa.

Megbeszélés

A rotavírus-RNS széketből történő közvetlen kivonása és gélelektroforézissel történő analízise lehetővé tette a rotavírus törzsek elektroforézistípus szerinti azonosítását (5). Az epidemiológiai vizsgálatok során e módszerrel felismerhetővé vált, hogy kevert, több törzssel egyszerre vagy pár napos eltulodással történő fertőzések is léteznek (6, 8, 11, 13, 15, 16). Ezekben az esetekben a gélben történő futtatást követően eltérő migrációjú, úgynevezett extra- vagy plusz-szegmentscikokat lehetett kimutatni. A szegmentek pozíciója rendszerint megfelelt az adott időszakban cirkuláló aktuális járványtörzsek elektroforézistípusának.

A módszer általunk történt hazai bevezetése óta (17) az itt ismertetett két esetben találtunk „kettős” rotavírus-fertőzésre utaló extra-szegmentscikokat. Az „alapszegmentskép” mindkét széketmintánál az izolálási időszakban domináns törzsek elektroforézistípusának felelt meg, amihez S. M. esetében a vizsgálati időszakban egy egyébként nem észlelt rotavírus törzs szegmentsképe társult, míg G. H. széketében egy olyan elektroforézistípus találtunk, amelyik akkor a Gyermek-klinikáról izolált rotavírus törzseket jellemezte. — S. M. esetében a klinikai lefolyás alapján is fel lehetett vetni, hogy két, egymást pár nappal követő rotavírus okozta az alaptertséget, illetve annak öt nap elteltével való kiújulását. G. H.-nál a fentiekhez hasonló kettős szakaszos lefolyást nem sikerült kimutatni, ugyanakkor a szegment-analízis alapján a „kettős” fertőzés igazolható volt.

Houly, Tam és Svensson sorozatmintákkal igazolták, hogy a kettős, kevert fertőzések már az első széketmintákból kimutathatók vagy a második törzs — esetleg mint nosokomiális infekció — csak pár nap múlva jelenik meg (8, 16, 18). Eseteinkben, a helytelen hazai gyakorlatnak megfelelően, csak a bakteriológiai és parazitológiai negatív eredmények után történt meg a vírusvizsgálat. Így, egy minta vizsgálata után csak feltételezés maradhatott, hogy a csecsemő esetleg az egyik rotavírust a kórházi osztályon kapta. Azóta, éppen ezen vizsgálatok tanulságaként, az azonnali vizsgálati anyagvétele sikerült is megoldanunk. — Meg kell jegyezni azt is, hogy S. M.-nél jó általános állapot mellett történt a sikeres víruskimutató és megbetegedést követő 11. napon. A legtöbb gyermek a vírus 6—8 napig szokta üríteni, de ismert hasonlóan hosszú, 16 napig tartó vírusürítés is (8). Nem szabad elfeledkezni, hogy S. M. klinikai tünetek nélkül is fertőzőforrást jelentett környezetére.

Jelenleg még nem teljesen tisztázott, hogy az extra RNS-szegmentek egyidőben több rotavírussal történt fertőződés eredményei vagy a szervezetben történő vírusszaporodás során a vírusgenom módosulása-

ként jelennek meg. Napjainkban inkább az első magyarázat látszik valószínűbbnek, de a második lehetséges is van példa egy rotavírust krónikusan ürítő immundeficiens gyermek esetében (12). A jövőben sorozatminták vizsgálatával, a vírusoknak szövétkultúrákban történő elkülönítése és genom-analízise alapján kaphatunk csak magyarázatot a kérdésre. Addig is fontosabbnak látszik, hogy feltételezzük — mint az influenza A vírusok esetében —, hogy a több vírussal egyszerre történő fertőzésekben olyan új rekombinánsok alakulhatnak ki, melyek egyrészt magyarázatul szolgálhatnak a rotavírusok nagyfokú heterogenitására, másrészt kiindulási lehetnek újabb és újabb megbetegedéseknek.

Közleményünkben arra kívántuk felhívni a figyelmet, hogy az elektroforetikus meghatározásával lehetőségét kaptunk az eddig fel nem ismerhető „kevert”, „kettős” rotavírusfertőzések észlelésére. Ugyanakkor azt is hangsúlyozni kívántuk, hogy a betegek gyógyító intézménybe kerülésekor azonnal és az ápolási időszakban később is szükség van virológiai vizsgálatra, hogy az esetleges nosokomiális infekciók felismerhetőek lehessenek.

A szerzők köszönetüket fejezik ki *Németh Istvánné* asszisztensnek az értékes és pontos laboratóriumi munkáért.

IRODALOM: 1. *Cukor, G., Blacikow, N. R.*: Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 1984. 48, 157. — 2. *Dimitrov, D. H. és mtsai*: Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants. *Infect. Immun.* 1983. 41, 523. — 3. *DuPont, H. L.*: Rotaviral gastroenteritis — Some recent developments. *J. Infect. Dis.* 1984. 149, 663 — 4. *Espejo, R. T. és mtsai*: Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City. *J. In-*

fect. Dis. 1979. 139, 474. — 5. *Estes, M. K., Graham, D. Y., Dimitrov, D. H.*: The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. med. Virol.* 1984. 29, 1. — 6. *Forster, J., Pastor, S.*: Epidemiology of human rotaviruses as determined by electrophoresis of genome RNA. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1983. 2, 141. — 7. *Herring, A. J. és mtsai*: Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 1982. 16, 473. — 8. *Houly, C. és mtsai*: Epidemiology of rotavirus gastroenteritis in infants from the area of Bochum as revealed by electrophoresis of genome RNA. *Eur. J. Pediatr.* 1984. 145, 128. — 9. *Loermans, U. K.*: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227, 680. — 10. *Lekos, A. és mtsai*: Rotavirus fertőzés légúti és enterális gyermekosztályon. *Orv. Hetil.* 1985. 126, 2969. — 11. *Lourenco, M. H. és mtsai*: Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 1981. 132E, 161. — 12. *Pedley, S. és mtsai*: The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J. gen. Virol.* 1984. 65, 1141. — 13. *Rodger, S. M. és mtsai*: Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. Clin. Microbiol.* 1981. 13, 262. — 14. *Rodrigues, W. J. és mtsai*: Use of electrophoresis of RNA from human rotavirus to establish the identity of strains involved in outbreaks in a tertiary care nursery. *J. Infect. Dis.* 1983. 148, 34. — 15. *Spencer, E. G., Avendano, L. F., Garcia, B. J.*: Analysis of human rotavirus mixed electropherotypes. *Infect. Immun.* 1983. 39, 569. — 16. *Stenson, L. és mtsai*: Molecular epidemiology of rotavirus infections in Uppsala, Sweden, 1981: Disappearance of a predominant electropherotype. *J. Med. Virol.* 1988. 18, 101. — 17. *Szűcs, Gy., Kende, M., Új M.*: Rotavirus-fertőzés igazolása a vírus-RNS székletből történő kimutatásával. *Orv. Hetil.* 1984. 125, 2177. — 18. *Tam, J. S. és mtsai*: Molecular epidemiology of human rotavirus infection in children in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 1986. 23, 660.

(*Szűcs György dr. Pécs Pf. 47. 7601.*)

Shift in Genomic Molecular Patterns of Human Rotaviruses over an Eighteen-Month Period in Hungary

György Szűcs¹, Miklós Kende, Mária Új

Laboratory of Virology, Public Health Station, Kőjál, Pécs, Hungary

Key Words. Human rotaviruses · Electropherotypes · Hungary

Summary. Rotavirus electropherotypes of 103 fecal samples collected from children for 18 months in Baranya County, Hungary, revealed seven different patterns. Two electropherotypes were predominant and a clear shift was evident in their occurrence. The results provide the first evidence of a shift in the prevalence of electropherotyping variants in Hungary.

The antigenic relatedness and the difficulty of cultivating human rotaviruses have hampered serological characterization of human virus strains. Therefore, analysis of the electrophoretic mobility of the 11 double-stranded RNA segments of rotavirus by polyacrylamide gel electrophoresis (electrophotyping) has become the method most commonly used for epidemiological studies of rotavirus infections [1, 2]. RNA migration pattern analyses reported from several coun-

tries have revealed considerable genome diversity [3-10].

In a survey of Hungarian children, aged 5 years or under, admitted to hospitals with acute gastroenteritis in Baranya County between November 1983 and April 1985, 151 stool samples (33%) were positive by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test (Rotazyme) for rotavirus antigen, and 103 of them (68%) contained sufficient numbers of rotaviruses for RNA analysis by gel electrophoresis in 10% polyacrylamide gels. The double-stranded RNA segments of the virus were stained with ethidium bromide, photographed under UV light and then analyzed [4, 7].

¹ Research Associate, Baylor College of Medicine, Houston, Tex., USA

Address inquiries to: Dr. G. Szűcs, Department of Virology and Epidemiology, Baylor College of Medicine, 1 Baylor Plaza, Houston, TX 77030 (USA)

Figure 1 shows the electropherograms of representatives of each electropherotype. Seven different electrophoretic migration profiles were detected. All of these electropherotypes revealed rapidly migrating (long

Revised: April 20, 1987

Accepted: June 17, 1987

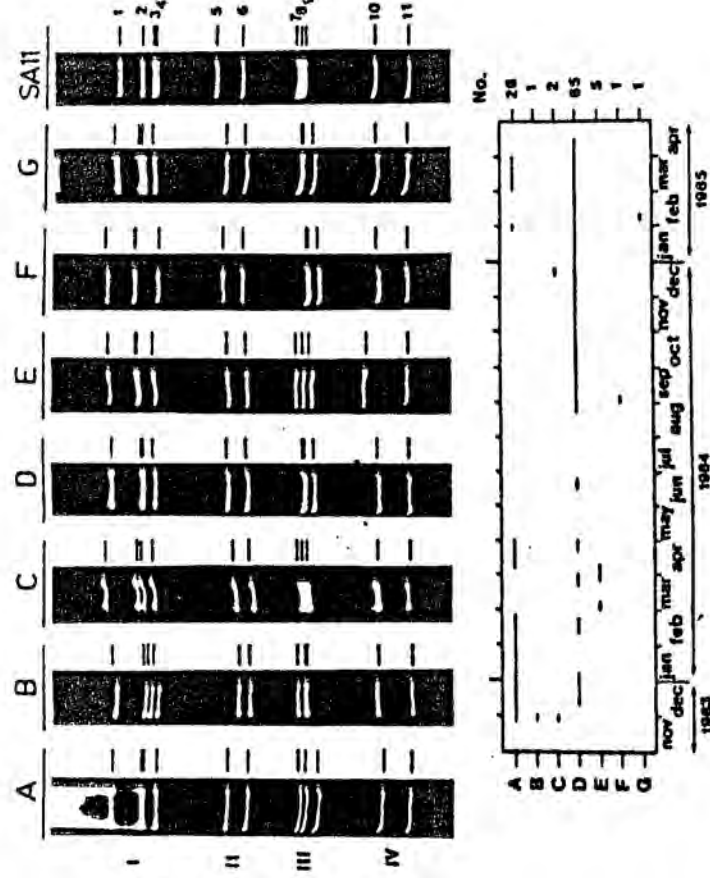


Fig. 1. Representative electrophoretic migration patterns of the genomic RNA of rotaviruses and their monthly distribution as revealed in Baranya County, Hungary. Independent alphabetical designation was employed for the classification of electropherotypes. Migration of RNA segments was from top to bottom. Numbers I-IV designate the segments, and I-IV, the four major migration groups. Below, the total number and the monthly distribution of strains with different patterns (from A to G) are shown schematically.

profile) RNA segments 10 and 11 like the corresponding segments of simian rotavirus SA11. Coelectrophoresis and parallel comparison of RNA isolates (not shown) made it possible to reveal existent migration differences and to put isolates in one of the seven electrophoretic migration groups. Segments in gene groups I and III showed extensive variability in their migration rate. Three different electropherotypes (B, F and G) were revealed in single cases and viruses with patterns C and E were also found in only 2 and 5 patients, respectively. Meanwhile, rotaviruses with patterns A and D were predominant throughout the study period. However, viruses with pattern A were more frequently

isolated during the first 6 months and were not found from May 1984 to January 1985 compared with rotaviruses with pattern D which were continuously observed from the end of August 1984 but were not detected in November 1983 or July 1984. In agreement with other studies [1, 2, 4], a clear shift in the predominant electropherotypes was evident. The difference between the electrophoretic migration profiles A and D is in gene group III; that is, in RNA pattern A, segments 7 and 8 migrate separately, whereas in pattern D, these segments comigrate. Other studies have also suggested that there is a major shift in the prevalent electropherotype every 2-3 years, mostly with variants of long strains [4, 6].

Table I. Monthly distribution of total and rotavirus RNA electropherotype-positive samples from children with gastroenteritis admitted to hospitals in Baranya County, Hungary, November 1983 to April 1985*

Number of cases	1984												1985					Total	
	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar		Apr
Total tested	9	30	12	23	35	23	13	13	30	26	25	47	23	37	27	24	33	27	457
Rotavirus RNA positive	4	11	9	5	7	8	1	3	-	4	5	3	7	10	8	9	6	3	103
	38%																		
	20%																		
	33%																		
	10%																		
	25%																		
	23%																		

* 151 samples (33%) were positive by the ELISA test.

The seasonal prevalence of rotavirus infection is presented in table I. The majority of rotavirus-positive samples was received during the cold months. The peak incidence were 47 and 28% in the two December-January periods, respectively. A similar seasonal prevalence has been reported in many countries in temperate climatic zones [5, 7, 8, 10].

Regarding the prevalence of electropherotyping variants of human rotaviruses, the findings of our investigation in Hungary are similar to those of earlier studies [3-10]. During the 18 months seven electropherotypes were revealed and some showed a periodic cocirculation and predominance. Usually many different strains of rotavirus are isolated at a given time and in this way, potential for genetic reassortment may exist suggesting wide antigenic diversity. However, presently it is still unclear whether the genome diversity reflects an antigenic change and a consequent change in the immunity of the population. Without successful isolation and precise serological characterization of different rotavirus strains, contin-

ued and expanded use of electrophoretic analysis will be useful to provide much of the epidemiological information on rotavirus infections.

Acknowledgment

We thank Dr. Mary K. Estes for her helpful comments.

References

- 1 Estes, M.K.; Graham, D.Y.; Dimitrov, D.H.: The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. med. Virol.*, vol. 29, pp. 1-22 (Karger Basel 1984).
- 2 Sanders, R.C.: Molecular epidemiology of human rotavirus infections. *Eur. J. Epidemiol.* 1: 19-32 (1985).
- 3 Lourenco, M.H.; Nicolas, J.C.; Cohen, J.; Scherret, R.; Bricout, F.: Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Annls Virol.* 132E: 161-172 (1981).
- 4 Rodger, S.M.; Bishop, R.F.; Birch, C.; McLean, B.; Holmes, I.H.: Molecular epidemiology of hu-

- man rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. clin. Microbiol.* **13**: 272-278 (1981).
- 5 Buitenwerf, J.; Muilwijk-van Alphen, M.; Schaap, G.J.P.: Characterization of rotaviral RNA isolated from children with gastroenteritis in two hospitals in Rotterdam. *J. med. Virol.* **12**: 71-78 (1983).
 - 6 Dimitrov, D.H.; Graham, D.Y.; Lopez, J.; Muchnik, G.; Velasco, G.; Stenback, W.A.; Estes, M.K.: RNA electropherotypes of human rotaviruses from North and South America. *Bull. Wild Hlth Org.* **62**: 321-329 (1984).
 - 7 Nicolas, J.C.; Pothier, P.; Cohen, J.; Lourenco, M.H.; Thompson, R.; Guimbaud, P.; Chenon, A.; Dauvergne, M.; Bricout, F.: Survey of human rotavirus propagation as studied by electrophoresis of genomic RNA. *J. infect. Dis.* **149**: 688-693 (1984).
 - 8 Houly, C.; Grunert, B.; Werchau, H.; Mietens, C.; Brüssov, H.; Hilpert, H.: Epidemiology of rotavirus gastroenteritis in infants from the area of Bochum as revealed by electrophoresis of genome RNA. *Eur. J. Pediat.* **143**: 128-132 (1984).
 - 9 Tam, J.S.; Kum, W.W.S.; Lam, B.; Yeung, C.Y.; Ng, M.H.: Molecular epidemiology of human rotavirus infection in children in Hong Kong. *J. clin. Microbiol.* **23**: 660-664 (1986).
 - 10 Svensson, L.; Uhnoo, I.; Grandien, M.; Wadell, G.: Molecular epidemiology of rotavirus infections in Uppsala, Sweden, 1981: disappearance of a predominant electropherotype. *J. med. Virol.* **18**: 101-111 (1986).

Group A rotavirus G type prevalence in two regions of Hungary

G. Szücs¹, D. O. Matson², M. Új¹, E. Kukán³, I. Mihály³,
Z. Jelenik⁴, and M. K. Estes⁵

¹Laboratory of Virology, County Institute of National Public Health Service, Pécs, Hungary. ²Center for Pediatric Research, Children's Hospital of The King's Daughters and Eastern Virginia Medical School, Norfolk, Virginia, U.S.A., ³Virus Laboratory and ⁴1st Department of Pediatrics, Szent László Central Hospital for Infectious Diseases, Budapest, Hungary. ⁵Division of Molecular Virology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.

Accepted June 20, 1995

Summary. Rotaviruses are a major cause of gastroenteritis in children worldwide. Rotaviruses are antigenically complex, with multiple serotypes (G types). The first longitudinal study of group A rotavirus serotype (G type) distribution in Hungary is reported. Neutralizing monoclonal antibodies specific for G1, G2, G3, and G4 were used in an enzyme immunoassay to determine the antigenic variation of group A rotaviruses in two collections of stool specimens assembled from 1984–1992 in Baranya County, southwest Hungary, and from 1988–1992 at the Central Hospital for Infectious Diseases in Budapest. Ninety-two percent of the 1215 virus-positive samples were typed as follows: G1 (81%), G2 (4%), G3 (1%), G4 (5%), or mixed type (1%). G1 was the predominant type during the entire study period with the exception of the 1988/1989 rotavirus season in Baranya County when G4 predominated. Among G1 strains, different electropherotypes were detected with a shift of the predominant G1 electropherotype(s) each 2 to 3 years. G typing from two longitudinal collections established regional differences within Hungary in the prevalence of rotavirus antigenic types among children with rotavirus-associated diarrhea. These are the first longitudinal rotavirus typing results for Hungary and Central Europe.

Introduction

About nine to ten million cases of serious dehydrating diarrhea occur each year worldwide [7, 10, 25, 26]. Group A rotaviruses are the most common cause of severe, acute gastroenteritis among infants and young children worldwide [15, 16, 27, 28]. During the last decade the antigenic complexity of circulating group A rotaviruses has become apparent. The virus outer capsid is composed of

two proteins, the protease-sensitive hemagglutinin (P) and a glycoprotein (G). These proteins induce neutralizing antibodies and are key targets of the host's protective immune response. Group A rotaviruses include 14 serotypes (G types), differentiated by changes of VP7, the major outer capsid glycoprotein [9]. At least ten G types occur among viruses isolated from humans and four of these (G1, G2, G3, and G4) are distributed widely throughout the world [1, 3, 6, 9, 11, 20, 47]. Antigenic types (P types) of human rotavirus VP4 are not as well defined; but six genotypes, which also may represent distinct P types, occur among human rotaviruses [9, 22, 23, 30].

Several studies characterizing the geographic and temporal distribution of rotavirus G types have been published [2, 5, 17-19, 21, 29, 32, 34, 40, 42, 44, 45] including a few reports from Europe [2, 17, 19, 34, 44, 45]. None of these reports are from Central or Eastern Europe. We report a study of the antigenic variability of rotaviruses in Hungary, using a G-specific MAb-based enzyme immunoassay (EIA) and samples collected over eight and four years from children with nonspecific gastroenteritis in two separate regions of the country.

Materials and methods

Definitions

A case of acute nonspecific gastroenteritis was an illness described by a nonspecific gastroenteritis diagnosis (International Classification of Diseases, version 9, Clinical Modification, codes 008.6, 008.8, 009.0-009.3, and 558.9) [31] and collection of a diagnostic stool specimen within the first seven days of illness, to exclude nosocomial cases. A case of acute rotavirus diarrhea was defined by the detection of rotavirus excreted in the stool of a child with acute nonspecific gastroenteritis. The rotavirus epidemic year was defined as July 1 through June 30. Rotavirus types G1 to G4 refer to MAb-based G type assignments on the basis of G antigenic type. Electropherotypes are the patterns of migration of rotavirus RNA gene segments in polyacrylamide gels.

Stool specimens from Baranya County

Baranya County is one of 19 counties in Hungary and is situated west of the Danube on the Hungarian-Croatian border. The population of Baranya County in 1992 was 477,731. All specimens submitted to the regional Laboratory of Virology, Pécs, from children with acute nonspecific gastroenteritis during the period June 1987 through July 1992, were screened for rotavirus. Samples from non-hospitalized children were submitted by pediatricians in Pécs and its outskirts, as well as from five district physicians in the county. Samples from hospitalized children were received from hospitals with pediatric wards in the towns of Komló, Mohács, Siklós, and Szigetvár, and from the County Children's Hospital, Pécs, and from the gastroenterology unit of the Department of Pediatrics, Medical University of Pécs. Previously electropherotyped, but not G-typed, samples collected during the 1984/85 to 1986/87 rotavirus seasons [38] also were included in this report. All stool samples were stored at -20 °C before testing.

Stool specimens from Szent László CHID, Budapest

Szent László Central Hospital for Infectious Diseases (CHID) is the only infectious diseases hospital in Hungary and is in Budapest, about 150 km north of Baranya County.

Rotavirus-positive stool samples submitted from the Department of Pediatrics and detected by Rotalex (Orion Diagnostica, Espoo, Finland) in the hospital virus laboratory were stored at -20°C and transferred to Pécs every two to three months. The stool samples in this collection were obtained between July 1, 1988 and June 30, 1992, from children five years or younger hospitalized because of acute gastroenteritis. Patients admitted to CHID resided in the metropolitan area of Budapest, which has a population of about two million persons, one-fifth the total Hungarian population.

Detection of rotavirus in stool specimens

All stool samples were tested for rotavirus in a commercial group A EIA (Dakopatts, Glostrup, Denmark) or by electropherotyping [39]. After 1988, electropherotypes were analyzed by silver staining, instead of ethidium bromide staining and UV-light detection.

Demographic and hospitalization data

Demographic and clinical data accompanying samples from Baranya County included the patient's age, date of sample collection, and place of residence. For each sample from the CHID, the patient's medical record number, date of hospital discharge, length of hospital stay, discharge status, and discharge diagnoses were obtained retrospectively.

Monoclonal antibody G-typing EIA

Ten percent stool suspensions were extracted with fluorocarbon and tested in an EIA using monoclonal antibodies (MAb) [28]. Typing MAbs included in the EIA were KU-4 (G1), S2-2G10 (G2), YO-1E2 (G3), and ST-2G7 (G4) [24, 37, 40, 41]. MAbs 631-7-54 and 60-F2D4, against group-specific determinants on the VP6 and VP7 proteins, respectively, also were used. Cut-off points for scoring positive EIA results were determined as the mean OD values plus three standard deviations for each MAb pair using a group of 20 rotavirus-negative specimens. A sample was assigned a single G type only if the reactivity with one G-typing MAb was at least twice that of the others tested. Samples that failed to react with VP6-specific MAbs were scored as "VP6-negative." Samples were scored as G1, G2, G3, G4, or "VP7-negative," depending upon their reactivities to the G type-specific or common VP7 MAbs. Samples were scored as "mixed" if they showed reactivity with more than one G type-specific MAb. Samples were called "non-typeable" if reactivity with G type common MAb was positive, but no reactivity was detected in wells containing the G type-specific MAbs.

Statistical analysis

Univariate analysis using the Epi Info statistical software package was performed for adjusted and unadjusted groups [13].

Results

Distribution of samples by study region, year, and patient age

During the 8-year period, 5506 stool specimens from the two regions in Hungary were collected. A total of 3267 (59%) samples were from Baranya County; most of these (61%) were collected during the last four years of the study period. Rotaviruses were detected in 915 (28%) of the Baranya County stool specimens and 367 (40%) of the positive samples were analyzed in the typing assay. The

Table 1. Age distribution of children with acute nonspecific gastroenteritis represented by the two collections of stool samples

Age group	Baranya County			Budapest Metropolitan Area		
	Samples submitted ^a	Rotavirus identified ^b	Number tested ^c	Samples submitted ^d	Rotavirus identified ^b	Number tested ^c
1-5 months	722	130 (18)	48 (37)	432	376 (87)	161 (43)
6-11 months	590	183 (31)	70 (38)	506	445 (88)	204 (46)
1 year	756	272 (36)	107 (39)	591	532 (90)	247 (46)
2 years	508	168 (33)	62 (37)	257	226 (88)	106 (47)
3 years	414	112 (27)	43 (38)	98	89 (91)	40 (45)
4 years	74	14 (19)	11 (79)	42	36 (86)	16 (44)
≥5 years	107	13 (12)	9 (69)	115	100 (87)	48 (48)
Not recorded	96	23 (24)	17 (74)	198	158 (80)	96 (61)
Total	3267 (100)	915 (28)	367 (40)	2239 (100)	1962 (88)	918 (47)

^aStool specimens from patients with acute nonspecific gastroenteritis, collected within 7 days of illness

^bRotavirus identified by EIA and/or electrophoresis of extracted viral RNA. Numbers in parentheses are percentages

^cNumber tested in the MAb-based G typing assay. Numbers in parentheses are percentages

^dSamples screened by Rotalex in Budapest and submitted to the Laboratory of Virology, Pécs

number of samples collected in each year differs in part because of differences in the amount of effort spent soliciting their submission. A total of 2239 samples screened as rotavirus-positive were sent from CHID. Testing in Pécs confirmed the presence of rotavirus in 1962 (88%) of the CHID samples and 918 (47%) of them were included in the G typing assay. Testing was stopped when the results indicated that further testing would not change the overall patterns noted (see below).

Rotavirus epidemic cases and the peak-incidence of illness were observed at least one or two months earlier at CHID than in Baranya County in each season. The age distribution of the children in the two groups was similar (Table 1) and an average of 45% of samples from each age group were G typed. More samples from CHID (78%) were from urban residents than among the samples from Baranya County (60%). Stool samples were equally selected for racial composition in both regions; 18% of stool samples were collected from gypsies.

Characterization of rotaviruses by G typing

Of the 1285 samples from both regions tested in the G typing assay, 1215 (95%) reacted with the VP6 common MAb (Table 2). G1 was detected in 81%, G2 in 4%, G3 in 1%, and G4 in 5% of these 1215 specimens. A total of 102 (8%) non-typeable specimens potentially represented types other than G1-G4. Ten

samples had more than one G type reactivity; all contained G1 with G2 or G1 with G4. Samples stored for a longer period of time before testing were more likely to lack reactivity to the VP6 common or VP7 common MAbs. Types were distributed comparably over all age groups studied.

Geographic distribution of G types

G1, G2, G3, and G4 were detected in both regions with comparable overall prevalence (Table 2). During the comparable last four rotavirus seasons only G4 was more frequently observed among the specimens from Baranya County (12%) than among the samples from CHID (2%; $X^2 = 47$, $P < .001$). Differences in the type distribution by referring hospital or rural rather than urban place of residence were not observed within individual seasons.

Year-to-year distribution of G types

G1 was the predominant type during all seasons except during the 1988/89 season in Baranya County when G4 exceeded G1 (Table 2). G1, G2, G3, and G4 co-circulated only in two seasons, in 1987/1988 and 1988/1989. G1 was detected each year, and the proportion of cases infected with this type varied between 41% and 100%. G2 and G3 rotaviruses were detected in a minor proportion of cases. G4 was detected in 22% of the samples during the 1987/88 season, the season prior to its peak season. Among specimens from CHID, G1 was the predominant type each year. Other types co-circulated at low levels without apparent trends.

The non-typeable strains were first detected in Baranya County during the 1987/88 season and were detected more frequently during the 1989/90 (15%) and 1990/91 (23%) seasons ($P < .001$), the two seasons following that in which G4 was predominant. Non-typeable strains also were more common among the CHID samples during the 1989/90 (16%) and 1990/91 (6%) seasons.

We did not observe more severe clinical symptoms associated with a particular G type nor a difference in prevalence of serotypes between hospitalized and non-hospitalized children.

RNA electropherotyping

Samples also were analysed by electropherotyping. Seven seasons of electropherotyping results were available from Baranya County and four seasons from CHID. In both regions a two- to three-year shift was detected among the three predominant electropherotypes, but the G type remained G1. The electropherotypes associated with G1 included multiple and many similar electropherotypes. The predominant electropherotypes were different between the regions in the four comparable seasons. The G4 types which were predominant during the 1987/1988 season in Baranya County had electropherotypes distinct from those associated with G1 types circulating during the same season. Two slightly different electropherotypes were associated with G4 types during the three seasons (1987/88 to 1989/90) in Baranya County when G4 was more active and

this number of electropherotypes was less than the number of electropherotypes associated with G1 in any season. Two electropherotypes were observed in six of the samples scored as mixed. Most (89%) of the samples with non-typeable rotaviruses were successfully analyzed for RNA and exhibited 'long' electropherotypes with at least three distinct patterns. Furthermore, two group C rotaviruses were detected by RNA analysis.

Discussion

During the last decade, information has accumulated about the distribution of rotavirus G types on five continents [2, 47]. The 1019 samples characterized from the 6-year collection in northeast London-West Midlands is the largest European study published [34]. Other G typing results from Europe include a total of 649 stool samples from four collections in England, Finland, Italy, and Sweden, collected during the last decade [2, 17, 19, 44, 45]. We report the distribution of rotavirus G types using 1285 samples collected from 1984-1992 and 1988-1992 in two regions of Hungary. The typing assay permitted the assignment of a G type in 92% of the virus-positive samples.

G1 was the most common type circulating in Hungary. This finding agrees with global and European G typing results [2, 34, 47]. The portion of G1 samples (81%) is close to the percentage observed in Finland (87%) and Italy (72%) [19, 44, 45], but higher than the rate observed in West Midlands (55%) [34]. Northeast London (60%) [34], and Sweden (50%) [2]. These regional differences may reflect cycles in the prevalence of G1 samples from year to year because in our study G1 prevalence ranged from 100% to 41% in our two study regions. Similar results were observed in Italy, where G1 occurred at a rate of 43% during the 1981/1982 season and increased to 90% during the 1984/1985 season [19], and in northeast London, where a rate of 98% was detected during the 1987/1988 season and decreased to about 30% during the 1989/1990 season [34]. A longer period of monitoring will be required to assess this fluctuation in the circulation of G1 more accurately.

The overall occurrence of G2 (4%), G3 (1%), and G4 (5%) were similar to that reported from Finland and Italy [19, 44, 45]. In some parts of the world, G3 has been the predominant type [47], including Houston, Texas, where G3 was predominant during 3 of 11 successive seasons [32]. G3 was the second most frequently detected G type in England and Sweden [2] a decade prior to our study and was detected at a low rate (8%) among samples from Finland [2] and in Northeast London (3%) [34]. G3 strains were not detected in Italy [19]. While G4 was absent from all stool specimens tested from Africa [47], Canada [2], and Italy [19], we found type G4 strains in both Hungarian regions. G4 strains were predominant during one season in Baranya County and one season in northeast London [34].

The analysis of our samples by RNA gel electrophoresis showed that several different electropherotypes of the same G type may co-circulate, as is known from previous studies [17, 19, 32, 34]. Among G1 rotaviruses, two to three

electropherotypes were predominant each season among the 6 to 12 co-circulating electropherotypes. The electropherotyping results also suggest that the prevalence of G1 subtypes has a two- to three-year cycle in the study regions, within the limits of the seven and four years of study reported here. Circulating G1 strains may be more antigenically heterogeneous than previously recognized and than viruses of other types, especially in surface-structures of neutralizing epitopes [5, 8, 27, 47]. Molecular characterization of VP7 and VP4 proteins of G1 viruses with distinct electropherotypes may identify antigenically distinct strains. Detailed characterization of circulating G3 and G4 strains may explain why these G types, when predominant, include only a few co-circulating electropherotypes. In this study, electropherotyping complemented G typing and identified differences within a G type suggesting future epidemiologic and laboratory studies.

The combined, published G typing results indicate that circulating rotavirus were antigenically diverse in most regions studied [2, 4, 5, 18, 21, 32, 34, 42, 47]. Although year-to-year cycles of antigenic change are community-wide events, no clear patterns of change have been discovered permitting predictions of predominant types. Further, cycles of changing G1 subtypes appear to be occurring even when G1 is not a predominant type. If the prevalence of G1 subtypes changes from year to year in the natural setting when many G1 types are co-circulating, it will be of interest to monitor changes of G1 subtypes that occur in response to universal immunization of children with a single G1 subtype, as is the plan with current vaccine strategies. It is possible that G1 subtypes change from year-to-year in response to the same immunologic pressures that drive changes in G type prevalence. The recent description of new antigenic rotavirus types [3, 11, 20, 46] is yet another facet of the "puzzling diversity" [12] of rotavirus.

The diversity of circulating rotaviruses may not prevent an effective vaccine program. The published G typing results suggest that rotavirus types are more endemic than influenza viruses. In addition, recent studies [35, 36, 45] suggest that two rotavirus infections are sufficient to stimulate heterotypic immunity protective against serious illness. These two infections can be asymptomatic because asymptomatic infections stimulate immunity to levels comparable to those achieved after symptomatic infections [33, 45]. If a vaccine can induce an immune response equivalent to two natural infections, the immunity thus acquired may be protective against sub-typic variants.

The results of our study in Hungary supplement data available for the distribution of rotavirus G types in Europe. Furthermore, it gives information on the circulation of rotavirus antigenic types for a longer period of time and in a larger children population than is available from other European regions. We believe our observations of subtype and G type variations when taken in the context of other studies, justify continuing monitoring of changes in predominating circulating G types and improved methods for P typing in a target population before and during introduction of a vaccine in any geographic area.

Acknowledgements

We thank Prof. József Budai for making possible the cooperation with Szent László CHID. We are also grateful to the following pediatricians for sending us their specimens: Drs. Iván Péley, Levente Varga, Rita Keves, Judit Pálos, Ildikó Batta, András Tóth, Adrien Kertész, Olga Schreffel, Mária Pataki, Mária Gellert, Irén Rajkai, Magdolna Horváth, Mária Pinterics, Erika Kiss, Agnes Kabács, Edit Bajnai, Zsuzsanna Cser, and Julianna Teész, as well as Edit Nagy, Magdolna Preisz, and Judit Bertusz for technical assistance, and Gábor Pavlovics for computer assistance. This work was supported by U.S. Public Health Service Awards HD13021 and AI20649.

References

1. Albert MJ, Unicomb LE, Tzipori SR, Bishop RF (1987) Isolation and serotyping of animal rotaviruses and antigenic comparison with human rotaviruses. *Arch Virol* 93: 123-130
2. Beards G, Desselberger U, Flewett TH (1989) Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes. 1983 to 1988. *J Clin Microbiol* 27: 2827-2833
3. Beards G, Xu L, Ballard A, Desselberger U, McCrae M (1992) A serotype 10 human rotavirus. *J Clin Microbiol* 30: 1432-1435
4. Bern C, Unicomb LE, Gentsch JR, Banul JR, Yunus M, Sack RB, Glass RI (1992) Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J Clin Microbiol* 30: 3234-3238
5. Bishop RF, Unicomb LE, Barnes GL (1991) Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. *J Clin Microbiol* 29: 862-868
6. Browning GF, Chalmers RM, Fitzgerald TA, Snodgrass DR (1991) Serologic and genomic characterization of L 338, a novel equine group A rotavirus G serotype. *J Gen Virol* 72: 1059-1064
7. Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho M-S (1990) Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ* 68: 171-177
8. Coulson BS (1987) Variation in neutralization epitopes of human rotaviruses in relation to genomic RNA polymorphism. *Virology* 159: 209-216
9. Das M, Dunn SJ, Woode GN, Greenberg HB, Rao CD (1993) Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 rotavirus. *Virology* 194: 374-379
10. de Zoysa I, Feachem RG (1985) Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull World Health Organ* 63: 569-583
11. Dunn SJ, Greenberg HB, Ward RL, Nakagomi O, Burns JW, Vo PT, Pax KA, Das M, Gowda K, Rao CD (1993) Serotypic and genotypic characterization of human serotype 10 rotaviruses from asymptomatic neonates. *J Clin Microbiol* 31: 165-169
12. Editorial (1990) Puzzling diversity of rotaviruses. *Lancet* 335: 573-575
13. Epi Info statistical package, version 3. Epidemiology Program Office, Centers for Disease Control, Atlanta
14. Estes MK, Cohen J (1989) Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53: 410-449
15. Estes MK, Graham DY (1979) Epidemic viral gastroenteritis. *Am J Med* 66: 1001-1007
16. Feachem RG (1986) Preventing diarrhoea: what are the policy options? *Health Policy Plan* 1: 109-117

17. Follitt EAC, Sanders RC, Beards GM, Hundley FM, Desselberger U (1984) Molecular epidemiology of human rotaviruses. *J Hyg* 92: 209-222
18. Georges-Courbot MC, Beraud AM, Beards GM, Campbell AD, Gonzalez JP, Georges AJ, Flewett TH (1988) Subgroups, serotypes, electropherotypes of rotavirus isolated from children in Bangui, Central African Republic. *J Clin Microbiol* 26: 668-671
19. Gerna G, Arista S, Passarani N, Sarasini A, Battaglia M (1987) Electropherotype heterogeneity within serotypes of human rotavirus strains circulating in Italy. *Arch Virol* 95: 129-135
20. Gerna G, Sarasini A, Parea M, Arista S, Miranda P, Brussow H, Hoshino Y, Flores J (1992) Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J Clin Microbiol* 30: 9-16
21. Gomez J, Estes MK, Matson DO, Bellinzoni R, Alvarez A, Grinstein S (1990) Serotyping of human rotaviruses in Argentina by ELISA with monoclonal antibodies. *Arch Virol* 112: 249-259
22. Gorziglia M, Green K, Nishikawa K, Taniguchi K, Jones R, Kapikian AZ, Chanock RM (1988) Sequence of the fourth gene of human rotavirus recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J Virol* 62: 2978-2984
23. Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, Chanock RM (1990) Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7155-7159
24. Greenberg HB, McAuliffe V, Valdesuso J, Wyatt R, Flores J, Kalica A, Hoshino Y, Singh N (1983) Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 39: 91-99
25. Ho M-S, Glass RI, Pinsky PF, Anderson LJ (1988) Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. *J Infect Dis* 158: 1112-1116
26. Institute of Medicine (1986) New vaccine development: establishing priorities. II. Diseases of importance in developing countries. National Academy Press, Washington, DC
27. Kapikian AZ, Chanock RM (1990) Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM (eds) *Virology*, 2nd ed. Raven Press, New York, pp 1353-1404
28. Kapikian AZ, Wyatt R, Greenberg HB, Kalica AR, Kim HW, Brandt CD, Rodriguez WJ, Parrott RH, Chanock RM (1980) Approaches to immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotaviruses. *Rev Infect Dis* 2: 459-469
29. LeBaron CW, Lew J, Glass RI, Weber JM, Ruiz-Palacios GM, The Rotavirus Study Group (1990) Annual rotavirus epidemic patterns in North America: results of a five-year retrospective survey of 88 centers in Canada, Mexico, and the United States. *JAMA* 264: 983-988
30. Li B, Larralde G, Gorziglia M (1993) Human rotavirus K8 strain represents a new VP4 serotype. *J Virol* 67: 617-620
31. Matson DO, Estes MK (1990) Impact of rotavirus infection at a large pediatric hospital. *J Infect Dis* 162: 598-604
32. Matson DO, Estes MK, Burns JW, Greenberg HB, Taniguchi K, Urasawa S (1990) Serotype variation of human group A rotaviruses in two regions of the USA. *J Infect Dis* 162: 605-614
33. Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK (1993) Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis* 167: 577-583
34. Noel JS, Beards GM, Cubitt WD (1991) Epidemiological survey of human rotavirus serotypes and electropherotypes in young children admitted to two children's hospitals in Northeast London from 1984 to 1990. *J Clin Microbiol* 24: 2213-2219

35. O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK (1994) Acquisition of G type-specific antibody of rotavirus. *Pediatr Infect Dis J* 13: 890-895
 36. O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK (1994) Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis* 169: 504-511
 37. Ofitt PA, Shaw RD, Greenberg HB (1986) Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J Virol* 58: 700-703
 38. Szűcs G, Kende M, Új M (1987) Shift in genomic molecular patterns of human rotaviruses over an eighteen-month period in Hungary. *Intervirology* 28: 110-113
 39. Szűcs G, Kende M, Új M, Deak J, Koller M, Szarka E, Csik M (1987) Different electropherotypes of human rotaviruses in Hungary. *Acta Virol* 31: 369-373
 40. Taniguchi K, Morita Y, Urasawa T, Urasawa S (1987) Cross-reactive neutralization epitopes of VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J Virol* 61: 1726-1730
 41. Taniguchi K, Urasawa S, Urasawa T (1985) Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J Gen Virol* 66: 1045-1053
 42. Urasawa S, Urasawa T, Taniguchi K, Wakasugi F, Kobayashi N, Chiba S, Sakurada N, Morita M, Morita O, Tokieda M, Kawamoto H, Minekawa Y, Ohseto M (1989) Survey of human rotavirus serotypes in different locales in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 160: 44-51
 43. Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Lourdes Guerrero M, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM (1994) Protective effect of a natural rotavirus infection against reinfection and illness. Abstract. Society of Pediatric Research, Seattle, Washington
 44. Vesikari T (1989) Clinical trials of rotavirus vaccines. In: Farthing MJG (ed) *Viruses and the gut*. Swan Press, London, pp 121-122
 45. Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Andre FE, Beards GM, Flewett TH (1985) Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. *J Pediatr* 107: 189-194
 46. Ward RL, Nakagomi O, Knowlton DR, McNeal MM, Nakagomi T, Clemens JD, Sack DA, Schiff GM (1990) Evidence for natural reassortants of human rotaviruses belonging to different genogroups. *J Virol* 64: 3219-3225
 47. Woods PA, Gentsch J, Gouvea V, Mata L, Santosham M, Bai ZS, Urasawa S, Glass RI (1992) Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations. *J Clin Microbiol* 30: 781-785
- Authors' address: Dr. D. O. Matson, Center for Pediatric Research, Children's Hospital of The King's Daughters and Eastern Virginia Medical School, 855 W. Brambleton Avenue, Norfolk, VA 23510, U.S.A.

Received February 15, 1995

SZÜCS GYÖRGY, KENDE MIKLÓS, UJ MÁRIA, DEÁK JUDIT, KOLLER

MIKLÓS

HUMÁN ROTAVIRUS-RNS KIMUTATÁSA SZÉKLETMINTÁKBÓL

Baranya megyei KÖJÁL, Pécs, SZOTE Kémiai Mikrobiológiai Laboratórium,
Szeged és Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest

1982/83-ban az ország három területéről - Baranya, Csongrád és Pest megye, illetve Budapest - származó, gastroenteritises tüneteket mutató 78 fiatal gyermek székletmintáiból 42 esetben sikerült a rotavirus-RNS-t kimutatni. A széletszuspenziókból a virális RNS kinyerése freon és SDS kezelet követően fenol extrakcióval, majd alkoholos kicsapással történt. Az RNS-képek értékelésére az SDS-PAGE-t követő ethidium bromid festés után került sor. A Csongrád megyéből, egy járványból származó törzsek RNS-képe - egy törzs kivételével - homogenitást, míg a másik két területről kapott, egymástól térben és időben izolált esetekből származó vírusrözsék nagyfokú heterogenitást mutatott.

A módszer molekuláris epidemiológiai vizsgálatok elvégzését teszi lehetővé azzal, hogy a már genom szinten jelentkező eltérések alapján elősegíti egy adott járványban, vagy egy adott közösségben a különböző rotavirus-törzsek felismerését.

MAGYAR MIKROBIOLÓGIAI TÁRSASÁG

NAGYGYŰLÉSE

NYIREGYHÁZA

1984. augusztus 22 - 24.

SZÉCS GYÖRGY, KÁRAI ANDREA, KÖRDE MIKLÓS, LJ. MÁRIA,
VÁNYAI ÉVA, SZÖLLŐSI ZSÓFIA:

REOVIRUSOK IZOLÁLÁSA ROTAVIRUS-PCZITIV SZÁLLÁSIN-
ÁRÁKÓL

Bacsanya megyei Kórház, Pécs, Csaszgrád megyei Kórház,
Szeged

Elektronmikroszkópos és/vagy gélelektroferézissel,
valamint Rotalex és ELISA vizsgálatokkal rotaviru-
sokat tartalmazó székletmintákból a szerzők MA-104
sejttenyészetekben tripeziakészletével kísérelték meg
a rotavirus izolálását. 3-10 passzázhat követően el-
tepetegén ágenszeket sikerült a mintákból nyerni, a-
miktől alapesetben vizsgálatok során 10 esetben kido-
rult, hogy reovirusok. A szövettanulmányok felülírásá-
ra 1:32-1:256 titerben agglutinálta a humán vörösvér-
sejteket, rotavirus-specifikus ELISA reakcióban nem
reagált, a fertőzött sejtekben anti-SALL poliválens
immunserummal, IF módszerrel, rotavirus indukálta an-
tigénseket nem lehetett látni, és végül a vírus nuk-
leinsavjának analízise a reovirusokra leírt 10 szeg-
ment jelenlétét igazolta. Használóan a rotavirus e-
lektroferotípusokhoz, a két földrajzi régióból szármá-
zó vírusoknál eltérések mutatkoztak a szegmenté-
pek között. A szerzők feltételezik, hogy a széklet-
mintákban eredetileg alacsony partikulaszámmal je-
lmezhető reovirusok a tenyésztés során gyorsabban
adaptálódva lehetőleg lették a rotavirusok szapo-
radái.

MAGYAR MIKROBIOLÓGIAI TÁRSASÁG

1989. ÉVI

NAGYGYŰLÉSÉNEK

ELŐADÁSAI

E G E R

1989 augusztus 24-26.

SZÜCS GYÖRGY, UJ MÁRIAELTÉRÉS IGAZOLÁSA A HUMÁN ROTAVIRUSOK SZEROTIPUSAINAK ÉVENKÉNTI ÉS TERÜLETI ELŐFORDULÁSÁBAN

Baranya megyei Köjál, Virologiai Osztály, P é c s

Baranya megyében 1984-től 1990-ig öt rotavirus széronból székletmintákat vizsgálva 157 esetben sikerült VP7-típusú ELISA reakcióban, 1-4 típus-specifikus monoklonális savókkal a rotavirusok szerotípusát meghatározni. - 1987-88-tól ez addig domináns 1-es szerotípus helyett a 4-es típus vált gyakoribbá a megyében. Területi összehasonlító vizsgálatok ugyanakkor azt mutatták, hogy (Prof. Budai József hozzájárulásával) a Fővárosi László Kórházból kapott székletminták 1988-ban, sőt 1989-ben is 4-es típust csak hét esetben, míg 1-es típust 112 esetben tartalmaztak. Baranyában - kisebb mintaszámból - ugyanakkor 34 1-es és ugyancsak 34 4-es szerotípust lehetett kimutatni. A 2-es és 3-as szerotípusok száma mindkét földrajzi területen alacsony volt. Hét esetben új szerotípusok jelenlétét sem lehetett kizárni. A talált adatok hazánkban is igazolják, hogy azonos időszakban a rotavirusok szerotípusainak előfordulása időben és területenként is változó lehet, ami megnehezíti a jövő oltási stratégiáját.

MAGYAR MIKROBIOLÓGIAI TÁRSASÁG

M A G G Y Ő L É S É N É K

E L Ő A D Á S - Ö S S Z E F O G L A L Ó I

S O P R O N

1990 augusztus 22-24.

SZÜCS GYÖRGY¹, ÚJ MÁRIA¹, MIHÁLY ILONA², DEÁK JUDIT³, TÓTH IRÉN⁴, KÁTAI ANDREA⁵

¹ ÁNTSZ Baranya megyei Intézete, Vírus Laboratórium, Pécs, ² Szt. László Kórház, Vírus Laboratórium, Budapest, ³ SZOTE, Központi Klinikai Mikrobiológiai Intézet, Szeged, ⁴ ÁNTSZ Hajdú-Bihar megyei Intézete, Vírus Laboratórium, Debrecen, és ⁵ ÁNTSZ Csongrád megyei Intézete, Szeged

Gastroenteritisek virális kórokozói: hazai vizsgálatok, diagnosztikai lehetőségek.

A szerzők kiemelik a hasmenéssel járó vírusinfekciók jelentőségét, áttekintik a szóba jöhető virális kórokozókat, bemutatják a hazai vizsgálatok eredményeit, és szólnak a diagnosztikai lehetőségekről.

A hasmenéssel járó esetek száma közelítőleg 3-5 billió a világon, és ezekből 5-10 millió letális kimenetelű. Vírusinfekciók - főképpen, évszaki és higiénés tényezőktől függően - többségben szerepeik a gastroenterális (GE) megbetegedések okai között. Bizonyított szerepük van a kórtételekben a rota-, enterális adeno- és a Norwalk illetve Norwalkszerű vírusoknak. Kevésbé igazolt az astrovírusok, calicivirusok, egyes coronavírusok és néhány egyéb vírus kóroki szerepe. A nem vagy csak korlátozottan tenyészthető vírusok előfordulásáról főleg direkt kimutatási eljárásokkal, újabbban a molekuláris módszerek alkalmazásával kapunk részletesebb adatokat.

Hazánkban az A, B és C szerocsoportba sorolható humán rotavírusok közül latex-agglutinációs és ELISA vizsgálatokkal az A csoportba tartozó rotavírusok előfordulását 1984 óta vizsgáljuk. Két főképpen régióbarát - 8 illetve 4 éves vizsgálatosorozat alapján - e kórokozó a GE esetekért 27 és 29 %-ban volt felelős. Az esetismozódás csúcsa minden évben január-március közé esett. Négy G-szerotípus monoklonális ellenanyagokkal történt vizsgálata alapján a G1 típus 81%-ban, a G2 4%-ban, a G3 1%-ban, a G4 pedig 5%-ban fordult elő, de 1%-ban kevert fertőzést is ki lehetett mutatni. Az évi rotavírus szezonokban a G1 szerotípus legtöbbször domináns, de időben és főképpen földrajzilag könlhatóan G2, G4 típusúval is találkozunk. A 11 szegmensekből álló RNS-genom vizsgálatával (electrophoretotyping) 2-3 éves ciklusok észlelhetők egyes törzsek genomszintű analízisének és igazolta több genotípust együttes jelenlétét. Így sikerült két esetben nosocomialis infekciót igazolni, valamint 3 C csoportba tartozó rotavírus beteganyagból kimutatni. A vizsgált mintákban B csoportú rotavírus eddig nem találtunk.

Az első hazai enterális adenovírusok kimutatása és genotípus molekuláris azonosítása 1989-ben sikerült. A négy izolátum mind a 41-es szerotípusba tartozott. Latex-agglutinációs próba, monoklonális savcson alapuló ELISA, "293" sejtenyészeten történt tenyésztés további törzsek kimutatását eredményezte, de 40-es szerotípust eddig nem találtunk. A 41-es típuson belül vizsgált két genotípust eddig nem találtunk. A 41-es típuson belül beteganyagunkban e vírusok a GE megbetegedésekért 3-7%-ban tehető felelőssé. 1993-ban - külföldi segítséggel - (baculovírus expresszálo rendszerben termett Norwalk vírus antigént használva), ELISA módszerrel kísérletük meg a Norwalk vírus hazai előfordulásának igazolását. Az ország négy főképpen régiójából, 13 korszorportból gyűjtött 800 savcson vizsgálatával 61%-os ellenanyagelőfordulást találtak. Az egy éves korban talált 20-30%-os arány 20 éves korra 80%, de 30-40 év között a 90%-ot is elérte. - Újabbban az astrovírusok hazai előfordulásának kimutatására is megteremtődött a lehetőség.

Az említett módszereken túl a PCR technika alkalmazhatóságát, jelentőségét külön is tárgyalják a szerzők. Továbbá rámutatnak, hogy a vírus laboratóriumok együttműködése, a molekuláris módszerek adaptálása, a klinikus, epidemiológus kollégák segítségével biztosítható lehet arra, hogy pár év múlva pontosabb ismereteink legyenek a hazai GE esetekben kóroki szerepet játszó vírusok előfordulásáról és epidemiológiai szerepükről.

^A
MAGYAR MIKROBIOLÓGIAI TÁRSASÁG
valamint a TÁRSASÁG ALAPÍTVÁNYA
1097 Budapest-100, Gyáli út 2-6.

ÁLTAL SZERVEZETT

1994. ÉVI NAGYGYŰLÉS

ELŐADÁSAINAK ÖSSZEFOGLALÓI

KERESKEDELMI ÉS GAZDASÁGI FŐISKOLA
Szolnok, Ady E. út 9.

GY. SZÚCS, D. O. MATSON, M. UJ, E. KUKÁN, I. MIHÁLY, Zs. JELENIK
and M. K. ESTES

Prevalence of rotavirus G serotypes in two regions of Hungary

Baranya County Institute, National Public Health Service, Pécs, Hungary, St. László Hospital for Infectious Diseases, Budapest, Hungary and Division of Molecular Virology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

The first longitudinal serotyping (G typing) data of group A rotaviruses in Hungary are reported. Enzyme immunoassay incorporating neutralizing monoclonal antibodies specific for the VP7 protein of serotypes 1, 2, 3, and 4 were used to determine the antigenic variation of group A rotaviruses in two collections of stool specimens. Of a total of 11 031 samples collected from 1984-1992 in Baranya County and from 1988-1992 from the St. László Hospital for Infectious Diseases in Budapest, 28% and 29% contained rotaviruses, respectively. Ninety-two percent of the 1285 tested samples were typed as G1 (81%), G2 (4%), G3 (1%), and G4 (5%), and mixed type (1%). Serotype G1 was the predominant type during the entire investigated period, with one exception in Baranya County, where a predominance of type G4 was observed in the 1988/1989 rotavirus season. With two year periodicity, serotype G2 circulated in both region, and rotaviruses of type G3 were not revealed in the last two seasons. These first serotyping data from Hungary are compared to those published previously of other European countries (UK, Finland, Italy, and Sweden).