

A humán parechovírusok klinikai jelentősége súlyos újszülött- és csecsemőkori fertőzésekben hazánkban

Boros Akos dr.^{1, 2*} ■ Hamarics Zsófia dr.^{1, 2*} Fenyvesi Hajnalka dr.^{1, 2 ^} Liptai Zoltán dr.^{3 ^} Nyul Zoltán dr.⁴
Pankovics Péter dr.^{1, 2 ^} Reuter Gábor dr.^{1, 2}

¹Allami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat Dél-dunántúli Regionális Intézete, Regionális Virologiai Laboratórium, Gastroenterális Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriuma, Pécs ²Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar, Klinikai Központ, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet, Pécs ³Dél-pesti Centrum Kórház - Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Szent László Kórház Telephely, Gyermekinfektológiai Osztály, Budapest ⁴Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar, Klinikai Központ, Gyermekgyógyászati Klinika, Pécs

Bevezetés: A humán parechovírus (HPeV, *Picornaviridae* víruscsalád) okozta fertőzések többsége tünetmentes, de gyermekeknél hasmenéssel járhatnak. Újabb megfigyelés, hogy a HPeV-ok a csecsemők körében súlyos, központi idegrendszeri megbetegedést és szepszisszerű kórképet is okozhatnak. A HPeV-ok szerepe a hazai klinikumban nem ismert.

Célkitűzés: A HPeV-ok kimutatása, meghatározása gyermekektől származó székletmintákból és a klinikai tünetek elemzése.

Módszer: A HPeV-ok kimutatása és tipizálása a reverz transzkripció-polimeráz-láncreakció és a szekvenálás módszereivel történt három betegcsoportban: A) 10 év alatti kórházban kezelt, n = 75; B) 1 év alatti, n = 237; és C) szisztémás/idegrendszeri tüneteket is mutató hasmenéses gyermekek (<18 év), n = 105 székletmintáiból. *Eredmények:* Az A csoportban 4% (3/75) volt a HPeV-pozitív minták aránya (két HPeV1, egy nem tipizálható HPeV), mind gastroenterális tüneteket mutató csecsemőkből (7-11 hónapos). A B csoportban a HPeV-fertőzések aránya 6,8% (16/237) volt, melyek közül öt HPeV1, hat HPeV3 és öt nem tipizálható HPeV volt. E csoportban a HPeV1-fertőzések többsége (4/5) nem igényelt kórházi ellátást, míg a HPeV3-fertőzéses esetek 83%-a (5/6) igényelte azt. A szisztémás/idegrendszeri tüneteket is mutató betegek közül (C csoport) azonosított HPeV-pozitív minták (4,8%) két genotípusba tartoztak (három HPeV1 és két HPeV3), és mind kórházban kezelt fiatal (<2 hónapos) csecsemőktől származtak.

Következtetés: A HPeV1-fertőzések általában enyhébb lefolyásúak, és ritkábban igényelnek kórházi ellátást. A HPeV1-fertőzés vezető tünete a hasmenés, azonban 1-2 hónapos csecsemőknél idegrendszeri érintettség (aluszékonyság, bágyadtság) is tapasztalható volt. Az újszülöttek körében a HPeV3-megbetegedések gyakoribbak. A súlyos HPeV3-fertőzésre jellemzőek a gastroenterális tünetek (7/8), a >38 °C-os láz (6/7), az étvágytalanság (6/7), az exanthema (4/7), az aluszékonyság/bágyadtság (3/7), a szepszisszerű állapot (3/7) és a légzőszervi tünetek (2/7).
Orv Hetil. 2019; 160(10): 386-395.

Kulcsszavak: humán parechovírus, gastroenteritis, szepszis, újszülött, csecsemő

The clinical significance of severe human parechovirus infections in newborns and infants in Hungary

Introduction: Most human parechovirus (HPeV, family *Picornaviridae*) infections are asymptomatic but may cause gastroenteritis in children. New reports show that HPeVs can be associated with severe central nervous system symptoms and sepsis-like syndromes in infants. The clinical significance of HPeVs in Hungary has not been investigated before.

*A szerzők azonos mértékben járultak hozzá a tanulmány elkészítéséhez.

Aim: The aim of this study was to detect genotype HPeV in faecal samples of children and analysis of the clinical symptoms.

Method: For the detection and genotyping of HPeV strains, reverse transcription-polymerase chain reaction and sequencing methods were used from faecal samples of children with gastroenteritis divided into three groups: group A) hospitalised children younger than 10 years (n = 75); group B) 0-12 months infants (n = 237) and group C) children less than 18 years of age with sepsis-like/neurological symptoms (n = 105) were tested. *Results:* Three HPeV positive samples (3/75, 4%) were found in group A, two of them belong to the HPeV type 1, the third was non-typeable. All positive samples were from infants of 7 to 11 months of age. In group B, HPeV was detected in 6.8% (16/237) of the samples. Five were HPeV1, six were HPeV3 and five were non-typeable. While most of the infants with HPeV1 (4/5) did not require hospitalisation, 83% of the HPeV3 infected infants (5/6) did. Five (4.8%) HPeV strains detected from children less than 18 years of age with

sepsis-like/neurological symptoms (group C) belonged to HPeV1 (three) and HPeV3 (two). All positive samples were from hospitalised infants less than 2 months of age.

Conclusion: HPeV1 infections are less severe in infants than HPeV3 infections. The leading symptom of HPeV1 was diarrhoea, although in infants less than 1-2 months neurological symptoms (somnolence, lassitude) were also present. HPeV3 infections were more common among newborns. The main symptoms of severe HPeV3 infection are: gastroenteritis (7/8), fever >38 °C (6/7), loss of appetite (6/7), rash (4/7), somnolence/lassitude (3/7), sepsis-like syndrome (3/7) and respiratory symptoms (2/7).

Keywords: human parechovirus, gastroenteritis, sepsis, newborns, infants

Rövidítések

ÁNTSZ = Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat; BLAST = Basic Local Alignment Search Tool; CRP = C-reaktív protein; HPeV = humán parechovírus; IC = (immunochroma-tography) immunkromatográfia; MR = (magnetic resonance) mágneses rezonancia; NCBI = (National Center for Biotechnology Information) az Egyesült Államok Nemzeti Biotechnológiai Információs Központja; NoV = norovírus; ORF = (open reading frame) nyílt leolvasási keret; RT-PCR = (reverse transcription-polymerase chain reaction) reverz transzkripció-polimeráz-lánreakció; RV = rotavírus; UTR = (untranslated region) nem kódoló régió; VP = virális protein

Albert Sabin és mtsa ismeretlen etiológiájú csecsemőkori hasmenéses székletmintákból azonosították az első humán parechovírusokat (HPeV) 1956-ban, melyeket akkor még mint ECHO-vírus (enteric cytopathic human orphan) 22 és 23 néven a *Picornaviridae* víruscsalád *Enterovirus* nemzetségébe soroltak [1]. 1999-ben - 43 évvel később -, miután e vírusok teljes genomszekvenciája ismertté vált, helyezték át őket az újonnan létrehozott *Parechovirus* nevű nemzetségbe [2]. A nemzetségbe jelenleg négy faj (*Parechovirus A-D*) tartozik [3], melyek közül a *Parechovirus A*-fajba tartoznak a humán parechovírusok, köztük az ECHO-vírus 22 (ma HPeV1) és 23 (ma HPeV2) is [3]. A HPeV3-at 1999-ben, Japánban, tranziens paralízissel, magas lázzal és hasmenéssel kórházba került 1 éves kislány mintájából azonosították [4]. Azóta a humán parechovírusok további 16, összesen 19 (HPeV1-19) különböző típusát írták le [5]. Ezek közül a különböző molekuláris epidemiológiai vizsgálatok szerint a leggyakrabban előforduló genotípus a HPeV1-es és a HPeV3-as, melyek lokális járványokat is okozhatnak [5-7]. A HPeV1- és HPeV4-genotípusok jelenlétét korábban már hazánkban is igazolták [8, 9].

A HPeV-ok pozitív polaritású, egyszálú RNS-genom-mal rendelkeznek, melynek hossza 7,1-7,3 kilobázis [2]. A genom egy virális poliproteint kódoló nyílt leolvasási keretből (ORF), az 5' és 3' végeken nem kódoló régióból (UTR), valamint a 3' végen poliadeninfarokból épül fel [2]. Az 5'UTR régió a HPeV különböző genotípusaiban erősen konzervatív, ezért a különböző RT-PCR-kban alkalmazott szűrőprimerek célszekvenciáiként alkalmazhatók, azonban az 5'UTR genotípusfüggetlen konzer-vációja miatt genotipizálásra nem használhatók [8, 10]. A virális poliprotein strukturális P1 (kapszid fehérjét kódoló) és nem strukturális P2 és P3 (nem strukturális fehérjét kódoló) részekre osztható [11]. A HPeV viri-onja ikozaéder formájú kapszidját a VP0, VP3 és VP1 kapszid fehérjék alkotják [12]. A kapszid fehérjét kódoló régió variábilis, és az egyes HPeV-genotípusok szekvenciaszintű elkülönítésére (genotipizálás) használhatók [10, 13].

A HPeV-ok világszerte elterjedt kórokozók. Elsősorban széklettel, fekális-orális úton, részben feltehetően a légutakon keresztül terjednek. A családban élő testvérek rizikófaktornak számíthatnak az expozíciónak kitett újszülöttek és csecsemők szempontjából [14]. A testvérek közötti átvitelt más tanulmányok is megerősítik [15, 16]. A humán populációban endémiásan jelen vannak, és az átfertőződés mértéke igen magas. A felnőtt lakosság nagy része, 95%-a szeropozitív HPeV1-re. A legtöbb esetben a fertőződés már 18 hónapos korig megtörténik, a fertőzések csak körülbelül 20%-a történik az első életév betöltése után [13]. A HPeV-ok klinikai jelentőségét az irodalmi adatok alapján korábban már részletesen összefoglaltuk [8, 9]. A HPeV-fertőzés klinikai megjelenése igen változatos lehet. A tünetek súlyossága az aszimptomatikus, szubklinikai formáktól egészen a súlyos, akár halálhoz vezető fertőzésekig terjedhet [5, 17]. A gastro-intestinalis tünetek (például hasmenés) gyakoriak, emellett gyakran tapasztalható láz is („lázás virális fertőzés”). A tünetek súlyossága nagyban függ az életkortól és feltehetőleg a HPeV genotípusától is [2, 5].

A HPeV1-fertőzés általában csecsemő- és kisgyermekkorban enyhébb lefolyású, főleg gastroenteralis, illetve légúti tünetekkel jár, ritka a központi idegrendszert érintő kórkép. Ezzel ellentétben a HPeV3-fertőzés gyakrabban érint újszülötteket, és gyakoribb a hasmenés mellett a súlyos, változatos tünetekkel és akár szepszisszerű képpel jellemezhető lefolyás, valamint a központi idegrendszeri érintettség (meningitis, encephalitis, flaccid para-lízis, görcsrohamok), ritkán akár maradandó idegrendszeri károsodással [5, 17, 18]. Bár a HPeV1- és HPeV4-genotípusok hazai jelenléte archivált szövettényészetekben már korábbról ismert [8, 9], mivel az egyes HPeV-típusok csak típusától függően tenyésztethetők [2], ezek az eredmények nem nyújtanak átfogó képet a hazai HPeV-típusokról. A klinikailag legsúlyosabb fertőzéseket okozó HPeV3 hazai jelenlétét tudomásunk szerint még nem igazolták.

Vizsgálataink során több, különböző korcsoportba tartozó, 18 év alatti gyermekektől származó székletmintákat elemezve arra kerestük a válaszokat, hogy: (i) milyen korcsoportú betegekben fordul elő HPeV-fertőzés hazánkban? (ii) Milyen HPeV-típusok cirkulálnak Magyarországon? (iii) Milyen tünetekkel hozhatók összefüggésbe az azonosított HPeV-típusok? (iv) A tünetek súlyossága, illetve a kórházi kezelés szükségessége alapján milyen korcsoportok a legveszélyeztetettebbek?

(v) A veszélyeztetett korcsoportokba tartozó betegek milyen közös tünetei utalhatnak HPeV-fertőzésre, amelyek elősegíthetik az időbeli és helyes klinikai diagnózis megállapítását? Vizsgálatainkhoz saját tervezésű HPeV-szűrő és -tipizáló primereket, RT-PCR-módszert használtunk, valamint nukleotidszekvencia-elemzést és a klinikai háttér adatok elemzését végeztük el.

Módszer

Vizsgált mintacsoportok

A vizsgált székletmintákat három csoportba soroltuk.

A csoport: A 2011. évben a Dél-Dunántúlon (Baranya, Somogy és Tolna megye) gyűjtött összesen 75, kórházi ellátást igénylő, 10 év alatti gyermektől származó székletminták, melyek diagnosztikus vizsgálatra érkeztek a laboratóriumunkba.

B csoport: A 2015 júliusa és 2016 júniusa között összesen 237, ápolási helytől függetlenül (kórházi vagy otthoni ápolású egyaránt) gyűjtött, 1 év alatti hasmenéses dél-dunántúli (Baranya, Somogy és Tolna megye) gyermekektől származó minta, melyek diagnosztikus vizsgálatra érkeztek a laboratóriumunkba.

C csoport: Enterovirus és/vagy humán parechovírus kimutatására a Baranya Megyei Kormányhivatal Népegészségügyi Főosztályának Mikrobiológiai Laboratóriumába (korábban az ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézete) 2012 és 2018 között beküldött, összesen 105, szisztémás/idegrendszeri tüneteket is mutató, 18 év alatti betegektől származó székletminta. A minták a déldunántúli régióból, illetve a budapesti Szent László Kórház beteganyagából származtak.

A három csoportba tartozó gyermekek egyike esetében sem lehetett a betegellátás során a különböző diagnosztikus célokra vett mintákból (széklet és/vagy vér, liquor) rutin enterális bakteriológiai és parazitológiai vizsgálatokkal kórokozót kimutatni. A három csoport székletmintáit a vizsgálatok kezdetéig -20 °C-on tároltuk.

I. táblázat A humán parechovírusok (HPeV) kimutatására (szűrés) és tipizálására (tipizálás), valamint a norovírus (NoV)-társfertőzés azonosítására használt oli- gonukleotid primerek listája. #: A termék mérete a HPeV-5'UTR-Fgen primerrel közös RT-PCR-ra vonatkozik				
A primer neve	Szekvencia (5'-3')	Felhasználás (RT-PCR)	A termék mérete	Referencia
HPeV-SUTR-Rgen			3S1 bp	-
HPeV-SUTR-Fgen				-
HPeV-VPO-Rgen			960 bp#	-
HPeV-VP3-Rgen			968 bp	-
HPeV-VP3-Fgen				-
HPeV-VP1-Rgen			780 bp	-
HPeV-VP1-Fgen				-
NoV-JV13I-R			289 bp	[20]
NoV-JV12Y-F				[20]
RT-PCR = reverz transzkripció-polimeráz-lánreakció; VP = virális protein				

Molekuláris diagnosztika, HPeV-tipizálás és filogenetikai analízis

A HPeV-ok kimutatása RT-PCR-módszerrel történt. A kimutatási reakciókhoz egy új, a vírusnak a genotípustól függetlenül konzervatív 5'UTR régiójához kötődő szűrő primerpárt (HPeV-5'UTR-R/F, *1. táblázat*) terveztünk, amely alkalmas lehet az eddig azonosított összes HPeV-genotípus kimutatására, azonban genotipizálásra nem. A szűrő primerpárral azonosított HPeV-törzsek tipizáló RT-PCR-iban a kapszidrégió különböző részeire (VP0, VP3 és VP1) tervezett erősen degenerált tipizáló primerpárokat használtunk (*1. táblázat*). A kapott PCR-termékeket mindkét irányból direkt módon szekvenáltuk, melyhez BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit-et (Applied Biosystems, Warrington, Egyesült Királyság) és automata szekvenátort használtunk (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, Egyesült Államok). A kapott szekvenciaadatok közül a filogenetikai vizsgálatokhoz használt 17 VP3- és 6 VP1-szekvenciát a GenBank-adatbázisba helyeztük el (VP3-szekvenciák: MH845197-MH845213, VP1-szekvenciák: MH845214-MH845219).

A HPeV-tipizálási RT-PCR-k PCR-termékeinek szek-venálásával kapott szekvenciákat GeneDoc ver. 2.7. programmal, illetve az NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST-programcsaládjával (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) elemeztük. A kimutatott HPeV-törzsek tipizálásakor a BLAST-fut-tatások találati listájából a legmagasabb szekvenciaegyezést és a legalacsonyabb E-értéket mutató HPeV-genotípust vettük figyelembe. A HPeV VP3- és VP1-régióinak filogenetikai elemzéséhez a referenciaszekvenciákat a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) adatbázisából öltöttük le. A filogenetikai fák elkészítéséhez a MEGA v7.0 programot használtuk [19]. A HPeV-positív mintákon a rotavírus és az enterális adenovírus kimutatását immunkromatográfiás (IC) gyorseszttel (CerTest, BioTech, Spanyolország), míg a norovírus-társfertőzés kimutatását általános szűrőprimerekkel (*1. táblázat*) [20] és RT-PCR-módszerrel vizsgáltuk.

2. táblázat: A különböző humán parechovírusok (HPeV) szűrő (5'UTR oszlop) és tipizáló (VP3, VP1 és VP0 oszlopok) RT-PCR-k eredményei, a kimutatott HPeV genotípusai (Típus oszlop), valamint a társfertőzéses vizsgálatok eredményei (Rotavírus, Adenovírus és Norovírus oszlopok). n.v.: nem végzett vizsgálat (VP0 RT-PCR-t csak akkor végeztünk, ha az adott mintából nem kaptunk pozitív RT-PCR-eredményt a VP3 és/vagy VP1 HPeV-tipizáló primerekkel). A mintaazonosító első betűje a mintacsoportra utal. A mintavétel ideje és az ország rövidítése (év/hónap/HUN) a mintaazonosító végén található

Mintacsoport	Mintaazonosító	5'UTR	VP3	VP1	VP0	Típus	Rotavírus	Adenovírus	Norovírus
A csoport	A-524-2011/01/HUN	+	+	-	n.v.	HPeV1	-	-	-
	A-478-2011/01/HUN	+	-	-	-	HPeV?	-	-	+
	A-77141-2011/09/HUN	+	+	+	n.v.	HPeV1	-	-	-
B csoport	B-1885-2015/07/HUN	+	-	-	-	HPeV?	-	-	-

B-414-2016/01/HUN	Fiú, 5 hónap	Kórházi	HPeV1	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B-6167-2015/09/HUN	Fiú, 5 hónap	Otthoni	HPeV? (RV+)	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B-3539-2015/11/HUN	Leány, 6 hónap	Otthoni	HPeV1	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B-176-2016/01/HUN	Fiú, 6 hónap	Otthoni	HPeV3	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Véres széklet
A-77141-2011/09/HUN	Leány, 7 hónap	Kórházi	HPeV1	+	+	-	-	-	+	Hepatomegalia, hányás
B-4048-2015/10/HUN	Fiú, 8 hónap	Kórházi	HPeV3	+	+	+	-	-	+	-
B-1746-2015/08/HUN	Fiú, 9 hónap	Kórházi	HPeV3	+	-	+	+	-	+	-
B-578-2016/02/HUN	Leány, 10 hónap	Kórházi	HPeV? (NoV+)	+	+	-	-	-	-	Elülső garatíven hólyagocsák
A-524-2011/01/HUN	Fiú, 11 hónap	Kórházi	HPeV1	+	-	-	-	-	+	Hepatomegalia, hányás, invaginatio
A-478-2011/01/HUN	Leány, 11 hónap	Kórházi	HPeV? (NoV+)	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B-0569-2015/12/HUN	Fiú, 12 hónap	Otthoni	HPeV1	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Eredmények

A csoport

A 2011-ben gyűjtött összesen 75, kórházi ellátást igénylő dél-dunántúli, 10 év alatti gyermek mintájából N = 3 volt HPeV-pozitív az alkalmazott 5'UTR-szűrő RT-PCR-módszerrel, mely 4%-os HPeV-kimutatási arányt jelent. A tipizálási RT-PCR-kban kapott részleges VP3-és/vagy VP1-kapszidszekvenciák BLAST-analízise alapján kettő az egyes típusú HPeV-ok közé tartozott (HPeV1, N = 2), a harmadik törzs pedig egyik tipizáló primerpárral sem adott PCR-terméket, ezért nem volt tipizálható (HPeV?, N = 1). Norovírus-társfertőzést egy esetben, a nem tipizálható HPeV-fertőzött betegnél találtunk (2. táblázat). Mindhárom HPeV-pozitív minta 7-11 hónap közötti életkorú csecsemőktől származott (3. táblázat), ezért ennek alapján további vizsgálatainkat az egy év alatti újszülöttek és csecsemők csoportjára szűkítettük le.

B csoport

Ápolási helytől függetlenül (kórházi vagy otthoni ápolá-sú egyaránt), 1 év alatti hasmenéses dél-dunántúli gyermekektől származó összesen 237 minta közül 16 HPeV-pozitív mintát találtunk, ami 6,8%-os HPeV-előfordulást jelent. A pozitív minták közül hat a hármastípusúhoz (HPeV3, N = 6), öt az egyeshez tartozott (HPeV1, N = 5), öt törzset pedig nem tudtunk a rendelkezésünkre álló primerekkel tipizálni. Kórházi kezelésre a HPeV3-mal fertőzött csecsemőknél hatból öt esetben (!), míg az egyes genotípussal fertőzött öt esetből csupán egyben volt szükség. Társfertőzést két esetben találtunk, mindkét esetben nem tipizálható HPeV-fertőzés mellé társult no-rovírus- vagy rotavírusfertőzés (2. táblázat).

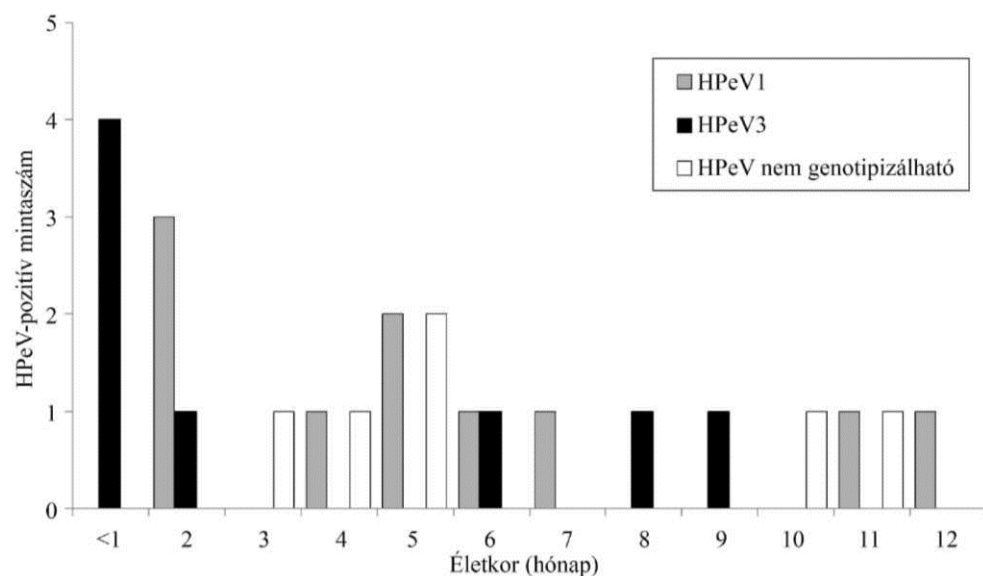
C csoport

Az idegrendszeri és/vagy szisztémás tüneteket mutató 18 év alatti betegektől származó 105 minta közül N = 5 (4,8%) bizonyult HPeV-pozitívnak. A HPeV-törzsek közül kettő a hármastípusúhoz (HPeV3, N = 2), három pedig az egyes típusúhoz tartozott (HPeV1, N = 3), tipizálatlan törzs ebben a mintacsoportban nem volt (2. táblázat). Mind az öt pozitív minta 2 hónapos vagy fiatalabb csecsemőktől származott (3. táblázat). A HPeV1-es genotípussal fertőzötteknél 2 hónapos, a HPeV3-as genotípus esetében 1 hónapos kor alatti csecsemők voltak érintettek (3. táblázat). Rotavírus-társfertőzést egy intenzív osztályos ellátást igénylő HPeV1-fertőzött csecsemőnél találtunk (2. táblázat).

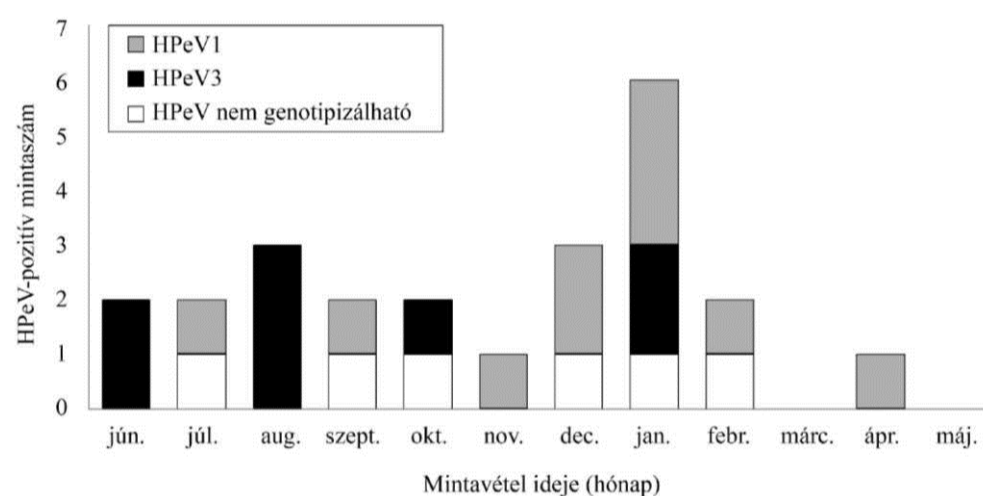
Nem-, koreloszlás és szezonális

A HPeV-sal fertőzött betegek korcsoporteloszlásának elemzése azt mutatta, hogy az összes pozitív minta 1 év alatti gyermekektől származott (1. ábra, 3. táblázat). Az 1 hónapos kor alatti csecsemők körében csak HPeV3 volt kimutatható (N = 4), amelyeknél minden esetben intenzív osztályos kezelés volt szükséges (1. ábra, 3. táblázat). A HPeV-pozitivitás nemek közötti eloszlása nem mutatott szignifikáns különbséget: HPeV1: fiú N = 6, leány N = 4; HPeV3: fiú N = 4, leány N = 4; összes HPeV: fiú N = 13, leány N = 11 (3. táblázat). Míg a HPeV3 esetében a

vizsgált mintacsoportokban nem lehetett szezonalitást megfigyelni, addig a HPeV1-esetek enyhe halmozódását tapasztaltuk a téli hónapokban (2. ábra). Érdekesként jegyzendő meg, hogy összesen egy HPeV-pozitív esetet azonosítottunk a tavaszi időszakból származó mintákból (2. ábra).



1. ábra: A három vizsgálati csoportból (A, B és C) azonosított HPeV-genotípusok



2. ábra: A HPeV-ok szezonális eloszlása a mintavétel ideje szerint

A HPeV-pozitív betegek főbb tünetei

Az összesen nyolc (B csoport N = 6; C csoport N = 2) HPeV3-fertőzésre a legjellemzőbb tünet a hasmenés volt (7/8 esetben). Megjegyzés: Az egyik otthoni ápolású HPeV3-pozitív beteg (B-176-2016/01/HUN, 3. táblázat) klinikai tünetei közül a hasmenésen kívül nem áll rendelkezésünkre további adat, ezért a hasmenésen kívüli tünetek elemzésekor ezt a beteget nem vettük figyelembe. A gastroenteralis tünetek mellett a HPeV3-fertőzéses esetekre jellemző volt a láz (>38 °C, 6/7 esetben), az étvágytalanság (6/7 esetben), az exanthema (4/7 esetben), a központi idegrendszeri érintettség (például aluszékonyság, bágyadság, 3/7 esetben), a szep-szisszerű állapot (3/7) és ritkábban a légzőszervi (köhögés/orrfolyás és/vagy hyperaemiás torok, 2/7 esetben) tünetek (3. táblázat). A 2 hónapos csecsemők között előforduló HPeV1-fertőzés esetén a hasmenés mellett súlyosabb tünetek is megjelentek, mint például a sárgaság vagy az aluszékonyság (3. táblázat). Megjegyzendő az is, hogy a máj rendellenességére utaló jelek (hepato-megalia és icterus) többször megfigyelhetők voltak mind a HPeV1- (3 esetben), mind a HPeV3- (2 esetben) fertőzött csecsemők körében (3. táblázat).

A hazai humán parechovírusok szekvencia-és filogenetikai elemzése

A BLASTn-analízis eredményei alapján a tipizálási RT-PCR-kban kapott, összesen 17 részleges VP3-szekvencia közül 9 a GenBank-ban található HPeV1- (91-98%-os nukleotid- [nt] egyezés), míg 8 a HPeV3-törzsekkel (98-99%-os nt-egyezés) mutatta a legmagasabb szekvenciaegyezést. Az összesen meghatározott 6 részleges VP1-szekvencia közül 5 a GenBank-ban található HPeV1- (96-98%-os nt-egyezés), míg 1 a HPeV3-törzsekkel (98%-os nt-egyezés) mutatta a legmagasabb szekvenciaegyezést.

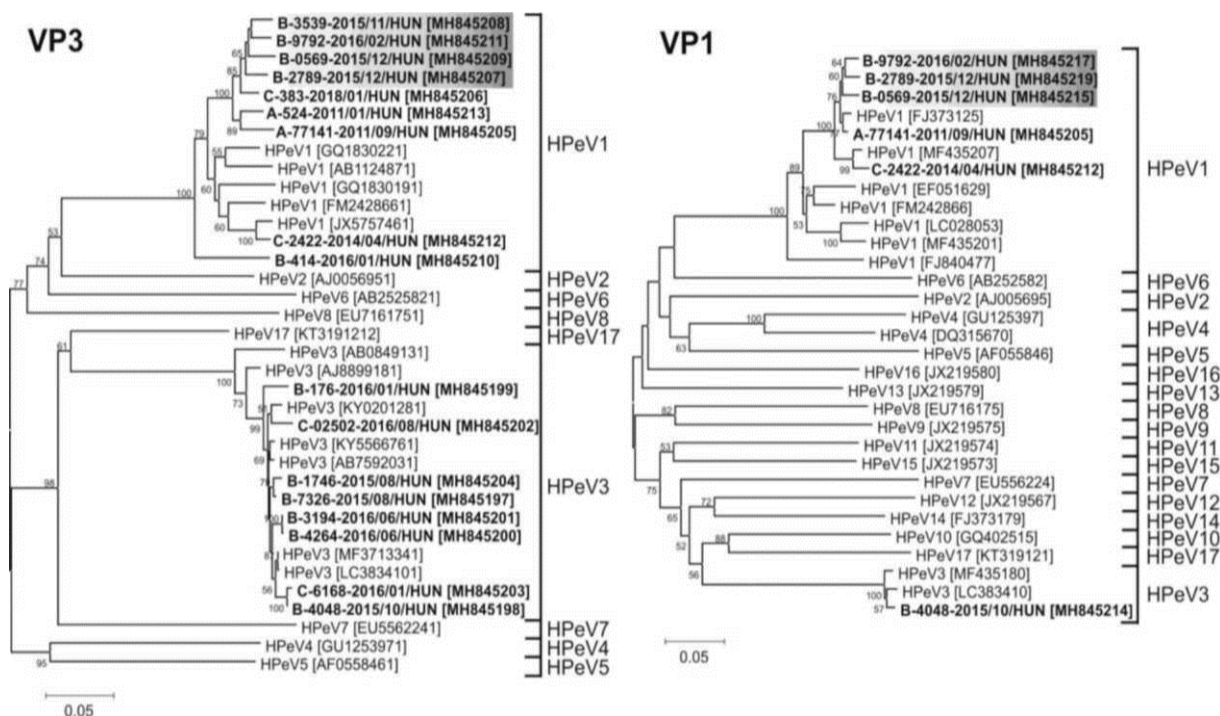
A VP3- és VP1-nukleotidszekvenciák filogenetikai elemzése alátámasztotta a BLAST-analízisen alapuló HPeV-tipizálást (3. ábra). A hazai HPeV1- és HPeV3-törzsek több különböző filogenetikai ágon helyezkednek el, ami azt mutatja, hogy egy adott időszakban különféle leszármazási vonalhoz tartozó HPeV1- és HPeV3-törzsek is cirkuláltak egyidejűleg Magyarországon (3. ábra). Kiemelendő a 2015 novembere

és 2016 februárja között gyűjtött mintákból kimutatott HPeV1-törzsek közeli genetikai rokonsága, ami esethalmozódásra/járványra utalhat (3. ábra).

Megbeszélés

Összesen 417, ismeretlen etiológiájú megbetegedésben szenvedő, három mintacsoportba tartozó (10 év alatti, kórházban kezelt; 1 év alatti, ápolási helytől független; és 18 év alatti, idegrendszeri/szisztémás tüneteket mutató) hazai betegből származó székletmintát vizsgáltunk humán parechovírus kimutatása és tipizálása céljából.

A vizsgált minták között összesen 24 HPeV-pozitív mintát azonosítottunk. A HPeV-pozitív minták aránya 4% (A csoport) és 6,8% (B csoport) között változott, ami összhangban áll az irodalomban található előfordulási arányokkal a hasonló betegcsoportokban [4, 21, 22]. A 24 HPeV-törzsből 18 (75%) esetben sikerült általános VP0-, VP1- és/vagy VP3-primerpárokkal a genotípust meghatározni. Szekvencia-összehasonlítási és filogenetikai elemzésekkel összesen két HPeV-genotípust (HPeV1 és HPeV3) tudtunk azonosítani, melyek irodalmi adatok



3. ábra: A hazai HPeV-törzsek filogenetikai elemzése. Vizsgálataink során azonosított részleges VP3- (894 nt) és VP1- (687 nt) nukleotidszekvenciákból (vastag betűk) és a HPeV-referenciaszekvenciákból készült filogenetikai fák 'neighbor joining' módszerrel és Jukes-Cantor-modell felhasználásával (bootstrap ismétlések száma: 1000) készültek MEGA 7.0 programmal. A mintaazonosító első betűje a mintacsoportra utal. A mintavétel ideje és az ország rövidítése (év/hónap/HUN) a mintaazonosító végén található. A GenBank-azonosítószámok szögletes zárójelben vannak. A szürke kiemelés a 2015 novemberre és 2016 februárja között gyűjtött mintákból azonosított, filogenetikailag közeli rokonságot mutató HPeV1-törzseket jelzi HPeV = humán parechovírus; VP = virális protein

alapján is a leggyakrabban kimutatható genotípusok a humán populációkban [2, 5, 7]. A HPeV3-at először sikerült hazánkban leírni. Bár az eddig ismert 19 HPeV-genotípusból hazánkban már a HPeV1 mellett a HPeV4-et is kimutatta munkacsoportunk [8, 9], a jelen tanulmányban az egyéb HPeV-típusok hiánya talán az alacsony mintaszámnak köszönhető. Bár az általunk alkalmazott 5'UTR-szűrő és VP1- és VP3-tipizáló primer-párok elméletileg képesek az összes, ismert genommal rendelkező HPeV-genotípus, köztük a HPeV4 kimutatására is, irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy más genotípusokat is ritkábban azonosítanak [5, 7]. A tipizálatlan HPeV-törzsek között elméletileg új típus(ok) is előfordulhatnak, bár a tipizálási reakciók sikertelenségének hátterében a vírus alacsony kópiaszáma a mintában vagy a tipizáló primerpárok tapadási helyének eltérő nukleotidszekvenciái is állhatnak.

A kimutatott HPeV-ok VP3-as és VP1-es kapszid-nukleotidszekvenciákon alapuló filogenetikai vizsgálatai, részben az adott genotípuson belül, különböző filogenetikai ághoz/altípushoz tartozó HPeV1- és HPeV3-vírustörzsek kocirkulációjára utalnak hazánkban. Ugyanakkor a filogenetikailag igen közeli rokonságot mutató HPeV1-törzsek - retrospektívan - egy esetleges, 2015 novemberre és 2016 februárja között lezajlott dél-dunántúli HPeV1-es esethalmozódásra/járványra is utalhatnak. A HPeV1 járványokozó képességére vannak nemzetközi irodalmi adatok [5-7], eddigi ismereteink szerint azonban a feltárt HPeV1-es esethalmozódás az első magyarországi dokumentált HPeV1-járvány lehet.

Az egyes HPeV-típusok szezonálisáról csak ellentmondó irodalmi adatok állnak rendelkezésre. A HPeV1 esetében vagy nem volt kimutatható évszak-preferencia, vagy tavaszi/nyári (például Anglia), nyári/őszi szezonálitást (például Egyesült Államok), vagy éppen a tavaszi/nyári időszak alacsony HPeV1-előfordulását (például Hollandia) találták [5-7, 18, 21]. A hollandiai HPeV-előforduláshoz hasonlóan [7] a mi vizsgálatainkban is csak a HPeV1 esetén találtunk enyhe pozitívmintaszámemelkedést a téli időszakban.

A HPeV-fertőzés és a gastrointestinalis tünetek megjelenése közötti ok-okozati kapcsolat nem mindig bizonyítható egyértelműen [2], és ez fokozottan igaz, ha a HPeV-on kívül más ismert, heveny gastroenteritist okozó vírus is jelen van a mintában. A HPeV jelenléte azonban a gyermekkori hasmenéses esetekben más gastroenteralis kórokozó mikroba hiánya esetén kórjelző lehet. Különösen fontos ez a megállapítás a HPeV3-fertőzésekre a csecsemőkori idegrendszeri és/vagy szisztémás megbetegedésekben, amelyeknél viszont a HPeV3 kimutatása ezekben a kórképekben diagnosztikus értékű lehet [10, 23]. Virális társfertőzést összesen négy esetben mutattunk ki. Két esetben HPeV/norovírus és további két esetben HPeV/rotavírus társfertőzést azonosítottunk. Kórházi kezelésre a társfertőzések háromnegyedében volt szükség, ami a társfertőzések súlyosabb lefolyására utalhat.

Vizsgálataink során a HPeV-fertőzések genotípustól függetlenül kizárólag az 1 év alatti gyermekeket érintették. Ez hasonló más irodalmi adatokhoz, amelyeknél a sporadikus esetektől és a HPeV3-járványtól eltekintve a klinikai tünetekkel járó HPeV-fertőzések többsége (~73%-a) az 1 év alatti csecsemőkorban jelentkezett [2, 8, 9, 24]. Míg a hazai HPeV1-fertőzött csecsemők átlagéletkora 5,6 hónap (2-12 hónap), addig a HPeV3-positívak átlagéletkora kevesebb, 4,1 hónap (<1-9 hónap) volt, ami összhangban van a HPeV1 és HPeV3 eltérő életkori előfordulásával [2, 5].

A vizsgált mintacsoportokban a HPeV3 a leggyakrabban az újszülöttkorban (1 hónapos kor alatt) okozott megbetegedéseket. Ezzel szemben a HPeV1-fertőzések inkább 4 hónapos kor felett mutattak halmozódást. Az azonosított újszülöttkori HPeV3-fertőzések mindegyike kórházi, ezen belül is intenzív osztályos kezelést tett szükségessé. Hasonlóan súlyosabb kórképek jelentkeztek azokban az esetekben, amikor a HPeV1 igen fiatal korban (<2 hónap) okozott fertőzést.

A későbbi életkorban (>4 hónap) okozott fertőzések a HPeV1 esetében ritkábban (3/7 esetben, 43%), a HPeV3 esetében azonban gyakrabban (2/3 esetben, 67%) igényeltek kórházi kezelést. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a HPeV-fertőzések, kiváltképp a HPeV3-fertőzések gyakoribbak és súlyosabb lefolyásúak (akár intenzív osztályos ellátást igénylő) újszülött- és korai csecsemőkorban (<2 hónap), így ezt a korcsoportot tekinthetjük a legvesélyeztetettebbnek, amelyben a HPeV3 esetleges jelenléte a vírus kóroki szerepére és az eset súlyosságára is utalhat. Egy 2015-ben megjelent japán tanulmány azt mutatja, hogy összefüggés van az anyai HPeV-átvételtség (anyai HPeV-ellenanyagok jelenléte vagy hiánya) és az újszülöttek/csecsemők HPeV-tünetekkel járó megbetegedései között. Az anyai HPeV3-ellenanyagok jelenléte csökkenti a súlyos kimenetelű újszülöttkori HPeV3-fertőzés veszélyét, éppen ezért felmerül az intravénás immunglobulin (IVIG)-kezelés a súlyos HPeV-fertőzések esetében [25, 26].

A rendelkezésünkre álló adatok alapján a változó súlyosságú gastroenteralis tünetek voltak a leggyakoribbak, amelyek típustól függetlenül szinte bármely HPeV-fertőzésnél jelen voltak. Ezt az eredményt azonban feltehetően a mintaszelekció is befolyásolta. A HPeV-fertőzött csecsemőknél hányás nélküli enyhe hasmenést (HPeV1), illetve akár napi többszöri (~15x) hasmenéssel és hányással (3x) járó eseteket (HPeV3) is találtunk. A betegek epidemiológiai adataiból az is kiderült, hogy mind az újszülöttkorban és korai csecsemőkorban (<2 hónap), mind pedig a későbbi csecsemőkorban (8-9 hónap) a HPeV3-fertőzésekre jellemző a gastroenteralis tünetek mellett megjelenő, lázzal, étvágytalansággal, kiütésekkel vagy akár központi idegrendszeri, illetve légzőszervi tünetekkel járó változatos klinikai kép. Ha azonban a HPeV1 a korai életkorban okoz fertőzést, akkor a kórházi ellátást igénylő hasmenés mellett súlyosabb tünetek is jelentkeztek, mint a sárgaság vagy az aluszékonyság. Feltehetően az ismeretlen eredetű gyermekkori, lázas virális fertőzések körében - gastroenteralis tünetek nélkül - a HPeV-fertőzéseknek további szerepük lehet. Vizsgálatunkban az eszközös (például MR, echokardiográfia stb.), kémiai laboratóriumi (például süllyedés, CRP, vércép stb.), illetve az egyéb kiegészítő vizsgálatok eredményeire és jellegzetességeire nem térhettünk ki, mert ezek az adatok nem álltak a rendelkezésünkre az adatvédelmi szabályok miatt. Vizsgálataink hazánkban elsőként írják le és finomítják a HPeV-fertőzések klinikumát, de a HPeV-ok okozta klinikai kórképek spektruma minden bizonnyal még nem teljesen feltárt. Érdeemes lenne a súlyos HPeV-fertőzött újszülöttek nyomon követése is az esetleges későbbi maradványtünetek feltárása érdekében.

Bár a HPeV-ok már több mint 60 éve ismertek, csak a közelmúlt molekuláris virológiai tanulmányai tárják fel e vírusok sokszínűségét és szerepét az egyes emberi fertőző megbetegedésekben [2, 5, 6, 13, 18]. Természetesen még számos megválaszolatlan kérdés felmerül a HPeV-okkal kapcsolatban, de már a meglévő ismeretek is elégségesek arra, hogy a klinikusok (elsősorban az újszülött-, csecsemő- és gyermekorvosok) figyelmét felhívjuk a HPeV-ok okozta kórképekre, a fertőzés jellegzetességeire és a differenciáldiagnosztika fontosságára, mely a kezelést (például antibiotikum adása vagy elhagyása szépszisszerű kórképben) is befolyásolja. Csecsemő-, de különösen újszülöttkorban, amennyiben a gastrointestinalis tünetek mellett láz, étvágytalanság, aluszékonyság, exanthema, légzőszervi tünetek, valamint megmagyarázhatatlan szépszisszerű állapot, esetleg súlyos központi idegrendszeri elváltozások is jelentkeznek, a klinikai gyakorlatban (különösen, ha más ismert kórokozó jelenléte kizárható) gondoljunk a humán parechovírusfertőzés lehetőségére is.

Anyagi támogatás: A munka az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok OTKA/NKFIH K111615. számú pályázatának anyagi támogatásával készült. B. Á. és P. P. az MTA Bolyai János Kutatói Ösztöndíj támogatásában részesül.

Szerzői munkamegosztás: B. Á., R. G.: A vizsgálat megtervezése és irányítása. B. Á., H. Zs., R. G.: A közlemény megírása. H. Zs., B. Á., P. P., F. H.: A laboratóriumi vizsgálatok kivitelezése. B. Á., H. Zs., F. H.: A vizsgálati eredmények elemzése. L. Z., Ny. Z.: Mintaküldés és a klinikai háttér adatok összegyűjtése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekeltségek: A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik. **Irodalom**

- [1] Wigand R, Sabin AB. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1961; 11: 224-247.
- [2] Harvala H, Simmonds P. Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. *J Clin Virol.* 2009; 45: 1-9.
- [3] Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Picornaviridae*. *J Gen Virol.* 2017; 98: 2421-2422.
- [4] Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, et al. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol.* 2004; 85: 391-398.
- [5] Olijve L, Jennings L, Walls T. Human parechovirus: an increasingly recognized cause of sepsis-like illness in young infants. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31: e00047-17.
- [6] van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, et al. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2884-2889.
- [7] Benschop K, Thomas X, Serpenti C, et al. High prevalence of human Parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 3965-3970.
- [8] Boros Á, Új M, Pankovics P, et al. Detection and characterization of human parechoviruses in archived cell cultures, in Hungary. *J Clin Virol.* 2010; 47: 379-381.
- [9] Reuter G, Új M, Pankovics P, et al. Clinical significance and the first identification of human parechoviruses in Hungary. [A humán parechovírusok klinikai jelentősége és első hazai azonosítása.] *Orv Hetil.* 2011; 152: 1007-1012. [Hungarian]
- [10] Romero JR, Selvarangan R. The human Parechoviruses: an overview. *Adv Pediatr.* 2011; 58: 65-85.
- [11] Palmenberg A, Neubauer D, Skern T. Chapter 1. Genome organization and encoded proteins. In: Ehrenfeld E, Domingo E, Roos RP. (eds.) *The Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, 2010; pp. 3-17.
- [12] Kalynych S, Pálková L, Plevka P. The structure of human pare-chovirus 1 reveals an association of the RNA genome with the capsid. *J Virol.* 2016; 90: 1377-1386.
- [13] Harvala H, Robertson I, McWilliam Leitch EC, et al. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 3446-3453.
- [14] Aizawa Y, Yamanaka T, Watanabe K, et al. Asymptomatic children might transmit human parechovirus type 3 to neonates and young infants. *J Clin Virol.* 2015; 70: 105-108.
- [15] Yun Z, Ekwall J, Jerkérus SF, et al. A case of intrafamilial human parechovirus type 3 infections resulting in sepsis-like illness in a neonate but hand, foot and mouth disease in an elder sibling. *J Clin Virol.* 2015; 70(Suppl 1): S62-S63.
- [16] Nielsen NM, Midgley SE, Nielsen ACY, et al. Severe human parechovirus infections in infants and the role of older siblings. *Am J Epidemiol.* 2016; 183: 664-670.
- [17] Wildenbeest JG, Benschop KS, Minnaar RP, et al. Clinical relevance of positive human parechovirus type 1 and 3 PCR in stool samples. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: O640-O647.
- [18] Ferreras Antolín L, Kadambari S, Braccio S, et al. Increased detection of human parechovirus infection in infants in England during 2016: epidemiology and clinical characteristics. *Arch Dis Child.* 2018; 103: 1061-1066.
- [19] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33: 1870-1874.
- [20] Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol.* 2002; 25: 233-235.
- [21] Fischer TK, Midgley S, Dalgaard C, et al. Human parechovirus infection, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 83-87.
- [22] Kolehmainen P, Oikarinen S, Koskiniemi M, et al. Human pare-choviruses are frequently detected in stool of healthy Finnish children. *J Clin Virol.* 2012; 54: 156-161.
- [23] Walters B, Peñaranda S, Nix WA, et al. Detection of human parechovirus (HPeV)-3 in spinal fluid specimens from pediatric patients in the Chicago area. *J Clin Virol.* 2011; 52: 187-191.
- [24] Mizuta K, Kuroda M, Kurimura M, et al. Epidemic myalgia in adults associated with human parechovirus type 3 infection, Yamagata, Japan, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1787-1793.

- [25] Aizawa Y, Watanabe K, Oishi T, et al. Role of maternal antibodies in infants with severe diseases related to human parechovirus type 3. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 1966-1972.
- [26] Wildenbeest JG, Wolthers KC, Straver B, et al. Successful IVIG treatment of human parechovirus-associated dilated cardiomyopathy in an infant. *Pediatrics* 2013; 132: e243-e247.