

BÉNULÁST OKOZÓ POLIOVÍRUS 3 IZOLÁTUMOK MOLEKULÁRIS GENETIKAI
VIZSGÁLATA, VALAMINT A HUMÁN NON-POLIO ENTEROVÍRUSOK
MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLÓGIÁJA MAGYARORSZÁGON

Kapusinszky Beatrix



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Dr. Erdei Anna, Ph.D., D.Sc., tanszékvezető egyetemi tanár,
az MTA levelező tagja

Elméleti és evolúciobiológia

Doktori Program

Programvezető: Prof. Dr. Szathmáry Eörs, Ph.D., egyetemi tanár

Témavezető: Prof. Dr. med. habil. Berencsi György, Ph.D., egyetemi magántanár,
szaktanácsadó főorvos

Készült: Országos Epidemiológiai Központ, Virologiai Főosztály

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Az enterovírusok rendszertani besorolása	8
2.2. A humán enterovírusok biológiai tulajdonságai	12
2.2.1. A virion szerkezete.....	12
2.2.2. Az enterovírus ciklus molekuláris biológiája.....	14
2.2.2.1. A genetikai állomány (genom) szerveződése.....	14
2.2.2.2. A transzláció iniciációja.....	16
2.2.2.3. A vírus RNS IRES elem szerkezete és funkciója.....	17
2.2.2.4. A vírus RNS szintézise.....	19
2.2.2.5. Az enterovírus genom változékonysága és evolúciója.....	20
2.3. Víruskölcönhatások	23
2.4. A humán enterovírusok kórokozó képessége és epidemiológiája	24
2.5. Az enterovírus fertőzések laboratóriumi diagnosztikája	29
2.6. A poliomyelitis elleni megelőző védőoltások	31
2.6.1. Inaktivált és attenuált poliovírus vakcinák.....	31
2.6.2. Poliovírus 3 (Sabin) vakcinatörzsek attenuációjának molekuláris alapjai.....	33
2.6.3. Poliovírus elleni védőoltások alkalmazása Magyarországon napjainkig.....	34
2.7. A vakcina eredetű poliovírusok csoportjai	36
2.8. Oltási poliomyelitis (VAPP)	37
3. CÉLKITŰZÉSEK	41
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	42
4.1. Vizsgálati anyagok	42
4.1.1. Poliovírus vizsgálati anyagok.....	42
4.1.2. Non-polio enterovírus vizsgálati anyagok.....	42
4.2. Módszerek	43
4.2.1. Vizsgálati minták feldolgozása.....	43
4.2.2. Vírusizolálás.....	44
4.2.3. A nukleinsav-kivonás módszerei.....	44
4.2.4. Az enterovírus 5'-NTR nested RT-PCR és kimutatás.....	45
4.2.5. Poliovírusok intratípusos differenciációja RT-PCR-rel és kimutatás.....	47
4.2.6. Poliovírus VP1 RT-PCR és nukletidsorrend meghatározás.....	49
4.2.7. Multiplex RT-PCR módszer a poliovírus rekombinánsok kimutatására.....	51
4.2.8. Pan-enterovírus VP1 seminested RT-PCR reakció és kimutatás.....	52
4.2.9. Poliovírus 5'-NTR, non-polio enterovírus 5'-NTR és VP1 régió nukleotidsorrend vizsgálata.....	54
4.3. A nukleotidsorrend-feldolgozás számítógépes módszerei	55
4.3.1. Filogenetikai elemzés.....	56
4.3.2. Az 5'-NTR nem-leolvasott régió RNS másodlagos szerkezetének becslése.....	56
4.3.3. Az 5'-NTR nem-leolvasott régió RNS másodlagos szerkezetének számítása.....	56
4.3.4. Aminosavsorrend elemzése.....	56
5. EREDMÉNYEK	57
5.1. A poliovírus 3 izolátumok molekuláris vizsgálata	57
5.1.1 A poliovírus intratípusos differenciáció RT-PCR eredménye.....	57

5.1.2. A poliovírus 3 izolátumok múltbéli virológiai és epidemiológiai adatainak eredménye.....	57
5.1.3. A poliovírus 3-as típus VP1 régiójának vizsgálata.....	59
5.1.4. A poliovírus rekombináns multiplex RT-PCR eredménye.....	62
5.1.5. A poliovírus 3-as típus 5'-NTR régió nukleotidsorrend vizsgálata.....	62
5.1.6. A poliovírus 3-as típus RNS másodlagos szerkezetének vizsgálata az 5'-NTR régióban.....	63
5.2. A non-polio enterovírusok kimutatása és a molekuláris tipizálás eredménye az 5'-NTR és a VP1 régióban.....	65
5.3. Az molekuláris módszerrel tipizált non-polio enterovírusok klinikai, epidemiológiai és filogenetikai eredményei.....	66
5.3.1. Coxsackie A16 okozta megbetegedések klinikai és epidemiológiai vizsgálata.66	66
5.3.2. A coxsackie A16 filogenetikai vizsgálata.....	69
5.3.3. A coxsackie A16 vírus RNS 5'-NTR másodlagos szerkezete.....	72
5.3.4. Az enterovírus 71 és echovírus 30 okozta megbetegedések klinikai és epidemiológiai vizsgálata.....	73
5.3.5. Az enterovírus 71 filogenetikai vizsgálata az 5'-NTR és VP1 régióban.....	74
5.3.6. Az enterovírus 71 RNS 5'-NTR másodlagos szerkezete.....	78
5.3.7. Az echovírus 30 törzsek filogenetikai vizsgálata.....	79
6. MEGBESZÉLÉS.....	81
6.1. A VAPP betegektől származó poliovírus 3-as típus nukleotidsorrend és aminosavsorrend tulajdonságai.....	83
6.2. A vakcinavírusok üritése az egészséges mOPV recipiensek által.....	85
6.3. Az OPV és a non-polio enterovírusok kölcsönhatása.....	86
6.4. Úton a globális <i>poliomyelitis</i> felszámolása felé.....	87
6.5. A non-polio enterovírusok tipizálási eredménye.....	87
6.6. A molekuláris módszerekkel tipizált non-polio enterovírusok klinikai, epidemiológiai és filogenetikai eredményei.....	89
6.6.1. A coxsackie A16 vírus vizsgálatok.....	89
6.6.2. Az enterovírus 71 vizsgálatok.....	92
6.6.3. Az echovírus 30 vizsgálatok.....	94
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	96
8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	122
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	126
10. ÖSSZEFOGLALÁS.....	127
11. SUMMARY.....	128

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

µg	mikrogramm
µl	mikroliter
3'-NTR	3'-nem leolvasott RNS régió (non-translated region)
5'-NTR	5'-nem leolvasott RNS régió (non-translated region)
aa	aminosav (aminoacid)
AFP	heveny petyhüdt bénulás (<i>acut flaccid paralysis</i>)
AVM RT	madár leukózis vírus reverz transzkriptáz
aVDPV	kétes vakcina eredetű poliovírus (ambiguous vaccine derived poliovirus)
bp	bázispár
BSL-4	4-es biztonsági szintű laboratórium (biosafety level 4)
CAR	coxsackie-adenovírus receptor
CDC	Betegségmegelőző Központ az Egyesült Államokban (Centers for Disease Control and Prevention)
cDNS	komplementer DNS
CO₂	széndioxid
CPE	citopátiás hatás (cytopathic effect)
CV-A és -B	coxsackievírus A és B
cVDPV	cirkuláló vakcina eredetű poliovírus (circulating vaccine derived poliovirus)
CVID	celluláris variábilis immundeficiencia
DAF	enterovírus receptor (decay accelerating factor)
DNáz	dezoxiribonukleáz enzim
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP set	dezoxiribonukleotid keverék
ECHO	echovírus (enteric cytopathogenic human orphan)
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
eIPV	emelt szintű inaktivált poliovírus vakcina
EV	enterovírus
FBS	fötális borjúsavó
HeLa	méhnyakrák eredetű immortalizált sejtvonat
HEV-A, -B, -C, -D	humán enterovírus fajok

ICAM-1	intercelluláris adhéziós molekula-1 (intercellular adhesion molecule)
ICTV	Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IgA, IgM, IgG	immunglobulinok (A), (M), (G)
IPV	inaktivált poliovírus vakcina
IRES	belső riboszómakötő hely (internal ribosomal entry site)
iVDPV	immunhiányos egyénből származó vakcina eredetű poliovírus (immunodeficient vaccine derived poliovirus)
kb	kilobázis
kV	kilovolt
L20B	transzgenikus úton előállított egér sejtvonala, expresszálja a human poliovírus receptort (CD 155)
Master Mix	PCR reakcióelegy megnevezése
mM	millimol
mOPV1	monovalens orális poliovírus vakcina, tartalmazza az élő attenuált poliovírus 1-es szerotípusát
mOPV2	monovalens orális poliovírus vakcina, tartalmazza az élő attenuált poliovírus 2-es szerotípusát
mOPV3	monovalens orális poliovírus vakcina, tartalmazza az élő attenuált poliovírus 3-as szerotípusát
mRNS	hírvivő (messenger) RNS
MuLV	egér leukémia vírus (murine leukemia virus)
nt	nukleotid
NTP-áz	nukleozid trifoszfátáz
NTR	nem leolvasott régió (non-translated region)
OEK	Országos Epidemiológiai Központ
OKI	Országos Közegészségügyi Intézet
OPV	orális poliovírus vakcina
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
OTU	vizsgált taxonómiai egység (operational taxonomic unit)
PABP	polyA kötő fehérje (polyA binding protein)
PCBP	polyC kötő fehérje (polyC binding protein)
PCR	polimeráz-lánreakció (polymerase chain reaction)

pM	pikomol
Polio-	poliovírus (gyermekbénulás vírusa)
PolyA	sok adeninből álló farok rész az RNS molekula 3'-végén
Poly(rC)	citozinban gazdag nukleotid szakasz az RNS molekula 5'-végén
PVR (CD155)	poliovírus receptor
rct⁴⁰	reproduktív kapacitás 40°C-on (reproductive capacity of growth on 40°C)
RD	humán <i>rhabdomyosarcoma</i> folyamatos sejtvonala
RF	replikatív forma (replicative form)
RI	replikatív köztes alak (replicative intermediate)
RNáz	ribonukleáz enzim
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció
RT-PCR	reverz transzkripció PCR
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
ssRNS	szimpla szálú RNS molekula
<i>Taq pol</i>	<i>Thermus aquaticus</i> termofil baktérium DNS polimeráz enzime
TBE	tris-bórsav-EDTA
tOPV	trivalens orális poliovírus vakcina, tartalmazza az élő attenuált poliovírus mindhárom szerotípusát
TRIS	tris (hidroximetil) aminometán
tRNS	transzfer RNS
U	(unit) egység, az enzim aktivitásának mértékegysége
UV	ultraibolya
VAPP	oltási <i>poliomyelitis</i> (vaccine associated paralytic poliomyelitis)
VDPV	vakcina eredetű poliovírus (vaccine derived poliovirus)
VP 1-4	vírus proteinek (kapszomérek 1-4)
VPgpU	a virális RNS 5'-terminális proteinje
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

1. BEVEZETÉS

A járványos gyermekbénulás (*poliomyelitis anterior acuta*) az emberiség egyik legrettegettebb betegsége, amit a *Picornaviridae* családba tartozó poliovírusok okoznak. Magyarországon a járványos gyermekbénulás megelőzésére 1959-1992 között élő gyengített, szájon át adható monovalens oltóanyagot használtak (mOPV), ezzel megfékezve a járványok terjedését. Hazánkban az utolsó vad poliovírus okozta bénulás 1969-ben, az utolsó behurcolt megbetegedés 1972-ben fordult elő. A későbbiekben azonban kiderült, hogy a vakcina vírusok is képesek *poliomyelitis*-t okozni, kis gyakorisággal. Magyarországon az 1961-1991 között végzett becslések szerint az oltási *poliomyelitis* előfordulása a Sabin 3 beadása után jelentősen gyakoribbnak bizonyult, mint a Sabin 1 és a Sabin 2 alkalmazásánál.

Napjainkban Afrika, Délkelet-Ázsia, India, Pakisztán és Afganisztán területén még honos a vad poliovírus 1-es és 3-as típusa. A vad poliovírus 2-es típus által okozott bénulás már 4 éve nem fordult elő. Ezért gazdasági okokból a WHO úgy döntött, hogy a mindhárom szerotípust tartalmazó trivalens vakcinát (tOPV) monovalens 1 és 3 oltóanyagra kell leváltani. Az oltóanyagok újraengedélyeztetése előtt a WHO az mOPV3 használatával kapcsolatos magyarországi tapasztalatok alapján kérte a Magyarországon 1960-1967 között bénulást okozó poliovírus 3 izolátumok molekuláris genetikai vizsgálatát.

Magyarországon hét országos méretű enterovírus járvány előfordulásáról vannak adatok. Az 1957-ben és 1959-ben zajlott két poliovírus járványon kívül a coxsackievírus B3 okozott Bornholm-betegség (*pleurodynia*) járványt 1958-ban. A coxsackievírus A16 okozta kéz-láb-száj betegség járványt utoljára 1976-ban írtak le. Az enterovírus 71 1978-ban 1550 betegnél okozott savós agyhártya- és agyvelőgyulladást 30 halálesettel a hat éven aluli gyermekekben. Az echovírus 11 „prime” törzse 386 gyereknél okozott vérzéses májgyulladást, ami 13 újszülött halálához vezetett 1989-ben. A non-polio enterovírusok napjainkban is súlyos járványokat okoznak a délkelet-ázsiai országokban.

A laboratóriumi vírusdiagnosztikában alkalmazott klasszikus enterovírus azonosítási módszerek (sejttenyésztésben, korábban szopós egérben is) nem mindig alkalmasak a vírus szerotípusának meghatározására. Ezért munkánkban a molekuláris tipizálás módszer segítségével határoztuk meg a Magyarországon 2000-2008. között kimutatott enterovírusok szerotípusait azzal a céllal, hogy betekintést nyerjünk a vírusok molekuláris epidemiológiájába, és tanulmányozzuk a vírusok genetikai változékonyságának szerepét a betegségek patogenezisében.

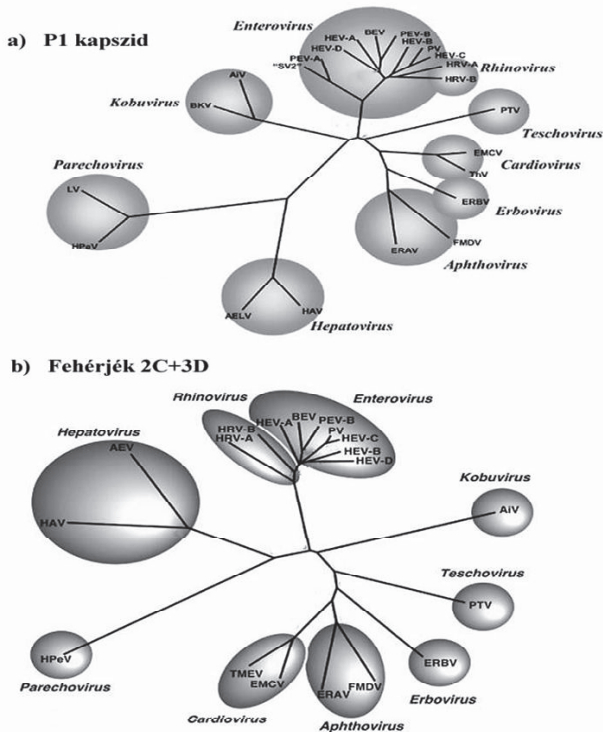
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az enterovírusok rendszertani besorolása

A gerincesek legkisebb autonóm, burok nélküli RNS vírusai a *Picornaviridae* (*pico*=kis, *RNA*=RNS) családba tartoznak. A család fajait filogenetikailag rokon szerotípusok vagy törzsek alkotják. Az egy fajba való besorolás a következő ismérvek szerint történik: a) szűk gazdaspektrum és sejtreceptor-specificitás; b) jelentős hasonlóság a proteolitikus szerkesztés, replikáció, enkapszidáció és rekombináció folyamataiban; c) viszonylag azonos genetikai térkép (King és mtsai., 2000).

A *Picornaviridae* család taxonómiája az utóbbi években nagy változásokon ment keresztül. Hosszú időn át 23 fajjal rendelkező 9 nemzetséget tartottak nyilván a családon belül: *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Aphtovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* és *Techovirus* (Stanway és mtsai., 2005). A fajok és nemzetségek közötti rokonság megállapítását a szerkezeti fehérje (P1= kapszid) és nem szerkezeti fehérje (2C+3D= proteáz + polimeráz) régió aminosav szekvencia hasonlóságai alapján végezték. A változékonny P1-es régió a vírusok antigéntulajdonságait tükrözi, ami általában a hagyományos vírus meghatározás alapja. A 2C+3D régió legtöbbször nagyon konzervált, és szoros egyezést mutat a genom kódolta információval (Stanway és mtsai., 2005) Az *Enterovirus* nemzetségbe a következő fajokat sorolták: *Humán enterovírus A (HEV-A)*, *Humán enterovírus B (HEV-B)*, *Humán enterovírus C (HEV-C)*, *Humán enterovírus D (HEV-D)*, *Sertés enterovírus A (PEV-A)*, *Sertés enterovírus B (PEV-B)*, *Szarvasmarha enterovírus (BEV)*, *Majom enterovírus A (SEV-A)* (1. ábra).

A *Humán Enterovírus (HEV)* nemzetséget egy korábbi (hagyományos) osztályozás szerint 5 faj és azok szerotípusai alkották: *Poliovírusok (PV)*, PV1-3; *Coxsackie A vírusok (CV-A)*, CV-A1-22, CV-A24; *Coxsackie B vírusok (CV-B)*, CV-B1-6; *Echovírusok (echo, E)*: E1-7, E9, E11-21, E24-27, E29-33; *Enterovírusok (EV)*, EV68-71. A fajok elkülönítésének alapja a vírusok antigéntulajdonsága, valamint emberben, kísérleti állatban és sejtenyészetben megfigyelt kórokozó-képesség volt. A molekuláris módszerek bevezetésével a humán enterovírusok hagyományos rendszertana megváltozott. A változás lényege az, hogy korábban a szerotípusokat tekintették *species*-nek. Az új besorolás szerint a fajt a fentebb említett ismérvek alapján a hasonlóan talált szerotípusok csoportjai alkotják.



1. ábra. A Picornaviridae család filogenetikai törzsfája (Stanway és mtsai., 2005).

a) P1 fehérje, b) 2C + 3D fehérjék. A neighbor-joining módszerrel szerkesztett fákat (1000 „bootstrap” replika) a CLUSTALX program és az aminosav súlyozó mátrix (BLOSUM) segítségével készítették. A fákat a TreeView v.1.5.2. programmal ábrázolták és csak a 90%-nál nagyobb bootstrap értékeket tüntették fel.

A Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság Picornavírus Munkacsoportja (ICTV Picornaviridae Study Group), 2006-ban javaslatot tett az *Enterovírus* és *Rhinovírus* nemzetségek egyesítésére. Történelmileg a humánpatogén entero- és rhinovírusokat legfőképpen a hagyományos ismérvek alapján, mint a patogenitás és a saválló képesség (az enterovírusok savállóak, a rhinovírusok nem) sorolták be a két nemzetségbe (*Enterovírus* és *Rhinovírus*) [Knowles és mtsai., 2008]. A szekvenciavizsgálatok alapján viszont

kiderült, hogy nincs jelentős eltérés a két nemzetség genomszerkezete között. A vizsgálatokat a picornavírusok rendszerezésében használt **P1** és **2C + 3CD** régiókban végezték. Azt találták, hogy a két nemzetség fajai sokkal közelebbi rokonságban állnak egymással, mint más *Picornaviridae* nemzetségek. Kiderült az is, hogy a saválló képesség szerinti osztályozás idejémtúlt (Blomqvist és mtsai., 2002; Savolainen és mtsai., 2002). Mindehhez hozzájárult az is, hogy a molekuláris diagnosztika a humán enterovírus „szerotípusok” számát 100-ra növelte a szövettenyészeten nem szaporítható vírusok jellemzésével. Ennek köszönhetően az egyre bővülő *Enterovirus* nemzetség jelenleg a következő emberi fajokból áll: *Humán enterovírus A*, *Humán enterovírus B*, *Humán enterovírus C*, *Humán enterovírus D*, *Humán Rhinovírus A*, *Humán Rhinovírus B*, *Humán Rhinovírus C*, *Humán Rhinovírus D* (**1. táblázat**).

(Faj: szerotípus)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Humán Enterovírus A (HEV-A)</i>: coxsackie A vírus (CV-A) CV-A2-10, CV-A12, CV-A14, CV-A16; enterovírus (EV) EV71, EV76, EV89, EV90, EV91, EV92. ▪ <i>Humán Enterovírus B (HEV-B)</i>: coxsackie A vírus (CV-A) CV-A9; coxsackie B vírus (CV-B) 1-6; echovírus (echo, E) E1-7, 9, E11-21, E24-27, E29-33; enterovírus (EV) EV69, EV73-75, EV77-88, EV79-88, EV95, EV97, EV100-101, EV103. ▪ <i>Humán Enterovírus C (HEV-C)</i>: coxsackie A vírus (CV-A) CV-A1, CV-A11, CV-A CV-A13, CV-A15, CV-A17, CV-A19-22, CV-A24; poliovírus (PV) PV1-3. ▪ <i>Humán Enterovírus D (HEV-D)</i>: enterovírus (EV) EV68, EV70, EV94; humán rhinovírus (HRV) HRV87. ▪ <i>Humán Rhinovírus A</i> ▪ <i>Humán Rhinovírus B</i> ▪ <i>Humán Rhinovírus C</i> ▪ <i>Humán Rhinovírus D</i>

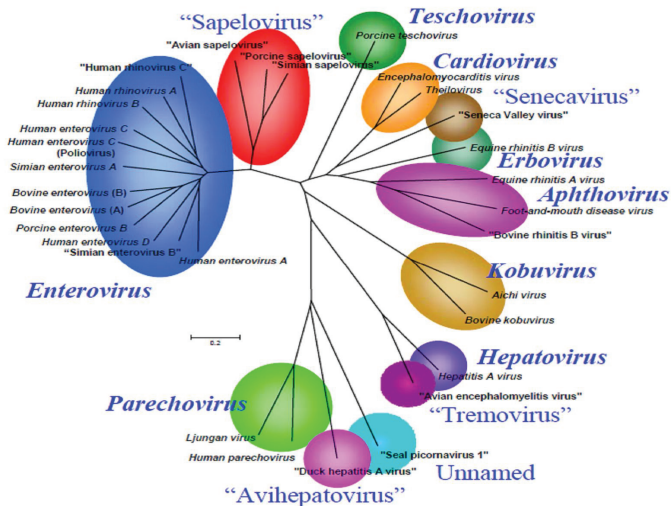
1. táblázat. A humán enterovírusok rendszerezése (King és mtsai., 2000; Stanway és mtsai., 2005).

A számozásban való hézagok jelzik a rendszerezésben bekövetkezett változtatásokat. Egyes szerotípusokat azonosnak találtak (pl. coxsackievírus A15 megegyezik az A11-gyel, a coxsackievírus A18 ugyanaz, mint az A13, a coxsackievírus A23 azonos az echovírus 9-cel, az echovírus 8, csak a vírusneutralizációban különbözik az echovírus 1-től és az echovírus

34 pedig a CV-A24 variánsa). Egyes szerotípusokat újraosztályoztak más Picornaviridae nemzetségekbe vagy víruscsaládokba. Az echovírus 10-ről már évtizedekkel ezelőtt kiderült, hogy nem enterovírus (reovírus 1, Orthoreovirus nemzetség, Reoviridae család), az echovírus 28 = human rhinovírus 1A (Rhinovírus genus, Picornaviridae), az enterovírus 72 humán hepatitis A vírusnak bizonyult (Hepatovírus genus, Picornaviridae), és az echovírus 22 és 23 jelenleg a humán parechovírus 1 és 2-ként kerültek újraosztályozásra (Parechovírus nemzetség, Picornaviridae).

A Picornavírus Munkacsoport javaslata szerint a korábban különálló fajt képező poliovírusokat a HEV-C fajba sorolták. Ennek fő indoka az volt, hogy a két enterovírus faj nagyon hasonló a nem-szerkezeti fehérje kódoló régióban (Supanaranond és mtsai., 1992). A teljes genom vizsgálatok megerősítették ezt a rokonságot (Brown és mtsai., 2003; Newcombe és mtsai., 2003). A két faj a Picornaviridae rendszertanban vizsgált P1 és 2C+3D régiókban nem monofiletikus, viszont a konzervált 2C+3D régióban az aminosav azonosság több mint 90%. Több tanulmány igazolta a poliovírusok és a HEV-C faj közötti gyakori homológ rekombinációt (Liu és mtsai., 2000; Arita és mtsai., 2005), ami önmagában is egy nyomós érv volt az egy fajba való besorolás mellett. A poliovírusok a HEV-C fajtól eltérő sejtspecifikus receptorral rendelkeznek; a HEV-B faj tagjainál is különböző a receptorhasználat, viszont ennek a jelenségnek nincs kizárólagos szerepe az Enterovírus taxonómiában.

2009-től a Picornaviridae családot 11 nemzetségre osztják: Enterovírus, Cardiovírus, Aphthovírus, Hepatovírus, Parechovírus, Erbovírus, Kobuvírus, Teschovírus, Sapelovírus, Senecavírus, Tremovírus. Egy új nemzetséggel (Avihepatovírus) való bővítés javaslata még elbírálás alatt van (**2. ábra**).



2. ábra. A Picornaviridae család törzsfája (Knowles N., 2008).

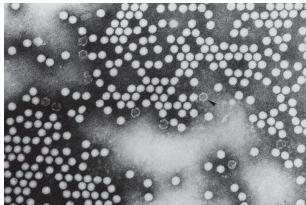
A Picornaviridae család P1 kapszid régió alapján, neighbor-joining módszerrel szerkesztett gyökértelen fája.

2.2. A humán enterovírusok biológiai tulajdonságai

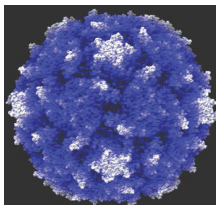
2.2.1. A virion szerkezete

Az enterovírus részecskék ikozahedrális (köbös) szimmetriájú, burok nélküli virionok (3. ábra). Átmérőjük az alkalmazott elektronmikroszkópos módszer függvényében 28 – 32 nm.

A.



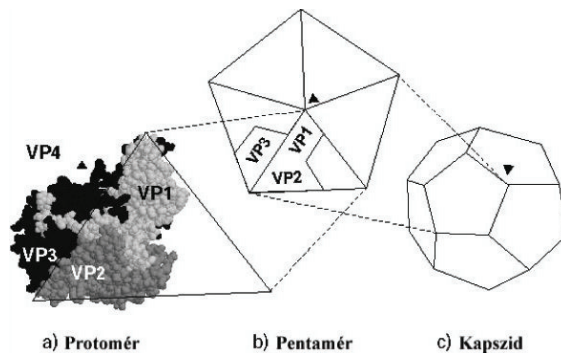
B.



3. ábra. (A.) A poliovírus 1-es típus transzmissziós elektronmikroszkóppal készült felvétele (Dr. Fred Murphy és Sylvia Whitfield, CDC). (B.) A poliovírus háromdimenziós képe, röntgenkristallográfiás rekonstrukció alapján (Hogle, JM, Chow M, Filman, DJ. Science, 1985; 229:1358-1365).

A virion kapszidjának a felületét VP1-VP3 fehérjék képezik, a VP4 a kapszid belsejében helyezkedik el, és az ott lévő ribonukleinsavhoz (RNS) kapcsolódik. A fehérjeszerkezeti egységek (kapszomér, protomér) 60 trimért képeznek, amelyek 12 pentamér egységgé épülnek össze az ikozahedrális téridom kialakításakor (4. ábra). A pentamerek összeépülése a transláció során spontán módon megy végbe, azonban a virion összeépüléséhez az RNS 3'-végén elhelyezkedő „enkapszidációs szignálra” van szükség. Az RNS genom csak akkor képes beépülni a virionba, ha a vírus RNS 5'-végén egy alternatív szekunder szerkezet alakul ki, amely megakadályozza a riboszóma kötődését (Szendrői és mtsai., 2000).

A VP1-VP3 fehérjék szekvenciái ugyan nem homológok, mégis mindhárom fehérje hasonló térszerkezetet mutat, amelyet 8 láncból álló antiparalel β -hordó alkot. A β -hordók N-terminális végződéseit veszik a szomszédos domének szoros összekapcsolásában, ennek a szerkezetnek köszönheti a virion a stabilitását. A kapszidfehérjék közötti szerkezeti eltérést az ún. hurkok (loops) adják, amelyek összekötik a β -láncokat és a β -hordók doménjeiből futó N- és C-terminális fehérjerészeket. Ezek az aminosavak biztosítják mindegyik enterovírus számára az eltérő morfológiát és antigénszerkezetet (Mueller és mtsai., 2005). A víruskapszidok jellegzetessége az ikosaéder ötszögű csúcsaiban található árok (canyon). A canyon régió a gazdaszervezet receptor megkötésében vesz részt. Az ellenanyagok nem tudnak behatolni az árokba, de lefedhetik azt, ezáltal megakadályozva a vírus-receptor kötődést (Berencsi és mtsai., 2004).



4. ábra. Az enterovírus kapszid szerkezete (Rueckert R., 1996).

a) a virion felszíne VP1, VP2 és VP3 fehérjékből áll, a VP4 fehérje a kapszid belsejébe néz. A négy fehérje együtt a protomér egységet képezi; b) az öt protomér egy pentamérben egyesül; c) az ikozahedrális kapszidot tizenkét pentamér alkotja.

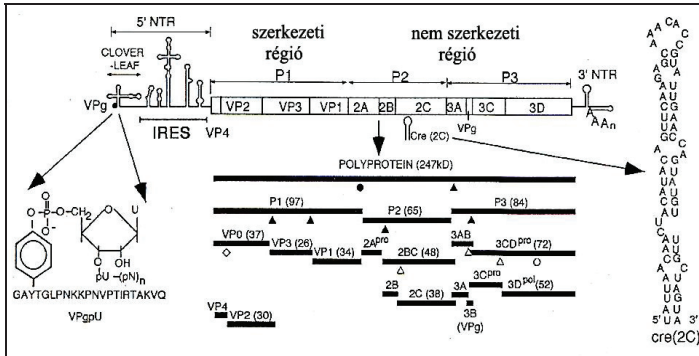
2.2.2. Az enterovírus ciklus molekuláris biológiája

2.2.2.1. A genetikai állomány (genom) szerveződése

Az enterovírusok mintegy 7500 nukleotidból álló, pozitív irányultságú, egyszálú (+ssRNS) genommal rendelkeznek. A genom 5'-NTR nem-leolvasott régiója 742 nukleotidból áll, ezt követi egyetlen poliprotein 2209 aminosavát kódoló (nyitott) leolvasási kerete („open reading frame” - ORF), végül a 70 nukleotidból álló 3'-NTR nem-leolvasott szakasz, amelyet különböző hosszúságú polyA-farok egészít ki.

Az 5'-végi első 88 nukleotid részt vesz az ún. „clover-leaf”, azaz lóhere szerkezet kialakításában (5. ábra), amelynek szerepe van a vírusreplikációban. A genom 5'-végén egy 22 aminosavból álló fehérje is megtalálható, ami primerként működik az RNS átírásánál.

A genom P1 szakasza a szerkezeti fehérjéket, a P2 és P3 szakaszok pedig a nem szerkezeti fehérjéket kódolják. A poliproteint a virális és a gazdasejt eredetű proteáz enzimek darabolják fel a replikáció során. A genom 3'-végén az „enkapszidációs szignál” helyezkedik el, és innen indul a replikatív formát képező komplementer (negatív) RNS szál szintézise is (5. ábra).



5. ábra. A poliovírusok genomszerveződése és a proteolitikus szerkesztés folyamata (Mueller és mtsai., 2005).

A genom P1-es régiója

A kapszid fehérjék prekurzorát a P1 genetikai régió kódolja. A P1 prekurzor fehérjét a 3CD^{pro} proteáz hasítja VP0, VP1 és VP3 fehérje alegységekre, amelyek ezután éretlen protomérré épülnek össze. Az öt protomér egy pentamért alkot. A morfogenezis

utolsó lépésében a VP0 fehérje hasad, ebből lesz a VP2 és a VP4 kapszidfehérje. Mivel a VP0 fehérje vágási helye az éretlen virion belsejében helyezkedik el, ezért feltételezik, hogy a hasítási folyamat autokatalitikus úton megy végbe. A VP1-3 kapszidfehérjék adják a neutralizáló antitestek számára az epitópokat.

A genom P2-es régiója

A P2-es régió fehérjéi a sejtmembrán átrendeződésében vesznek részt, és a zárt membránvezikulumok kialakításában, ahol a vírusreplikáció zajlik. Ezeknek a membránhólyagocskáknak köszönhetően a virális RNS a citoplazmában napokig károsodás nélkül megmarad (Berencsi Gy. és Nagy G., 1973). A P2-es régió fehérjéi a következők: 2A, 2B, 2C, 2BC.

2A kis tripszinszerű fehérje: a saját aminoterminális végének a hasítását katalizálja (2A^{pro}), és felszabadítja a P1 kapszidfehérje prekursorát. Szerepe van a gazdasejt fehérjeszintézisének leállításában azáltal, hogy hasítja a gazdasejt transzlációjához szükséges „cap-kötő” fehérjét, szabaddá téve a riboszómákat. A vírus RNS szintézisében is részt vesz (Pallai és mtsai., 1989; Gorbalenya és mtsai., 1989b; Ansardi és mtsai., 1995; Li és mtsai., 2001).

2B fehérje: növeli a gazdasejt intracelluláris membránjának permeabilitását, és részt vesz a replikációs vezikulumok képződésében. A permeabilitás növelése segíti az újonnan kialakult virionok kiszabadulását a sejtből, és egyúttal lehetővé teszi az ellenanyagok bejutását is (van Kuppeveld és mtsai., 1997; Berencsi Gy. és Nagy G., 1973).

2C fehérje: részt vesz a replikációs vezikulumok képződésében. A 2C-nek specifikus szerepe van a negatív szálú RNS-szintézis iniciációjában. A fehérje egy NTP-áz motívumot tartalmaz, amely hasonlít a DNS-helikáz motívumához (Gorbalenya és mtsai., 1989 a, b). A 2C fehérje a guanidin-hidroklorid célmolekulája is, amelynek hatására leáll a vírusreplikáció (Pincus és mtsai., 1986).

2BC fehérje: a vírusreplikációban van szerepe.

A genom P3-as régiója

A P3-as régió a 3A, 3B, 3C, 3D fehérjéket kódolja. Elsődleges szerepük van a replikációban és a proteolitikus folyamatok szabályozásában.

3A kis hidrofób fehérje: kapcsolatban van az intracelluláris vezikulumokkal (Datta és mtsai., 1994). Részt vesz a replikációs komplex kialakításában, ilyenkor a 3AB prekursor formájában működik.

3B fehérje: maga a VPg molekula, amely az RNS molekula 5'-végéhez kovalensen kötődik és az RNS-szintézis primerjeként szolgál.

3AB prekurzor fehérje: serkenti a 3D polimeráz aktivitását, valamint a 3CD proteolitikus aktivitását (Lama és mtsai., 1992). A VPg megtalálható a pozitív és negatív szálú RNS 5'-végén is. Az *in vitro* kísérletek bizonyították, hogy a VPg fehérjét a 3D RNS-polimeráz enzim uridilálja, így az primerként tud szerepelni a vírusreplikációban.

3C/3D fehérje: a vírusfehérjék harmadlagos szerkezetének kialakításában van szerepe, ilyenkor a proteáz funkciója érvényesül, ezen kívül részt vesz az RNS-replikációban is. A 3C RNS-kötő doménnel rendelkezik, és kölcsönhatásba lép a pozitív szálú RNS molekula másodlagos szerkezetével az 5'-végén. A kialakult komplex a gazdasejt fehérjeinek megkötéséhez szükséges a vírusreplikáció elindításában.

3CD fehérje: szerepe van a pozitív szálú RNS cirkularizációjában, valamint a virális és a gazdasejt fehérjék közötti fehérjehíd kialakításában a vírusreplikáció megkezdése előtt (Herold és mtsai., 2001).

3D fehérje: a vírus RNS-függő RNS-polimeráza. A pozitív és negatív RNS szálak szintézisében vesz részt.

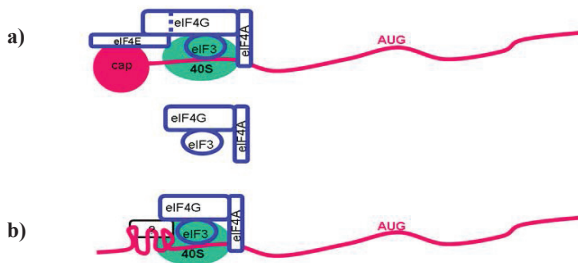
A fehérjekódoló régiót szegélyező 5'-NTR és 3'-NTR

Mindkettő nagyon konzervatív szekvencia. Az **5'-NTR** a transláció iniciációjáért felelős szignálokat tartalmazza. A vírusgenom **3'-NTR** nem-leolvasott régiója poliadenilált. A poliovírusoknál a polyA szakasz hossza kb. 60 nukleotid. A 3'-végi szakasz tRNS-szerű alakot vesz fel, amely az RNS-replikációban felismerő szignálként működik.

2.2.2.2. A transláció iniciációja

Miután a pozitív szálú vírusgenom bejutott a citoplazmába, azonnal elkezdődik a **transzláció**. A vírusok fehérjeszintézise a fertőzött sejt translációs gépezetének segítségével történik (Sonenberg és mtsai., 1990).

Az mRNS leolvasása az **eukariótákban riboszómapásztazó (scanning)** mechanizmussal megy végbe (Kaminski és mtsai., 1994). Az enterovírusok fehérjeszintézisének iniciációja „cap”-független, mert az RNS-ük nem rendelkezik 7-metilguanozin sapkával (cap) az 5'-végén (ezt ismerik fel az eukarióta iniciációs faktorok ahhoz, hogy az mRNS 5'-végét a 40S riboszóma-alegységhez kössék). Az **enterovírusok** az RNS leolvasásához **riboszómakötő mechanizmust** használnak, ilyenkor az 5'-NTR szakaszban található belső riboszómakötő hely (IRES = internal ribosomal entry site) segítségével történik a kapcsolódás (**6. ábra**).



6. ábra. Az iniciációs komplex kialakulása (<http://pathmicro.med.sc.edu/>).

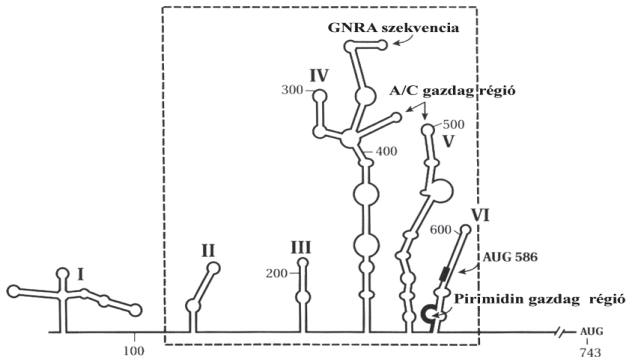
a) eukariótákban *cap*-függő riboszómapasztázó mechanizmus; b) enterovírusoknál IRES közvetített riboszómakötő mechanizmus. Minkét mechanizmus résztvevői az eukarióta iniciációs faktorok (*eIF3*, *eIF4A*, *eIF4E*, *eIF4G*). A transzlációs startkodon (AUG) az eukarióta mRNS molekulán (a) és az enterovírus RNS molekulán (b).

Az enterovírus RNS 5'-NTR szakasza 700 nt hosszú. A szakaszon belül jellegzetes másodlagos szerkezeti elemek találhatók, köztük az IRES elemek is, amelyeket még a riboszóma sem tud felnyitni (Malnou és mtsai., 2002). A belső kötődés valószínűleg az egyszálú RNS-szakaszon megy végbe, a folyamat résztvevői az eukarióta transzlációs iniciációs faktorok és a celluláris IRES-kötő fehérjék. A poliprotein transzlációja a poliovírus RNS-en a 743 nt pozícióban lévő AUG startkodontól indul (Rueckert és mtsai., 1996).

2.2.2.3. A vírus RNS IRES elem szerkezete és funkciója

A *Picornaviridae* családba tartozó vírusok IRES elemei kb. 450 nukleotid hosszúak, és az RNS molekula 5'-végének nem-transzlálódó szakaszán belül találhatóak (150-700 nt). Mindegyik IRES elemnek azonos a szerepe, viszont szerkezetük eltérő lehet a különböző enterovírus nemzetségeknél. Összesen három IRES típust különböztetnek meg: I-es típus (entero- és rhinovírusok), II-típus (cardio-, aphto-, kobu- és parechovírusok), III-as típus (hepatovírusok) [Wimmer és mtsai., 1993]. Az IRES elem „hajtú-hurok”-szerű másodlagos szerkezeti elemeket tartalmaz, számítógépes modellszerkezetét a **7. ábra** mutatja. Az

IRES, mint korábban is említésre került, a virális RNS-transzláció és a replikáció kulcseleme (Johansen és mtsai., 2000; Gromeier és mtsai., 1996).



7. ábra. A poliovírusok 5'-NTR-végi **I-es típusú IRES** motívuma (Wimmer és mtsai., 1993).

Az ábra bemutatja a poliovírus genom 5'-NTR régióját a másodlagos szerkezeti elemeket római számmal jelölve I.-VI. Az IRES szekvenciát a szaggatott vonallal jelzett keret ábrázolja. Az IRES elem működésének kiemelt motívumai: GNRA szekvencia, A/C gazdag régió, pirimidinben gazdag régió. A 743-ik triplet AUG, a transzláció iniciáció startkodonja.

Az enterovírus RNS 5'-végi szakaszán az I-es hurkok a replikációhoz szükséges lóhere szerkezetet vesz fel, a **II.-VI. hurkok** pedig az **IRES elem** funkcionális részeit alkotják. A szerkezeti elemeken kívül az IRES néhány **konzervatív motívumot** is tartalmaz, amelyek az elem megfelelő működésében vesznek részt. Az első motívum **Yn-Xm-AUG**, ahol az Yn egy pirimidin-gazdag szakasz, az Xm pedig egy 15-25 nt-ből álló spacer szakasz, és az IRES végét jelző AUG kodon. A pirimidin-gazdag régiót a gazdasejt kötőfehérjéi ismerik fel, ez a kölcsönhatás döntő szerepet játszik abban, hogy a **pozitív szálú RNS-molekula replikálódni vagy átíródni fog** (Egger és mtsai., 2000).

A második motívum, a **GNRA tetraloop** (N = bármelyik nukleotid, R = purin) az **I-es típusú IRES szekvencia IV. hurkában** helyezkedik el. A mutációs vizsgálatok azt mutatták, hogy ennek a motívumnak jelentős szerepe van az **IRES aktivitásában**. (Kaminski és mtsai., 1994; Malnou és mtsai., 2002; M'hadheb-Gharbi és mtsai., 2008).

A harmadik motívum az A/C gazdag régió az I-es típusú IRES IV. és V. doménjében helyezkedik el, szerepe van a hajtú-hurok szerkezet kialakításában.

Az IRES elem mutációi a translációra, replikációra és egyéb vírusfunkciókra vannak kihatással, pl. az IRES V. doménjének mutációja mindhárom Sabin vakcinatörzsnél a neurovirulencia visszanyerését eredményezi (Minor és mtsai., 1988; 1992; M'hadheb-Gharbi és mtsai., 2009), vagy pl. a coxsackievírus B3 IRES felcserélése a poliovírus IRES elemmel csökkenti a vírus szaporodását sejtenyészetben, valamint gátolja a szív- és hasnyálmirigy-betegségek kialakulását kísérleti egerekben (Chapman és mtsai., 2000; Lee és mtsai., 1997).

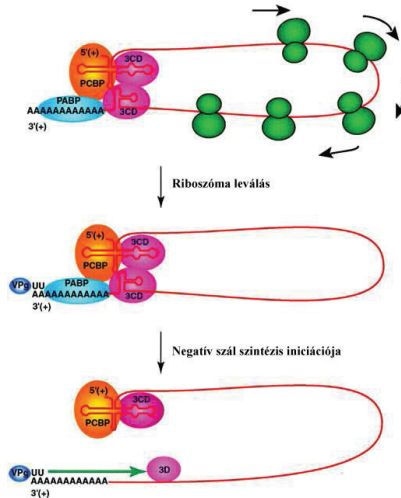
2.2.2.4. A vírus RNS szintézise

Az enterovírusral fertőzött sejtekben a pozitív szálú genom replikációja negatív szálú intermedieren (replikatív forma) keresztül megy végbe. A vírus RNS szintézise aszimmetrikus. A replikáció alatt háromféle RNS-alak képződik: a) replikatív forma (RF-replicative form), duplaszálú RNS; b) replikatív köztes alak (RI-replicative intermediate), (-) szálú RNS, amely részlegesen hibridizál a (+) RNS szállal; c) újonnan szintetizált egyszálú (+) RNS.

A vírusreplikáció egyszerűsített útvonala a következő:

Bejövő (+) szálú virion RNS → (-) szál szintézise → RF → (+) szál szintézise → RI → (+) szálú RNS

Az RNS-függő RNS-polimeráz (3D^{pol}) egy kizárólagosan primerfüggő enzim (Paul és mtsai., 1998), és csak a VPg-fehérje uridilálása után (VPg pU-pU) tudja elvégezni a negatív szál szintézist (8 ábra). Az újonnan megsintetizált negatív szál 5'-végén egy jellegzetes lóhere szerkezet képződik (Gamarnik és mtsai., 2000). Ez utóbbi kölcsönhatásba lép az RNS 3'-végén a polyA-farokkal, aminek következtében a genom cirkularizálódik, és a translációt a (-) szál szintézise váltja fel (Teterina és mtsai., 2001; Borman és mtsai., 2002; Steil és mtsai., 2008). A vírusgenom cirkularizációjában a celluláris kötőfehérjékből (PCBP, PABP) álló ribonukleoprotein komplexnek van szerepe (Gamarnik és mtsai., 1998; Mueller és mtsai., 2005).



8. ábra. Az enterovírus RNS-replikáció folyamata (<http://biochem.med.ufl.edu>).

Az ábra bemutatja a zárt hurok modell szerkezet kialakulását, amelyben a celluláris fehérjék: polyA-kötő fehérje (PABP = polyA binding protein) és a poly(rC)-kötő fehérje (PCBP = poly(rC) binding protein) vesznek részt. Az uridilált VPg fehérje a pozitív szálú RNS molekula polyA szekvenciájához kötődik, és kijelöli a vírus polimeráz számára a replikáció helyét.

Az RNS replikáció a gazdasejt citoplazmájában rozettaszerű membránszerkezeteken megy végbe, amelyek kialakulását a 2C és 2BC virális fehérjék indukálják (Rust és mtsai., 2001; Belov és mtsai., 2004). A poliovírusok replikációjánál például a membránszerkezet az endoplazmatikus retikulumból származik (Mueller és mtsai., 2005).

2.2.2.5. Az enterovírus genom változékonysága és evolúciója

Pontmutációk

A picornavírusok RNS-replikációs mechanizmusa nem teljesen hűsleges. Az RNS szintézisekor gyakran téves nukleotidok épülnek be az új szálba, mivel az RNS-polimeráz enzim nem rendelkezik a hibás bázis eltávolításához szükséges hibajavító (proof-reading) mechanizmussal (Holland és mtsai., 1982). A poliovírusok mutációs rátája *in vitro* és *in vivo* 10^{-3} és 10^{-5} szubsztitúció/nukleotid/replikáció, és a tranzíció gyakrabban fordul elő,

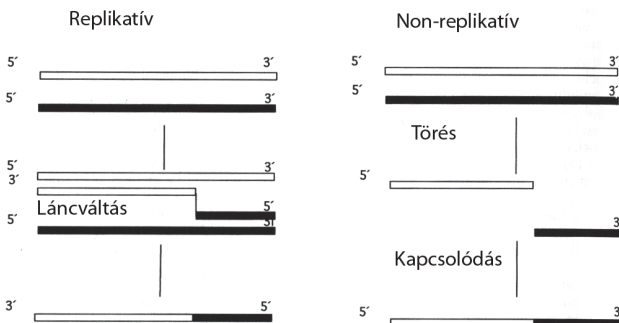
mint a transzverzió. A magas mutációs ráta a környezeti változásokhoz való gyors genetikai adaptációt eredményez. Az így keletkezett RNS vírusok klónjai genomszerkezetükre nézve nem homogének, hanem ún. „kvázispecies”-t alkotnak (Vignuzzi és mtsai., 1961). A keletkező mutációk nagy része semleges a fenotípusra nézve, míg mások befolyással vannak a víruszaporodására (Kuge és mtsai., 1989).

Genom átrendeződés

A genom átrendeződését **intermolekuláris** vagy **intramolekuláris** folyamatok okozzák. A **rekombináció** egy olyan mechanizmus, amely mindkét folyamat során okozhat deléció, inzerciót (beleértve a duplikációt) a genetikai állományban. A rekombinációt könnyebb kimutatni kevert fertőzéseknel, ami különböző vírusvariánsok vagy egy sejtet megfertőző rokon vírusok között jön létre. A poliovírus vakcinatörzsek például rekombinálódhatnak egymással az ember bélrendszerében, de előfordulhat rekombináció a vad poliovírusokkal és a non-polio enterovírusokkal is (Dahourou és mtsai., 2002, Martin és mtsai., 2002, Oprisan és mtsai., 2002, Santti és mtsai., 1999a).

a) Replikatív átrendeződés

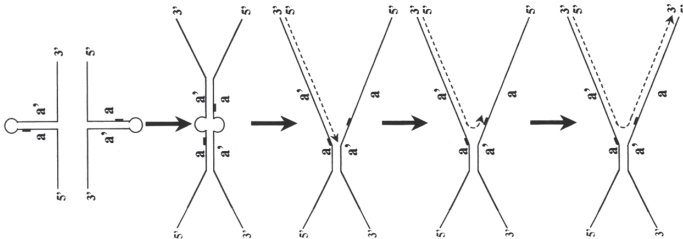
Az enterovírusoknál a replikatív rekombináció **láncváltás (copy choice)** mechanizmussal meg végbe (9. ábra). Ilyenkor az újonnan keletkező RNS szál szintézise az egyik szülői szálon elindul, és a másik szálon fejeződik be. A végeredmény rekombináns RNS-molekula. Azt a folyamatot, amikor a képződő RNS a 3'-végnél leválik, és az RNS-polimerázzal komplexet alkotva pontosan megérkezik a homológ RNS szálra, **pontos** vagy **homológ rekombinációnak** nevezik. A poliovírus rekombinációja leggyakrabban a negatív szál szintézise alatt történik (Kirkegaard és mtsai., 1986).



9. ábra. Az RNS genomok rekombinációjának két modellje (Agol V., 2002).

Az ábra bemutatja a rekombináció két modelljét az RNS genomok között. A **replikatív** folyamatnál az újonnan keletkező RNS szál szintézise elindul az egyik szülői szálon, majd **láncváltással** a másik szálon fejeződik be. A **non-replikatív** folyamatnál a két különböző szülői szál **kovalens kötésen** keresztül egyesül.

Feltételezik, hogy a homológ rekombináció a másodlagos szerkezeti elemek közreműködésével megy végbe. Ezek az elemek szoros közelségbe hozzák a két templát szál homológ helyeit a rekombináció megkezdése előtt (**10. ábra**). A homológ rekombináció jelensége gyakoribb a nem-homológ rekombinációval szemben (pl. kevert vírusfertőzésnél), valószínűleg azért, mert elősegíti a defektív genomok eliminációját (Lukashev és mtsai., 2005).



10. ábra. Homológ rekombináció folyamata (Agol V., 2002).

Az ábrán két homológ RNS molekula heteroduplexet képez a másodlagos szerkezeti elemeken keresztül (hajtű-hurok). A heteroduplex határozza meg a homológ rekombináció pontos helyét.

b) Non-replikatív átrendeződés

A non-replikatív rekombináció a nem-homológ átrendeződés egyik formája (**9. ábra**). A folyamat kulcslépései a rekombináns partner szálak hasítása és újraegyesítése. Elméletileg a rekombinációs partnerek előállításában a celluláris RNázoknak és az önhasító kriptikus ribozimeknek van szerepe (Gmyl és mtsai., 1999).

A picornavírusok evolúciójával kapcsolatosan sok a megválaszolatlan kérdés, mivel nincs információ a feltételezett közös ősről vonatkozóan, amelyikből a későbbiekben kialakultak a család nemzetségei. A vad poliovírusok például, amelyek időben vagy térben

elkülönülnek, jól körülírható eltérésekkel rendelkeznek nukleotid és/vagy aminosav szinten. A poliovírusok természetes evolúciós rátája 1-2% nukleotid/év (Kew és mtsai., 1984). Azok a genetikai változások, melyek növelik a vírus fitness-ét (szaporodó képességét), rögzülnek a genomban, a kevésbé előnyösek pedig kiszelektálódnak. Azonban a legtöbb rögzült mutáció fenotípusosan semleges, ami nem jár aminosavcserével. Ha az RNS-polimeráz hibázásának gyakorisága állandó, akkor a semleges mutációk felhalmozódása a vírus replikációs ciklusok mennyiségétől függ egy időegység alatt, azaz a vírus genomok molekuláris óráként viselkednek. Ezt a ténymegállapítást használják a picornavírusok divergenciós idejének („kor”) kiszámításánál.

2.3. Víruskölsönhatások

Egy sejtet több vírus is képes egyszerre megfertőzni. A különböző vírusgenomok kölsönhatásba lépnek egymással, rekombináns utódokat produkálva. Másrészt a vírusok által megtermelt fehérjék közvetve (pl. az intracelluláris körülmények megváltoztatása által) vagy közvetlenül befolyásolják egymás szaporodását.

Komplementáció

Kevért fertőzőskor a két homológ genetikai rendszerben történő olyan kompenzáló folyamat, amely fenotípusos változás nélkül csillapítja a mutáns gének defektusát. Az enterovírusoknál gyakori a nem allélos (intergenikus) komplementáció. Ilyenkor a mutások különböző funkciójukban defektívek, szaporodáskor a másik vírusban defektív funkciót átadják egymásnak. Kevésbé gyakori az allélos (intra-genikus) komplementáció, ilyenkor a két szülői vírus ugyanazon fehérjének különböző doménjeiben vannak a hibák. Már a 80-as években kialakítottak egy jól működő rendszert a komplementációs folyamatok tanulmányozására az enterovírusok nem szerkezeti fehérjéinél (Bernstein és mtsai., 1986). Az intergenikus komplementációnak szerepe lehet az enterovírusok fajváltásában is (pl. háziállatok és ember).

Interferencia

Az vírusok interferálhatnak egymással, a verseny a sejtreceptorok szintjén vagy a sejt belsejében történhet. Az első mechanizmusnál a vírusok speciális fehérjéket szintetizálnak, amelyek képesek semlegesíteni a koinfekcióban résztvevő partner vírust. A másik mechanizmusnál a sejtet elsőként megfertőző vírus átrendezi a citoplazmamembránt, és ezzel a később érkező vírus bejutását gátolja (Lago és mtsai., 2004).

2.4. A humán enterovírusok kórokozó képessége és epidemiológiája

A **poliovírusok** a járványos gyermekbénulás (Heine-Medin-kór) kórokozói. Antigénszerkezetük alapján 3 szerológiai típust különböztetnek meg. Ezek közül a komplementkötő antigénnel rendelkeznek, de neutralizációs próbával jól elkülöníthetők. A poliovírus fertőzés négy formája: *inapparens* fertőzés, abortív fertőzés, *asepticus meningitis* és *paralyticus poliomyelitis* (érzékszavar nélküli petyhüdt bénulás, amelynek oka a gerincvelő mellsősarvai motoros neuronjainak a károsodása).

A **coxsackievírusok** antigéntulajdonságaik alapján a 30 szerotípust számláló „A” és „B” csoportra oszthatók. Az „A” csoportú vírusok egerekben petyhüdt bénulást idéznek elő, amíg a B csoportúak *spasticus* bénulást okoznak. Az emberi fertőzések egy része lehet tünetmentes, vagy a következő klinikai formákban nyilvánulhatnak meg: *herpangina* (láz, torokfájás, szájüregi hólyagok), enyhe felső légúti megbetegedések, kéz-láb-száj betegség (hólyagos kiütések a végtagokon, afták a szájban), *asepticus meningitis*, Bornholm-betegség (fájdalmas bordaközi idegyulladás), *conjunctivitis*, *iridocyclitis*, *pericarditis*, *myocarditis*. A coxsackievírusoknak szerepet tulajdonítanak az I-es típusú gyermekkori inzulinfüggő cukorbetegség (*diabetes mellitus*) kialakulásában (Sadeharju és mtsai., 2003). A vírusok sejtfelszíni receptora a „CAR” (coxsackie-adenovírus-receptor), amelyet legfőképpen a hasnyálmirigy és szívizom szövetei expresszálnak. A vírus patogenitásával kapcsolatosan két hipotézist dolgoztak ki. Az első szerint a vírusszaporodás közvetlenül károsítja a szívizom vagy hasnyálmirigy sejtjeit; a második szerint az ún. molekuláris **mimikri mechanizmus** következtében károsodnak a sejtek. A molekuláris mimikri során a vírusantigének keresztreatágnak a szervezet egyes saját antigénjeivel, ennek következtében a vírus által indukált ellenanyagok és citotoxikus immunsejtek kötődnek a szervezet egészséges sejtjeihez, aminek szerepe lehet a szívizomgyulladás és a diabétesz kialakulásában (Thivolet C. és Trepo C., 1988; Salminen és mtsai., 2003;).

Az **echovírusok** antigéntulajdonságuk alapján 31 szerotípussal rendelkeznek. Elnevezésük (enteric cythopathogenic orphan) arra utal, hogy kezdetben nem sikerült klinikai megbetegedéssel kapcsolatba hozni őket, később azonban fény derült az echovírusok szerepére egyes betegségek etiológiájában. Különböző szerotípusok hasonló megbetegedéseket okozhatnak, és egy szerotípus több különböző szindróma kialakulásáért is felelős lehet. A legjelentősebb megbetegedések a következők: *asepticus meningitis*, bőrkiütéssel járó lázas állapot, *uveitis*, *myocarditis*, enyhe légúti megbetegedések,

újszülöttek nekrotizáló májgyulladás. Mindazokat a kórképeket tudják létrehozni, mint a coxsackievírusok.

A **számozott enterovírusok** közül a *humán enterovírus* 68-71 típusok enyhe felső-légúti megbetegedéseket, *meningitis*-t, vérzéses kötőhártya-gyulladást okozhatnak. Az enterovírus 71 (EV71) kéz-láb-száj betegséget, *encephalitis*-t és *acut flaccid paralysis*-t idézhet elő. Az EV71 magas halálozással járó megbetegedéseket okozott Magyarországon és Bulgáriában a 70-es évek közepén és végén (Nagy és mtsai., 1982; Melnick JL., 1980; 1984). Jelenleg a délkelet-ázsiai országokat sújtják a neurovirulens EV71 okozta járványok (Ho és mtsai., 1999; Qiu J., 2008).

A vírusok terjedése

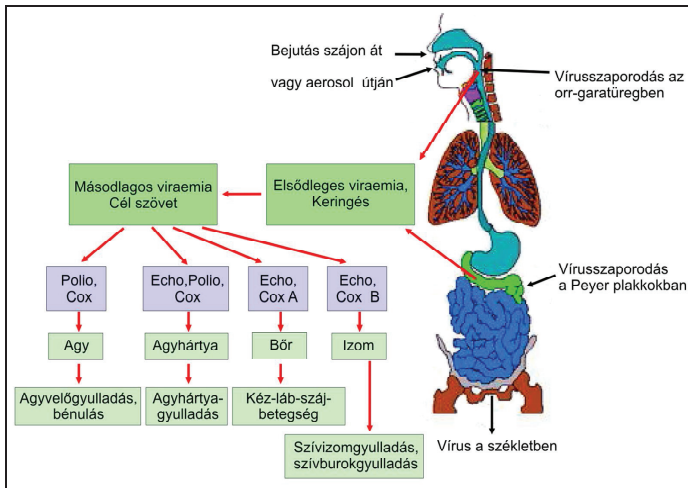
A humán enterovírusok főleg *feco-oralis* úton terjednek. Egyes szerotípusoknál bizonyították az aeroszol útján történő terjedést is. Az enterovírus 70 és a coxsackievírus A24 általában hemorrhagiás kötőhártya-gyulladást okoznak, a fertőzés legfőképp szemváladékkal terjed. A hólyagos kiütéseket okozó enterovírus szerotípusok a hólyagok fertőző tartalmával közvetlenül vagy közvetett módon fertőznek (Kono R., 1975). Az enterovírusok bejuthatnak a véráramba és fertőzést okoznak, pl. laboratóriumi baleset következtében.

Az enterovírus okozta fertőzéseknek gyakran járványos jellege van, pl. a vírusok elterjedhetnek zárt gyerekközösségekben vagy családon belül. A járványok nagyságát mindig a fogékony egyének száma, valamint a szociális és gazdasági körülmények szabják meg. Több tanulmány kimutatta az „A” és „B” csoportú coxsackievírusok *nosocomialis* terjedését újszülött osztályokon vagy pl. az enterovírus 70 és coxsackievírus A24 terjedését szemészeti klinikán, nem megfelelően fertőtlenített műszereken keresztül. Halálos kimenetelű coxsackievírus A1 fertőzéseket közöltek csontvelő transzplantált betegek esetében (Townsend és mtsai., 1982).

Az enterovírusok közegészségügyi, járványügyi jelentősége napról napra nő. Rendkívüli ellenálló képességüknek köszönhetően különböző szerotípusokat mutattak ki talajvizekből, szennyvizekből és felszíni vizekből egyaránt (Lee C. és Lee G., 2008; Lambertini és mtsai., 2008; Schets és mtsai., 2008; Shieh és mtsai., 2008; Chen és mtsai., 2008). Ugyanakkor izoláltak vírusokat nyers vagy félig elkészített kagylókból és rákfélékből is (Milne és mtsai., 2007; Gabrieli és mtsai., 2007; Umeha és mtsai., 2008). Az enterovírusok +1°C és +21°C között három hétig is „túlélnek” osztrigában (Bouchriti és mtsai., 1992).

Kórokozó képesség

Az emberi szervezetbe bejutott vírusok fertőzik az orr-garat nyálkahártya sejtjeit és a limfoid szöveteket (mandulákat), ahol megtörténik az elsődleges vírusreplikáció (**11. ábra**). Az **inkubációs időt** nehéz pontosan meghatározni, mivel klinikai formánként változhat, **általában 7-14 naposra** tehető a jellemző klinikai kép kialakulása. A prodromális tünetek **2-5 nap** között jelenhetnek meg. A fertőzés az emésztőrendszerben terjed tovább. A vírusok rendkívüli saválló képességüknek köszönhetően könnyen bejutnak a bélrendszerbe, ahol a nyálkahártyasejtekben és a limfoid szövetekben (Peyer-plakkokban) tovább szaporodnak. Az előtűnetek alatt a vírusok a garatváladékkal is ürülnek. A széklettel való ürítés a fertőzést követő 2. napon kezdődik el, és akár egy hónapig is eltarthat (Baranyai E. és mtsai., 1994).



11. ábra. Az enterovírusok kórokozó képessége (<http://pathmicro.med.sc.edu>).

Rövidítések: Polio = poliovírus, Echo = echovírus, Cox = coxsackievírusok, CoxA = coxsackie A vírus, CoxB = coxsackie B vírus.

Az elsődleges megtapadási helyeken történő vírusszaporodásnak általában semmiféle klinikai jele nincs. A poliovírusok példáját nézve, ilyen tünetmentes (*inapparens*) formában zajlik le a fertőzések több mint 99%-a. A fertőzések 4-8%-ában a

vírus a nyirokutakon a véráramba jut. A virémia lázreakcióval jár (minor illness), amely néhány nap múlva minden következmény nélkül elmúlhat (abortív fertőzés). A megbetegedések kis hányadában a nyirokszervekben történő másodlagos szaporodás mellett a vírus a központi idegrendszerbe juthat (valószínűleg a makrofágok közvetítésével). Ennek legtöbbször csak mérsékelt idegrendszeri következményei vannak: meningeális tünetek (*non-paralyticus poliomyelitis*). Az összes fertőzés 0,01-2%-ában alakul ki a másodlagos vírusszaporodás a központi idegrendszer motoros neuronjaiban, és ezek elhelyezkedésétől és számától függően alakulnak ki a bénulásos *poliomyelitis* különböző klinikai formái (Grist és mtsai., 1978).

Az, hogy a másodlagos virémia során az enterovírus fertőzés következtében melyik szerv fertőződik meg, függ a sejtek felszínén expresszálandó vírusspecifikus receptoroktól. A poliovírusok receptora, a CD155 a központi idegrendszerben található meg. A coxsackievírusok receptorait (CAR, ICAM-1, DAF) számos sejtfeleség, főleg a hámsejtek és a limfoid sejtek hordozzák (Staunton és mtsai., 1989). Egyes echovírusok és a coxsackie B vírusok a sejtbe való bejutáshoz koreceptornak integrineknek igényelnek (Xing és mtsai, 2004, Ylipaasto és mtsai 2004, Esfandiari és mtsai., 2006). A különböző humán enterovírus okozta kórképeket a **11. ábra** foglalja össze.

Az enterovírus fertőzések járványtana

Az enterovírus fertőzések klinikai manifesztációjának gyakoriságát több tényező is befolyásolja. Ezek részben a fertőző vírussal, részben a fertőzött szervezettel kapcsolatosak. Csecsemők csak akkor betegednek meg, ha az adott vírustípussal édesanyjuk nem találkozott (el-Sageyer és mtsai., 1998). A legtöbb fertőzés fél évnél idősebb gyermekekben zajlik le. A gyerekek az egyik jelentős terjesztői az enterovírus fertőzéseknek, ezért pl. az agyhártyagyulladás járványokban érintettségük jóval magasabb, mint a felnőtteké. A fejlődő országokban a poliovírus fertőzések incidenciája 4-6 hónapos csecsemőknél viszonylag alacsony, mert az anyai ellenanyagok védeltséget nyújtanak a fertőzéssel szemben. Azonban a 6 hónapnál idősebeknél a *paralyticus* betegségek incidenciája jelentősen megugrik. Ennek egyik fő oka a szegényes higiéniai körülmények (Pallansch M., 2001).

A poliovírusok mellett a legtöbb non-polio enterovírus okozta megbetegedés is korfüggő. Például a coxsackie A vírusok és echovírusok enyhébb tüneteket okoznak csecsemőkben, mint felnőttekben. Másrészt viszont egyes enterovírusok súlyosabb betegségeket okoznak újszülött korban. Ide tartoznak a *myocarditis*-szel járó „virális

sepsis”, *encephalitis*, *hepatitis*, amelyeknek sokszor halálos kimenetele lehet (el-Sageyer és mtsai., 1998). Az utóbbi években az enterovírus 71 okozott súlyos idegrendszeri szövődémmel járó kéz-láb-száj betegség járványokat a délkelet-ázsiai országokban, magas halálozási aránnyal a gyermekek körében (Zhu és mtsai., 2007; Hosoya és mtsai., 2006). A kutatások azt mutatják, hogy az *encephalitis* és *asepticus meningitis* általában az 5-14 év körüli gyerekeket érinti. Ennek az a magyarázata, hogy a felnőtt korosztályok már immunizálódtak az adott földrajzi területen cirkuláló vírusokkal.

Fontos megjegyezni, hogy az enterovírus ürítés ténye önmagában még nem felelős a betegség kialakulásáért, mivel a fertőzések nagy része tünetmentesen zajlik. Az enterovírusokra nem érvényesek a Koch posztulátumok. A megbetegedések víruseredetének bizonyításához szükséges egy „járványtani ismérv” meghatározása is. Több hasonló kórképben kell ugyanazt a vírust kimutatni, miközben a kórokozót számos egészséges kontaktszemély is ürítheti. Az enterovírusok szórványosan vagy járványos formában terjednek a populációban, egyes szerotípusok mindkét formában képviseltetik magukat.

Egy adott enterovírus típus okozta megbetegedés incidencia-, illetve prevalencia adatainak a közlésére általában a járvány után kerül sor. Ilyenkor történik a betegek nyomon követése, valamint az esetlegesen kocirkuláló egyéb vírusszerotípus(ok) felderítése. Ezt tükrözik a Magyarországon 1958-1991 között végzett poliovírus és non-polio enterovírus surveillance adatai (Dömök I., Molnár E., 1961a; Dömök I., 1984, Hargitai R., 1994), amelyeket az Országos Közegészségügyi Intézet (1998-tól Országos Epidemiológiai Központ) gyűjtött. A vizsgálatok igazolták a különböző enterovírus szerotípusok (echovírus 4, 6, 11, 30; coxsackie B3; enterovírus 71) szórványos és járványos előfordulási formáit. A közlemények szerint 1958-ban a CV-B3 vírus okozott nagy kiterjedésű járványt Bornholm-betegség formájában (Lukacs V, Romhanyi J. 1960; Domok I, Molnar E., 1960a, 1960b), majd 1978-ban az EV71 okozott *encephalitis*-t (Baranyai E, Káli G., 1980, Nagy és mtsai, 1982), 1989-ben pedig az echovírus 11 „prime” törzse vérzéses májgyulladászt okozott csecsemőkben (Kapiller és mtsai., 1998; el-Sageyer és mtsai., 1998; Szendrői és mtsai., 2000).

Az enterovírusok változatosságát jellemzi, hogy amíg egyes szerotípusok főleg zárt közösségekben okoznak járványt, addig mások országos vagy nemzetközi szinten cirkulálnak. Az echovírus 30 az egyik leggyakoribb szerotípus, amely napjainkban is több európai országban jelen van (Brunel és mtsai., 2008; Roth és mtsai., 2007; Cabrerizo és

mtsai., 2008). Mérsékelt égövön az enterovírusok cirkulációjára a nyári-őszi szezonális jellemző, míg a trópusi országokban előfordulási gyakoriságuk egész évben állandó.

Az enterovírusok molekuláris vizsgálata korábban nem látott lehetőségeket nyújt a vírusbetegségek epidemiológiájának a megértésében.

2.5. Az enterovírus fertőzések laboratóriumi diagnosztikája

Mintagyűjtés és mintatárolás

A mintákat tünetes időszakban mielőbb, de legalább a betegség kezdetétől számított 2 héten belül kell begyűjteni. A vizsgálatra alkalmas minták: széklet, perikardiális folyadék, agy-gerincfolyadék, vezikuláris folyadék, autopszia, biopszia minta, szérum, torokmosó/garatváladék, szemváladék, stb. A laboratóriumba érkezés után a mintákat néhány óráig +4°C-on, hosszabb ideig fagyasztva -20 vagy -70°C-on kell tárolni (Lennette E., 1979).

Vírusizolálás és azonosítás

A enterovírusok számtalan emlősből származó sejt kultúra-féleségben szaporíthatók. A leggyakrabban használt sejt kultúrák: primer majomvese, humán embrionális vese- és bőr-izom fibroblaszt, humán amnion kultúrák, valamint HeLa és RD-sejtvonalak. A sejt tropizmus meghatározó tényezője a megfelelő sejtreceptorok jelenléte. A vírusszaporodás sejttenyészetben fénymikroszkóppal észlelhető alaki elváltozást, citopatogén hatást (CPE) okoz (sejtlekerekedés, sejtlízis, sejtleválás a tenyésztő edény faláról).

A szelektív sejttenyészetek (RD és L20B) lehetővé tették a polio- és non-polio enterovírusok külön-külön izolálását (Pipkin és mtsai., 1993). A vizsgálati mintával beoltott sejttenyészeteket minimum 14 napig kell inkubálni, ez idő alatt két átoltás (passzázs) végezhető el. A sejttenyészeteket 37°C-on, 5% széndioxid-tartalom mellett kell inkubálni. A vizsgálat eredményét a fénymikroszkópos megfigyelés során tapasztalt CPE jelenléte (pozitív) vagy hiánya (negatív) adja (WHO, 2004).

A vírusserotípus meghatározása a kereskedelembe kapható immunsavókkal végezhető. Az egyes coxsackie „A” csoportú vírusok nem szaporodnak sejttenyészetben, a kimutatásuk szopós egérbe való oltással lehetséges. A módszert az OEK Általános vírusdiagnosztikai osztályán 2004-ig alkalmazták.

A sejtenyészetben való vírusizolálást jelenleg is „arany standardnak” tekintik az enterovírus diagnosztikában. Hátránya, hogy anyag- és időigényes módszer, ráadásul számtalan enterovírus szerotípus nem is szaporodik sejtenyészetben. Ennek lehetséges okai a receptor-felismerés hiánya, a vírus-aggregátumok képződése, antigén drift vagy rekombinációk a kapszid régióban (Oberste és mtsai., 1999a; 1999b). A vírustipizálásra használt kereskedelmi immunsavók is csak néhány szerotípus azonosítását teszik lehetővé, ezért a molekuláris módszerek egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a vírusdiagnosztikai laboratóriumokban.

Enterovírus kimutatás reverz-transzkripció polimeráz-lánreakció (RT-PCR) módszerrel

A módszernek az enterovírus diagnosztika tekintetében három alapvető változata ismert: univerzális kimutatás, szerotípus-specifikus kimutatás és csoport-specifikus kimutatás. Korlátozott számban egyes vírusokat szerotípus-specifikus, vagy szerotípuson belüli változatok megkülönböztetésére szolgáló módszerekkel is lehet vizsgálni. A vírusdiagnosztikai laboratóriumok általában az univerzális kimutatási módszereket alkalmazzák. A módszer az enterovírus genom konzervatív régiójára pl. 5'-NTR kimutatására tervezett oligonukleotidokkal működik (Rotbart HA., 1991; Zoll és mtsai., 1992; Sawyer és mtsai., 1994;). Ez a módszer kimutatja az *Enterovirus* genus majdnem mindegyik típusát. A módszerre jellemző a magas szenzitivitás és specificitás, és néhány óra alatt eredményt ad, aminek különös jelentősége van a vírusfertőzések differenciál-diagnosztikájában (Chonmaitree és mtsai., 1988). Az enterovírus tipizálás molekuláris módszerrel a VP1 genetikai régióra kidolgozott PCR-rel valósítható meg, mivel ez a régió szoros korrelációt mutat a vírus szerotípusával (Oberste és mtsai., 1999b; Santti és mtsai., 1999a, 1999b).

Szerológiai diagnózis

A szerológiai kimutatási módszereknek, mint pl. immunoassay, csak korlátozott lehetőségei vannak az enterovírusok diagnosztikájában, mert a számtalan szerotípus közös antigénjei keresztreakálnak, a vírusneutralizációs próba pedig típus-specifikus. A vizsgálatot egyidejűleg vírussorozatokkal szükséges elvégezni a kórokozó azonosítása céljából, ami technikailag nem kivitelezhető.

Amennyiben a beteg székletéből, vagy egyéb mintáiból sikerül izolálni a vírust, akkor annak kóroki szerepe a beteg savópárjának (a két vérminta közötti mintavételi idő min. 14 nap) a vírusneutralizációs vizsgálatával bizonyítható. A négyszeres titeremelkedés megerősíti az aktuális enterovírus fertőzés tényét.

A szerológiai vizsgálatoknak főleg a retrospektív tanulmányokban van szerepük, amikor egy bizonyos enterovírus szerotípus ellen képződött ellenanyagszintet kívánnak meghatározni (pl. védőoltás utáni anti-poliovírus ellenanyag meghatározás).

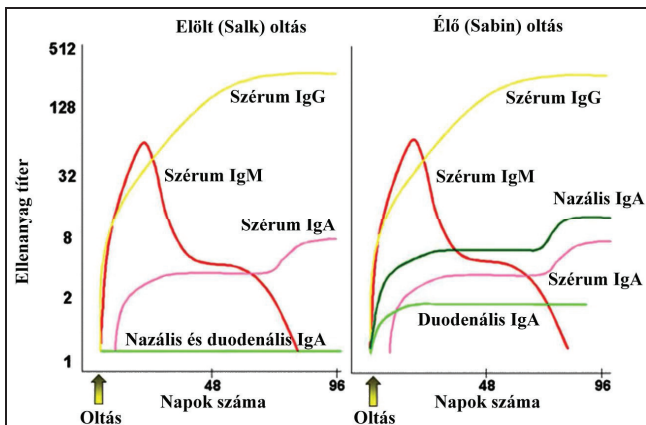
Három alapvető enterovírus ellenanyag-meghatározó módszert használnak: komplementfixáció, haemagglutináció-gátlás és vírusneutralizáció sejtenyészetben. Ez utóbbi alkalmazása legelterjedtebb a diagnosztikai laboratóriumokban.

2.6. A poliomyelitis elleni megelőző védőoltások

2.6.1. Inaktivált és attenuált poliovírus vakcinák

Az 50-es évek második felében vezették be a világ számos országában a poliomyelitis elleni **inaktivált védőoltást**. A formalinnal előlt oltóanyagot (IPV) három vad típusú poliovírusból - Mahoney (1-es típus), MEF-1 (2-es típus) és Saukett (3-as típus) - állították elő (Sabin A., 1954). A későbbiekben kidolgozták a második generációs, emelt hatékonyságú inaktivált poliovakcinát (eIPV), amellyel akár az első oltás után is 90% feletti szerokonverziót lehetett elérni (Salk J., 1960). Salk és munkatársai bebizonyították, hogy az eIPV tartós immunitást biztosít még akkor is, ha évek múltával az ellenanyagok kimutathatatlanná válnak, mert az immunológiai memória megmarad. A poliovírussal való esetleges fertőzés okozta antigéningerre ugyanis gyors, szekunder típusú ellenanyagválasz alakul ki, amely meggátolja a vírusnak a központi idegrendszerbe való bejutását a véráramon keresztül (Salk J., 1960, 1977).

Egyik hátránya az IPV-nek, hogy **nem indukál szekretoros IgA ellenanyagokat (12. ábra)**, így a magas ellenanyag-tartalom a garatban lezajló víruszaporodást gátolja, de a vékonybélben szaporodó vírusokét már nem (Schwartz és mtsai., 1989) Az **IPV adagolása parenterális**, ami gyenge egészségügyi hálózattal rendelkező országokban jelentős gátló tényező. A legnagyobb hátrány azonban az eIPV magas ára, ugyanis a gyárban kell megtermelni azt az antigén mennyiséget, ami az OPV esetén az oltott egyén szervezetében termelődik meg. Az előlt vakcina előnye, hogy **nem okoz oltási poliomyelitis-t**, viszont a kialakult járványok leküzdésére nem használható.



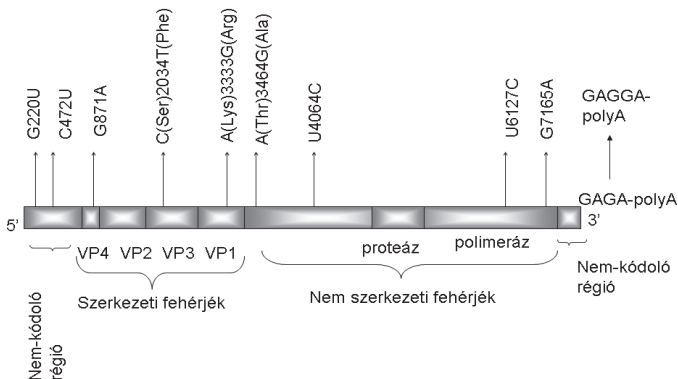
12. ábra. Az elölt (IPV) és az élő (OPV) gyengített vakcina által indukált immunválasz (Baranyai és mtsai., 1994).

Az ábra bemutatja az IgA, IgM, IgG típusú ellenanyagok megjelenését a vérben az elölt védőoltás (Salk) beadását követően, valamint az élő védőoltás indukálta szekretoros (nazális IgA, duodenális IgA) ellenanyag titereket.

Ezzel szemben az élő attenuált **orális poliovírus vakcina (OPV)** a természetes immunizáló, inapparens fertőzést utánozza. A szájon át történő bevitel után a víruszaporodás a torokban és vékonybélben ugyanúgy zajlik, mint a természetes fertőzés esetében. A vakcinavírus eljut a regionális nyirokcsomókig, de virémia rendkívül ritkán és első sorban a Sabin 2-es típus esetén fordul elő. A víruszaporodás tartama és nagyságrendje megfelel a természetes fertőzésnek ugyanúgy, mint az indukált immunválasz (12. ábra). A vérben megjelenő ellenanyagválasz mellett kialakul a **lokális immunitás** is (Dömök I., 1984). Előnyként és hátrányként egyaránt felhozható, hogy az oltottak **nagy mennyiségben ürítik a vakcinavírust**. Ennek előnye, hogy a monovalens oltóanyag beadását követően járulékos immunizálódás jön létre, azaz az oltottak környezetében élő fogékony személyek is fertőződnek és immunissá válhatnak. Hátránya, hogy a szóródás kapcsán a vírus változhat, **neurovirulenssé válhat** és bénulást okozhat. Az oltottakban elsősorban a Sabin 3-as típus, a fogékony környezetben pedig a Sabin 2-es típus okoz megbetegedést. A Sabin 1-et tartják a legstabilabbnak.

2.6.2. Poliovírus 3 (Sabin) vakcinatörzsek attenuációjának molekuláris alapjai

Genom-összehasonlítást végeztek a Sabin 3 (P3/Leon12a₁b) és a virulens prekursora (P3/Leon/37) között, amelyet *poliomyelitis*-ben meghalt betegből izoláltak 1937-ben (**13. ábra**).

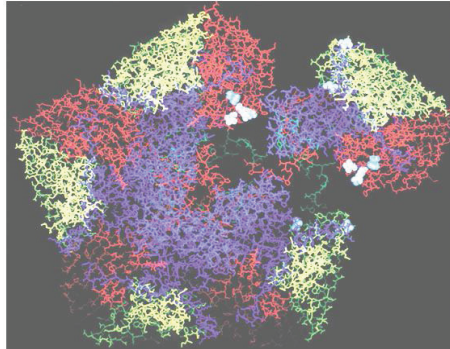


13. ábra. Genetikai különbségek a vad poliovírus 3 (P3/Leon/37) és az attenuált vakcina törzs (P3/Leon 12a₁b) között (*Westrop és mtsai., 1989*).

Az ábrán láthatók az attenuáló mutációk pozíciói a genomban. Az első nukleotid a vad típusé, a második az attenuált vírusban kimutatott nukleotid. A számok mind a mutációk, mind az aminosavak esetében a megváltozott nukleotid pozícióját mutatják.

A két genom szekvencia közötti különbségek száma meglehetősen alacsonynak bizonyult, **kilenc mutációt** mutattak ki (**13. ábra**). Ezek közül összesen két nukleotid különbségre van szükség az attenuált fenotípus fenntartásához. Az egyik az **5'-NTR** régió **472 nt pozíciójában** található, a másik a **2034 nt** pozíciót érinti, ez utóbbi aminosav változást is okoz a **VP3 kapszidfehérjében** (szerin cserélődik ki fenilalaninra), amely az attenuált állapot fenntartásáért felelős állatkísérleti modellben (**14. ábra**).

Az **5'-NTR attenuáló mutációja** az **IRES elem V. doménjét** érinti. Az attenuációban részt vevő mutáció gyengíti a bázispárosodott RNS szerkezetet. Ennek oka, az hogy a **vad poliovírus 3** mutációja során a **472 nt pozícióban** egy erős **G-C** bázispár **G-U** bázispárra változik (Evans és mtsai., 1985; Racaniello és mtsai., 1986). Ez a folyamat bizonyítja az RNS másodlagos szerkezet valódi élettani jelentőségét a víruszaporodásban.



14. ábra. A poliovírus 3 kapszid szerkezete (Minor PD.,1999).

Az ábra bemutatja a termoszenzitív, attenuált fenotípus fenntartásában, valamint a szuppresszióban résztvevő aminosavak helyét. A kapszidfehérjék színjelölései: VP1 = kék, VP2 = sárga, VP3 = piros, VP4 = zöld. Attenuáló mutációk a VP3 régióban (91. aminosav) = cián. A szuppresszióban résztvevő mutációk fehér színnel jelölték.

A Sabin 3 törzsek **attenuáló mutációja a VP3-ban** a víruskapszid protomér alegységeinek illesztési felületén a szerinnek egy nagy molekulásúlyú aminosavval, a **fenil-alaninnal történő szubsztitúcióját** eredményezi. Ez utóbbi meggátolja a kapszid szoros összeépülését, így az **instabillá** válik és **37°C felett a vírusreplikáció leáll**. Maga a vírusrészecske is hőlabilissá válik (**14. ábra**). A kapszid régió néhány szuppresszor mutációja is képes fenntartani a vakcinatörzs termoszenzitív fenotípusát. A **VP3 régió 91. aminosavának** visszamutálása viszonylag ritka jelenség, de ha mégis bekövetkezik, akkor a **VP1 régió 54. aminosavának** a megváltozásával jár együtt. A VP1-ben bekövetkezett mutáció önmagában is hatással van a vakcinavírus termoszenzitív tulajdonságainak az elvesztésére (Minor PD., 1999).

2.6.3. Poliovírus elleni védőoltások alkalmazása Magyarországon napjainkig 1955-1959

Magyarországon 1955-ben, 1957-ben és 1959-ben három nagy poliovírus járvány vonult végig, ezek együtt több mint 3500 beteg bénulását és több száz gyermek halálát (Heine–Medin kór) okozták. Ekkor került bevezetésre az inaktivált poliovírus vakcina

(IPV). Ezzel a vakcinával azonban csak mérsékelt eredmények születtek, és nem volt ritka, hogy az előlt vakcina kiterjedt használatára ellenére újabb járványok léptek fel, ezért Magyarország az élő vakcina bevezetése mellett döntött (Dömök I., 1961b).

1960-1991

Az első gyengített Sabin-vakcina alkalmazásával (orális poliovakcina, OPV) 1960-ban sikerült megakadályozni a *poliomyelitis* járványos terjedését. Az oltásokat a Sabin által javasolt séma szerint végezték: a monovalens OPV-t (**mOPV**), 1-3-2 típusrendben, 5-6 hetes időintervallummal adták **kampányszerűen** 2-38 hónapos gyerekeknek. A védőoltásnak köszönhetően a betegszám általában gyorsan csökkent. **Magyarországon az utolsó vad vírus okozta megbetegedés 1969-ben**, az utolsó behurcolt betegség 1972-ben fordult elő (Dömök I., 1999).

A virológiai és epidemiológiai vizsgálatok eredményei **igazolták**, hogy a gyengített vakcinavírus is képes bénulást okozni. Az **oltási poliomyelitis-t Magyarországon** először Dr. Dömök István írta le (Domok I., 1984).

1992-2006

A monovalens orális poliovakcinával végzett kampányoltásokat 1992-ben felváltotta a gyermekek **folyamatos, kombinált oltóanyaggal** végzett immunizálása. Az fogékony gyerekeket 3 hónapos kortól oltották egy adag **eIPV**-vel, majd öt adag trivalens vakcinával (**tOPV**) 6 éves korig.

Az eIPV minimális ellenanyagválaszt eredményezett mindhárom poliovírus szerotípus ellen annak ellenére, hogy a csecsemők többségének még voltak anyai ellenanyagai (Herremans és mtsai., 2000). Sok gyerekben szerológiai módszerekkel ezt a választ nem is lehetett kimutatni, azonban az így kialakult **aktív védettség 1992 óta megakadályozta az oltási poliomyelitis** kialakulását. Az eIPV és tOPV együttes alkalmazása a minimálisra csökkentette az oltás utáni vírusok szóródását, ami a korábbi oltási rendszerben gyakran előfordult (Maldonado és mtsai., 1997). A víruscirkuláció visszaszorításában természetesen szerepet játszott a lakosság igen magas védettsége is.

Magyarországon a védőoltási rend hatékonyságát 2000-ben ellenőrizték. Több mint 8000, különböző korcsoportból származó savóminta szeroepidemiológiai vizsgálatát végezték el. Az eredmények azt mutatták, hogy a lakosság védettségi szintje mindhárom szerotípussal szemben meghaladja a 98%-ot (Berencsi és mtsai., 2005).

2006-

A *poliomyelitis* elleni vakcináció leállításának lehetséges módja, amennyiben a vakcina eredetű törzsek tartósan cirkulálnak, bizonyos ideig tartó eIPV alkalmazása

(Martin és mtsai., 2003). Mivel az európai régió már 6 éve mentes a honi eredetű vad poliovírustól, és a magyarországi lakosság immunállapota is kielégítő, a járványos gyermekbénulás elleni immunizálást az orális élő poliovírus vakcina helyett **inaktivált poliovírus** tartalmú vakcinával végzik a 2005. november 1. után születetteknek. **Magyarországon 2006. április 1-től** az orális poliovírus tartalmú vakcina használata megszűnt.

2.7. A vakcina eredetű poliovírusok csoportjai

A poliovírus izolátumok következő kategóriáit különböztetik meg: **1). OPV-szerű** (oral poliovirus-like vagy Sabin-like) izolátumok, azok amelyek <1%-ban térnek el a VP1 kódoló régióban a szülői Sabin-törzsektől; **2). VDPV** (vaccine derived poliovírus), amelyek a szülői Sabin-törzsektől 1-15%-ban térnek el a VP1 régióban (≥ 10 nukleotid szubsztitúció); **3). vad poliovírusok**, amelyek a VP1 régióban >15%-ban térnek el a Sabin-törzsektől.

A VDPV vírusok három típusa ismert: **(a) iVDPV** (immunodeficient VDPV), immundeficiens egyénből származó izolátumok, amelyek vakcinabeadáستól számítva hosszú ideig ürrülnek az immunsuppresszált egyénekből; **(b) cVDPV** (circulating VDPV), azok az izolátumok, amelyek tartósan részt vesznek az emberről emberre való terjedésben; **(c) aVDPV** (ambiguous VDPV), kétes eredetű környezeti vagy klinikai mintákból származó izolátumok, ahol az immundeficiens vagy járvánnyal összefüggő etiológiát nem sikerült tisztázni (Kew és mtsai., 2004; Agol VI., 2006).

Az OPV-szerű és a VDPV izolátumok közötti, 1%-ot meghaladó eltérés a VP1 régióban arra utal, hogy a vakcinavírus replikációja már egy éve vagy esetleg hosszabb ideig tart, szemben a szabályos poliovírus ürítéssel, ami általában 4-8 hét. A definíció csak VDPV izolátumok hosszantartó ürítésére utal, a vírusok biológiai tulajdonságaira nem tér ki. Ez azt jelenti, hogy az 1%-nál kevesebb eltéréssel rendelkező vakcinavírusok is képesek bénulást okozni vagy cirkulálni az alulimmunizált populációban. Az esetek többségében a Sabin-törzsek kritikus attenuáló mutációi revertálnak még mielőtt a nukleotid szubsztitúciók száma a VP1 régióban elérné az 1%-ot.

Az **iVDPV** izolátumok hosszantartó ürítése a gazdaszervezet immundeficiens állapotával függ össze, pl. variabilis immunodefektus (CVID), hypogammaglobulinémia, agammaglobulinémia, HIV okozta immundeficiens állapot, stb. Egyes CVID betegeknek a vakcinavírus ürítése rövid időn belül magától megszűnik, egyesek pedig több mint 15 évig

űrítik azt (Kew és mtsai., 1984). A hosszantartó vírusűrítők közül egyesek tünetmentesen vészelik át a vírushordozást, míg mások megbénuľnak. Ez idáig a CVID betegekbeľ kimutatott iVDPV leggyakrabban a poliovírus 1 típusba tartozott (Kew és mtsai., 2004; Khetsuriani és mtsai., 2003; Shahmahmoodi és mtsai., 2008).

A **cVDPV** izolátumok világszerte okoznak járványokat alulimmunizált közösségekben. Az első járványt 2000-2001 között mutatták ki Hispaniola szigetén 31 igazolt *poliomyelitis* megbetegedéssel (Kew és mtsai., 2005). Ezt követően a világ egyéb részeiről évente jelentettek újabb járványokat (Cherkasova és mtsai., 2002; Kojouharova és mtsai., 2003; Rousset és mtsai., 2003; Yang és mtsai., 2003; Shimizu és mtsai., 2004; Kew és mtsai., 2005).

Az **aVDPV** izolátumok zömét eddig környezeti mintákból mutatták ki. A környezetbeľ, túlnyomórészt szennyvízbeľ kimutatott izolátumok az iVDPV izolátumokhoz hasonlítanak, főleg ha olyan országban kerülnek izolálásra, ahol magas a populáció átoltottsági aránya (Pertinacová és mtsai., 2004; Pavlov és mtsai., 2005; Blomqvist S., 2004).

A neurovirulens vakcina eredetű törzsek szelekciójában jelentős szerepet játszanak a természetben megfigyelt rekombinációs folyamatok a non-polio enterovírusokkal, pl. a coxsackie A csoportúakkal. Ezen kívül a vakcina eredetű törzsek rekombinálnának (intertípusosan és intratípusosan) a vad poliovírusokkal is, 50%-ban rekombináns genomot képezve (Arita és mtsai., 2005; Rakoto-Andrianarivelo és mtsai., 2008; Riquet és mtsai., 2008; Guillot és mtsai., 2000; Santti és mtsai., 1999a).

2.8. Oltási *poliomyelitis* (VAPP)

Az oltási *poliomyelitis* (VAPP = **vaccine-associated paralytic poliomyelitis**) egy ritka és komoly szövödmény, amely az OPV beadását követően alakul ki. Az első VAPP megbetegedéseket az 50-es években mutatták ki, közvetlenül a vakcina forgalomba hozatala után (Terry L., 1962). A VAPP előfordulhat egészséges oltottakban vagy a fogékony környezetben. A VAPP rátája alacsony, és a legtöbb országban körülbelül egyforma. Az Egyesült Államokban a VAPP kockázata a fogékony populációban az első oltást követően 1 megbetegedés volt 750.000 immunizált gyerekre nézve (Prevots és mtsai., 1994).

A VAPP betegek jellemzésére nincs egységes meghatározás (Kew és mtsai., 2004). Általánosan elfogadott, hogy a VAPP az oltás utáni 4-40 nap között jelentkező *acut flaccid*

paralysis, amely 60 napnál tovább is eltarthat. A VAPP betegek két csoportja: **a) recipiens**, ha a betegség kezdete előtt 4-40 nappal kapta az OPV-t; **b) kontakt**, ha betegség kezdete előtt kapcsolata volt oltottal, akit 4-75 nappal megelőzően oltottak be (Georgescu és mtsai., 1994). A VAPP-ot az OPV recipiensekben és kontaktokban leggyakrabban a Sabin 3 (71%), utána a Sabin 2 (26%) okozza. A Sabin 1 ritkán és főleg immundeficiens egyénekben okoz VAPP-ot (Kew és mtsai., 2004).

Magyarországon 1961 és 1990 között a monovalens kampányoltások időszakában a 66 bejelentett *poliomyelitis* megbetegedésből **56 oltási poliomyelitis-nek bizonyult**, ebből **44 a 3-as típusú vakcinatörzssel** volt kapcsolatos. Klinikai vizsgálatok alapján nem lehetett megkülönböztetni a vad vírus okozta *poliomyelitis*-t az oltási eredetűtől, kizárólag a részletes epidemiológiai adatok, a vírusizolálási és szerológiai eredmények dönthettek a klinikai képpel együtt (Dömök I., 1999). Az 1961-67 időszakban végzett becslések azt mutatták, hogy a **VAPP esetek száma: 0,77 (polio 1 után), 0,51 (polio 2 után) és 2,82 (polio 3 után) 1 millió vakcinált gyermekre számítva** (Dömök I., 1971).

A VAPP oka egyelőre ismeretlen, feltételezik, hogy a vakcinavírus reverziója okozza. Az OPV beadása után az élő gyengített vakcinavírusok a gyomor-bélrendszerben szaporodnak. Az oltottak a székletükkel ürítik a többszöri genetikai változáson átesett vírusokat, amelyek potenciális veszélyt jelentenek a recipiens és a fogékony kontaktok számára is. A három vakcina szerotípus közül a Sabin 3 okozza a legtöbb VAPP-ot (Wright és mtsai., 1991). Több elmélet létezik a Sabin 3 törzs megváltozásával kapcsolatosan, amely lehet **mutáció, konformációs változás, rekombináció, gazdaszervezet okozta tényező** vagy **víruskompetíció** következménye. Az elméletek bizonyos szinten átfedésben vannak egymással, de igazából egyikük sem tudja megmagyarázni valójában, hogyan okoz a gyengített poliovírus vakcina oltási *poliomyelitis*-t.

A Sabin 3 mutációs elmélet

A három OPV vírustörzset a vad poliovírusok sorozatos passzálásával különböző sejtvonalonak nyerek ki. A passzálás során a vírus elveszíti a virulenciáját. Az OPV beadása után a létrejött mutációk revertálnak az oltottakban (Almond és mtsai., 1984; Evans és mtsai., 1985; Minor és mtsai., 1986; Tatem és mtsai., 1991; Chumakov és mtsai., 1992; 1994; Chumakov KM., 1996; Lu és mtsai., 1996; Rezapkin és mtsai., 1995; 1998; Kauder és mtsai., 2004). Feltételezik, hogy ennek a mechanizmusnak van a legnagyobb szerepe a VAPP kialakulásában. Az elmélet egyelőre csak kevés információt szolgáltat a

mutációk pontos hatásmechanizmusáról a VAPP patogenezisében (Minor PD., 1992; 1993b; Minor és mtsai., 1993a).

Konformációs változás elmélete

Az elmélet azokkal a mutációkkal foglalkozik, amelyek konformációs változásokat idéznek elő a belső riboszómakötő hely szekvenciájában (IRES). Az IRES jelzi a riboszóma számára a transláció kezdetét. Az IRES-t érintő mutációk a vírusreplikáció megváltozását és a neurovirulencia fokozódását eredményezik (Skinner és mtsai., 1989; Gromeier és mtsai., 1996).

Rekombináns elmélet

Az elmélet a három Sabin típus és más vírusok közötti rekombinációt helyezi előtérbe (Friedrich és mtsai., 1996; Georgescu és mtsai., 1994; 1995; Furione és mtsai., 1993; Chumakov és mtsai., 1994; Li és mtsai., 1996). A vírusreplikáció során egyes szekvenciaresek kicserélődnek idegen genetikai információval, ami általában az ugyanott szaporodó más vírusoktól származik (Adu és mtsai., 2007; Rakoto-Andrianarivelo és mtsai., 2008). Végtelen számú rekombináció lehetséges (Egger és mtsai., 2000; Oprisan és mtsai., 2002; Liu és mtsai., 2000; Rousset és mtsai., 2003; Arita és mtsai., 2005; Cherkasova és mtsai., 2005; Paximadi és mtsai., 2006; Rakoto-Andrianarivelo és mtsai., 2007; Iakovenko és mtsai., 2008; Dedepsidis és mtsai., 2008). Az elmélet főleg azokat a rekombinációkat részesíti előnyben, amelyek az attenuált fenotípus elvesztését okozzák (Avellón és mtsai., 2008; Martin és mtsai., 2002).

„Gazdaszervezet-függő” elmélet

Az elmélet a gazdaszervezet szerepét hangsúlyozza, nem pedig a vírusét. Az immundeficiencia a gazdaszervezet egy olyan állapota, amely növeli a VAPP kockázatát (Parvaneh és mtsai., 2007). Feltételezik, hogy immundeficiencián kívül más gazdaszervezeti tényezők is közrejátszanak a VAPP kialakulásában, de egyelőre ezeket még nem sikerült azonosítani.

Viruskompetíció

Maldonado és mtsai. (1997) kimutatták, hogy a Sabin 1-es és 2-es típusok jól nőnek együtt, viszont a Sabin 2-es és 3-as típus már nem. Ebből következik, hogy a Sabin 2-es szelekciós nyomást gyakorol a Sabin 3-as növekedésére. A szelekciós nyomás hatására mutációk keletkeznek az IRES régióban, valamint rekombinációk sorozata is végbemeleg. Az a gazdaszervezet, ahol a mukozális immunitás aránya magasabb a humorálissal szemben, telítődni fog a neurovirulens mutáns vagy rekombináns vírusokkal, melyek

bekerülve a véráramba megfelelő védettség hiányában megtámadják a központi idegrendszert.

A VAPP megbetegedéseket évente 250 és 500 közöttire becsülik világszerte, és a leggyakrabban a vad poliovírustól mentes országokban mutatják ki. A VAPP közvetlen következménye a Sabin OPV törzsek genetikai instabilitásának, ezért a leghatékonyabb módszer ennek kivédésére az OPV alkalmazásának a leállítása lenne (Kew és mtsai., 2004).

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Bénulást okozó poliovírus 3 izolátumok molekuláris genetikai vizsgálata:

- 1.1. Magyarországon a 60-as években archivált poliovírus 3 vírusizolátumok epidemiológiai és virológiai adatainak a felkutatása;
- 1.2. Annak megállapítása, hogy a bénult gyermekekből 1960 és 1967 között izolált poliovírus 3-as törzsek vad típusúak vagy vakcina eredetűek-e;
- 1.3. Amennyiben a vakcinatörzs okozta a bénulást, annak melyik változata, a Sabin-szerű vírus vagy vakcina eredetű poliovírus (VDPV)?
- 1.4. Amennyiben az oltóanyag törzs okozta a bénulást, milyen molekuláris mechanizmusok játszhattak közre a neurovirulencia visszanyerésében?

2. Non-polio enterovírusok molekuláris jellemzése és epidemiológiája Magyarországon:

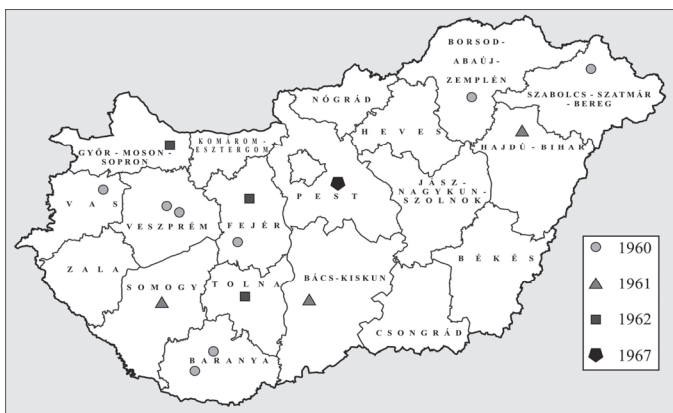
- 2.1. A molekuláris tipizálás módszerének adaptálása az enterovírusok rutin laboratóriumi diagnosztikájában;
- 2.2. A Magyarországon 2000-2008 között az 5'-NTR nested RT-PCR-rel kimutatott enterovírusok molekuláris tipizálása;
- 2.3. Az előforduló szerotípusok molekuláris epidemiológiai vizsgálata;
- 2.4. A vírusgenom szerkezeti változásai és a kórokozó képesség közötti összefüggés felkutatása;
- 2.5. Az egyedi szerotípusok összehasonlítása a múltbeli járványokat okozó magyarországi izolátumokkal filogenetikai elemzés segítségével.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Vizsgálati anyagok

4.1.1. Poliovírus vizsgálati anyagok

Összesen **18 poliovírus 3-as** típust vizsgáltunk, amelyek **1960-1967** között kerültek izolálásra. Az archív iratokban kutatva sikerült azonosítanunk a 18 izolátum eredetét, amelyek 15 *poliomyelitis*-ben szenvedő gyerektől származtak. A gyerekek kora 5 hónap és 4,5 év között volt (medián 1,5). A poliovírus 3 izolátumok földrajzi eloszlását a **15. ábrán** tüntettük fel.



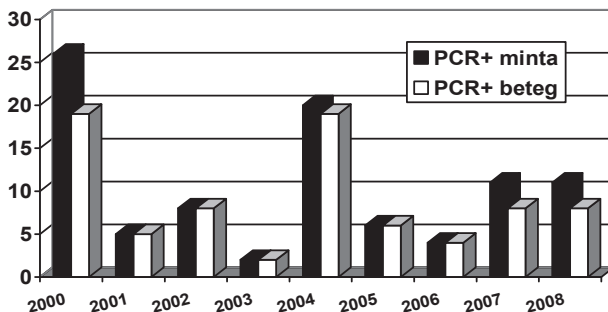
15. ábra. A poliovírus 3 okozta gyermekbénulás megbetegedések földrajzi eloszlása.

A molekuláris vizsgálatokkal párhuzamosan végeztük a hiányzó epidemiológiai és virológiai adatok felkutatását az archivált virológiai kártonok alapján, valamint a 60-as évekből származó tudományos közleményekben. A poliovírus izolátumokat az OEK BSL-4 szintű laboratóriumában tároltuk -70°C -on.

4.1.2. Non-polio enterovírus vizsgálati anyagok

Az OEK Általános vírusdiagnosztikai osztályára rutindiagnosztikai vizsgálat céljából beérkezett minták közül (széklet, torokmosó, agy-gerincfolyadék, hólyagbennék) azokat választottuk ki, amelyek előzőleg **pozitívnak** bizonyultak **enterovírus 5'-NTR nested RT-PCR** módszerrel.

Összesen **93 eredeti mintát** vizsgáltunk **79 betegtől**, amelyek **2000-2008** között kerültek beküldésre (**16. ábra**). A minták 6-33 éves (medián 8,25) betegektől származtak, akiknek *asepticus meningitis*, *encephalitis*, kéz-láb-száj betegség, *herpangina*, néhány esetben pedig atípusos tünetei (láz, fejfájás, stb.) voltak. Az enterovírus 5'-NTR nested RT-PCR pozitív minták tárolási hőmérséklete -20°C volt.



16. ábra. A retrospektív vizsgálatban résztvevő minták/betegek száma (2000-2008).

4.2. Módszerek

4.2.1. Vizsgálati minták feldolgoása

A sterilnek tekintendő vizsgálati mintákat (agy-gerincfolyadék, hólyagbennék) előkészítés nélkül használtuk a vizsgálatainkhoz. A beérkezett nem steril, folyékony halmazállapotú mintákat (garatmosó folyadék, torokmosó folyadék) a mikrobiológiai szennyezettség csökkentése érdekében a következő módon készítettük elő: 2 ml mintához 1 ml antibiotikum tartalmú (streptomycin 50 $\mu\text{l/ml}$, penicillin 100 U/ml) tápfolyadékot (Parker-199, OEK) és 0,5 ml kloroformot (Reanal, Budapest) adtunk. A homogenizátum egy részét Eppendorf-csövekbe pipettáztuk, majd 10 percig $+4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk (13.000xg). A széklet mintákat a WHO ajánlása szerint dolgoztuk fel (WHO, 2004). Kloroform rezisztens centrifugacsőben homogenizáltunk 1-3 g székletmintát, 4,5 ml antibiotikus tápfolyadék és 0,5 ml kloroform (Reanal, Budapest) hozzáadásával. Az enterovírusok jellegzetessége, hogy rezisztensek a kloroformos kezelésre, szemben az egyéb enterális kórokozókkal. A homogenizátumot 20 percig centrifugáltuk (4075xg), $+4^{\circ}\text{C}$ -on. A felülúszó egy részét Eppendorf-csövekbe pipettáztuk, majd 10 percig

centrifugáltuk (13.000xg) +4°C-on. A minták felüliszóját -20°C-on tároltuk a későbbi felhasználásig.

4.2.2. Vírusizolálás

Az archivált poliovírus izolátumokat a molekuláris vizsgálatok megkezdése előtt RD (human rhabdomyosarcoma, ATCC136) folyamatos sejtvonagra oltottuk az infektiivirionok kimutatása, valamint a fertőző víruspartikulumok növelése céljából. A vírusizolálást 24-lyukú lemezben (Corning GmbH, Germany) végeztük. Az egynapos monolayer sejt kultúráról leöntöttük a tápfolyadékot [D-MEM, 10% FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)], és ráértünk a 100 µl vírusizolátumot. A lemezeket 30 percig termosztátban inkubáltuk 37±0,5°C-on, 5%-CO₂ tartalom mellett. Az inkubációs idő elteltével a lemezekre 0,5 ml tápfolyadékot mértünk [D-MEM, 10% FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)], majd újra visszahelyeztük őket a termosztátba. A vírusszaporodás indikátora a citopatogén hatás (CPE) megjelenése volt, amit fénymikroszkóppal olvastunk le. Öt nap elteltével a sejtek felüliszójával L20B (NIBSC 910705) sejteket fertőztünk. Majd újabb öt nap elteltével a vírusszuspenziót fagyasztó ampullákba gyűjtöttük és -20°C-on tároltuk.

4.2.3. A nukleinsav-kivonás módszerei

A nukleinsav-izolálás előtt a szobahőmérsékleten felengedett vírusizolátumokat centrifugáltuk 6800xg-vel 3 percig. A nukleinsav-kivonást a vizsgálati mintákkal egyidejűleg a későbbi PCR reakciókra jellemző pozitív és negatív kontrollrok hozzáadásával végeztük.

Fenol-kloroformos módszer

A nukleinsav-kivonáshoz 1,5 ml-es Eppendorf-csővekbe 395 µl sejtlyázó oldatot (50 mM TRIS, 0,5 SDS, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 7,5) mértünk. A csövekbe 160 µl mintát pipettáztunk, majd minden mintához 4 µl (2 mg/ml) proteináz K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldatot mértünk. A reakcióelegyet kémcsőkeverővel homogenizáltuk, és legalább 1 órán át vízfürdőben 37±1°C-on inkubáltuk. Ezután minden mintához hozzáadtunk 395 µl fenolt [0,1 M citrát puffer, pH 4,3 ± 0,2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)] és 160 µl kloroformot (Reanal, Budapest), majd 10 másodpercig kevertük. A szerves és szerves fázisok szétválasztását hűthető (+4°C) centrifugában 15 percig 13.000xg-n végeztük. A felüliszózt pipettával leszívtuk újabb 1,5 ml-es Eppendorf-csővekbe úgy, hogy legalább 480 µl legyen, és a szétvárt fázisok között található

kicsapódott fehérjeréteg ne kerüljön bele. Minden csőhöz 480 µl izopropanolt adtunk, homogenizáltuk (kémcsőkeverő), majd -20°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, hogy az RNS-kicsapódás teljesen végbemenjen.

A csapadékot hűthető centrifugában +4°C-on 15 percen át 13.000xg ülepitettük. A felülúszót óvatosan leöntöttük és 400 µl 70%-os etanol (Reanal, Budapest) hozzáadásával mostuk. A csapadékot az előzőleg leírt paramétereken újra centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után a mintákat egy órán át szobahőmérsékleten szárítottuk, majd a csapadékot 8 µl DNáz/RNáz-mentes desztillált vízben (GIBCO, Grand Island, NY, USA) oldottuk. A nukleinsav oldatot azonnal használtuk a reverz transzkripcióhoz, a fel nem használt mennyiséget izopropanolban -70°C-on tároltuk.

Szilikamembrán alapú módszer

Az RNS-kivonáshoz QIAamp[®] Viral RNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) reagenskészlettel dolgoztunk a gyártó utasításai szerint. Egy 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe 140 µl mintát mértünk, majd hozzáadtunk 560 µl „hordozó” RNS tartalmú lízis puffert (a „hordozó” vagy carrier RNS megvédi a nukleinsavat a lebomlástól, és segíti annak megkötődését a szilikamembránon). Vortex segítségével az oldatot megkevertük, és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Feltárás után 560 µl abszolút etanolt (Reanal, Budapest) adtunk az elegyhez, majd az alkoholos kicsapást követően a mintát szilikagél oszlopra adszorbeáltuk úgy, hogy a kapott oldat felét centrifugálható, szűrővel ellátott oszlopra mértük, és 6000xg-vel egy percig centrifugáltuk. A szűrletet eltávolítottuk, a maradék reakcióelegyet újból a szűrőre mértük, majd ismét centrifugáltuk. Ezután különböző etanol tartalmú mosóoldatokkal eltávolítottuk a szennyező elemeket, és a kötődött RNS-t 60 µl eluáló pufferral leoldottuk az adszorbensről. Az RNS mintákat felhasználásig -70°C-on tároltuk.

4.2.4. Az enterovírus 5'-NTR nested RT-PCR és kimutatás

Reverz transzkripció

Az RNS vírusok vizsgálatakor a mintákból nyert nukleinsavból először reverz transzkriptáz enzim segítségével komplementer DNS szálát készítettünk (cDNS). Primerként az átírandó szakasz kezdőpontjának a kijelölésére Random Hexamer használtunk. A reverz transzkripció két lépésből tevődött össze. Első lépésben a reverz transzkriptáz enzim 42°C-on 15 percen keresztül szintetizálta a cDNS-t. Második lépésben

történt a DNS szálak denaturációja és az enzim inaktiválása 99°C-on 5 percig. Az inkubálás lépéseit Master Cycler PCR (Eppendorf, Germany) készülékben végeztük.

A reakcióelegyet a következőképpen állítottuk össze: 2 µl 10x PCR puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 1 µl RNáz/DNáz-mentes víz, 8 µl dNTP keverék (10 mM), 4 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl Random Hexamer (25 pM/µl), 1 µl RNáz Inhibitor (20 U/µl), 1 µl murine leukémia vírus reverz transzkriptáz enzim MuLV-RT (50 U/µl), 2 µl izolált RNS oldat. A reverz transzkripció elegy összterfógata 20 µl/minta volt. A reakciókat az Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) reagenseivel végeztük.

PCR reakció

A reverz transzkripciót követően az enterovírusok konzervatív 5' nem-leolvasott régiójának (5'-NTR) egy-egy szakaszát amplifikáltuk pan-enterovírus primerek segítségével (*polio és non-polio enterovírusok kimutatását teszik lehetővé*) az irodalomban közöltek alapján (Chapman és mtsai., 1997; el-Sageyer és mtsai., 1998; Diedrich és mtsai., 1995; Zoll és mtsai., 1992). A primereket az Integrated DNA Technologies Inc., USA szintetizálta, kapcsolódási helyeit a **17. ábra** szemlélteti.

Az I. PCR primerei:

Sense: „1”: 5'-AAGCACTTCTGTTTCC-3' (*pozíció:164-184 nt)

Antisense: „3”: 5'-CATTCAGGGGCCGAGGA-3 (*pozíció 584-599 nt)

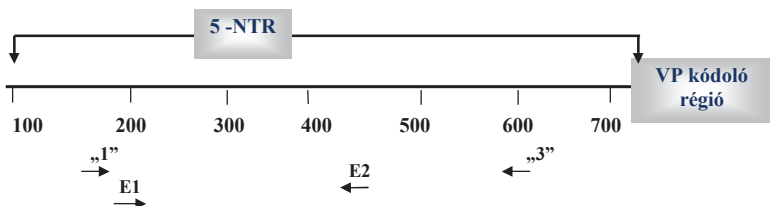
Termék mérete: 440 bp

A II. PCR primerei:

Sense: E1: 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3' (*pozíció 165-602 nt)

Antisense: E2: 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3' (*pozíció 470-490 nt)

Termék mérete: 317 bp



17. ábra. A pan-enterovírus primerek kapcsolódási helyei a vírusgenom 5'-NTR régiójában. *A pozíciómegadás referenciája, poliovírus Sabin 3-as típus (AY184221).

I., II. PCR reakció összetevői:

14µl PCR víz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,5-0,5 µl sense és antisense primer (50 pM), 25 µl REDTaq ReadyMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2-2 µl cDNS/I. PCR termék. A reakciók végtérfogata 42 µl volt. A reakciók körülményeit a **2. táblázat** tartalmazza.

kezdeti denaturáció	denaturáció	anelláció	extenzió	végző extenzió
2 perc 94°C	1 perc 95°C	1 perc 40°C	1 perc 72°C	7 perc 72°C
1x (ciklus)	30x (ciklus)			1x (ciklus)

2.táblázat. 5'-NTR pan-enterovírus I., II. PCR reakció idő/hő profilja/ciklusszám

PCR termékek kimutatása

A keletkezett PCR terméket 2%-os agaróz gélben (Invitrogen, CA, USA), 0,5 µg/ml etidium-bromid festék (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hozzáadásával futtattuk. Az elektroforézist 150 V-on 30-40 percig végeztük, 10x TBE (50 mM bázikus Tris, 41.5 mM bórsav, 0.5 mM Na₂EDTA) futtató pufferben. A termék méretét 100 bp-os felbontású DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA) marker jelenlétében ellenőriztük. Az elektroforézis befejeztével a keletkezett PCR terméket transzilluminátorban 302 nm-es ultraibolya fény (UV) megvilágításban tettük láthatóvá. Az adatokat digitális fényképezőgéppel rögzítettük, és számítógépes információ formájában tároltuk.

4.2.5. Poliovírusok intratípusos differenciációja RT-PCR-rel és kimutatás

A poliovírusok intratípusos differenciációját (a vad vírus megkülönböztetése a vakcinavírusról) a Poliovírus Diagnosztikus Kit (CDC, GA, USA) segítségével végeztük. A kit tartalmazta a cDNS szintézishez és a PCR reakcióhoz szükséges különböző specifitású oligonukleotid primereket (**3. táblázat**).

A reakcióhoz szükséges pozitív kontrollokat a kit tartalmazta, negatív kontrollként fertőzetlen sejtek (RD; ATCC136) felülszóját használtuk. A vírusizolátumokat felhasználásig jégkásán hűtöttük. A reagenskészlet (kit) útmutatóját követve elkészítettük a primerek hígítását a kijelölt pufferoldatban, majd a mintát bidesztillált vízben 4x-esére hígítottuk. Az 1-1 µl mintát és a kontrollokat külön csövekbe osztottunk szét. A mintákat 5 percig 95°C-on inkubáltuk, majd jégkásán hűtöttük.

Primer specificitás	Primer szekvencia	Termék mérete
Pan-Enterovírus (PanEV)	5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC-3' 5'-TCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC-3'	114 bp
Pan-Poliiovírus* (PanPV)	5'-TTIAIIGCRTGICCRTRTT-3' 5'-CITAITCIMGITTYGAYATG-3'	79 bp
PV-Szerotípus 1*	5'-ATCATICTYTCIARCATYTG-3' 5'-TGCGIGAYACIACICAYAT-3'	70 bp
PV-Szerotípus 2*	5'-AYICCYTCIACIRCICCYTC-3' 5'-TGCGIGAYACIACICAYAT-3'	79 bp
PV-Szerotípus 3*	5'-CCIAIYTGITCRRTTIGYRTC-3' 5'-AAAYCCITCIRTITTYTAYAC-3'	140 bp
Sabin 1	5'-TCCACTGGCTTCAGTGTT-3' 5'-AGGTCAGATGCTTCAAAGC-3'	97 bp
Sabin 2	5'-CGGCTTTGTGTCAGGC-3' 5'-CCGTTGAAGGGATTACTAAA-3'	71 bp
Sabin 3	5'-AGTATCAGGTAAGCTATCC-3' 5'-AGGGCGCCCTAACTTTG-3'	53 bp
*Degenerált primerek: M = A és C; R = A és G; Y = C és T; I = Inozin.		

3. táblázat. A poliovírus tipizáláshoz használt primerek nukleotidsorrendjei.

A mintákhoz primer tartalmú puffert és az RT reakcióhoz szükséges enzimeket adtuk (0,7 µl 1M DTT, 6,9 µl (40 U/µl) placenta RNase Inhibitor, 3,6 µl 25 U/µl AMV RT, és 13,7 µl 5 U/µl *Taq* polimeráz). Az RT reakciót: 42°C/20 perc, 95°C/5 perc körülmények között végeztük. Ezt követően elindítottuk a különálló PCR reakciókat. **Degenerált primerek esetén** (panPV és szerotípus primerek): 95°C/45 mp, 42°C/45 mp, 60°C/45 mp, 30 ciklus. **Nem-degenerált primerek esetén** (panEV és Sabin primerek): 95°C /45 mp, 55°C/45 mp, 70°C/ 45 mp, 30 ciklus. A reakciók végeztével a mintákat +4°C-ra hűtöttük, majd közvetlenül ezután végeztük az elektroforézist.

PCR termék detektálása poliakrilamid gélben

A PCR termékeket brómfenolkék festékkel elegyítve, gyári készítésű 10%-os poliakrilamid gél zsebeibe töltöttük. Az elektroforézist 5x TBE pufferben, 40 mA

áramerősséggel, 45 percig végeztük. A gélt a futtató kádból eltávolítva etídium-bromid (1 µg/ml) tartalmú oldatban, billegtető rendszer használatával 15 percig festettük. Vizes öblítést követően UV megvilágításban a PCR terméket láthatóvá tettük. A képet polaroid kamerával (Fotolyne Incorporated, New Berlin, WI, USA) rögzítettük.

4.2.6. Poliovírus VP1 RT-PCR és nukletidsorrend meghatározás

Poliovírus VP1 genetikai régiójának amplifikálását a reverz transzkripcióval egy lépésben végeztük. Ehhez olyan primereket használtunk, amelyek kapcsolódási helyei nem a VP1 régióban, hanem a szomszédos génszakaszokban helyezkedtek el. Így az „Y7” jelzésű primer a VP3 kódoló régióban, a „Q8” jelzésű a 2A régióban kapcsolódott. Mindezt azzal a céllal tettük, hogy a teljes VP1 régiót, amelynek várható hossza 1,1 kb, megsokszorozzuk. A reakcióban használt primerek adatait a **4. táblázatban** tüntettük fel.

Primer megnevezése	Szekvencia	Pozíció*
„Y7” (sense)	5'-GGGTTTGTGTCAGCCTGTAATGA-3'	2399-2421 nt
„Q8” (antisense)	5'-AAGAGGTCTCRTTCCACAT-3'	3485-3504 nt

4. táblázat. Poliovírus VP1 szakasz kimutatására szolgáló oligonukleotidok (Yang és mtsai., 1991). *A pozíciómegadás referenciája, poliovírus *Sabin 3-as típus (AY184221)*.

A reverz transzkripció a következőkből állt: az RNS minták 3 µl-éhez 1 µl antisense „Q8” (10 pM/µl) primert adtunk, 5 perc 95°C-os denaturáció után a mintákat hozzámértük a PCR reakcióelegyhez. A PCR elegy összetétele: 20 mM dNTPs (Roche Applied Science, Indianapolis Inc., USA), 10x PCR puffer, 40 U/µl RNasin, reverz transzkriptáz Superscript II, 25 U/µl (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 ng/µl „Y7” primer, 5 U/µl *Taq* DNS polimeráz (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), desztillált víz. A reakció összterfoga 50 µl volt. A reverz transzkripció lépései: 42°C/60 perc, 94°C/5 perc, amit a PCR reakció lépései követtek: kezdeti denaturáció: 94°C/45 mp, majd 35 ciklus 94°C/45 mp, 42°C/42 mp, 65°C/2 perc, végezetül 10 perc 65°C.

A várt 1,1 kb nagyságú terméket 1%-os agaróz (Invitrogen CA, USA) gélben futtattuk, 2 µl etídium-bromid (1µg/ml) hozzáadásával, 5x TBE futtató pufferben. Molekulatömeg kontrollként „Marker VI”-ot használtuk (Roche, Switzerland). A futtatáshoz a tápegységet

(Power Pac 300, Bio-Rad, USA) 90 V-ra és 2 órára programoztuk. Az elektroforézis után a gélt UV fényel megvilágítottuk, és fotodokumentáló rendszerrel (Fotolyne Incorporated, New Berlin, WI, USA) rögzítettük.

PCR termék tisztítása, szekvenálási reakció

A PCR terméket UV megvilágításban vágtuk ki a gélből. A termék tisztításához QIAquick® (Qiagen, Valencia, CA, USA) kitet használtunk vákuum rendszerhez, a gyártó utasításai szerint.

A szekvenálási reakciót didezoxinukleotid módszerrel az ABI Prism Big Dye nucleotide Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük MJ Research PTC-200 (Bio-Rad, USA) gradiens PCR készülékben a gyártó utasítása szerint. A PCR reakció primerei mellett („Y7”, „Q8”), a szekvenálási reakcióhoz két kiegészítő primert is használtunk: PV1A antisense [2935-2916 nt; 5'-TTIAHGCRGTGICRTRTT-3'] és PV2S sense [2855-2875 nt; 5'-AAGAGGTCTCTRTTCCACAT-3']. A reakció összetevői a következők voltak: 3,2 pmol primer, 8 µl Terminator Ready Mix, a templát DNS-t és a desztillált víz arányát úgy választottuk, hogy a reakció összterfoga 20 µl legyen. A reakció paraméterei a következők voltak: 94°C/20mp, 42°C/15 (ramp: 0.4°C/mp.), 60°C/4 perc mp (Kew és mtsai., 1998).

A szekvenálási reakció termékeinek tisztítását a feleslegben jelen lévő jelölt nukleotidtól és terminátor molekulától Centri Sep 96 (Princeton Separations, Inc, NJ, USA) szeparáló gélben végeztük a gyártó használati útmutatóját követve. A megtisztított terméket ½ órán keresztül vákuum szárítóban (Integrated Speed vac System Holbrook, Ny) inkubáltuk. A megszáradt DNS-t 20 µl formamidban (Gibco BRL) oldottuk be. A feloldott nukleinsavat 2 percig 95°C-on inkubáltuk fűthető rendszerben (Dry-Bath Barnstead Thermolyne, USA), majd 5 percig hűtöttük.

A mintákat rövid ideig centrifugáltuk, majd az ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Hitachi Ltd. Instruments, Japan) készülékbe betöltve futattuk. A nukleotidsorrend meghatározást a DNS mindkét szálán elvégeztük. A kapott nukleotidsorrendeket a *Sequencher 4.8* (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) programmal javítottuk.

4.2.7. Multiplex RT-PCR módszer a poliovírus rekombinánsok kimutatására

A poliovírus 3 izolátumokból rekombinánsok kimutatására irányuló vizsgálatot a P2 és P3 nem szerkezeti fehérjekódoló régióban végeztük el. A reakció Sabin törzs specifikus primereit az 5. táblázat tartalmazza (Kilpatrick és mtsai., 1996, 1998).

Primer	Szekvencia (5'→3')	Pozíció (nt)	Termék mérete
SAB1-REC-2C-S	TGTAACAAAACCTTAGACAAC	4284-4303	199 bp
SAB1-REC-2C-A	TATGTAGTTGTTAATGGTATG	4482-4462	
SAB1-REC-3D-S	TAAGGAAATGCAAAAACCTGC	6423-6442	226 bp
SAB1-REC-3D-A	ATCGCACCCCTACTGCTGA	6648-6631	
SAB2-REC-2C-S	CAAATTCATTAGTTGGTTGC	4224-4243	189 bp
SAB2-REC-2C-A	TGGATAGATAGCCACCGC	4412-4395	
SAB2-REC-2C-A	AGGAAATGCGGAGACTCTTA	6425-6444	225 bp
SAB2-REC-3D-A	GGATCACAACCAACTGCACT	6649-6630	
SAB3-REC-2C-S	TGTAACCAAATTGAAACAGT	4482-4343	199 bp
SAB3-REC-2C-A	TATGTAATTATTAATGGTGTG	4482-4462	
SAB3-REC-3D-S	CAAAGAAATGCAAAGACTTT	64236442	228 bp
SAB3-REC-3D-A	GGATCGCATCCAACCTGCACT	6650-6631	

5. táblázat. Poliovírus VP1 szakasz kimutatására szolgáló oligonukleotidok.

*A nukleotid pozíciókat Nomoto és mtsai., (1984) konszenzus szekvencia alapján adtuk meg.

A reverz transzkripciót és a PCR reakciót egy lépésben végeztük. Az amplifikáció 24 µl reakcióelegyben történt, mely mintánként tartalmazott: 1 µl vírus RNS-t, 1 mM dNTPs-t (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), 10x PCR puffert (Tris-HCl, pH 8.3, 5 mM MgCl₂, 6 µM EDTA), 10 pmol/µl a Sabin törzs rekombináns primereiből (SAB-REC) és enzim keveréket [2 U/µl RNáz Inhibitor (Roche), 1,25 U AMV reverz transzkriptázt (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Ind), 1,25 U *Taq* polimerázt (Perkin Elmer, Norwalk Conn., USA)]. A reverz transzkripció 42°C-on 30 percig; 95°C-on 3 percig történt.

A PCR reakció körülményei: denaturáció 95°C/1 perc, anelláció 50°C/1 perc, extenzió 65°C/1 perc, 30 cikluson keresztül, DNA thermal cycler (Perkin Elmer) készülékben. Az elektroforézist 10% poliakrilamid gélben végeztük, a korábban megadott módon.

4.2.8. Pan-enterovírus VP1 seminested RT-PCR reakció és kimutatás

A pan-enterovírus VP1 seminested RT-PCR reakciót Nix és mtsai. (2006) protokollja alapján állítottuk be némi módosításokkal. A reakcióhoz szükséges primereket a **6. táblázatban** foglaltuk össze, az oligonukleotidokat az Integrated DNA Technologies Inc., USA szintetizálta.

Primer	Szekvencia	Aminosav motívum	Gén	*Pozíció (nt)
AN32	GTYTGCCA	WQT	VP1	3009-3002
AN33	GAYTGCCA	WQS	VP1	3009-3002
AN35	CCRTCRTA	YDG	VP1	3111-3104
AN35	RCTYTGCCA	WQS	VP1	3009-3002
SO224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	AMLGTH(I/L/M)	VP3	1977-1996
SO222	CICIGGIGGIAYRWACAT	M(F/Y)(I/V)PPG(A/G)	VP1	2969-2951
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	PALTA(A/V)E(I/T)G	VP1	2602-2627
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	M(F/Y)(I/V)PPGGPV	VP1	2977-2951
AN232	CCAGCACTGACAGCA	PALTA	VP1	2602-2616
AN233	TACTGGACCACCTGG	PALTA	VP1	2977-2963

6. táblázat. A cDNS készítés, a PCR amplifikáció és a szekvenálási reakció primerei.

**A pozíciók megadásához a PV1 Mahoney (J02281) referencia törzs szolgált.*

A primereket CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) technikával tervezték (Rose és mtsai., 1998). A CODEHOP primerek jellegzetessége, hogy a 3'-végükön kb. 9-12 bp-ból álló konszenzus degenerált mag régiót tartalmaznak, valamint az 5'-végen nem degenerált kapocs régiót, amely kb. 15-25 bp. A degenerált mag régió a tág spektrumú célszekvenciák iránt mutat specificitást, a kapocs régió pedig biztosítja a primer-templát hélix kialakulását és lehetővé teszi a magasabb anellációs hőmérséklet alkalmazását a nem specifikus amplifikáció csökkentése érdekében.

Reverz transzkripció

A cDNS szintézishez SuperScriptII™ (Invitrogen, CA, USA) reverz transzkriptázt használtunk. Ez az M-MLV RT polimeráz genetikailag módosított változata, csökkentett RNaseH aktivitással, amellyel jó hatásokkal lehet szintetizálni nagy molekulatömegű cDNS-t. A reverz transzkripció elegy összetétele 10 µl végtérfogatban a következő volt: 10 mM dNTP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 pmol cDNS primer keverék (AN32, AN33, AN34, AN35), 5 µl vizsgálati minta RNS, steril desztillált víz (Gibco). A reakcióelegyet 65°C-on 5 percig inkubáltuk, majd jégkásán hűtöttük. Minden csőhöz 7 µl enzimkeveréket adtunk [2 µl 5x PCR puffer (Invitrogen, CA, USA), 0,1 M dithiothreitol (Invitrogen), 40 U RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 100 U SuperScript II™ reverz transzkriptáz]. A reverz transzkripciót PCR készülékben (Hybaid, Springer) végeztük: 22°C/10 perc, 42°C/60 perc, 95°C/5 perc. A cDNS-t felhasználásig -20°C-on tároltuk.

I. PCR reakció

A reakciót 50 µl végtérfogatban végeztük, 10 µl cDNS-hez hozzáértük a PCR reakcióelegyet: 10x PCR puffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 25 mM MgCl₂, 200 mM dNTP (Applied Biosystems), 50-50 pmol SO224 és SO222 primer, 2,5 U Taq DNS polimeráz (Applied Biosystems). A PCR reakciót gradiens PCR készülékben TweenCycler1000 (Bio-Rad) végeztük: kezdeti denaturáció 95°C/1 perc, 95°C/30 mp, 42°C/30 mp, 60°C/45mp, összesen 35 cikluson keresztül, végső extenzió 60°C/10 perc.

II. PCR reakció

A seminested amplifikációhoz 1 µl-t mértünk az I.-es PCR termékből a II.-es PCR reakcióelegybe: 10x PCR puffer (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂, 200 mM dNTP (Applied Biosystems), 40-40 pmol AN89 és AN88 primer, 200 mM dNTP, 5 µl 10x FastStart Taq puffer (Roche Applied Science), 2,5 U FastStart Taq DNS polimeráz (Roche Applied Science), 50 µl végtérfogatban. A FastStart Taq polimerázt 95°C-on 6 percig aktiváltuk, majd 35 ciklusban elvégeztük az amplifikációt: 95°C/30 mp, 60°C/20 mp, 72°C/15 mp, végső extenzió 72°C/10 perc.

Az RT-PCR vizsgálatokat minden esetben pozitív és negatív kontrollok együttes használatával végeztük. Pozitív kontrollként echovírus-11/1989 izolátumot, enterovírus-71/1978 izolátumot, negatív kontrollként pedig RNáz, DNáz mentes vizet használtunk.

Elektroforézis

A reakció termékeit 1,5% agaróz gélben (SeaKem, Sweden) választottuk el, 0,5 µg/ml etídium-bromid (Sigma-Aldrich Ltd. St. Louis, MO, USA) tartalom mellett. Az elektroforézist 150 V-on 60 percig végeztük, 10x TBE (50 mM bázikus Tris, 41,5 mM bórsav, 0,5 mM Na₂EDTA) futtató pufferben. A termék méretét 100 bp-os felbontású DNA Ladder (Promega) marker jelenlétében ellenőriztük.

4.2.9. Poliovírus 5'-NTR, non-polio enterovírus 5'-NTR és VP1 régió nukleotidsorrend vizsgálata

PCR termékek tisztítása

A PCR terméket a feleslegben lévő nukleotidoktól, primerektől és sótól oszlopos módszerrel tisztítottuk. Ehhez a PCR-MTM Clean Up System kitet (Viogene, Sunnyvale, CA, USA) használtuk a gyártó útmutatója szerint. Röviden: a PCR terméket 1,5-ml-es Eppendorf-csőbe mértük, majd a mintákhoz 0,5 ml PX puffert adtunk és összekevertük. A reakcióelegyet a kit gyűjtőcsővel ellátott oszlopára mértük, és 1 percig centrifugáltuk 13.000 xg-vel. A szűrletet leöntve az oszlopokat 0,5 ml WF és 0,7 ml etanol tartalmú WS pufferrel mostuk, közben 1-1 perces centrifugálásokat végezve. A mintákat tartalmazó csöveket 3 percig szellőztettük, hogy az etanol maradéktalanul elpárologjon. A DNS-t 30-50 µl elúciós puffer segítségével oldottuk le az oszlopokról, és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

Szekvenálási reakció

A reakcióban használt DNS templát mennyiséget a gélfotón kapott PCR csík erőssége alapján választottuk ki (1-10 µl).

Szekvenált régió	PCR termék	*Szekvenáló primerek
Poliovírusok 5'-NTR	440 bp	„1”, „3”
Non-polio enterovírusok 5'-NTR	317 bp	E1, E2
Non-polio enterovírusok VP1	348-393 bp	AN232, AN233

7. táblázat. A szekvenálási reakció primerei.

*A primerek jellemzőit az előző PCR reakciónál részleteztük.

A megfelelő DNS mennyiséget DNáz-mentes vízzel (Gibco BRL) egészítettük ki 11 µl-re, és hozzáadtuk a szekvenálási reakcióelegyhez: 8 µl DYEnamic ET reagens premix (MegaBACE™, Amersham Biosciences), 1-1 µl megfelelő primer (5 pmol/shzekvenálási reakció), össztérfogat 20 µl. A reakcióelegyet inkubáltuk: 95°C/20 mp, 55°C/15 mp, 60°C/1 perc, 35 cikluson keresztül. A szekvenálási reakciót a DNS templát mindkét irányában elvégeztük, a reakcióban használt primereket a **7. táblázat** tartalmazza.

A szekvenálási reakció tisztítása

A szekvenálási reakció termékeit alkoholos kicsapással tisztítottuk 96-lyukú lemezben. A 20 µl termékhez 2 µl ammónium acetátot (Amersham Pharmacia) és 55 µl abszolút etanolt (Reanal, Budapest) mértünk, lefedés után kevertük (vortex) és 2500xg-n centrifugáltuk 30 percig. A felülúszót leöntve, a mintákat 120 µl 70% etanollal mostuk és 1 percig centrifugáltuk 2500xg-n. Öt perc szárítás után az üledéket 10 µl, a futtatáshoz szükséges oldatban [MegaBACE loading solution (Amersham Pharmacia)] oldottuk fel.

Elektroforézis

Minden egyes futtatáshoz 5 µl mintát használtuk. A nukleotidsorrend meghatározása MegaBACE™1000 DNA Sequencer készülékben (Amersham Biosciences) történt. A készülék poliakrilamid géllal (MegaBACE™ Long Read Matrix) töltött kapillárisaiban egyidejűleg 16 mintát tudunk vizsgálni. A futtatást +44°C-on, standard paraméterek mellett végeztük (a minta injektálási feszültsége: 3 kV, a minta injektálási ideje 60 mp, futtatási feszültség: 9 kV, futtatási idő: 100 perc).

4.3. A nukleotidsorrend-feldolgozás számítógépes módszerei

A leolvasott szekvenciák eredményeit a *Finch TV v. 1.4.0* program (Geospiza, Inc., USA) segítségével ellenőriztük, majd az adatokat *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) keresőprogram (Altschul és mtsai., 1990) segítségével összehasonlítottuk a GenBankban található szekvencia adatokkal. Az egy minta két párhuzamos szekvenálási eredményeit a *CLUSTAL W* (Thompson és mtsai., 1994) program segítségével illesztettük.

4.3.1. Filogenetikai elemzés

A filogenetikai vizsgálatba bevont nukleotidszekvenciákat egymáshoz illesztettük, rokonságukról számításokat végeztünk, és azokat illesztés (alignment) valamint filogenetikai törzsfá formájában jelenítettük meg. A vizsgálatokhoz a *MEGA 4.0.2* programot (Tamura és mtsai., 2007) használtunk. A programon belül elvégeztük a vizsgált szekvenciák és a GenBankból kiválasztott rokon szekvenciák többszörös illesztését a *ClustalW* algoritmus segítségével (Saitou és Nei, 1987; Larkin és mtsai., 2007). A filogenetikai fa szerkesztéséhez Kimura két-paraméteres szubsztitúciós modellt használtunk. A fa topológiájának a valószínűségét bootstrap elemzéssel vizsgáltuk, melynek értékét 1000 ismétlésre állítottuk be. Az alternatív fák egyesítéséből származó %-os értéket a fa ágainak kiinduló pontjánál ábrázolta a *MEGA 4.0.2.* program. A filogenetikai fákat outgroup szekvencia hozzáadásával szerkesztettük. Az outgroup egy külső információval rendelkező taxonómiai egység (operational taxonomic unit, OTU). A vizsgált szekvenciák mellé az enterovírus nemzetségen belül egy szomszédos faj vagy ugyanazon faj egy másik szerotípusának nukleotidszortrendjét használtuk outgroup-ként.

4.3.2. Az 5'-NTR nem-leolvasott régió RNS másodlagos szerkezetének becslése

A vizsgált nukleinsav másodlagos szerkezetének becslését az *MFOLD 3.2* program (Zukker és mtsai, 1999; 2003) segítségével végeztük a *Mobyle platform* on-line szerverén (Pasteur Intézet, Franciaország).

4.3.3. Az 5'-NTR nem-leolvasott régió RNS másodlagos szerkezetének számítása

A minimum szabadenergia (minimum free energy = mfe) számítással 37°C-on meghatároztuk a nukleotidszortrendek másodlagos szerkezetét. A számításokhoz az *RNAFOLD Vienna RNA Package v. 1.7.* programot használtunk a *Mobyle platform* on-line szerverén (Pasteur Intézet, Franciaország).

4.3.4. Aminosavsorrend elemzése

A vizsgálatokban kapott poliovírus nukleotidszortrendeket aminosavsorrendekre fordítottuk a *TRNSEQ* program segítségével (Rice és mtsai, 2000).

5. EREDMÉNYEK

5.1. A poliovírus 3 izolátumok molekuláris vizsgálata

5.1.1 A poliovírus intratípusos differenciáció RT-PCR eredménye

A poliovírus diagnosztikus RT-PCR módszerrel mind a **18 poliovírus izolátum pozitívnak** bizonyult a **Sabin 3** specifikus primerekkel, ami azt jelenti, hogy a gyermekek bénulását a vakcinatörzs okozta. A VAPP betegek földrajzi eloszlása azt mutatta, hogy a betegek között nem állt fent járványügyi kapcsolat (**18. ábra**).



18. ábra. A VAPP betegek földrajzi eloszlása Magyarországon, 1960-1967.

5.1.2. A poliovírus 3 izolátumok múltbéli virológiai és epidemiológiai adatainak eredménye

A poliovírus 3 izolátumokkal kapcsolatos adatok egy részét a következő közlemények szolgáltatták: Kátay A., 1961; Dömök I., 1961b (**8. táblázat**). E szerint a *poliomyelitis*-ben szenvedő 15 gyerek mintáit *Macacus rhesus* majom primer veseszöveten izolálták. A vírusok tipizálását a „Lim-Benyesh-Melnick” nyúl-immunsavó keverékkel végezték, amelyet az intézetben (OKI) állítottak elő és validáltak (Benyes-Melnick M., 1959; Melnick és mtsai., 1972).

Beteg	Izolátum	Lakhely (megye)	Kor	Betegség	mOPV oltások			Intratípusos antigén és rct ⁴⁰ markerek
					1	2	3	
1	HUN/1960-1	Vas	4.5 év	<i>Poliomyelitis</i>	+	-	+	PV3-VL, T+
2	HUN/1960-2	Baranya	4 év	<i>Poliomyelitis</i>	+	-	+	PV3-VL, T-
3	HUN/1960-3	Veszprém	1 év	<i>Poliomyelitis</i>	-	-	+	PV3-VL, ND
4	HUN/1960-4A HUN/1960-4B	Szabolcs- Szatmár	11 hó	<i>Poliomyelitis</i>	+	-	+	PV3-VL, T+ PV3-VL, T+
5	HUN/1960-5	Fejér	6 hó	<i>Poliomyelitis</i>	-	-	-	PV3-VL, T+
6	HUN/1960-6	Borsod	9 hó	<i>Poliomyelitis</i>	+	-	-	PV3-VL, ND
7	HUN/1960-7A HUN/1960-7B	Veszprém	8 hó	<i>Poliomyelitis</i>	+	-	-	PV3-VL, T+ PV3-VL, T+
8	HUN/1960-8	Baranya	3 év	<i>Poliomyelitis</i>	+	-	+	PV3-VL, ND
9	HUN/1961-1	Bács-Kiskun	9 hó	<i>Paresis</i>	+	-	+	PV3-VL, T+
10	HUN/1961-2	Somogy	6 hó	<i>Flaccid paralysis</i>	+	-	+	PV3-VL, T+
11	HUN/1961-3A HUN/1961-3B	Hajdú-Bihar	11 hó	<i>Poliomyelitis</i>	+	-	+	PV3-VL, T+ PV3-VL, T+
12	HUN/1962-1	Győr-Sopron	11 hó	<i>Poliomyelitis</i>	ND	ND	ND	ND
13	HUN/1962-2	Fejér	7 hó	<i>Poliomyelitis</i>	ND	ND	ND	ND
14	HUN/1962-3	Tolna	1 év	<i>Poliomyelitis</i>	ND	ND	ND	ND
15	HUN/1967	Pest	5 hó	<i>Poliomyelitis</i>	-	-	-	PV3-VL, T+/-

8. táblázat. Az oltási *poliomyelitis*-ben szenvedő gyerekek poliovírus 3 izolátumai, 1960-1967.

*Rövidítések: PV3-VL, poliovírus 3-as típus, Sabin-szerű (vaccine-like) antigén tulajdonsággal, rct⁴⁰ (reproduktív kapacitás 40°C-on), T+ : nő 40°C-on, T- : nem nő 40°C-on, ND- nincs meghatározva (not done).

Az intratípusos differenciációt, avagy a vakcinavírus megkülönböztetését a vad típustól, az antigén tulajdonságok és a fenotípusos markerek alapján végezték (McBride és mtsai., 1959; Nakano és mtsai., 1966). Ezek közül az rct⁴⁰ markerre vonatkozó adatok voltak fellelhetők (McBride, 1959; Melnick és mtsai., 1972; Agol VI., 2006). Az intratípusos differenciáció eredményei alapján 12 betegnél vírusizolátuma Sabin-szerűnek bizonyult, 3 beteg izolátumait nem vizsgálták. Az rct⁴⁰ marker alapján 7 beteg izolátuma

pozitív (T+) értéket adott. Egy beteg izolátuma negatív (T-) lett, egy beteg izolátuma kétes (T+/-) eredményt adott. Hat beteg izolátumainak nem volt eredménye (**8. táblázat**).

A virológiai adatok mellett a 12 beteg esetében az oltási adatok is rendelkezésre álltak, 3 beteg adatai azonban ismeretlenek voltak. Azokat a gyerekeket, akik részesültek monovalens poliovírus 3 oltásban (8 beteg) a recipiens csoportba, akik nem kaptak oltást (4 beteg), a kontaktok csoportjába soroltuk (**8. táblázat**).

5.1.3. A poliovírus 3-as típus VP1 régiójának vizsgálata

A 18 poliovírus 3 izolátum VP1 RT-PCR vizsgálata során 1.100 bp nagyságú termékeket kaptunk, amelyek nukleotidsorrend-vizsgálat eredményeit a **9. táblázatban** foglaltuk össze. A szekvenálással meghatározott nukleotidszakaszok hossza 900 nt volt. A nukleotid szubsztitúciók becsléséhez a Sabin 3 referencia törzset használtuk (AY184221). A nukleotidsorrendeket lefordítottuk aminosavsorrendekre is, hogy kimutassuk a nem-szinonim szubsztitúciókat a vírus kapszid régiójában.

Hét VAPP izolátum nukleotidsorrendjében nem volt mutáció a VP1 régióban. Három izolátum (HUN/1960-4A, HUN/1960-7B, HUN/1961-1) csak egy-egy mutációval rendelkezett, amely mindegyikben egy-egy aminosav cserét eredményezett. Három izolátumban (HUN/1960-3, HUN/1960-7A, HUN/1967) két-két mutáció volt kimutatható. Két további izolátumban (HUN/1960-2, HUN/1960-8) három-három mutáció volt jelen. A legnagyobb számú mutációval két izolátum rendelkezett: 5 szubsztitúció (HUN/1960-8) és 7 szubsztitúció (HUN/1961-3B) a vizsgált 900 nt hosszú szakaszon. A 4. sorszámú beteg első (HUN/1960-4A) és második (HUN/1960-4B) izolátuma ugyanazt a nem-szinonim mutációt hordozta, amelynek következtében egy aminosavcsere történt a VP1 szakasz 54. aminosav pozíciójában (A54T). A 7. sorszámú beteg mindkét izolátuma az A54V aminosav cserét tartalmazta. A 11. számú beteg két mintája között 5 nukleotid eltérést találtunk, a nukleotid szubsztitúciók között nem volt átfedés. Az első izolátumban (HUN/1961-3A) csak szinonim mutációkat mutattunk ki, a második izolátum (HUN/1961-3B) pedig olyan mutációkat tartalmazott, amelyeknek 2 aminosavcsere lett a következménye (A54T, R107H). Hét izolátumban az 54. aminosav pozíciójában fordult elő mutáció.

Beteg	Izolátum	Nukleotid (aminosav) szubsztitúció(k) és pozíciója (nt, aa) a VP1 régióban *	U472C reverzió, 5'-NTR
No.1	HUN/1960-1	–	+
No.2	HUN/1960-2	C2863U (T141A), A2897G, G3334C (R286S)	+
No.3	HUN/1960-3	U2554C, A2973U (K166M)	+
No.4	HUN/1960-4A	G2636A (A54T)	+
	HUN/1960-4B	G2636A (A54T),U3226C	+
No.5	HUN/1960-5	–	+
No.6	HUN/1960-6	–	+
No.7	HUN/1960-7A	C2637U (A54V), C3244T	+
	HUN/1960-7B	C2637U (A54V)	+
No.8	HUN/1960-8	G2636A (A54T), C2644, C2764T, G2824A, C3277T	+
No.9	HUN/1961-1	U3353C (S293P)	+
No.10	HUN/1961-2	–	+
No.11	HUN/1961-3A	U2783G, A3265G	+
	HUN/1961-3B	G2636A (A54T), G2796A, A3111G (R107H), U3130C, U3211C, A3229G, T3355A	+
No.12	HUN/1962-1	–	+
No.13	HUN/1962-2	–	+
No.14	HUN/1962-3	–	+
No.15	HUN/1967	C2637U (A54V), U3130C	+

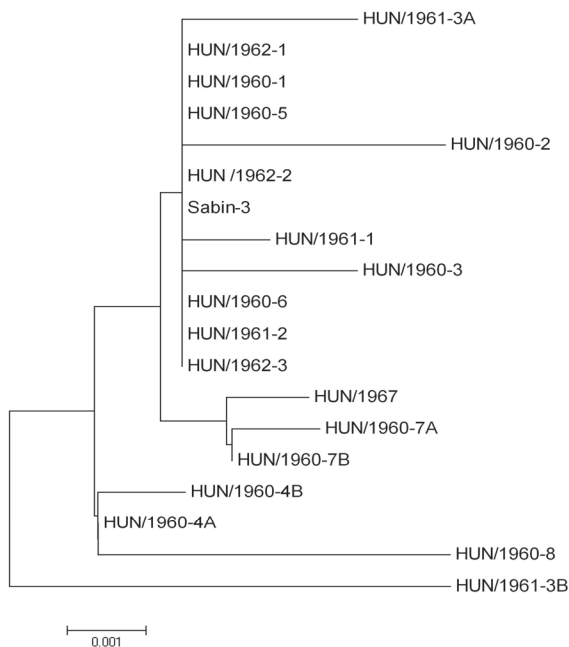
9. táblázat. A VAPP betegektől származó izolátumok nukleotid és aminosav szubsztitúciói a VP1 régióban és az U472C reverzió az 5'NTR-ben.

*A nukleotidok és az aminosavak pozícióit a Sabin 3 (P3/Leon 12 a1b, GenBank Ac. No.: X00925) referencia törzshöz viszonyítva adtuk meg.

Az eredmények azt mutatták, hogy csak egy vírusizolátum (HUN/1960-2) tartotta meg a termoszenzitív vakcinatípusra jellemző ret^{40-} tulajdonságot, ami vakcina recipiensből (2.-es számú beteg) származott. Az izolátumában két aminosav változás történt, az 54-es

aminosav pozíciótól távolabb eső helyeken (141 aa és 286 aa). A 15-ös számú kontakt vírusizolátumában (HUN/1967) A54V aminosav csere következett be, amely valószínűleg hatással volt a vírus $rct^{40+/}$ tulajdonságára. Két kontakt beteg (No. 1 és No. 5) izolátuma nem tartalmazott mutációkat a VP1 szekvenciában, de rct^{40+} tulajdonsággal rendelkezett (**8. táblázat**).

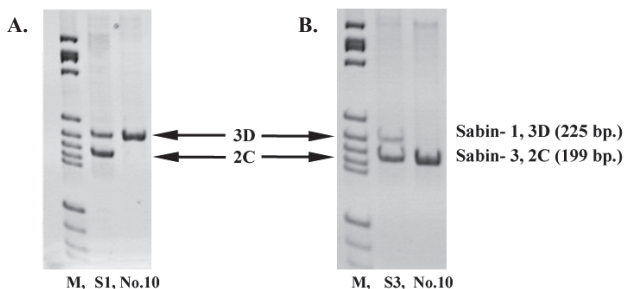
Az vizsgált poliovírus 3 izolátumok és a Sabin 3 referenciatörzs közötti rokonsági viszony ábrázolását neighbour-joining módszerrel generált törzsfán mutatjuk be (**19. ábra**).



19. ábra. A VAPP betegektől származó izolátumok filogenetikai törzsfája a VP1 régióban (900 nt).

5.1.4. A poliovírus rekombináns multiplex RT-PCR eredménye

A poliovírus genom P2 és P3 régióira tervezett specifikus primerekkel vizsgáltuk a VAPP betegektől származó izolátumokat rekombinánsok kimutatása céljából. A 10-es számú beteg izolátuma (HUN/1961-2) a Sabin 1 vakcinatörzssel rekombinánsnak bizonyult a polimeráz (3D) kódoló régióban (**20. ábra**). A rekombináns vírusizolátum nem hordozott egyetlen egy mutációt sem a VP1 régióban.



20. ábra. A VAPP beteg (No. 10) poliovírus 3 izolátuma (HUN/1961-2).

(A.) rekombináns a Sabin 1-es típusal a 3D kódoló régióban a SABI/REC primer párral;

(B.) a 3D régió specifikus termék hiányzik a SEB3/REC primer párral;

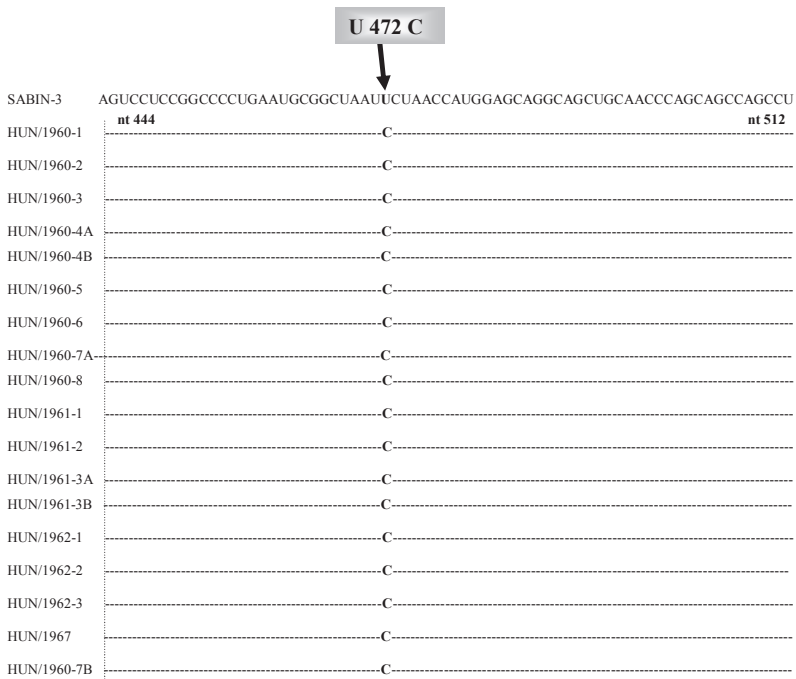
Rövidítések: M-molekulatömeg kontroll (mérettartomány: 8-587 bp), 2C- proteáz kódoló régió, S1-Sabin 1 pozitív kontroll, S3-Sabin 3 pozitív kontroll.

5.1.5. A poliovírus 3-as típus 5'-NTR régió nukleotidsorrend vizsgálata

A poliovírus 5'-NTR RT-PCR során mind a 18 izolátum esetében az „1” és „3” primerek segítségével a várt 440 bp nagyságú PCR termékeket kaptuk. A termékek nukleotidsorrendjét elemzésnek vetettük alá, az eredményeket a **21. ábrán** foglaltuk össze. A meghatározott nukleotidszakaszok hossza 371 nt volt.

Az eredmények azt mutatták, hogy a VAPP betegektől származó izolátumok egymáshoz illesztett nukleotidszakaszai teljesen azonosak voltak, azonban mindegyikük

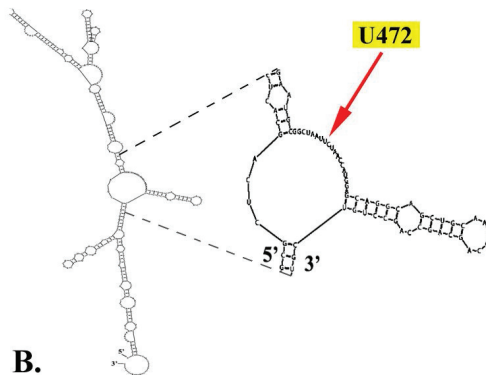
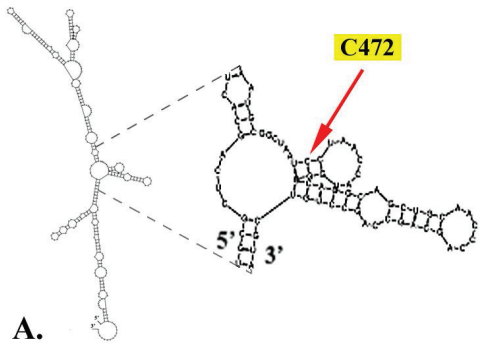
eltért a 472. nt pozícióban a Sabin-3 referencia törzstől, a kérdéses helyen ugyanis uracil helyett citozin volt kimutatható.



21. ábra. A poliovírus 3-as VAPP betegekől származó izolátumok nukleotidsorrendjeinek illesztése a Sabin 3 referencia törzs (AY184221) megfelelő szakaszához. *Az ábra az illesztett 370 nt hosszú szakasz egy részét mutatja be. A szaggatott vonalak az azonos bázisokat jelzik.*

5.1.6. A poliovírus 3-as típus RNS másodlagos szerkezetének vizsgálata az 5'-NTR régióban

A vizsgált 18 izolátum és a Sabin 3 referencia törzs másodlagos szerkezetének becslését az *MFOLD* programmal végeztük a 370 nt hosszú szakaszon (**22. ábra**).



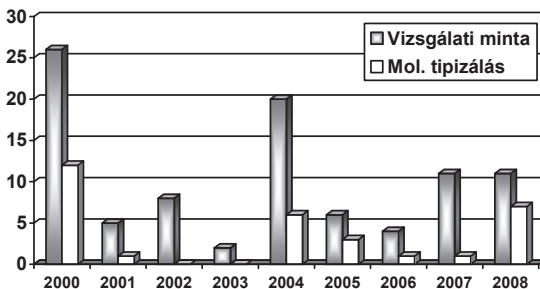
22. ábra. A poliovírus RNS másodlagos szerkezete az 5'-NTR-ben, 385 nt (pozíció a genomban: 190-575 nt). *A* vizsgált poliovírus 3 izolátumok RNS másodlagos szerkezete (*A.*), összehasonlítva a Sabin 3 referencia törzs (AY184221) szerkezetével (*B.*).

A másodlagos szerkezetek összehasonlítása azt mutatja, hogy a VAPP izolátumok mindegyikében az RNS-molekula eggyel több szerkezeti hurkot tartalmaz, mint a Sabin 3 referencia törzs. Ennek a szerkezetnek a megváltozása minden bizonnyal a poliovírus 3 vakcinatörzseknek a neurovirulens fenotípushoz való reverzióját okozta.

5.2. A non-polio enterovírusok kimutatása és a molekuláris tipizálás eredménye az 5'-NTR és a VP1 régióban

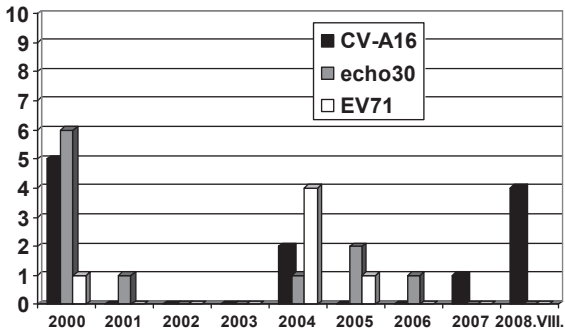
Az enterovírus 5'-NTR nested RT-PCR során 93 minta esetén az E1 és E2 nested primerekkel 317 bp nagyságú terméket kaptunk. A termékeket nukleotidsorrend-elemzésnek vetettük alá. Ugyanazon minták RNS-éből végeztük el az enterovírus VP1 seminested RT-PCR vizsgálatát is. Összesen 29 minta esetén kaptunk PCR terméket, méreteik a protokoll szerinti megengedett tartományban 348-393 bp voltak.

A nukleotidsorrend-vizsgálat során meghatároztuk az enterovírusok szerotípusát mindkét genetikai régió alapján. Az oszlopdiagram a molekuláris tipizálással meghatározott enterovírusok számát (N = 29) számát mutatja évenkénti eloszlásban, a kísérletben résztvevő összes enterovírus-pozitív mintához (N = 93) viszonyítva (23. ábra).



23. ábra. Az 5'-NTR és VP1 régióban molekuláris módszerrel tipizált enterovírus-pozitív minták száma (fehér oszlopok), a vizsgálatban résztvevő enterovírus-pozitív minták száma (szürke oszlopok).

Az 5'-NTR és a VP1 régióban végzett nukleotidsorrend meghatározása egybehangzó eredményt adott az enterovírusok szerotípusára vonatkozóan. A vizsgálat azt mutatta, hogy 12 minta a coxsackie A16 (CV-A16), 6 minta az enterovírus 71 (EV71) és 11 minta az echovírus 30 (echo30) típusba tartozott (24. ábra).



24. ábra. Molekuláris módszerrel tipizált non-polio enterovírusok évenkénti megoszlása, 2000-2008.

A vizsgált 93 enterovírus-positív mintából 45 mintának (köztük 5 beteg mintái duplikátumban) egyelőre csak az 5'-NTR régióra vonatkozó eredményei állnak a rendelkezésünkre. Az 5'-NTR előzetes eredményei alapján a vírusok az echovírus 4, 6, 9, 11, valamint a CV-B1, CV-B5 szerotípusokba tartoznak. Ennek megerősítésére szükség van a VP1 régió nukleotidsorrend-vizsgálatok eredményeire is, mivel ez a régió mutat szoros korrelációt a szerotípussal. Tizenkilenc minta esetén a szekvenálási kísérlet az 5'-NTR régióban sikertelen volt.

5.3. Az molekuláris módszerrel tipizált non-polio enterovírusok klinikai, epidemiológiai és filogenetikai eredményei

5.3.1. Coxsackie A16 okozta megbetegedések klinikai és epidemiológiai vizsgálata

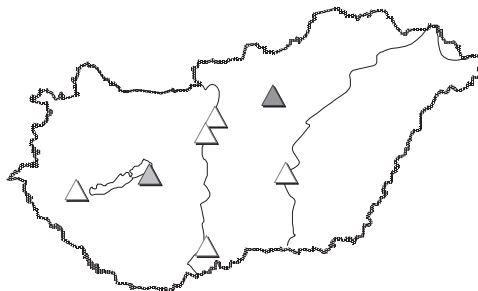
Összesen 12 mintából (torokmosó folyadék, hólyagbennék, széklet) határoztunk meg coxsackie A16 vírust a nukleotidsorrend vizsgálattal. A minták 11 betegtől származtak, átlagéletkoruk 5,5 év volt (**10. táblázat**).

Szerotípus	Minta sorszáma	GenBank szám	Minta	Kor (év)	Nem	Betegség/tünetek	Vírusizolálás sejtenyészeten
CV-A16	HUN-681-2000-Baja	FN 298939	torokmosó	15	N	<i>facialis paresis</i>	Negatív
CV-A16	HUN-711-2000-Siójut	FN 298940	széklet	7	N	kéz-láb-száj betegség	Negatív
CV-A16	HUN-716-2000-Balatonszabadi	FN 298941	széklet	6	N	kéz-láb-száj betegség	Negatív
CV-A16	HUN-719-2000-Balatonszabadi	FN 298947	széklet	5	N	kéz-láb-száj betegség	Negatív
CV-A16	HUN-721-2000-Balatonszabadi	FN 298950	széklet	5	F	kéz-láb-száj betegség	Negatív
CV-A16	HUN-4069-2004-Tiszakécske	FN 298948	széklet	8	F	<i>encephalitis</i>	Negatív
CV-A16	HUN-6838-2004-Százhalombatta	FN 298949	torokmosó	15	F	<i>encephalitis</i>	Negatív
CV-A16	HUN-2991-2007-Gétye	FN 298946	széklet	6	F	fejfájás, láz, arcideg görcs	Negatív
CV-A16	HUN-3118-2008-Budapest	FN 298942	végbél	1	F	<i>exitus</i>	Negatív
CV-A16	HUN-2340-VF-2008-Atkár	FN 298944	vezikuláris folyadék	4	N	kéz-láb-száj betegség	Negatív
CV-A16	HUN-2346LI-VF-2008-Atkár	FN 298945	vezikuláris folyadék	4	N	kéz-láb-száj betegség	Negatív
CV-A16	HUN-2347LI-Ths-2008-Atkár	FN 298943	torokmosó	4	N	kéz-láb-száj betegség	Negatív

10. táblázat. A CV-A16 okozta megbetegedések Magyarországon, 2000-2008.

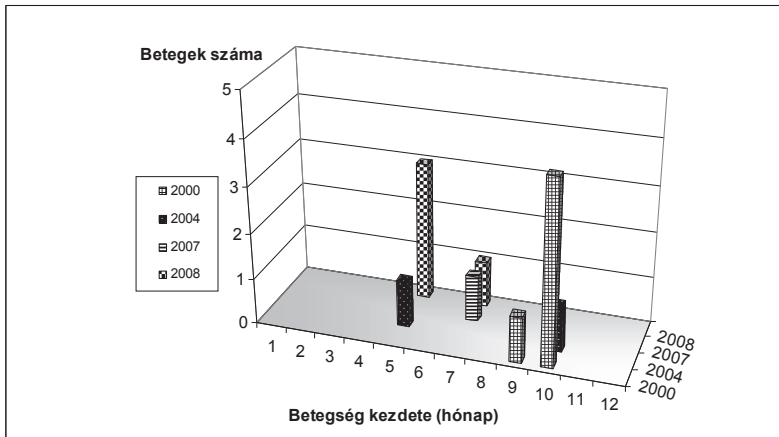
Rövidítések: F = férfi, N = nő.

A kimutatott coxsackie A16 vírusok járványos formában kéz-láb száj betegséget okoztak, a sporadikus megbetegedéseket pedig különböző idegrendszeri tünetek kísérték. A coxsackie A16 okozta betegségek földrajzi eloszlását a **25. ábra** mutatja.



25. ábra. A coxsackie A16 vírus okozta járványok (szürke háromszög) és egyedi megbetegedések (fehér háromszög) földrajzi eloszlása, 2000-2008.

Összesen két CV-A16 okozta kéz-láb-száj betegség járványt sikerült felderíteni a molekuláris tipizálás segítségével. Az egyik 2000-ben, egy balatoni üdülőhelyen fordult elő, a másik 2008-ban, egy Heves megyei óvodai közösségben. A megbetegedések május és október között jelentkeztek. A 2000-2008 között kimutatott CV-A16 vírusok szezonálisát a **26. ábra** mutatja be.



26. ábra. A coxsackie A16 vírus okozta megbetegedések havonkénti eloszlása 2000.06.01-2008.08.31.

Részletes epidemiológiai eredményeket a 2008-ban lezajlott kéz-láb-száj járvány során sikerült begyűjtenünk. A járvány Atkáron (Heves megye) egy 53 fős óvodában tört ki, a gyerekek életkora 3-6 év között volt. Május 23-án, 2008-ban egy gyermek betegedett meg, öt nap elteltével további 12 gyermeknél fordult elő hólyagos kiütés tenyéren, talpon, illetve afták a szájban, 2 gyermeknél hőemelkedés is jelentkezett. A járványban összesen 21 gyermek betegedett meg. Öt súlyosabban érintett gyerek mintáit (hólyagbennék, torokmosó folyadék, széklet) vizsgálta a laboratórium.

Az epidemiológiai adatok ismeretében kiszámítottuk a CV-A16 vírus támadási rátáját (attack rate) az óvodai közösségben (**11. táblázat**).

Csoport	Korosztály (évek)	Gyermekek száma	Megbetegedések száma (támadási ráta, %)
I.	3-5	26	12 (46.2 %)
II.	5-6	27	9 (33.3%)
Összesen	3-6	53	21 (39,6%)

11. táblázat. A CV-A16 támadási rátája az atkári óvodában, 2008.

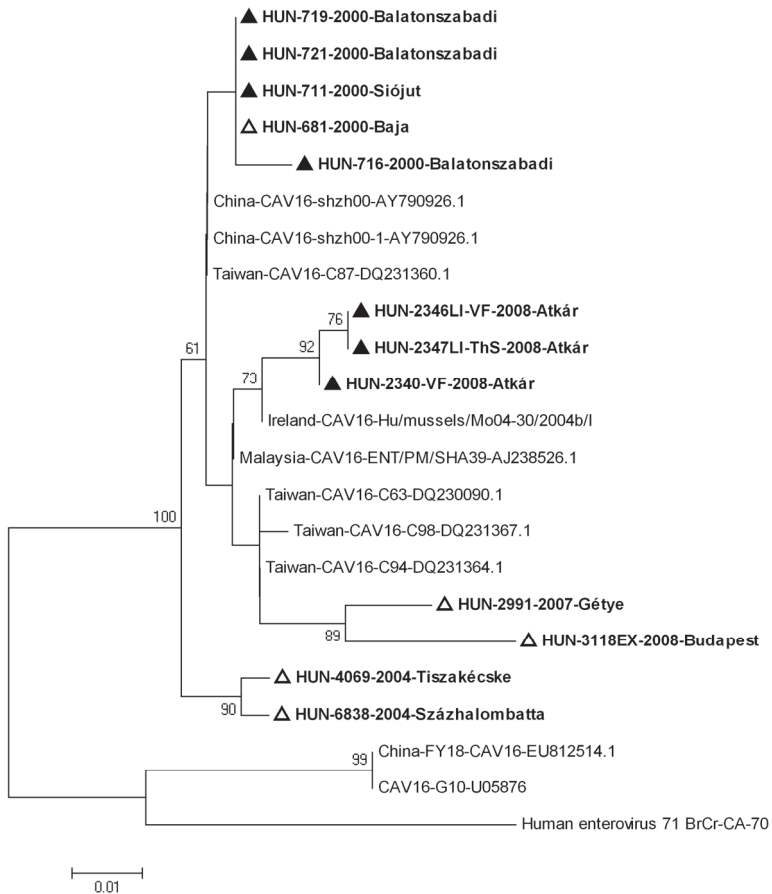
A sporadikus megbetegedéseknél a coxsackie A16 vírus reverzibilis neurológiai tüneteket okozott (1.-es, 7.-es, és 9.-es beteg), kivéve a 2008-ban elhunyt 10-es számú beteget (**10. táblázat**).

5.3.2. A coxsackie A16 filogenetikai vizsgálata

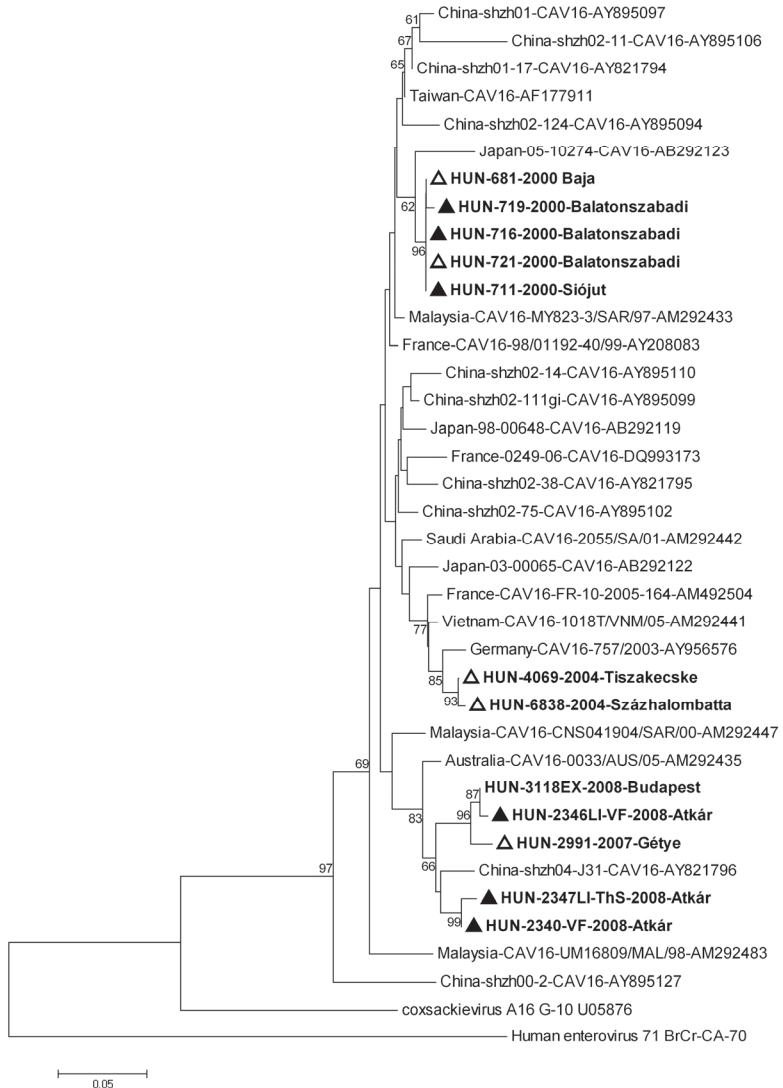
A CV-A16 mintáknál az 5'-NTR régió 255 nukleotidból álló szakaszán és a VP1 régió 237 nt szakaszán filogenetikai elemzést végeztünk. A rokonsági fok megállapítása a GenBankban fellelhető CV-A16 izolátumok nukleotidsorrendjének hozzáadásával történt. A filogenetikai fa szerkesztését neighbour-joining algoritmussal, Kimura 2-paraméteres modell alapján végeztük (**27., 28. ábrák**).

A 5'-NTR szekvencia eredmények azt mutatták, hogy a magyarországi CV-A16 minták 4 különböző alcsoportot (clustert) képeznek, ami egyben a kimutatásuk időpontjával is egybeesik. A vizsgált szekvenciák közül a 2004-ből származó minták kivételével mindegyik a távol-keleti izolátumok nukleotidsorrendjével mutatott közeli rokonságot (**27. ábra**).

A VP1 régióban a magyarországi szekvenciák 3 alcsoportba (cluster) csoportosultak (**28. ábra**). A szekvenciák többsége a távol-keleti izolátumok szekvenciáival mutatott közeli rokonságot. Csak a 2004-ben kimutatott CV-A16 törzsek mutatnak közeli rokonságot a német (AY956576) és egy franciaországi vírussal (AM492504).



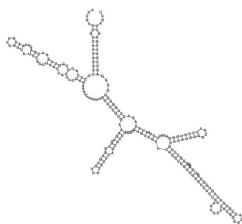
27. ábra. A coxsackie A16 vírus 5'-NTR filogenetikai törzsfája, 255 nt hosszú szakaszon. Az elágazásoknál csak a 60%-nál magasabb bootstrap értékek kerültek feltüntetésre. A skála mutatja a 0,01 genetikai távolságot. Outgroup: EV71-BrCr-CA-70 (AB204853).



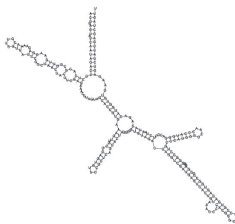
28. ábra. A coxsackie A16 vírus VP1 filogenetikai törzsfája, 237 nt hosszú szakaszon. Az elágazásoknál csak a 60%-nál magasabb bootstrap értékek kerültek feltüntetésre. A skála mutatja a 0,05 genetikai távolságot. Outgroup: EV71-BrCr-CA-70 (AB204853).

5.3.3. A coxsackie A16 vírus RNS 5'-NTR másodlagos szerkezete

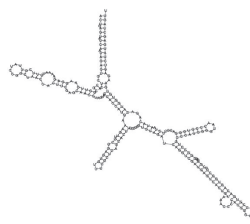
Az *RNAFOLD* program segítségével az 5'-NTR régióban modelleztük a szekvenált CV-A16 vírusok RNS másodlagos szerkezetét (**29. ábra**).



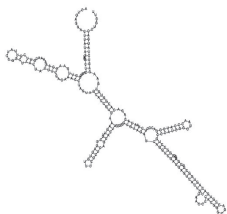
1.
HUN-716-2000-Balatonszabadi



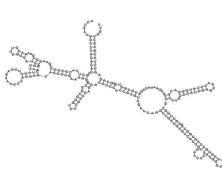
2.
HUN-681-2000-Baja,
HUN-721-2000-Balatonszabadi,
HUN-711-2000-Siójut,
HUN-719-2000-Balatonszabadi



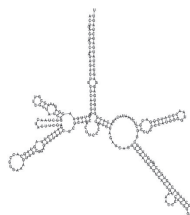
3.
HUN-4069-2004-Tiszakécske,
HUN-6838-2004-Százhalombatta



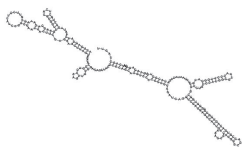
4.
HUN-2991-2007-Gétye



5.
HUN-3118EX-2008-Budapest



6.
HUN-2346LI-VF-2008-Atkár,



7.
HUN-2347LI-Ths-2008-Atkár,
HUN-2340-VF-2008-Atkár

29. ábra. A CV-A16 RNS másodlagos szerkezete az 5'-NTR-ben (255 nt, pozíció a genomban: 193-447 nt a CV-A16 G10 (U05876) prototípus törzshöz viszonyítva).

Az eredmények azt mutatták, hogy a 10-es számmal jegyzőkönyvezett betegnél (5. szerkezet), akinek a betegsége halálos kimenetelű volt, a CV-A16 vírus 5'-NTR RNS-ének másodlagos szerkezete jelentősen megváltozott az előző évek vírusaihoz képest. Ugyanakkor a 2008-as kéz-láb-száj járványból származó minták egymáshoz viszonyítva is nagyon különbözőek voltak (6., 7. szerkezet).

5.3.4. Az enterovírus 71 és echovírus 30 okozta megbetegedések klinikai és epidemiológiai vizsgálata

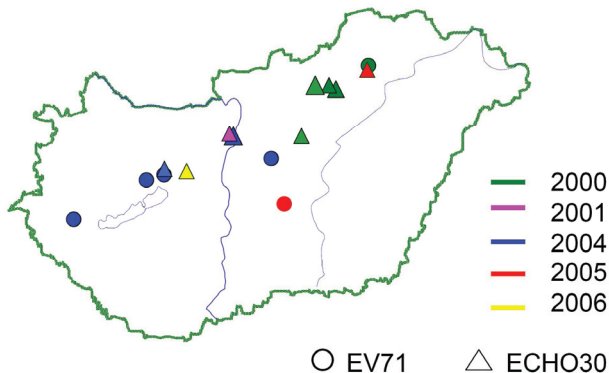
Szerotípus	Minta sorszáma	GenBank szám	Minta	Kor (év)	Nem	Betegség/tünetek	Vírusizolálás sejttenyésztésen
EV71	HUN-792-2000-Miskolc	FN 298933	széklet	5	F	láz, fejfájás	negatív
EV71	HUN-5702-2004-Veszprém	FN 298934	széklet	6	F	<i>asepticus meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
EV71	HUN-5522-2004-Pilis	FN 298935	széklet	2	F	<i>acut flaccid paralysis</i>	pozitív/nem tipizálható
EV71	HUN-7007-2004-Csatár	FN 298936	széklet	4	F	<i>meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
EV71	HUN-7195-2004-Pétfürdő	FN 298937	széklet	1	F	kiütések, <i>meningo-encephalitis</i>	pozitív/nem tipizálható
EV71	HUN-5756-2005-Ujcsanak	FN 298938	széklet	7	N	<i>encephalitis</i>	negatív
E30	HUN-368-2000-Eger	FN 298951	széklet	10	F	<i>meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
E30	HUN-370-2000-Eger	FN 298952	széklet	8	N	<i>meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
E30	HUN-423-2000-Eger	FN 298953	széklet	11	F	<i>meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
E30	HUN-519-2000-Recsk	FN 298954	széklet	2	F	<i>meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
E30	HUN-520-2000-Recsk	FN 298955	széklet	1	F	<i>meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
E30	HUN-638-2000-Jászberény	FN 298956	széklet	4	F	<i>meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
E30	HUN-852-2001-Budapest	FN 298957	széklet	8	N	tarkókötöttség	pozitív/E30
E30	HUN-6913-2004-Budapest	FN 298961	széklet	5	N	<i>asepticus meningitis</i>	negatív
E30	HUN-4940-2005-Miskolc	FN 298958	széklet	26	N	<i>asepticus meningitis</i>	pozitív/nem tipizálható
E30	HUN-5419-2005-Várpalota	FN 298959	liquor	27	N	<i>asepticus meningitis</i>	negatív
E30	HUN-4737-2006-Székesfehérvár	FN 298960	széklet	15	F	<i>meningitis</i>	pozitív/E30

12. táblázat. Az EV 71 és E30 okozta megbetegedések Magyarországon, 2000-2008.

Rövidítések: F = férfi, N = nő.

Összesen 6 vizsgálati mintából mutattuk ki az EV71-et és 11 betegfő az echovírus 30 szerotípust (**12. táblázat**). A táblázatot kiegészítettük a sejttenyészetben történő vírusizolálási és tipizálási kísérletekre vonatkozóan rendelkezésünkre álló adatokkal (12. táblázat, jobb szélső oszlop). Azt találtuk, hogy a hat EV71-ből kettő negatívnak bizonyult, a négy pozitív EV71 izolátum pedig nem volt tipizálható sejttenyészetben. Az 11 echovírus 30 közül kettő negatív volt, 9 vírus citopatogén hatást mutatott sejttenyészetben, ebből 7 nem volt tipizálható, két izolátum esetében viszont sikerült meghatározni a vírus szerotípusát a klasszikus módszertant követve.

Az enterovírus 71 idegrendszeri megbetegedéseket okozott 6 év alatti gyermekekben. Az echovírus 30 általában az iskoláskorú gyerekeket és felnőtteket betegítette meg. A kimutatott vírusszerotípusok földrajzi megoszlását a **30. ábra** szemlélteti.

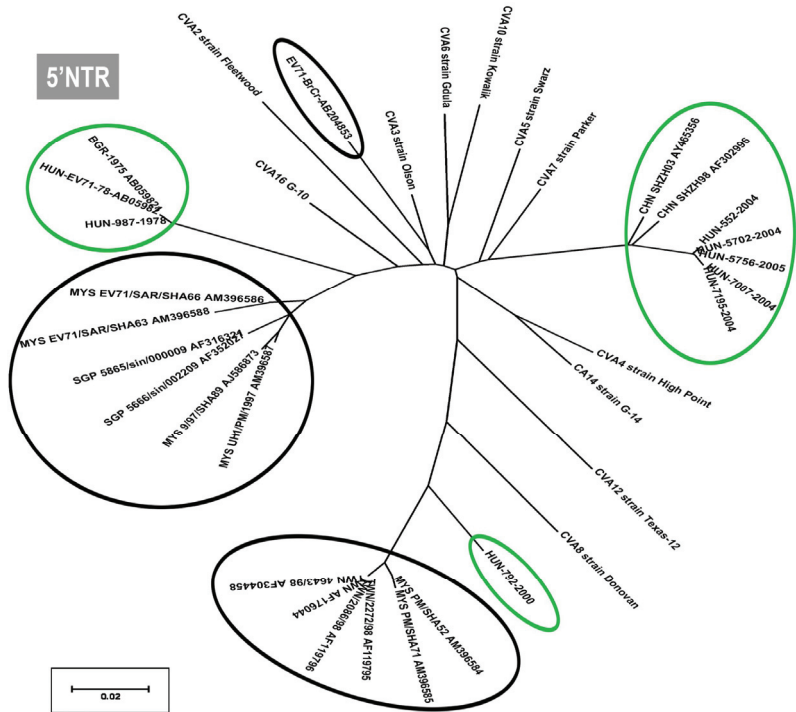


30. ábra. Az enterovírus 71 (kör) és echovírus 30 (háromszög) földrajzi eloszlása, 2000-2008.

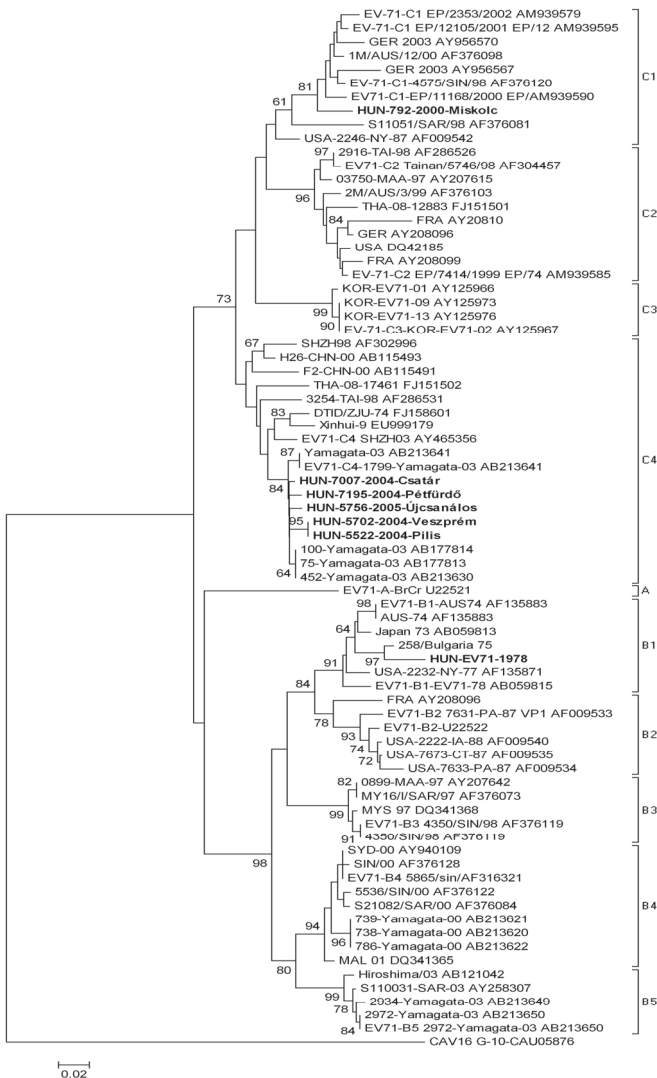
5.3.5. Az enterovírus 71 filogenetikai vizsgálata az 5'-NTR és VP1 régióban

A kapott enterovírus 71 nukleotidsorrendeket összehasonlítottuk a GenBankból kiválasztott EV71 szekvenciákkal, beleértve a magas neurovirulenciájú bulgáriai (BGR-1975-AB059821) és magyarországi (HUN-EV71-78-AB059822) EV71 szekvenciákat. Az EV71 nukleotidsorrendeket összehasonlítottuk a *HEV-A* faj prototípus törzsével az 5'-

NTR konzervatív régióban és a VP1 variábilis régióban (31., 32. ábrák). A filogenetikai törzsfát neighbour-joining módszerrel, Kimura 2-paraméteres modell alapján szerkesztettük a MEGA 4.0.2 program felhasználásával.



31. ábra. A HEV-A faj gyökértelen filogenetikai törzsfája az 5'-NTR régióban, 269 nt hosszú szakaszon. Prototípus törzsek: CV-A2/Fleetwood (AY421760), CV-A3/Olson (AY421761), CV-A4/High Point (AY421762), CV-A5/Swartz (AY421763), CV-A6/Gdula (AY421764), CV-A7/Parker (AY421765), CV-A8/Donovan (AY421766) CV-A10/Kowalik (AY421767), CV-A12/Texas-12 (AY421768), CV-A14/G-14 (AY421769), CV-A16/G-10 (U05876). Az enterovírus 71 szekvenciák jelölései: zöld színnel vannak kiemelve a magyarországi vírusok csoportjai, feketével az egyéb enterovírus 71 típusok nukleotidsorrendjei.

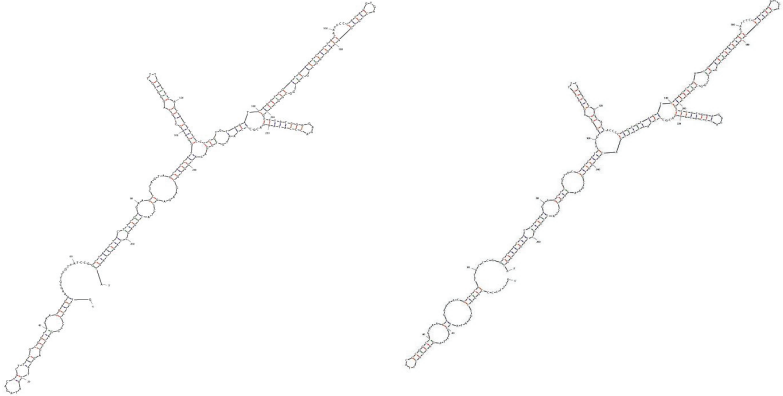


33. ábra Az enterovírus 71 VP1 filogenetikai törzsfája, 255 nt hosszú szakaszon.

Az elágazásoknál csak az 60%-nál magasabb bootstrap értékek kerültek feltüntetésre. A skála mutatja a 0,02 genetikai távolságot. Outgroup: coxsackievírus A16 G-10 prototípus törzs (CAU05876).

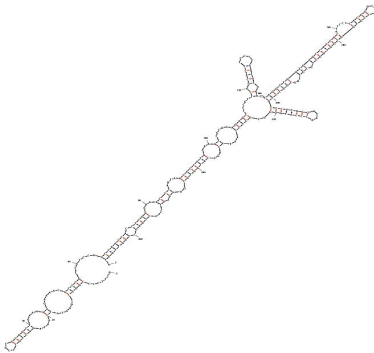
A magas neurovirulenciájú törzsek a **B1** genotípusba, míg a Magyarországon az elmúlt néhány év során izolált vírusok a **C1** és **C4** genotípusba tartoztak (**33. ábra**).

5.3.6. Az enterovírus 71 RNS 5'-NTR másodlagos szerkezete



1. HUN-EV71-78-AB05982 (**B1 genotípus**)

2. HUN-792-2000-Miskolc (**C1 genotípus**)



3. HUN-7007-2004- Csatár (**C4 genotípus**)

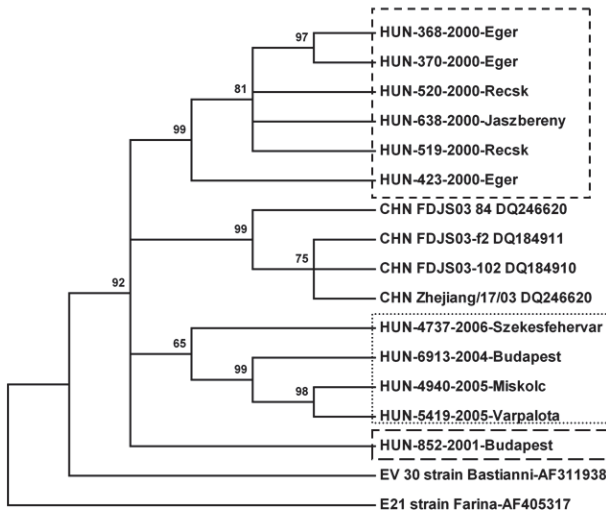
34. ábra. Az EV71 5'-NTR RNS másodlagos szerkezetének becslése *MFOLD* programmal, 269 nt (pozíció a genomban: 178-447 nt az EV71 BrCr (U22521) prototípus törzshöz viszonyítva).

A kapott szerkezetek közül az első (**1.**) egy magas neurovirulenciájú, 1978-ban izolált magyarországi törzs RNS-ének másodlagos szerkezete (B1 genotípus). A második

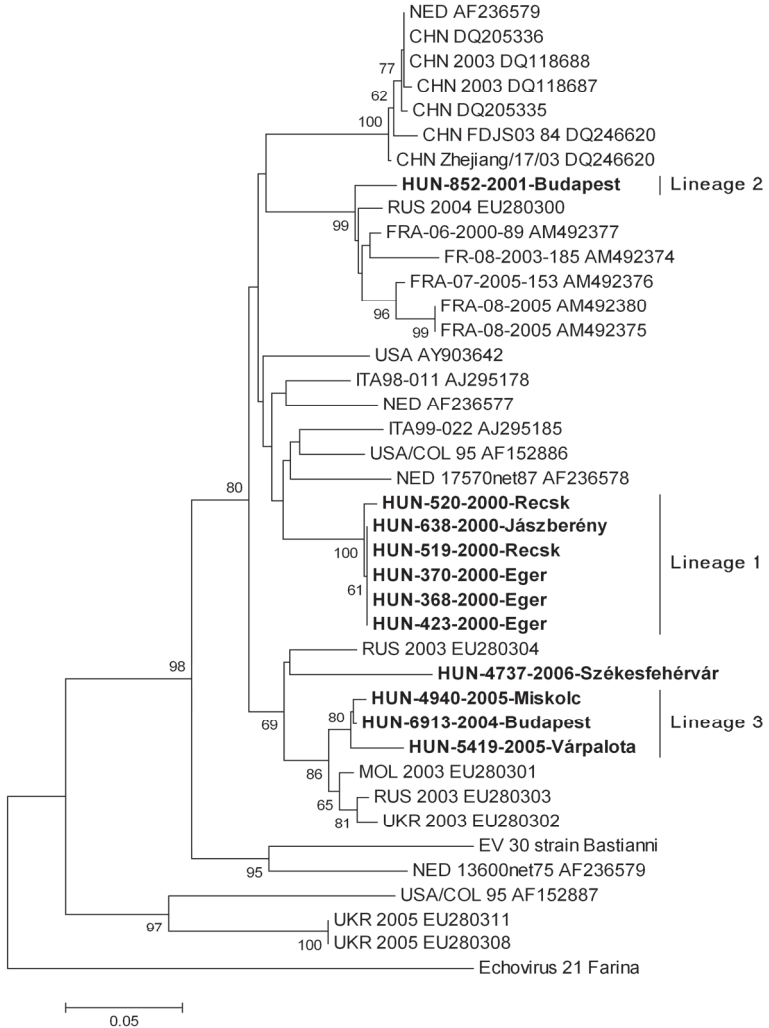
szerkezetet (2.) a 2000-ben kimutatott EV71 adja, ez a vírus a VP1 régió alapján antigénszerkezetileg a németországi izolátumokkal mutatott szoros rokonságot, és a C1 genotípusba tartozott. A 2004-ből és 2005-ből származó összes EV71 RNS szerkezete a (3.) szerkezetet mutatta, mindegyikük a C4 genotípusba tartozott (34. ábra).

5.3.7. Az echovírus 30 törzsek filogenetikai vizsgálata

A magyarországi echovírus 30 minták 5'-NTR és VP1 régió nukleotidsorrendjének filogenetikai elemzését is elvégeztük (35., 36. ábrák). A filogenetikai fák szerkesztését neighbour-joining algoritmussal, Kimura 2-paraméteres modell alapján végeztük. Outgroup-nak az echovírus 21 Farina nukleotidszekvenciáját választottunk, az echovírus 30-hoz közel álló törzset a *HEV-B* fajból.



35. ábra. Az echovírus 30 5'-NTR filogenetikai törzsfája, 246 nt hosszú szakaszon. Az elágazásoknál csak az 50%-nál magasabb bootstrap értékek kerültek feltüntetésre. Outgroup, echovírus 21 Farina (AY302547) prototípus törzs.



36. ábra. Az echovirus 30 VP1 filogenetikai törzsfája, 303 nt hosszú szakaszon. Az elágazásoknál csak az 60%-nál magasabb bootstrap értékek kerültek feltüntetésre. A skála mutatja a 0,05 genetikai távolságot. Outgroup: echovirus 21 Farina (AY302547) prototípus törzs.

6. MEGBESZÉLÉS

A *poliomyelitis* megelőzésére két alapvető oltóanyagot dolgoztak ki, az inaktivált emelt szintű vakcinát és szájon át adható élő vakcinát (Salk J.,1960; 1977; Sabin és mtsai.,1960). A trivalens OPV három gyengített vad poliovírusból: Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3 áll, amelyek a vad poliovírus 1-3 gyengített, termoszenzitív mutánsai.

A Poliovírus Eradikációs Program az OPV-t előnyben részesíti, mert aktív szaporodása az emberi bélrendszerben hosszantartó immunválaszt eredményez, és az előállítási költsége is alacsonyabb, mint az IPV-nek. Az OPV indukálta lokális immunitás védelmet biztosít az újrafertőzéssel szemben, és csökkenti a vad poliovírus cirkulációt is. Ezeknek a tulajdonságoknak köszönhetően az OPV az egyik leghatékonyabb eszköze a vad poliovírus okozta fertőzések felszámolásának (Ghendon és mtsai., 1994; Strebel és mtsai., 1992; Shulman és mtsai., 2006; Swartz és mtsai., 1989).

Az inaktivált poliovírus vakcinák az eradikációs végjáték szakaszában töltenek be majd fontos szerepet (Kew és mtsai., 2005; Kew O., 2006; Shulman és mtsai., 2006). A Sabin törzsek alapvetően jó biztonsági tulajdonságokkal rendelkeznek, bár a genetikai változások következtében kiszelektálódott neurovirulens variánsok valódi veszélyforrást jelentenek. Az OPV kutatások korai szakaszaiban ezeket a genetikai változásokat a különböző genetikai markerek segítségével mutatták ki, mint pl. a víruszaporodás hőérzékenysége (rct^{-40} marker), vagy az antigéntulajdonságok megváltozása szulfatált poliszacharidok jelenlétében.

Az attenuáció molekuláris alapjait több munkacsoport is behatóan tanulmányozta, mindhárom szerotípusnál. A genom különböző régióiban keletkezett mutációk különböző módon hatnak a vakcinavírus attenuált fenotípusára. Ilyen mutációkat mutattak ki a vakcinavírus genom 5'-NTR végén, amely a vírus replikációjához és a fehérjeszintézis iniciációjához szükséges másodlagos szerkezeti elemeket tartalmazza (Minor PD., 1992; 1992; 1993b; Minor és mtsai., 1993a; 2005; Mueller és mtsai., 2005; Skinner és mtsai., 1989). Az 5'-NTR attenuáló mutációja csökkenti az IRES elem V-ös doménjének termodinamikai stabilitását (Cann és mtsai., 1983; 1984; Contreras és mtsai., 1992; Evans és mtsai., 1985; Laassri és mtsai., 2006; Macadam és mtsai., 1989; 1992; 2006; Malnou és mtsai., 2002; 2004). A reverzió 2-5 nap alatt végbemegy, és egy U472C mutációt eredményez a genomban, ilyenkor egy gyenge U-G bázispárosodást egy magas energiájú C-G bázispárosodás vált fel (Almond és mtsai., 2007; Cherkasova és mtsai., 2002;

Contreras és mtsai., 1992; Westrop és mtsai., 1989, Oogra és mtsai., 1991; Macadam és mtsai., 2006; Pliaka és mtsai., 2007).

Az attenuáció második lehetséges mechanizmusát a kapszid régióban létrejött aminosavváltozások jelentik. Ebben a régióban csak két különbség van a poliovírus 3 vakcinatörzs és a neurovirulens vad típus között. Ezek aminosav-változások a VP3 régióban szerinről fenilalaninra (C2034T nt) és a VP1 régióban lizinről argininre (A3333G nt). Egyéb aminosav-változások, amelyek részt vesznek a revertáns vírusok kialakulásában a VP2 kapszomérban és a VP1 protomérban találhatóak: csere argininről lizinre (G1548A nt) és csere alaninról valinra (C2637T nt). Ezek a változások részt vesznek a vakcinatörzsek attenuált fenotípusának a szupressziójában (Kew és mtsai., 2002; 2004).

A WHO Globális Poliovírus Eradikációs Program keretében bevezették a vakcinaeredetű poliovírus (VDPV) fogalmát is. A VDPV izolátumok elsősorban a hosszantartó vírusürítés során alakulnak ki (Yakovenko és mtsai., 2006). A VDPV típusok molekuláris meghatározása a genom VP1 régiójában az 1%-ot meghaladó arányban előforduló mutációk alapján történik (Kew és mtsai., 2002; 2004). Az immundeficiens betegekből származó izolátumok az iVDPV csoportot képezik. A Sabin törzsek egyéb változatait olyan országokban mutatták ki, ahol az eradikációs program már korábban véget ért, és az átoltottság csökkenése miatt szeronegatív populáció alakult ki. Az OPV törzsek szabad cirkulációja egy alulimmunizált populációban a cVDPV vakcinatörzsek kialakulásához vezetett. Egyre több olyan országban mutatták ki kétes eredetű aVDPV izolátumokat szennyvízből vagy felszíni vizekből, amelyek mentesek a vad poliovírus cirkulációtól (Vinjé és mtsai., 2004).

Magyarországon rutin immunizálás céljából 1959 decemberétől 1992-ig monovalens, szájon át adható vakcinát (mOPV) alkalmaztak. 1960-ban összesen 36 oltási *poliomyelitis*-t jelentettek az mOPV beadását követően. Öt megbetegedés (2 recipiens és 3 kontakt) az 1-es típusal, 1 megbetegedés (recipiens) a 2-es típusal, 8 megbetegedés (5 recipiens és 3 kontakt) a 3-as típusal függött össze. Tizenkilenc beteg mintái negatívak voltak, 3 minta esetén nem történt vizsgálat (Kátay A., 1961). 1961 és 1990 között további 54 VAPP megbetegedést jelentettek. Ebből 3 az 1-es típusal, 7 a 2-es típusal és 44 a 3-as típusal függött össze (Baranyai és mtsai., 1994). A VAPP betegek diagnosztizálását végző kollégák az akkoriban rendelkezésre álló virológiai kimutatási módszerekkel bizonyították a benuást okozó poliovírusok oltási eredetét (Dömök I, 1984).

A magyarországi VAPP megbetegedésekből, amelyeket a poliovírus 3-as típusa okozott, munkacsoportunk molekuláris biológiai módszerekkel 18 izolátumot vizsgált. Az

izolátumok 15 gyerektől származtak (8 recipiens, 4 kontakt és 3 gyerek ismeretlen oltási történettel), akik 1960-1967 között bénultak meg. A VAPP betegek között nem állt fent járványügyi kapcsolat (Baranyai és mtsai., 1994).

6.1. A VAPP betegektől származó poliovírus 3-as típus nukleotidsorrend és aminosavsorrend tulajdonságai

Oltási *poliomyelitis*-t (VAPP) mindhárom Sabin szerotípussal kapcsolatban regisztráltak, azonban kockázata a 3-as típusnál bizonyult a legmagasabbnak (Dömök I. 1971; Prevots és mtsai., 1994).

A VAPP betegektől származó valamennyi poliovírus 3 típus esetén intratípusos RT-PCR módszerrel bizonyítottuk az izolátumok Sabin 3 (Leon 12 a₁b) eredetét. Mindegyik izolátumban kimutattuk az U472C nukleotid reverziót az 5'-NTR-ben, ami az attenuált fenotípus elvesztését, és a termoszenzitív tulajdonságok részleges kiesését eredményezte.

A korai vizsgálatok időszakából sikerült felkutatnunk 8 izolátum rct⁴⁰ fenotípusos marker vizsgálati eredményeit. Ebből 6 izolátum rct⁴⁰⁺ (T+), egy rct⁴⁰⁻ (T-), és egy rct^{40+/-} (T+/-) jellegűt mutatott. Az eredmény egyértelműen alátámasztja azt, hogy a termoszenzitív fenotípus elvesztését az U472C mutáció okozza más, a kapszid régióban keletkezett mutációk kíséretében (lásd később). A vizsgált 370 nt hosszú 5'-NTR szakaszon más mutációk nem voltak kimutathatók.

A 18 poliovírus 3 izolátum VP1 régiójában 0-7-ig terjedő számú nukleotid szubsztitúciót detektáltunk. Egy izolátum sem tartalmazott tíznél több nukleotid szubsztitúciót a VP1 régióban, tehát mindegyik <1%-ban tért el a szülői Sabin törzstől és ezért a vakcina-szerű (Sabin-like) csoportba lett besorolva.

A poliovírusok molekuláris órája ~1% VP1 szubsztitúció/évvel számol (Kew és mtsai., 2005; Yang és mtsai., 2005; Shahmahmoodi és mtsai., 2008). Az 1%-nál nagyobb eltérés a vakcinavírus elhúzódó replikációjára utal (1 év, vagy hosszabb idő), ami jóval meghaladja az oltás utáni általános vírusürítést (3-6 hét). Feltételezik, hogy egyes szubsztitúciók, főleg az ürítés korai szakaszában, pozitívan szelektálódnak (Odoom és mtsai., 2008), ezért az egy poliovírus 3 izolátumban (HUN/1961-3B) kimutatott 7 mutáció a VP1 régióban nem feltétlenül a hosszantartó ürítésre utal.

A VP1 nukleotidsorrend alapján a 18 Sabin-szerű vírus 12 csoportot alkotott. A legnagyobb csoport (n = 7) nem tartalmazott szubsztitúciót a VP1-ben, ezeket a vírusokat 5 mOPV3 recipiensből és 2 kontaktból izolálták. A többi izolátum egyedi mintázatot

mutatott a VP1 szubsztitúciókat illetően. A véletlenszerű eloszlásban lévő szinonim mutációk mellett 8 különböző nem-szinonim szubsztitúciót is sikerült kimutatnunk. Az 54. aminosav szubsztitúciója 7 izolátumban jött létre (4 esetben A54T, 3 alkalommal A54V). Az A54L aminosavcsere egy szuppresszor mutáció eredménye, ami önmagában is képes megváltoztatni a Sabin 3-as típus termoszenzitív tulajdonságait (Minor PD., 1986). Feltételezzük, hogy az A54T mutációnak is hasonló hatása lehet.

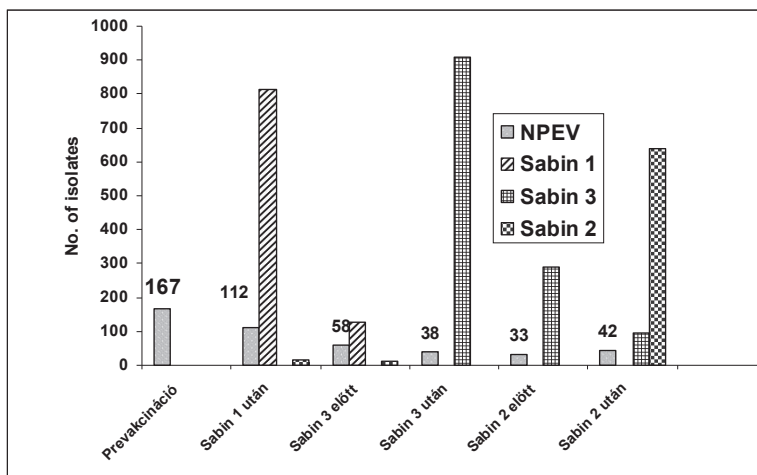
Rekombinánsok kimutatása céljából 18 izolátumot vizsgáltuk multiplex RT-PCR módszerrel a P2 és P3 kódoló régióban. Ezzel a módszerrel csak egy poliovírus 3 vakcina-szerű izolátum (HUN/1961-2) bizonyult rekombinánsnak, a Sabin 1 törzzsel a 3D régióban. A klinikai eredmények azt mutatták, hogy a gyermek az mOPV3 oltás előtt 6 héttel részesült az mOPV1-ben. Valószínűleg az 1-es típusú mOPV még nem ürült ki teljesen a szervezetéből, amikor az mOPV3-t kapta, és emiatt volt lehetséges a vakcinatörzsek rekombinációja. Feltehetően a többi beteg az mOPV1 beadás utáni 5-6 héttel már nem ürítette az 1-es típusú vakcinavírust.

A Sabin törzsek rekombinációját a természetben már többen is leírták (Arita és mtsai., 2005; Furione és mtsai., 1993; Georgescu és mtsai., 1994; Guillot és mtsai., 2000; Karakasiliotis és mtsai., 2004; Lipskaya és mtsai., 1995; Martín és mtsai., 2002; Yang és mtsai., 2005; Kilpatrick és mtsai., 2004; Lukashev és mtsai., 2005; Shulman és mtsai., 2006). Néhány esetben a rekombináció a vakcinatörzs és vad típusú poliovírus között is előfordul (Georgescu és mtsai., 1994; 1995). A VAPP betegektől származó Sabin 2 rekombinánsokat már korábban leírták, az esetek többségében a rekombináció a P3 kódoló régióban történt (Furione és mtsai., 1993; Friedrich és mtsai 1996; Lipskaya és mtsai., 1991). Az általunk vizsgálat VAPP betegből származó Sabin 3-szerű izolátum Sabin 1 rekombinánsnak bizonyult a 3D polimerázt kódoló régióban. Ezt a jelenséget elsőként sikerült közölnünk az irodalomban.

Az eredményeink azt mutatták, hogy a magyarországi VAPP betegektől származó poliovírus 3 izolátumok mind vakcina revertánsok voltak. Az irodalmi adatok igazolják, hogy a revertánsok az orális poliovakcina beadását követően már néhány nap után megjelennek az ember gyomor- és bélrendszerében (Evans és mtsai., 1984; Gmyl és mtsai., 1993; Gnanashanmugam és mtsai., 2007; Macadam és mtsai., 1992; Malnou és mtsai., 2004; Melnick és mtsai., 1972). Következtetésként elmondható, hogy a 60-as években VAPP-ot okozó revertáns vírusok valószínűleg a primovakcináltak késői immunválaszával hozhatók összefüggésbe, aminek az oka ismeretlen maradt.

6.2. A vakcinavírusok ürítése az egészséges mOPV recipiensek által

A poliovírus elleni oltási korszak kezdetén Magyarországon az mOPV-t alkalmazták (Fornosi és mtsai., 1965). Az oltás eredményességét évente ellenőrizték 1962-1972 között. Összesen 1000 teljes mintasorozatot vizsgáltak 11 év alatti primovakcinált gyerekekből a védőoltás előtti héten, majd a vakcina beadását követően. Az összesített adatokat a **37. ábra** mutatja be. Egyetlen VAPP megbetegedés sem fordult elő azokban a közösségekben, ahol a vizsgálatokat végezték (Dr. Berencsi György, nem közölt adatok).



37. ábra. A non-polio enterovírusok (NPEV) és az oltás utáni vakcinavírusok ürítése a primovakcinált gyermekközösségekben, 1962-1972.

A védőoltást megelőző héten vették az „oltás előtti” székletmintákat, majd az oltásokat követően 3-3 székletmintát vettek. Minden monovalens OPV beadását követően 6 hét szünetet tartottak. Öt héttel az mOPV1 beadását követően már csak az oltottak 14%-ából mutatták ki a Sabin 1 vírust, melynek ürítése teljesen megszűnt az mOPV3 beadását követően. Öt héttel az mOPV3 beadása után a gyermekek 32%-a még ürítette a Sabin 3 vírust és az mOPV2 beadását követően is még 12%-nak a széklete volt pozitív a Sabin 3 vírusra. Fontos megfigyelés volt, hogy a non-polio enterovírusok (NPEV) száma majdnem négyszeresére csökkent az élő poliovakcina beadását követően. A vizsgálatok során bizonyítást nyert az is, hogy a Sabin 3 vakcinatörzs hosszabb ideig ürül, mint a Sabin 1 és

Sabin 2-es típus. Megfigyelték, hogy az elhúzódó Sabin 3 ürtítés felelős az oltás utáni Sabin 2 ürtítés csökkenéséért (68,8%, szemben a 80,8% és 90,8% a Sabin 1 és Sabin 3 esetében). Feltehetően az OPV3 tartós szaporodása miatt az U472C reverzió kialakulásának a valószínűsége is nagyobb (Martinez és mtsai., 2004). A neurovirulencia vizsgálatok (amit majmok intracerebrális oltásával végeztek) csak akkor adtak volna pozitív eredményt, ha a mintában lévő bénító vírusmutánsok száma meghaladta volna a 100TCID₅₀-et. Nem zárható ki, hogy a revertánsok megsokszorozódhatnak egyes betegekben még mielőtt az immunválasz megkezdődne, és elindíthatják a VAPP-ot. A Sabin 2 vírusürtítés követését 3 héttel az oltás után fejezték be, ezért a 3-as és 2-es vírustípus kölcsönhatásának tanulmányozására nem volt lehetőség (Dr. Berencsi György, nem közölt eredmények).

A trivalens élő oltóanyag (tOPV) alkalmazása lehetővé tette a vírusok kiegyenlített szaporodását az oltottakban. Magyarországon 1992 és 2006 között kombinált (eIPV és tOPV) védőoltást alkalmaztak. Az 1999-2000-ben végzett szeroepidemiológiai szűrővizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az első adag inaktivált poliovírus (eIPV) védőoltás, valamint a két trivalens élő oltóanyag beadását követően a szeronegatív gyermekek aránya: 12,1% a Sabin 1, 9,6% Sabin 2 és 20,0% Sabin 3 esetében. A második tOPV oltásban részesült gyermekek között (3-5 év), a szeronegatívak aránya Sabin 1, Sabin 2 és Sabin 3 estben lecsökkent: 1,7%, 0,76% és 2,7%-ra. Annak ellenére, hogy az első emelt szintű IPV beadása után a mérhető ellenanyag szint csak a gyermekek 60%-ában volt kimutatható, 1992 óta egyetlen egy VAPP megbetegedés sem fordult elő az 1,4 millió primovakcinált körében (Berencsi és mtsai., 2005).

6.3. Az OPV és a non-polio enterovírusok kölcsönhatása

A vírustenyésztés összesített eredményei azt mutatták, hogy 167 non-polio enterovírus (NPEV) tenyésztett ki az oltási kampányok megkezdése előtt (37. ábra). A védőoltási sorozatok végén azonban már csak 33, illetve 42 NPEV-t mutattak ki. Ezért a 20-25%-ra történő csökkenésért a védőoltás interferáló tulajdonsága, valamint a non-polio enterovírusoknak a téli hónapokban való alacsonyabb cirkulációja lehetett a felelős (Dr. Berencsi György, nem közölt eredmények). Az enterovírusok interferenciáját Magyarországon először az 1958-ban lezajlott Bornholm-járvány során írták le, amit a coxsackie B3 vírus okozott, és a bénulással járó *poliomyelitis* megbetegedések számát 97%-kal csökkentette (Domok és mtsai., 1960 a, b; 1962). Hasonló jelenség zajlott le 1989-ben, amikor a 450 ezer gyermeknek beadott monovalens OPV két héten belül

megállította az echovírus 11' prime törzs terjedését (el-Sageyer és mtsai., 1998). Következtetésként számolni lehet azzal, hogy az inaktivált védőoltás kizárólagos bevezetését követően a non-polio enterovírusok járványügyi jelentősége is nőni fog.

6.4. Úton a globális *poliomyelitis* felszámolása felé

2002. június 21-én az Európai régiót *poliomyelitis*-mentesnek nyilvánították. Az Amerikai és a Nyugat-Csendes-óceáni régiók úgyszintén mentesek a honi eredetű poliovírusoktól, szemben a fennmaradt három endémiás WHO régióval: a Kelet-Mediterrán, a Délkelet-Ázsiai és az Afrikai. A mentesség azonban csak addig maradhat fenn, amíg a lakosság vakcina eredetű védettsége meghaladja a 95%-ot. A védettség csökkenése ugyanis lehetővé teszi a cVDPV virulencia növekedését az emberről emberre való terjedés során (CDC, 2001). Ahhoz, hogy a behurcolt vírus terjedése és újbóli hazai meghonosodása megakadályozható legyen, szükséges működtetni a behurcolás azonnali felderítésére alkalmas AFP surveillance-t (WHO, 1998), amelyet Magyarországon 1988-ban vezettek be (Dömök I., 1999).

6.5. A non-polio enterovírusok tipizálási eredménye

Az OEK Általános vírusdiagnosztikai osztályán 2000-2008 között 2569 betegmintát vizsgáltunk enterovírus-kimutatás céljából. A vizsgálat első lépésében a mintákat 5'-NTR enterovírus nested RT-PCR módszerrel „szűrtük”, aminek eredményképpen 459 pozitív mintát (PCR+) kaptak. Második lépésben a PCR pozitívnak bizonyult minták eredetijét fogékony sejtvonalakra oltottuk (RD, L20B) vírusizolálás céljából. A **citopatogén hatást mutató (CPE+)** mintákból non-polio enterovírus szerotípus-meghatározást kíséreltünk meg a kereskedelemben kapható poliklonális immunsavó keverékkel (RIVM, Hollandia, Bilthoven). 2000-2004 között azokat az enterovírus PCR pozitív mintákat, amelyek nem okoztak citopatogén hatást (CPE-), egerbe oltottuk.

A klasszikus enterovírus-tipizálás módszerei (sejtenyészetten és egerbe oltva) eszköz- és munkaigényesek. Több hetet, időként hónapokat szükséges várni, amíg értékelhető eredmény születik. Számos enterovírus szerotípus nem szaporítható sejtenyészetten, ennek lehetséges okai a receptor felismerés hiánya, vírusaggregátumok kialakulása, antigén drift vagy rekombinációk a kapszid régióban. A vírustipizálásra

használt kereskedelmi immunsavók is csak egyes szerotípusok azonosítását teszik lehetővé. Ezért a molekuláris tipizálási módszereknek egyre nagyobb jelentősége van a laboratóriumok számára (Oberste és mtsai., 1999a; 1999b; 2000; 2003; 2006; Norder és mtsai., 2001; 2003; Pliaka és mtsai., 2007). Az enterovírus tipizálás a VP1 genetikai régióra kidolgozott PCR-rel valósítható meg, mivel ez a régió szoros korrelációt mutat a vírus szerotípusával (Caro és mtsai., 2001; Oberste és mtsai., 1999a; 1999b Thoenen és mtsai., 2004).

A molekuláris tipizálás elvégzésének fő indokai voltak: a) járványügyi okokból tisztázni milyen non-polio enterovírusok cirkulálnak Magyarországon; b) annak ismeretében, hogy különböző enterovírusok egy és ugyanazon kórkép kialakulásáért felelősek, vagy egy szerotípus több különböző kórképet okozhat, a vírusfertőzések differenciáldiagnosztikája a laboratórium egyik fontos feladata.

Az enterovírus VP1 seminested RT-PCR módszer alkalmazása a laboratóriumunkban sikeresnek bizonyult. A VP1 variábilis régió molekuláris tipizálásán kívül a genom 5'-NTR konzervatív régiójának nukleotidsorrend-vizsgálatát is elvégeztük.

A 459 PCR-pozitív minta szerológiai és molekuláris tipizálási eredményét a **13. táblázat** tartalmazza.

Vírus szerotípus/év	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	N (%)
E2				1 ^a						1 (0.2)
E4		8 ^a								8 (1.7)
E6	5 ^a	5 ^a					2 ^a			12 (2.6)
E7			1 ^c							1 (0.2)
E9				2 ^d						2 (0.4)
E11				3 ^a						3 (0.6)
E13	1 ^a	1 ^a		1 ^b						3 (0.6)
E25	3 ^a						2 ^a			5 (1.0)
E30	6 ^a	2 ^a			1 ^a	2 ^a	2 ^a			13 (2.8)
EV71	1 ^b				4 ^b	1 ^b				6 (1.3)
CV-B5	1 ^a			1 ^b						2 (0.4)
CV-A16	1 ^a , 4 ^e				2 ^b			1 ^b	1 ^b , 2 ^e	11 (2.3)
CV-A19			1 ^a							1 (0.2)
Nem tenyésztető/nem tipizálható	44	156	61	29	54	15	4	13	15	391 (85)
Összesen	66	172	63	37	61	18	10	14	18	459 (100)

13. táblázat. A non-polio enterovírusok (NPEV) kimutatása Magyarországon és az általuk okozott megbetegedések.

Rövidítések: a= asepticus meningitis, b= encephalitis, c= Guillain-Barré Syndroma/AFP (acut flaccid paralysis), d= myocarditis, e= kéz-láb-száj betegség.

A 2000-2008 között 5'-NTR PCR módszerrel kimutatott 459 enterovírus közül 68 minta vírus szerotípusát sikerült azonosítani, ebből 39-et szerológiai és 29-et molekuláris módszerrel. Az eredmények alapján a Magyarországon előforduló leggyakoribb NPEV szerotípusok a következők: E30 (2,8%), E6 (2,6%), CV-A16 (2,3%), E4 (1,7%), EV71 (1,3%), E25 (1,0%), E11(0,6%), E13 (0,6%), E9 (0,4%), CV-B5 (0,4%), E2 (0,2%), E7 (0,2%) és CV-A19 (0,2%).

A molekuláris módszerrel vizsgált 93 PCR minta közül 12 esetben CV-A16-ot, 6 esetben EV71-et és 11 esetben echovírus 30-at sikerült azonosítanunk. A molekuláris tipizálást a PCR-pozitív minták csak egy részénél sikerült végrehajtani, technikai és anyagi okok miatt. A jövő feladatai közé tartozik a többi PCR-pozitív mintának a tipizálása is, mivel a klasszikus módszertan alkalmazásával a 2000-2008-as időszakból származó minták 85%-a nem tenyészhetőnek, illetve nem tipizálhatónak bizonyult. A nem tipizálható enterovírusok molekuláris jellemzésének kiemelkedő jelentősége van a vírusok terjedési útvonalainak és epidemiológiájának megértésében a polio eradikáció korszakában.

6.6. A molekuláris módszerekkel tipizált non-polio enterovírusok klinikai, epidemiológiai és filogenetikai eredményei

6.6.1. A coxsackie A16 vírus vizsgálatok

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a CV-A16 típusú vírusok mind sporadikus, mind pedig járványos formában cirkulálnak a magyarországi populációban. Az általunk vizsgált esetekben a megbetegedések az 5 év alatti gyerekeket érintették. Járványos formában a vírus kéz-láb-száj betegséget okozott, sporadikus formában pedig enyhe, reverzibilis neurológiai tüneteket. Kéz-láb-száj betegséget más non-polio enterovírusok is tudnak okozni: a coxsackie A5, A9, A10, A16, B2, B5 valamint az enterovírus 71 (Barlean és mtsai., 1994; M'hadheb-Gharbi és mtsai., 2008; Hughes és mtsai., 1972; Itagaki és mtsai., 1983). A betegség viszonylag enyhe tünetekkel jár, a szájban megjelenő hólyagok főleg a táplálkozás során okoznak gondot. A betegségnek ugyan ritkán, de lehetnek szövődményei, mint pl. *asepticus meningitis*, letális *myocarditis*, *rhabdomyolysis* vese szindrómával, *pneumonitis*, stb. (Wright és mtsai., 1963; Cooper és mtsai., 1989; Wang és mtsai., 2004; Legay és mtsai., 2007). A terhes asszonyok fokozott veszélynek vannak kitéve egy kéz-láb-száj járvány során, amelynek spontán vetélés lehet a következménye

(Ogilvie és mtsai., 1980). Magát a vírust ki lehet mutatni a kéz-láb-száj betegek székletéből több héttel a kiütések elmúlása után is. Mivel a CV-A16 főleg *feco-oralis* úton terjed, ezért a betegeket a kiütések elmúlása után is szükséges lenne karanténban tartani, mert a vírusirítás több hétig is eltarthat (Chemez és mtsai., 1976; Ooi és mtsai., 2007). Az irodalmi adatok alapján halálos kimenetelű CV-A16 fertőzéseket 1,1%-ban mutattak ki világszerte (Khetsuriani és mtsai., 2006).

2000-ben a CV-A16 okozta kéz-láb-száj betegség járvány egy Balaton melletti üdülőhelyen tört ki, a betegek járványügyi nyomonkövetéséről nem álltak a rendelkezésünkre adatok. A 2008-as atkári kéz-láb-száj járvány során viszont részletes tájékoztatást kaptunk. Ennek megfelelően kiszámítottuk a CV-A16 támadási rátáját az óvodai közösségben, ami 46,5%-nak bizonyult a 3-5 éves gyerekek csoportjában és 33,3%-nak az 5-6 éves korcsoportban. Az eredmények egyezést mutattak az irodalomban közölt adatokkal a CV-A16 támadási rátájára vonatkozóan (Ferson és mtsai., 1991; Froeschle és mtsai., 1967; Chemez és mtsai., 1976). Az atkári óvodai közösségben a gyerekek maradványtünet nélkül meggyógyultak. Feltételezzük, hogy a helyi járvány kitörésének lehetséges oka az volt, hogy a CV-A16 szerotípus az elmúlt időszakban nem került behurcolásra az adott földrajzi területre.

Sporadikus CV-A16 fertőzést 2004-ből, 2007-ből és 2008-ból mutattunk ki ($n = 3$). Két betegnek reverzibilis neurológiai tünetei voltak. Egy esetben coxsackie A16 vírust mutattunk ki egy 2008-ban elhunyt csecsemő végbélmintájából, ahol a halál oka tisztázatlan maradt. A CV-A16 lehetséges kóroki szerepéről nem született állásfoglalás a szakemberek részéről.

A VP1 régió filogenetikai vizsgálata azt mutatta, hogy a 2000-ből, 2007-ből és 2008-ból származó magyarországi CV-A16-ok az ázsiai izolátumokkal mutatnak rokonságot, amelyek kéz-láb száj betegséget okoztak Japánban (Mizuta és mtsai., 2005) és Szingapúrban 2001-2007 között (Ang és mtsai., 2009). A VP1 szekvencia alapján két CV-A16 vírus 2004-ből (HUN-4069-2004-Tiszakécske, HUN-6838-2004-Százhalombatta) együtt csoportosul a filogenetikai törzsfán egy 2003-as németországi izolátummal (AY956576) és egy franciaországi izolátummal (AM492504) 2005-ből. Viszonylag kevés genetikai adat áll rendelkezésre az európai CV-A16 előfordulásáról, valószínűleg a vírusok által okozott általában enyhe klinikai kép miatt.

A coxsackie A16 5'-NTR és VP1 régió nukleotidsorrend vizsgálatai szinte egybehangzó eredményeket adtak a 2000-2008 között kimutatott vírusok csoportosulásait illetően mindkét genetikai régióban. Az 5'-NTR szerint 4 csoportot, a VP1 vizsgálatok alapján pedig 3 csoportot különböztettünk meg. A GenBankban viszonylag kevés 5'-NTR adat áll a rendelkezésre, ezért ez is befolyásolja a helyes következtetéseket.

Csoport	5'-NTR	VP1
I.	HUN-681-2000-Baja	HUN-681-2000-Baja
	HUN-711-2000-Siójut	HUN-711-2000-Siójut
	HUN-716-2000-Balatonszabadi	HUN-716-2000-Balatonszabadi
	HUN-719-2000-Balatonszabadi	HUN-719-2000-Balatonszabadi
	HUN-721-2000-Balatonszabadi	HUN-721-2000-Balatonszabadi
II.	HUN-2340-VF-2008-Atkár	HUN-2340-VF-2008-Atkár
	HUN-2346LI-VF-2008-Atkár	HUN-2346LI-VF-2008-Atkár,
	HUN-2347LI-Ths-2008-Atkár	HUN-2347LI-Ths-2008-Atkár
		HUN-2991-2007-Gétye
III.	HUN-2991-2007-Gétye	HUN-3118-2008-Budapest
	HUN-3118-2008-Budapest	HUN-4069-2004-Tiszakécske
IV.	HUN-4069-2004-Tiszakécske	HUN-6838-2004-Százhalmobatta
	HUN-6838-2004-Százhalmobatta	

Az *RNAFOLD* programmal kapott CV-A16 vírusok RNS 5'-NTR régió másodlagos szerkezetei alapján elmondható, hogy az 5-ös számú, halálos kimenetelű fertőzésből származó vírus RNS szerkezete eltérő volt az atkári járványból származó vírusok szerkezetétől (6. és 7. szerkezet, **29. ábra**). Feltételezzük, hogy a szerkezetek mutáció vagy rekombináció következtében térnek el egymástól. Ezek a változások valószínűleg hatással lehetnek a vírusok virulenciájára. Irodalmi adatok szerint a virulenciaváltozások érinthetik a CV-A16 IRES elem ún. GNRA tetraloop motívumát, melynek szerepe van a vírus replikációjában (Malnou és mtsai., 2002; Gharbi és mtsai., 2006; M'hadheb-Gharbi és mtsai., 2007; 2008). Azonban az ezzel a kérdéssel foglalkozó tudományos közlemények száma egyelőre elenyésző, a feltételezések bizonyítására további kísérleti munka elvégzése szükséges.

6.6.2. Az enterovírus 71 vizsgálatok

A 90-es évek elején az ázsiai-csendes-óceáni régióban az enterovírus 71 számos kéz-láb-száj betegség járványt okozott súlyos idegrendszeri szövődeményekkel és magas halálozási aránnyal az 5 év alatti gyermekek körében. A korábbi járványokból (Bulgária, 1975; Magyarország, 1978), már sikerült bizonyítani a magas neurovirulenciájú EV71 törzsek terjedését (Nagy és mtsai., 1982, Tariska és mtsai., 1980). Halálos kimenetelű EV71 fertőzéseket leírtak számos ázsiai országban: Malajziában (1997), Tajvanon (1998), Vietnamban (2005) és nemrégiben (2008) Kínában (Ang és mtsai., 2009; Chua és mtsai., 2007; Chen és mtsai., 2007; Hamaguchi és mtsai., 2008; Li és mtsai., 2005).

Az enterovírus 71 a *HEV-A* faj tagja, 3 genocsoporttal rendelkezik: A, B, C (Brown és mtsai., 1999). A BrCr prototípus törzs az A genocsoport egyetlen tagja. A többi enterovírus izolátum a B és C genocsoportba tartozik, amelyek további szubgenocsoportokra vagy genotípusokra oszthatók: B1-B5 és C1-C5 (Jee és mtsai., 2003; Herrero és mtsai., 2003; Li és mtsai., 2005; Podin és mtsai., 2006; Yoke-Fun és mtsai., 2006). Jelenleg a C genocsoportú EV71 vírusok dominálnak Európában: a C1-es és C2-es genotípus az Egyesült Királyságban; a C1-es és C4-es genotípus Ausztriában és Németországban (Bible és mtsai., 2008; Ortner és mtsai., 2009; Diedrich és mtsai., 2009). Más EV71 genotípusok okoznak járványokat a Távol-Keleten és az ázsiai-csendes-óceáni országokban. A B3-as genotípust először Malajziában mutatták ki 1998-ban, majd 1998-ban a C4-es genotípust Kínában, és a B3, C2 genotípusokat 1999-ben Perthben (Ausztrália). A B5 és C5 genotípusokat 2003-ban Japánban, és 2005-ben Dél-Vietnamban, mutatták ki (Mizuta és mtsai., 2005; Tu és mtsai., 2007).

Az EV71 vírusok filogenetikai vizsgálata azt mutatta, hogy a korábbi járványokból (Bulgária, 1975 és Magyarország, 1975) származó *bulbaris encephalitis*-t okozó EV71 izolátumok a B1 genotípusba tartoznak. A Magyarországon 2000-ben kimutatott EV71 C1 genotípusúnak bizonyult. A megbetegedett gyermeknek enyhe neurológiai tünetei voltak, ami különös jelentőséggel bír, mivel hasonlóan alacsony patogenitású, C1 genotípusba tartozó EV71 vírust mutattak ki egy tünetmentes gyermekből Norvégiában. Feltételezik, hogy a neurovirulencia megváltozásáért az 5'-NTR és a 3D konzervatív genetikai régiók változásai a felelősek (Witsó és mtsai., 2007). A Magyarországon 2004-2005 között cirkuláló EV71 vírusok (n = 5) mindegyike a C4-es genotípusba tartozott. Az EV71 prevalencia adatai szerint Európában a C1 genotípus dominál. Az Egyesült Királyságban végzett vizsgálatok alapján a C1 genotípus az érintett esetek 78%-ában, a C2 pedig 12%-

ban volt kimutatható (Bible és mtsai., 2008). A nemrégiben közölt adatok alapján a C1 genotípus 2003-ig dominált Németországban is (Diedrich és mtsai., 2009). 2002-2003-ban egy EV71 okozta kisebb járvány tört ki a Magyarországgal szomszédos Ausztriában, amit a C1 genotípus okozott, valamint sporadikus idegrendszeri megbetegedéseket is leírtak, amit a C4-es genotípus okozott 2004-ben (Ortner és mtsai., 2009). A populáció tünetmentes, magas arányú átvészelttségét az EV71-gyel szemben a németországi szeroprevalencia vizsgálatok igazolják (Diedrich és mtsai., 2009).

Az EV71 fertőzések a legnagyobb közegészségügyi gondot jelentik az ázsiai-csendes-óceáni régió fejlett és fejletlen országaiban, mert a betegség kezelésére nem áll rendelkezésre megfelelő antivirális szer, és a vakcina bevezetése is még várat magára. A C4-es genotípus 2008-ban került a figyelem középpontjába Kínában, amikor magas halálozással járó járványt okozott. Magyarországon összesen öt C4 genotípusú vírus mutattunk ki 2004 és 2005 között, amelyek különböző földrajzi helyekről származtak. A betegek mindegyike *encephalitis*-ben szenvedett.

Az enterovírus 71 a poliovírusok eradikációja után a neurológiai betegséget okozó egyik legkomolyabb kórokozóvá nővi majd ki magát, mivel a poliovírusokhoz hasonlóan *acut flaccid paralysis*-t tud okozni (Melnick JL., 1984). Az EV71 mindegyik genotípusa képes súlyos kórképeket előidézni, viszont egyelőre nem sikerült határozott összefüggést találni a genotípusok szerkezeti eltérései és a neurovirulencia között (Shih és mtsai., 2000).

Vizsgálataink során az RNS másodlagos szerkezetének számítógépes modellezésével az EV71 5'-NTR régiójában alapvetően 3 szerkezetet kaptunk, amelyek összefüggést mutattak a különböző genotípusba tartozó EV71 izolátumokkal. Az 5'-NTR másodlagos szerkezetének szerepét kiemelték az enterovírus 71 virulenciájában (AbuBakar és mtsai., 1999). Ezen kívül az enterovírus 71 virulenciaváltozásában az intratípusos, különösen a coxsackie A16 típusú vírusokkal történő rekombinációnak is szerepet tulajdonítottak a *HEV-A* fajon belül (Chan YF, AbuBakar S., 2004; Yoke-Fun és mtsai., 2006).

Ugyanakkor feltételezik, hogy a neurovirulencia fokozódását a gyermek populáció immunstátusza és genetikai hajlama, valamint esetleges más vírusokkal való koinfekció magyarázza (Shih és mtsai., 2004). A vírus terjedési útjának megváltozása szintén megnövekedett víruscirkulációhoz vezet, mint azt kimutatták az ázsiai-csendes-óceáni régióban, ahol az elsősorban *feco-oralis* úton terjedő EV71 légúti terjedésbe kezdett. Az EV71 fertőzések mérsékelt égvői szezonálisága, valamint a demográfiai különbségek magyarázattal szolgálhatnak az EV71 nagyfokú cirkulációjára a trópusi és szubtrópusi

területeken. Ezzel talán megmagyarázható, hogy a Magyarországon kimutatott genotípusok hogyan okozhattak enyhébb vagy kisebb számú megbetegedést, amikor ugyanazon genotípus az ázsiai országokban súlyos járványokat idézett elő.

6.6.3. Az echovírus 30 vizsgálatok

Összesen 12 mintában mutattuk ki az echovírus 30 (echo30) szerotípust. Mindkét genetikai régióban (5'NTR, VP1) egybehangzó eredményt kaptunk a vírus típusára vonatkozóan. Az echovírus 30 az *asepticus meningitis* leggyakoribb kórokozója a non-polio enterovírusok közül Magyarországon. A betegség leginkább a 10 év körüli gyerekeket érinti. Irodalmi adatok igazolták, hogy az echovírus 30 iskoláskorú gyerekeknél és felnőtteknél gyakoribb (66,8%), mint az 5 év alattiakban (33,2%) (Khetsuriani és mtsai., 2006; Begier és mtsai., 2008).

Az echovírus 30 aktivitása folyamatosan nő, ami nagy kiterjedésű *asepticus meningitis* járványokat eredményez (Zhao és mtsai., 2005; Hauri és mtsai., 2005; Bernit és mtsai., 2000; Wang és mtsai., 2002; Rice és mtsai., 1995; Carberizo és mtsai., 2008). Az echovírus 30 aktivitásának a mértékét a vírus különböző genomváltozatai idézik elő, amikor egy új cirkuláló vonulat (lineage) felváltja a másikat (Oberste és mtsai., 1999c; Palacios és mtsai., 2002).

A Magyarországon 2000-2008 között kimutatott echovírus 30 izolátumok európai eredetűnek bizonyultak, és a kimutatás éve szerint csoportosultak (**35.**, **36. ábra**). A VP1 genetikai régió vizsgálata alapján 3 genetikai lineage megjelenését sikerült kimutatnunk. Az első lineage-be 6 magyarországi vírus tartozott, amelyek *meningitis*-ben szenvedő gyerekektől származtak 2000-ből. Ezek a vírusok közeli rokonságot mutattak a Hollandiában 1999-ben (AF236578), Olaszországban 1999-ben (AI 295185) és az USA-ban 1994-ben (AF152886) kimutatott vírusokkal. A második lineage-be csak egy szekvencia tartozott 2001-ből, amely szoros rokonságot mutatott a 2000-ben kimutatott franciaországi izolátummal (AM492377), és egy oroszországi E30 szekvenciával (EU 280300) 2004-ből. A harmadik lineage-be tartozó vírusok közül kettő 2004-ből, 2 vírus 2005-ből és egy 2006-ból a VP1 szekvencia alapján együtt csoportosult a szomszédos országokban – Ukrajna (EU280302), Moldova (EU280301) és Oroszország (EU280304) – meghatározott vírus szekvenciákkal.

Az echovírus 30 az egyik leggyakoribb szerotípus más európai országokban is (Paananen és mtsai., 2007; Roth és mtsai., 2007; Brunel és mtsai., 2008; Cabrerizo és mtsai., 2008). Az echovírus 30 új vonulatainak (lineage) kialakulásában nagy szerepe van a rekombinációs folyamatoknak. Az elméletek szerint az echovírus 30 különböző genomrégiói egymástól függetlenül cirkulálnak, aminek következtében mozaik genomok alakulnak ki (Mirand és mtsai., 2007; Lukashev és mtsai., 2008).

Kimutatták, hogy az echovírus 30 evolúciós változása kapcsolatban van az 1-es típusú *diabetes* incidenciájának a növekedésével (Sadeharju és mtsai., 2003). Feltételezik, hogy a patogenitás fokozódásában más, a kapszidfehérjét kódoló régiótól távol eső genetikai szakaszok vesznek részt (Hviid és mtsai., 2004; Paananen és mtsai., 2007).

Össességében elmondható, hogy az általunk alkalmazott enterovírus tipizálási módszerrel egybehangzó eredményt kaptunk mindkét genetikai régióban a vírus szerotípusára vonatkozóan, azonban a filogenetikai vizsgálathoz informatívabbnak bizonyultak a szerotípussal szoros korrelációt mutató variábilis VP1 régió eredményei a konzervatív 5-NTR-hez képest.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. AbuBakar S, Chee HY, Al-Kobaisi MF, Xiaoshan J, Chua KB, Lam SK. 1999. Identification of enterovirus 71 isolates from an outbreak of hand, foot and mouth disease (HFMD) with fatal cases of encephalomyelitis in Malaysia. *Virus Res.* 61(1):1-9.
2. Adu F, Iber J, Bukbuk D, Gumede N, Yang SJ, Jorba J, Campagnoli R, Sule WF, Yang CF, Burns C, Pallansch M, Harry T, Kew O. 2007. Isolation of recombinant type 2 vaccine-derived poliovirus (VDPV) from a Nigerian child. *Virus Res.* 127(1):17-25.
3. AgoI VI, Belov GA, Bienz K, Egger D, Kolesnikova MS, Romanova LI, Sladkova LV, Tolskaya EA. 2000. Competing death programs in poliovirus-infected cells: commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J Virol.* 74 (12): 5534-41.
4. AgoI V in Bert L. Semler, Eckard Wimmer (eds): *Molecular biology of picornaviruses.* ASM Press, Washington, DC. 2002.
5. AgoI, V.I. 2006. Vaccine-derived polioviruses. *Biologicals* 34: 103-8.
6. Almond JW, Cann AJ, Minor PD, Reeve P, Schild GC, Hauptmann R, Stanway G. 1984. Nucleotide sequence from neurovirulent and attenuated strains of type 3 poliovirus. *Rev Infect Dis*;6:S487-93.
7. Almond, J.W., Westrop, G.D., Evans, D.M., Dunn, G., Minor, P.D., Magrath, D., and G.C. Schild. 2007. Studies on the attenuation of the Sabin type 3 oral polio vaccine. *J. Virol. Methods.* 17: 183-9.
8. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 5;215(3):403-10.
9. Ang LW, Koh BK, Chan KP, Chua LT, James L, Goh KT. 2009. Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001-2007. *Ann Acad Med Singapore.* 38(2):106-12. PubMed PMID: 19271036.
10. Ansardi DC, Pal-Ghosh R, Porter D, Morrow CD. 1995. Encapsidation and serial passage of a poliovirus replicon which expresses an inactive 2A proteinase. *J Virol.* 69(2):1359-66.
11. Arita, M, Zhu, S.L, Yoshida, H, Yoneyama, T, Miyamura, T, Shimizu H. 2005. A Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in the viral polymerase coding region. *J. Virol.* 79: 12650-7.
12. Avellón A, Cabrerizo M, de Miguel T, Pérez-Breña P, Tenorio A, Pérez JL, de Aragón MV, Trallero G. 2008. Paralysis case and contact spread of recombinant vaccine-derived poliovirus, Spain. *Emerg Infect Dis.*14(11):1807-9.

13. Baranyai E, Káli G. 1980.[Enterovirus-71 induced meningitis-meningoencephalitis epidemic among children in 1978 (prospective study)]. *Orv Hetil.* 18;121(20):1175-8.
14. Baranyai Elza. 1994. A gyermekbénulás elleni küzdelem. A Szent László Kórház centenáriuma készült összeállítás. Budapest, Literatura Medica.
15. Barlean L, Avram G, Pavlov E, Cotor F. 1994. Investigation of five cases of vesicular enteroviral stomatitis with exanthema induced by coxsackie A5 virus. *Rev Roum Virol.* 45 (1-2): 3-9.
16. Begier EM, Oberste MS, Landry ML, Brennan T, Mlynarski D, Mshar PA, Frenette K, Rabatsky-Ehr T, Purviance K, Nepal A, Nix WA, Pallansch MA, Ferguson D, Carter ML, Hadler JL. 2008. An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clin Infect Dis.* 1;47(5):616-23.
17. Belov GA, Lidsky PV, Mikitas OV, Egger D, Lukyanov KA, Bienz K, Agol VI. 2004. Bidirectional increase in permeability of nuclear envelope upon poliovirus infection and accompanying alterations of nuclear pores. *J Virol.* 78 (18):10166-77.
18. Benyesh-Melnick M, Melnick JL. 1959. Neutralizing-antibody-combining (NAC) test for measuring antigenic potency of poliomyelitis vaccine. *Bull. World Health Organ.* 20: 1075-98.
19. Berencsi G, Nagy G. 1973. Intracellular neutralization of poliovirus by type-specific antiserum. *Arch Gesamte Virusforsch.* 43 (4):320-5.
20. Berencsi György, Szendrői Andrea, Kapusinszky Beatrix. 2005. Humán pikornavírusok (10. fejezet) 180-191. old. *Orvosi molekuláris virológia* (Szerk. Berencsi György). Kiadó: Convention Budapest Kft.
21. Bernit E, de Lamballerie X, Zandotti C, Berger P, Veit V, Schleinitz N, de Micco P, Harlé JR, Charrel RN. 2004. Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France. *Medicine (Baltimore).* 83(4):245-53.
22. Bernstein HD, Sarnow P, Baltimore D. 1986. Genetic complementation among poliovirus mutants derived from an infectious cDNA clone. *J Virol.* 60(3):1040-9.
23. Bible JM, Iturriza-Gomara M, Megson B, Brown D, Pantelidis P, Earl P, Bendig J, Tong CY. 2008. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J Clin Microbiol.* 46(10):3192-200.

24. Blomqvist S, Savolainen C, Råman L, Roivainen M, Hovi T. 2002. Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J Clin Microbiol.* 40(11):4218-23.
25. Blomqvist S, Savolainen C, Laine P, Hirttio P, Lamminsalo E, Penttila E, Joks S, Roivainen M, Hovi T. 2004. Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. *J Virol.* 78(9):4876-83.
26. Borman AM, Michel YM, Malnou CE, Kean KM. 2002. Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction. *J Biol Chem.* 277(39):36818-24.
27. Bouchriti N, Goyal SM. 1992. Evaluation of three methods for the concentration of poliovirus from oysters. *Microbiologica.* 15(4):403-8.
28. Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, Kennett ML, Pallansch MA. 1999. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol.* 73(12):9969-75.
29. Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. 2003. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol.* 77(16):8973-84.
30. Brunel D, Lévêque N, Jacques J, Renois F, Motte J, Andréoletti L. 2008. Clinical and virological features of an aseptic meningitis outbreak in North-Eastern France, 2005. *J Clin Virol.* 42(2):225-8.
31. Cabrerizo M, Echevarria JE, González I, de Miguel T, Trallero G. 2008. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol.* 80(6):1018-24.
32. Cann AJ, Stanway G, Hauptmann R, Minor PD, Schild GC, Clarke LD, Mountford RC, Almond JW. 1983. Poliovirus type 3: molecular cloning of the genome and nucleotide sequence of the region encoding the protease and polymerase proteins. *Nucleic Acids Res.* 11: 1267-81.
33. Cann AJ, Stanway G, Hughes PJ, Minor PD, Evans DM, Schild GC, Almond JW. 1984. Reversion to neurovirulence of the live-attenuated Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *Nucleic Acids Res.* 12: 7787-92.
34. Caro V, Guillot S, Delpeyroux F, Crainic R. 2001. Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J Gen Virol.* 82:79-91.

35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2001. Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus--Philippines. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 12;50(40):874-5.
36. Chan YF, AbuBaker S. 2004. Recombinant human enterovirus 71 in hand, foot and mouth disease patients. *Emerg Infect Dis.* 10(8):1468-70.
37. Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. 1999. Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *Pediatr Infect Dis J* 18:1092–6.
38. Chapman NM, Tracy S, Gauntt CJ, Fortmueller U. 1990. Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J Clin Microbiol.* 28(5):843-50.
39. Chapman N, Tracy S, Gauntt C. 1997. Genomic regions of coxsackievirus B3 associated with cardiovirulence. *J. Med. Virol.* 52: 341-7.
40. Chapman NM, Ragland A, Leser JS, Höfling K, Willian S, Semler BL, Tracy S. 2000. A group B coxsackievirus/poliovirus 5' nontranslated region chimera can act as an attenuated vaccine strain in mice. *J Virol.* 74(9):4047-56.
41. Chemez R, Nagy G, Németh C, Dömök I. 1976. Hand, foot and mouth disease epidemic in a nursery *Orv. Hetil.* 117:2421-3.
42. Chen CH, Hsu BM, Wan MT. 2008. Molecular detection and prevalence of enterovirus within environmental water in Taiwan. *J Appl Microbiol.* 104(3):817-23.
43. Chen KT, Chang HL, Wang ST, et al. 2007. Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998–2005. *Pediatrics* 120: e244–52.
44. Cherkasova EA, Korotkova EA, Yakovenko ML, Ivanova OE, Eremeeva TP, Chumakov KM, Agol VI. 2002. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 76: 6791-9.
45. Cherkasova EA, Yakovenko ML, Rezapkin GV, Korotkova EA, Ivanova OE, Eremeeva TP, Krasnoproshina LI, Romanenkova NI, Rozaeva NR, Sirota L, Agol VI, Chumakov KM. 2005. Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine *Virology* 79(2):1062-70.
46. Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. 1988. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 26(12):2576-80.

47. Chua KB, Chua BH, Lee CS, Chem YK, Ismail N, Kiyu A, Kumarasamy V. 2007. Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in the 1997, 2000 and 2005 outbreaks, Peninsular Malaysia. *Malays J Pathol.* 29(2):69-78.
48. Chumakov KM; Norwood LP; Parker ML; Dragunsky EM; Ran YX; Levenbook IS. 1992. RNA sequence variants in live poliovirus vaccine and their relation to neurovirulence. *Journal of Virology*, 66(2):966-70.
49. Chumakov KM; Dragunsky EM; Norwood LP; Douthitt MP; Ran Y; Taffs RE; Ridge J; Levenbook IS. 1994. Consistent selection of mutations in the 5'-untranslated region of oral poliovirus vaccine upon passaging in vitro. *Journal of Medical Virology*, 42(1):79-85.
50. Chumakov KM. 1996. PCR engineering of viral quasispecies: a new method to preserve and manipulate genetic diversity of RNA virus populations. *Journal of Virology*, 70(10):7331-4.
51. Contreras G, Dimock K, Furesz J, Gardell C, Hazlett D, Karpinski K, McCorkle G, Wu L. 1992. Genetic characterization of Sabin types 1 and 3 poliovaccine virus following serial passage in the human intestinal tract. *Biologicals* 20:15-26.
52. Cooper DJ, Shaw DR, LaBrooy JT, Blumbergs P, Gilbert J, Simmons A. Cooper DJ, Shaw DR, LaBrooy JT, Blumbergs P, Gilbert J, Simmons A. 1989. Fatal rhabdomyolysis and renal failure associated with hand, foot and mouth disease. *Med J Aust.* 151:232-4.
53. Dahourou G, Guillot S, Le Gall O, Crainic R. 2002. Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J Gen Virol.* 83(Pt 12):3103-10.
54. Datta U, Dasgupta A. 1994. Expression and subcellular localization of poliovirus VPg-precursor protein 3AB in eukaryotic cells: evidence for glycosylation in vitro. *J Virol.* 68(7):4468-77.
55. Dedepisdís E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulias C, Levidiotou-Stefanou S, Pratti A, Mamuris Z, Markoulatos P. 2008. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 52(3):343-51.
56. Diedrich S, Driesel G, Schreier E. 1995. Sequence comparison of echovirus type 30 isolates to other enteroviruses in the 5'noncoding region. *J Med Virol.* 46(2):148-52.
57. Diedrich S, Weinbrecht A, Schreier E. 2009. Seroprevalence and molecular epidemiology of enterovirus 71 in Germany. *Arch Virol.* 154(7):1139-42.

58. Domok I, Molnar E, Rudnai O. 1960a. An epidemic of Bornholm disease in Hungary in 1958. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 7:151-68.
59. Domok I, Molnar E. 1960b.[Meningo-encephalo-myocarditis in newborn infants during the epidemic of Bornholm disease in Hungary in 1958. II. Etiological aspects.] *Orv Hetil.* 24;101:593-7.
60. Domok I, Molnar E. 1961a. Enterovirus studies during the 1959 poliomyelitis epidemic in Hungary. *Orv Hetil.* 9;102:1306-13.
61. Domok I, Molnar E, Jancso A. 1961b. Virus excretion after mass vaccination with attenuated polioviruses in Hungary. *Br. Med. J.* 1: 1410-7.
62. Domok I, Molnar E, Jancso A, Daniel M. 1962. Enterovirus survey in children after mass vaccination with live attenuated polioviruses. *Br. Med. J.* 1: 743-6.
63. Domok I. 1963. Some results of country-wide vaccinations against poliomyelitis with Sabin's attenuated strains in Hungary. *Arch Gesamte Virusforsch.* 13:98-103.
64. Dömök I. 1971.[Results and problems in the control of poliomyelitis in Hungary and abroad]. *Orv. Hetil.*112: 243-52.
65. Dömök I. 1984. Experiences associated with the use of live poliovirus vaccine in Hungary, 1959-1982. *Rev. Infect. Dis.* 6 Suppl 2:S413-8.
66. Dömök I. 1999. Haladás a gyermekbénulástó a megszabadított világ felé. *LAM,* (9) 12: 908-916.
67. Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, Bienz K. 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol.* 74(14):6570-80.
68. el-Sageyer MM, Szendrői A, Hütter E, Uj M, Szücs G, Mezey I, Tóth I, Kátai A, Kapiller Z, Páll G, Petrás G, Szalay E, Mihály I, Gourova S, Berencsi G. 1998. Characterisation of an echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary. *Acta Virol.* 42(3):157-66.
69. Esfandiari M, Suarez A, Amaral A, Si X, Rahmani M, Dedhar S, McManus BM. 2006. Novel role for integrin-linked kinase in modulation of coxsackievirus B3 replication and virus-induced cardiomyocyte injury. *Circ Res.* 18;99(4):354-61.
70. Evans D, Dunn G, Minor PD, Schold GC, Cann AJ, Stanway G, Almond JW, Currey K, Maizael Jr JV. 1985. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 polio vaccine genome. *Nature*;314 :548-50.

71. Ferson MJ, Bell SM. 1991. Outbreak of coxsackievirus A16 hand, foot, and mouth disease in a child day-care center. *Amer J Public Hlth* 1:1675–6.110.
72. Fornosi F, Talos I. (1964-1965) Comparative serological studies on the effectiveness of monovalent live poliovirus vaccines given alternatively in the order 2-3-1 and 1-3-2. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 11: 263-9.
73. Friedrich F, Da-Silva EF, Schatzmayr HG. 1996. Type 2 poliovirus recombinants isolated from vaccine-associated cases and from healthy contacts in Brazil. *Acta Virol.* 40(1):27-33.
74. Friedrich F; Da-Silva EF; Schatzmayr HG. 1996. Type 2 poliovirus recombinants isolated from vaccine-associated cases and from healthy contacts in Brazil. *Acta Virologica*, 40(1):27-33.
75. Froeschle JE, Nahmias AJ, Feorino PM, McCord G, Naib Z. 1967. Hand, foot, and mouth disease (Coxsackievirus A16) in Atlanta. *Am J Dis Child.* 114(3):278-83.
76. Furione M, Guillot S, Otelea D, Balanant J, Candrea A, Crainic R. 1993. Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology* 196: 199-208.
77. Gabrieli R, Macaluso A, Lanni L, Saccares S, Di Giamberardino F, Cencioni B, Petrinca AR, Divizia M. 2007. Enteric viruses in molluscan shellfish. *New Microbiol.* 30(4):471-5.
78. Gamarnik AV, Andino R. 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* 1;12(15):2293-304.
79. Gamarnik AV, Andino R. 2000. Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J Virol.* 74(5):2219-26.
80. Georgescu MM, Delpyroux F, Tardy-Panit M, Balanant J, Combiescu M, Combiescu AA, Guillot S, Crainic R. 1994. High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 68: 8089-101.
81. Georgescu MM; Delpyroux F; Crainic R. 1995. Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *Journal of General Virology*, 76 (Pt 9):2343-8.
82. Gharbi J, el Hiar R, Ben M'hadheb M, Jaïdane H, Bouslama L, N'saïbia S, Aouni M. 2006. Nucleotide sequences of IRES domains IV and V of natural ECHO virus type 11 isolates with different replicative capacity phenotypes. *Virus Genes.* 32(3):269-76.

83. Ghendon Y, Robertson SE. 1994. Interrupting the transmission of wild polioviruses with vaccines: immunological considerations. *Bull World Health Organ.* 72: 973-83.
84. Gmyl AP, Belousov EV, Maslova SV, Khitrina EV, Chetverin AB, Agol VI. 1999. Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J Virol.* 73(11):8958-65.
85. Gnanashanmugam D, Falkovitz-Halpern MS, Dodge A, Fang M, Wong LJ, Esparza M, Hammon R, Rivas-Merelles EE, Santos JI, Maldonado Y. 2007. Shedding and reversion of oral polio vaccine type 3 in Mexican vaccinees: comparison of mutant analysis by PCR and enzyme cleavage to a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2419-25. 28.
86. Gorbalenya AE, Blinov VM, Donchenko AP, Koonin EV. 1989a. An NTP-binding motif is the most conserved sequence in a highly diverged monophyletic group of proteins involved in positive strand RNA viral replication. *J Mol Evol.* 28(3):256-68.
87. Gorbalenya AE, Donchenko AP, Blinov VM, Koonin EV. 1989b. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett.* 30;243(2):103-14.
88. Grist NR, Bell EJ, Assaad F. 1978. Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol.*; 24:114-57.
89. Gromeier, Matthias, Louis Alexander, Eckard Wimmer. 1996. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 19, (93), pp 2370-2375.
90. Guillot S, Caro V, Cuervo N, Korotkova E, Combiescu M, Persu A, Aubert-Combiescu A, Delpeyroux F, Crainic R. 2000. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74: 8434-43.
91. Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, Shimizu H, Yamada M. 2008. Acute encephalitis caused by intrafamilial transmission of enterovirus 71 in adult. *Emerg Infect Dis.* 14(5):828-30.
92. Hargitai R. 1994. [Data from the history of the fight against poliomyelitis in Hungary]. *Orv Hetil.* 10;135(28):1539-41.
93. Hauri AM, Schimmelpfennig M, Walter-Domes M, Letz A, Diedrich S, Lopez-Pila J, Schreier E. 2005. An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiol Infect.* 133(2):291-8.
94. Herold J, Andino R. 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell.* 7(3):581-91.

95. Herremans T, Reimerink JH, Kimman TG, van Der Avoort HG, Koopmans MP. 2000. Antibody responses to antigenic sites 1 and 3 of serotype 3 poliovirus after vaccination with oral live attenuated or inactivated poliovirus vaccine and after natural exposure. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(1):40-4.
96. Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, Chua BH, Chua KB, McMinn PC. 2003. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol.* 148(7):1369-85.
97. Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, Wang JR, Shih SR. 1999. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med* 341:929-35.
98. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes *Science* 26; 215(4540):1577-85.
99. Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, Honzumi K, Kato A, Hiroshima T, Ishiko H, Suzuki H. 2006. Genetic diversity of enterovirus 71 associated with hand, foot and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. *Pediatr Infect Dis J.* 25(8):691-4.
100. Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, Honzumi K, Hayashi A, Hiroshima T, Ishiko H, Kato K, Suzuki H. 2007. Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. *J Clin Microbiol.* 45:112-20.
101. Hughes RO, Roberts C. 1972. Hand, foot, and mouth disease associated with Coxsackie A9 virus. *Lancet.* 7;2(7780):751-2.
102. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. 2004. Childhood vaccination and type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 1;350(14):1398-404.
103. Iakovenko ML, Korotkova EA. 2008. [Evolution of vaccine poliovirus strains] *Vopr Virusol.* 53(3):45-8.
104. Itagaki A, Ishihara J, Mochida K, Ito Y, Saito K, Nishino Y, Koike S, Kurimura T. 1983. A clustering outbreak of hand, foot, and mouth disease caused by Coxsackie virus A10. *Microbiol Immunol.* 27(11):929-35.
105. Jee YM, Cheon DS, Kim K, Cho JH, Chung YS, Lee J, Lee SH, Park KS, Lee JH, Kim EC, Chung HJ, Kim DS, Yoon JD, Cho HW. 2003. Genetic analysis of the VP1 region of human enterovirus 71 strains isolated in Korea during 2000. *Arch Virol.* 148(9):1735-46.
106. Johansen LK, Morrow CD. 2000. The RNA encompassing the internal ribosome entry site in the poliovirus 5' nontranslated region enhances the encapsidation of genomic RNA. *Virology* 273: 391-9.

107. Kaminski A, Hunt SL, Gibbs CL, Jackson RJ. 1994. Internal initiation of mRNA translation in eukaryotes. *Genet Eng (N Y)*. 16:115-55.
108. Kapiller Z, Páll G, Petrás G, Szalay E, Mihály I, Gourova S, Berencsi G. 1998. Characterisation of an echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary. *Acta Virol*. 42(3):157-66.
109. Karakasiliotis I, Markoulatos P, Katsorichis T. 2004. Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes*. 18: 103-9.
110. Kátay A. in *Control of poliomyelitis by live poliovirus vaccine : [studies in mass vaccination in Hungary, in the USSR, in Czechoslovakia and in the German Democratic Republic] / edited by J. Weissfeiler Budapest : Akademiai Kiado, 1961. "Papers presented at the 9th Hungarian-Soviet Medical Conference, September 28-30, 1960"*.
111. Kauder SE, Racaniello VR. 2004. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J Clin Invest*. 113(12):1743-53.
112. Kew OM, Nottay BK. 1984. Molecular epidemiology of polioviruses. *Rev Infect Dis*. 6 Suppl 2:S499-504.
113. Kew OM, Sutter RW, Nottay BK, McDonough MJ, Prevots DR, Quick L, Pallansch MA. 1998. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J. Clin. Microbiol*. 36: 2893-9.
114. Kew OM, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, et al. 2002. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 296: 356-9.
115. Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA. 2004. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull World Health Organ*. 82(1):16-23
116. Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. 2005. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol*. 59: 587-635.
117. Kew O. 2006. What role for inactivated poliovirus vaccine in the eradication endgame? *J. Infect. Dis*. 193: 1341-3.
118. Khetsuriani N, Prevots DR, Quick L, Elder ME, Pallansch M, Kew O, Sutter RW. 2003. Persistence of vaccine-derived polioviruses among immunodeficient persons with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Infect Dis*. 15; 188(12):1845-52.

119. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA; 2006. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ.* 15;55(8):1-20.
120. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, Yang SJ, Mulders MN, Holloway BP, Pallansch MA, Kew OM. 1996. Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residue at positions of codon degeneracy. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2990-6.
121. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, Yang SJ, Da Silva E, Peñaranda S, Pallansch M, Kew O. 1998. Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. *J. Clin. Microbiol.* 36: 352-7.
122. Kilpatrick DR, Ching K, Iber J, Campagnoli R, Freeman CJ, Mishrik N, Liu HM, Pallansch MA, Kew OM. 2004. Multiplex PCR method for identifying recombinant vaccine-related polioviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4313-5.
123. King, A.M.Q., Brown, F., Christian, P., Hovi, T., Hyypiä, T., Knowles, N.J., Lemon, S.M., Minor, P.D., Palmenberg, A.C., Skern, T. and Stanway, G. 2000. Picornaviridae. In "Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses". Eds Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Calisher, C.H., Carsten, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. Academic Press, New-York, San Diego, pp. 657-673.
124. Kirkegaard K, Baltimore D. 1986. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell.* 1986 Nov 7;47(3):433-43.
125. Knowles N., Hovi T., Hyypiä T., King A, M. Lindberg, Minor P., Pallansch M., Palmenberg A., Skern T., Stanway G., Yamashita T., Zell R. Taxonomy of Picornaviridae: Current Situation and Future Proposals. EUROPIC 2008: XVth Meeting in Sitges, Barcelona, Spain, 26-30th May 2008.
126. Kojouharova M, Zuber PL, Gyurova S, Fiore L, Buttinelli G, Kunchev A, Vladimirova N, Korsun N, Filipova R, Boneva R, Gavrilin E, Deshpande JM, Oblapenko G, Wassilak SG. 2003. Importation and circulation of poliovirus in Bulgaria in 2001. *Bull World Health Organ.* 81(7):476-81.
127. Kono R. 1975. Apollo 11 disease or acute hemorrhagic conjunctivitis: a pandemic of a new enterovirus infection of the eyes. *Am J Epidemiol.* 101(5):383-90.
128. Kuge S, Kawamura N, Nomoto A. 1989. Genetic variation occurring on the genome of an in vitro insertion mutant of poliovirus type 1. *J Virol.* 63(3):1069-75.

129. Kushner PG, Krebs. 1972. M. J Am Osteopath Assoc. Epidemiology of hand, foot, and mouth disease in a summer camp due to Coxsackie virus A16. 72:281-3.
130. Laassri M, Lottenbach K, Belshe R, Rennels M, Plotkin S, Chumakov K.. 2006. Analysis of reversion in the 5'-untranslated region of attenuated poliovirus after sequential administration of inactivated and oral poliovirus vaccines. J. Infect. Dis. 193: 1344-9.
131. Lago PM, Sarmiento L, Díaz J, Goyenechea A, Díaz M, Barrio J. 2004. [Silent circulation of poliovirus demonstrated by interference against non-polio enterovirus]. Rev Cubana Med Trop. 56(2):117-25.
132. Lama J, Carrasco L. 1992. Expression of poliovirus nonstructural proteins in Escherichia coli cells. Modification of membrane permeability induced by 2B and 3A. J Biol Chem. 5;267(22):15932-7.
133. Lambertini E, Spencer SK, Bertz PD, Loge FJ, Kieke BA, Borchardt MA. 2008. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. Appl Environ Microbiol. 74(10):2990-6.
134. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23: 2947-2948.
135. Lee C, Maull E, Chapman N, Tracy S, Gauntt C. 1997. Genomic regions of coxsackievirus B3 associated with cardiovirulence. J Med Virol. 52(3):341-7.
136. Lee G, Lee C. 2008. Molecular detection and characterization of human enteroviruses in Korean surface water. J Microbiol. 46(3):319-24.
137. Legay F, Lévêque N, Gacouin A, Tattevin P, Bouet J, Thomas R, Chomelt JJ. 2007. Fatal coxsackievirus A-16 pneumonitis in adult. Emerg Infect Dis. 13(7):1084-6.
138. Lennette, E.H., Halonen, P., and Murphy, F.A. (Eds). 1979. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice, Volume II: Viral, Rickettsial and Chlamydial Diseases, 864-890. Springer-Verlag, New York, NY.
139. Li J, Zhang LB; Yoneyama T; Yoshida H, Shimizu H; Yoshii K, Hara M; Nourvra T; Yoshikura H; Miyamura T. 1996. Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine- associated paralytic patients. Arch Virol. 141 (6): 1047-54.
140. Li L, He Y, Yang H, Zhu J, Xu X, Dong J, Zhu Y, Jin Q. 2005. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China. J Clin Microbiol. 43(8):3835-9.

141. Li X, Lu HH, Mueller S, Wimmer E. 2001. The C-terminal residues of poliovirus proteinase 2A (pro) are critical for viral RNA replication but not for cis- or trans-proteolytic cleavage. *J Gen Virol.* 82(Pt 2):397-408.
142. Lipskaya GY, Muzychenko AR, Kutitova OK, Maslova SV, Equestre M, Drozdov SG, Bercoff RP, Agol VI. 1991. Frequent isolation of intertypic poliovirus recombinants with serotype 2 specificity from vaccine-associated polio cases. *J Med Virol.* 35(4):290-6.
143. Lipskaya GYu, Chervonskaya EA, Belova GI, Maslova SV, Kutateladze TN, Drozdov SG, Mulders M, Pallansch MA, Kew OM, Agol VI. 1995. Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 76:1687-99.
144. Liu HM, Zheng DP, Zhang LB, Oberste MS, Pallansch MA, Kew OM. 2000. Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J. Virol.* 74: 11153-61.
145. Lukacs V, Romhanyi J. 1960. [On a meningo-encephalo-myocarditis epidemic in newborn infants during the epidemic of Bornholm's disease in Hungary in 1958. I. Clinical and pathological findings.] *Ann Paediatr.* 194:89-102.
146. Lukashiev AN. 2005. [A role of recombination in the evolution of enteroviruses]. *Vopr. Virusol.* 50: 46-52.
147. Lukashiev AN, Ivanova OE, Ereemeeva TP, Gmyl LV. 2008. Analysis of echovirus 30 isolates from Russia and new independent states revealing frequent recombination and reemergence of ancient lineages. *J Clin Microbiol.* 46(2):665-70.
148. Macadam AJ, Arnold C, Howlett J, John A, Marsden S, Taffs F, Reeve P, Hamada N, Wareham K, Almond J, et al. 1989. Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology*, 172: 408-14.
149. Macadam AJ, Ferguson G, Burlison J, Stone D, Skuce R, Almond JW, Minor PD. 1992. Correlation of RNA secondary structure and attenuation of Sabin vaccine strains of poliovirus in tissue culture. *Virology*, 189: 415-22.
150. Macadam AJ, Ferguson G, Stone DM, Meredith J, Knowlson S, Auda G, Almond JW, Minor PD. 2006. Rational design of genetically stable, live-attenuated poliovirus vaccines of all three serotypes: relevance to poliomyelitis eradication. *J. Virol.* 80: 8653-63.
151. Maldonado YA, Peña-Cruz V, de la Luz Sanchez M, Logan L, Blandón S, Cantwell MF, Matsui SM, Millan-Velasco F, Valdespino JL, Sepulveda J. 1997. Host and viral

- factors affecting the decreased immunogenicity of Sabin type 3 vaccine after administration of trivalent oral polio vaccine to rural Mayan children. *J Infect Dis.* 175(3):545-53.
152. Malnou CE, Pöyry TA, Jackson RJ, Kean KM. 2002. Poliovirus internal ribosome entry segment structure alterations that specifically affect function in neuronal cells: molecular genetic analysis. *J Virol.*76(21):10617-26.
153. Malnou CE, Werner A, Borman AM, Westhof E, Kean KM. 2004. Effects of vaccine strain mutations in domain V of the internal ribosome entry segment compared in the wild type poliovirus type 1 context. *J Biol Chem.* 12; 279(11):10261-9.
154. Martin J, Samoilovich E, Dunn G, Lackenby A, Feldman E, Heath A, Svirchevskaya E, Cooper G, Yermalovich M, Minor PD. 2002. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76:10921-8.
155. Martin J, Crossland G, Wood DJ, Minor PD. 2003. Characterization of formaldehyde-inactivated poliovirus preparations made from live-attenuated strains. *J Gen Virol.* 84(Pt 7):1781-8.
156. Martin J, Odoom K, Tuite G, Dunn G, Hopewell N, Cooper G, Fitzharris C, Butler K, Hall WW, Minor PD. 2004. Long-term excretion of vaccine-derived poliovirus by a healthy child. *J Virol.* 78(24):13839-47.
157. Martinez CV, Old MO, Kwock DK, Khan SS, Garcia JJ, Chan CS, Webster R, Falkovitz-Halpern MS, Maldonado YA. 2004. Shedding of Sabin poliovirus Type 3 containing the nucleotide 472 uracil-to-cytosine point mutation after administration of oral poliovirus vaccine. *J. Infect. Dis.* 190: 409-16.
158. McBride WD. 1959. Antigenic analysis of polioviruses by kinetic studies of serum neutralization. *Virology* 7: 45-58.
159. Melnick JL, Berencsi G, Biberi-Moroceanu S, Combiescu AA, Furesz J, Kantoch M, Kostrzewski J, Magrath DI, Perkins FT, Vonka V, Cockburn WC, Dömök I, Assaad FA. 1972. WHO collaborative studies on poliovirus type 3 strains isolated during the 1968 poliomyelitis epidemic in Poland. *Bull World Health Organ.* 47: 287-94.
160. Melnick JL, Schmidt NJ, Mirkovic RR, Chumakov MP, Lavrova IK, Voroshilova MK. 1980. Identification of Bulgarian strain 258 of enterovirus 71. *Intervirology.* 12(6):297-302.
161. Melnick JL. 1984. Enterovirus type 71 infections: a varied clinical pattern sometimes mimicking paralytic poliomyelitis. *Rev Infect Dis.* 6 Suppl 2:S387-90.

162. M'hadheb-Gharbi MB, El Hiar R, Paulous S, Jaïdane H, Aouni M, Kean KM, Gharbi J. 2008. Role of GNRA motif mutations within stem-loop V of internal ribosome entry segment in coxsackievirus B3 molecular attenuation. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 14(4):147-56.
163. M'hadheb-Gharbi MB, Kean KM, Gharbi J. 2009. Molecular analysis of the role of IRES stem-loop V in replicative capacities and translation efficiencies of Coxsackievirus B3 mutants. *Mol Biol Rep.*;36(2):255-62.
164. Milne SA, Gallacher S, Cash P, Lees DN, Henshilwood K, Porter AJ. 2007. A sensitive and reliable reverse transcriptase PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human pathogenic viruses in bivalve molluscs. *J Food Prot.* 70(6):1475-82.
165. Minor PD, Dunn G. 1988. The effect of sequences in the 5' non-coding region on the replication of polioviruses in the human gut. *J Gen Virol.* 69: 1091-6.
166. Minor PD, John A, Ferguson M, Icenogle JP. 1986. Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary vaccinee. *J Gen Virol.* 67:693-706.
167. Minor PD. 1992. The molecular biology of poliovaccines. *J. Gen. Virol.* 73: 3065-77.
168. Minor PD, Macadam AJ, Stone DM, Almond JW. 1993a. Genetic basis of attenuation of the Sabin oral poliovirus vaccines. *Biologicals* 21: 357-63.
169. Minor PD. 1993b. Attenuation and reversion of the Sabin vaccine strains of poliovirus. *Dev. Biol. Stand.* 78: 17-26.
170. Minor PD. 1999. Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert. Rev. Mol. Med.* 23: 1-17.
171. Minor PD, Dunn G, Ramsay ME, Brown D. 2005. Effect of different immunisation schedules on the excretion and reversion of oral poliovaccine strains. *J. Med. Virol.* 75: 153-60.
172. Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL. 2007. Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. *J Gen Virol.*88(Pt 1):166-76.
173. Mizuta K, Abiko C, Murata T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Sanjoh K, Sakamoto M, Hongo S, Murayama S, Hayasaka K. 2005. Frequent importation of enterovirus 71 from surrounding countries into the local community of Yamagata, Japan, between 1998 and 2003. *J Clin Microbiol.* 43(12):6171-5.

174. Mueller S, Wimmer E, Cello J. 2005. Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res.* 111: 175-93.
175. Nagy G, Takátsy S, Kukán E, Mihály I, Dömök I. 1982. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol.*;71(3):217-27.
176. Nakano JH, Gelfand HM, Cole JT. 1966. Antigenic segregation of type 3 poliovirus isolates related and unrelated to Sabin's vaccine strain with the use of modified Wecker and McBride techniques. *Am. J. Epidemiol.* 83: 130-45.
177. Newcombe NG, Andersson P, Johansson ES, Au GG, Lindberg AM, Barry RD, Shafren DR. 2003. Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *J Gen Virol.* 84(Pt 11):3041-50.
178. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. 2006. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.*;44:2698-704.
179. Nomoto A, Toyoda H, Kataoka Y, Kohara M, Suganuma T, Omata T, Imura N. 1984. Approaches to the development of new poliovirus vaccines based on molecular genetics. *Rev Infect Dis.* 6 Suppl 2:S494-8.
180. Norder H, Bjerregaard L, Magnus LO. 2001. Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing. *J Med Virol.*;63:35-44.
181. Norder H, Bjerregaard L, Magnus L, Lina B, Aymard M, Chomel JJ. 2003. Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *Gen Virol.*;84:827-36.
182. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. 1999a. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *Clin Microbiol.* 37(5):1288-93.
183. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. 1999b. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol.*73(3):1941-8.
184. Oberste, MS, Maher K, Kennett ML, Campbell JJ., Carpenter MS, Schnurr D, Pallansch MA. 1999c. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J. Clin. Microbiol.* 37:3928-3933.

185. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. 2000. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol*;38:1170-4.
186. Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. 2003. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol*;26:375-7.
187. Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA. 2006. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*.87(Pt 1):119-28.
188. Odoom JK, Yunus Z, Dunn G, Minor PD, Martín J. 2008. Changes in population dynamics during long-term evolution of sabin type 1 poliovirus in an immunodeficient patient. *J Virol*. 82(18):9179-90.
189. Ogilvie MM, Tearne CF. 1980. Spontaneous abortion after hand-foot-and-mouth disease caused by Coxsackie virus A16. *Br Med J*.281:1527-8.
190. Ogra PL, Faden HS, Abraham R, Duffy LC, Sun M, Minor PD. 1991. Effect of prior immunity on the shedding of virulent revertant virus in feces after oral immunization with live attenuated poliovirus vaccines. *J. Infect. Dis*. 164: 191-4.
191. Ooi MH, Solomon T, Podin Y, Mohan A, Akin W, Yusuf MA, del Sel S, Kontol KM, Lai BF, Clear D, Chieng CH, Blake E, Perera D, Wong SC, Cardosa J. 2007. Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease. *J Clin Microbiol*.45(6):1858-66.
192. Oprisan G, Combiescu M, Guillot S, Caro V, Combiescu A, Delpeyroux F, Crainic R. 2002. Natural genetic recombination between co-circulating heterotypic enteroviruses. *J Gen Virol*. 83(Pt 9):2193-200.
193. Ortner B, Huang CW, Schmid D, Mutz I, Wewalka G, Allerberger F, Yang JY, Huemer HP. 2009. Epidemiology of enterovirus types causing neurological disease in Austria 1999-2007: detection of clusters of echovirus 30 and enterovirus 71 and analysis of prevalent genotypes. *J Med Virol*. 81(2):317-24.
194. Paananen A, Savolainen-Kopra C, Kaijalainen S, Vaarala O, Hovi T, Roivainen M. 2007. Genetic and phenotypic diversity of echovirus 30 strains and pathogenesis of type 1 diabetes. *J Med Virol*. 79(7):945-55.

195. Palacios, G, Casas I, Cisterna D, Trallero G, Tenorio A, Freire C. 2002. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *J. Virol.* 76:4940–4949.
196. Pallai PV, Burkhardt F, Skoog M, Schreiner K, Bax P, Cohen KA, Hansen G, Palladino DE, Harris KS, Nicklin MJ. 1989. Cleavage of synthetic peptides by purified poliovirus 3C proteinase. *J Biol Chem.* 15:264(17):9738-41.
197. Pallansch M in *Fields Virology*, 4th edition Edited by David M Knipe and Peter M Howley, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, 2001.
198. Parvaneh N, Shahmahmoudi S, Tabatabai H, Zahraei M, Mousavi T, Esteghamati AR, Gooya MM, Mamishi S, Nategh R, Kew OM. 2007. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in a patient with MHC class II deficiency. *J Clin Virol.* 39(2):145-8.
199. Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E. 1998. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 21;393(6682):280-4.
200. Pavlov DN, Van Zyl WB, Van Heerden J, Grabow WO, Ehlers MM. 2005. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in sewage and river water in South Africa. *Water Res.* 39(14):3309-19.
201. Paximadi E, Karakasiliotis I, Mamuris Z, Stathopoulos C, Krikelis V, Markoulatos P. 2006. Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes.* 32(2):203-10.
202. Pertinacová J, Böhmová E, Sobotová Z. 2004. [Isolation of highly divergent vaccine strains of polioviruses in Slovakia] *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 53(1):22-4. 2:
203. Pincus SE, Diamond DC, Emimi EA, Wimmer E. 1986. Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. *J Virol.* 57(2):638-46.
204. Pipkin PA, Wood DJ, Racaniello VR, Minor PD. 1993. Characterisation of L cells expressing the human poliovirus receptor for the specific detection of polioviruses in vitro. *J Virol. Methods.* 41: 333-40.
205. Pliaka V, Dedepsidis E, Kyriakopoulou Z, Papadopoulou I, Levidiotou S, Markoulatos P. 2007. Use of mutational pattern in 5'-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis. *Mol. Cell. Probes.* 21: 267-75.
206. Podin Y, Gias EL, Ong F, Leong YW, Yee SF, Yusof MA, Perera D, Teo B, Wee TY, Yao SC, Yao SK, Kiyu A, Arif MT, Cardoso MJ. 2006. Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: lessons from the first 7 years. *BMC Public Health.* 7;6:180.

207. Prevots DR, Sutter RW, Strebel PM, Weibel RE, Cochi SL. 1994. Completeness of reporting for paralytic poliomyelitis, United States, 1980 through 1991. Implications for estimating the risk of vaccine-associated disease. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 148: 479-85.
208. Qiu J. 2008. Enterovirus 71 infection: a new threat to global public health? *Lancet Neurol.* 7(10):868-9
209. Racaniello VR, Meriam C. 1986. Poliovirus temperature-sensitive mutant containing a single nucleotide deletion in the 5'-noncoding region of the viral RNA. *Virology*, 155: 498-507.
210. Rakoto-Andrianarivelo M, Guillot S, Iber J, Balanant J, Blondel B, Riquet F, Martin J, Kew O, Randriamanalina B, Razafinimpiasa L, Rousset D, Delpeyroux F. 2007. Co-circulation and evolution of polioviruses and species C enteroviruses in a district of Madagascar. *PLoS Pathog.* 3(12):e191.
211. Rakoto-Andrianarivelo M, Gumede N, Jegouic S, Balanant J, Andriamamonjy SN, Rabemanantsoa S, Birmingham M, Randriamanalina B, Nkolomoni L, Venter M, SchoubBD, Delpeyroux F, Reynes JM. 2008. Reemergence of recombinant vaccine-derived poliovirus outbreak in Madagascar. *J Infect Dis.* 15;197(10):1427-35.
212. Rezapkin GV; Norwood LP; Taffs RE; Dragunsky EM; Levenbook IS; Chumakov KM. 1995. Microevolution of type 3 Sabin strain of poliovirus in cell cultures and its implications for oral poliovirus vaccine quality control. *Virology*, 20, 211(2): 377-84.
213. Rezapkin GV, Alexander W, Dragunsky E, Parker M, Pomeroy K, Asher DM, Chumakov KM. 1998. Genetic stability of Sabin 1 strain of poliovirus: implications for quality control of oral poliovirus vaccine. *Virology* 245: 183-7.
214. Rice P., Longden I., Bleasby A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16: 276-277.
215. Rice SK, Heintz RE, Thornton LI, Opal SM. 1995. Clinical characteristics, management strategies, and cost implications of a statewide outbreak of enterovirus meningitis. *Clin Infect Dis.*20(4):931-7.
216. Riquet FB, Blanchard C, Jegouic S, Balanant J, Guillot S, Vibet MA, Rakoto-Andrianarivelo M, Delpeyroux F. 2008. Impact of exogenous sequences on the characteristics of an epidemic type 2 recombinant vaccine-derived poliovirus. *J Virol.*82(17):8927-32.

217. Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* 1;26(7):1628-35.
218. Rotbart HA. 1991. Nucleic acid detection systems for enteroviruses. *Clin Microbiol Rev.* 4(2):156-68.
219. Roth B, Enders M, Arents A, Pfitzner A, Terletskaja-Ladwig E. 2007. Epidemiologic aspects and laboratory features of enterovirus infections in Western Germany, 2000-2005. *J Med Virol.* 79(7):956-62.
220. Rousset D, Rakoto-Andrianarivelo M, Razafindratsimandresy R, Randriamanalana B, Guillot S, Balanant J, Mauclère P, Delpeyroux F. 2003. Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis.* 9(7):885-7.
221. Rueckert R. R. 1996. Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, third edition, pp. 609-654. Ed. Fields B. N. et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
222. Rust RC, Landmann L, Gosert R, Tang BL, Hong W, Hauri HP, Egger D, Bienz K. 2001. Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J Virol.* 75(20):9808-18.
223. Sabin A. 1954. On the trail of avirulent viruses for immunization against poliomyelitis. *Bibl Paediatr.* 58:429-36.
224. Sabin AB, Ramos-Alvarez M, Alvarez-Amezquita J, Pelon W, Michaels RH, Spigland I, Koch MA, Barnes JM, Rhim JS. 1960. Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses. *Bull. World Health Organ.* 77: 196-201.
225. Sadeharju K, Hämäläinen AM, Knip M, Lönnrot M, Koskela P, Virtanen SM, Ilonen J, Akerblom HK, Hyöty H. 2003. Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clin Exp Immunol.* 132(2):271-7.
226. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406-25.
227. Salk J. 1960. Persistence of immunity after administration of formalin-treated poliovirus vaccine. *Lancet.* 1;2(7153):715-23.
228. Salk J. 1977. Polio vaccines and polioviruses. *Br. Med. J.* 2: 765.
229. Salminen K, Sadeharju K, Lönnrot M, Vähäsalo P, Kupila A, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Knip M, Hyöty H. 2003. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol.* 69(1):91-8.

230. Santti J, Hyypia T, Kinnunen L, Salminen M. 1999a. Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol.* 73(10):8741-9.
231. Santti J, Vainionpaa R, Hyypia T. 1999b. Molecular detection and typing of human picornaviruses. *Virus Res.* 62(2):177-83.
232. Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. 2002. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol.* 83(Pt 2):333-40.
233. Sawyer MH, Holland D, Aintablian N, Connor JD, Keyser EF, Waecker NJ Jr. 1994. Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. *Pediatr Infect Dis J.* 13(3):177-82.
234. Schets FM, van Wijnen JH, Schijven JF, Schoon H, de Roda Husman AM. 2008. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to cryptosporidium and giardia in these waters. *Appl Environ Microbiol.* 74(7):2069-78.
235. Schwartz TA, Handsher R, Stoeckel P, Drucker J, Caudrelier P, Van Wezel AL, Cohen H, Salk D, Salk J. 1989. Immunologic memory induced at birth by immunization with inactivated polio vaccine in a reduced schedule. *Eur. J. Epidemiol.* 5:143-5.
236. Shahmahmoodi S, Parvaneh N, Burns C, Asghar H, Mamishi S, Tabatabaie H, Chen Q, Teimourian S, Gooya MM, Esteghamati AR, Mousavi T, Yousefi M, Farrokhi K, Mashloul M, Kew O, Nategh R. 2008. Isolation of a type 3 vaccine-derived poliovirus (VDPV) from an Iranian child with X-linked agammaglobulinemia. *Virus Res.* 137(1):168-72.
237. Shieh YC, Wong CI, Krantz JA, Hsu FC. 2008. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters using direct RT-PCR and integrated cell culture-RT-PCR. *J Virol Methods.* 149(1):184-9.
238. Shih SR, Ho MS, Lin KH, Wu SL, Chen YT, Wu CN, Lin TY, Chang LY, Tsao KC, Ning HC, Chang PY, Jung SM, Hsueh C, Chang KS. 2000. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res.* 68(2):127-36.
239. Shih SR, Stollar V, Lin JY, Chang SC, Chen GW, Li ML. 2004. Identification of genes involved in the host response to enterovirus 71 infection. *J Neurovirol.* 10(5):293-304.
240. Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita M, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O,

Miyamura T. 2004. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol.* 78(24):13512-21.

241. Shulman LM, Manor Y, Sofer D, Swartz T, Mendelson E. 2006. Oral poliovaccine: will it help eradicate polio or cause the next epidemic? *Isr. Med. Assoc. J.* 8: 312-5.

242. Skinner MA, Racaniello VR, Dunn G, Cooper J, Minor PD, Almond JW. 1989. New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J. Mol. Biol.* 207: 379-92.

243. Sonenberg N, Meervovitch K. 1990. Translation of poliovirus mRNA. *Enzyme.* 44(1-4):278-91.

244. Stanway, G., Brown, F., Christian, P., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lemon, S.M., Minor, P.D., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C. and Skern, T. 2005. Family Picornaviridae. In: "Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Eds. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. Elsevier/Academic Press, London. p. 757-778.

245. Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA. 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell.*10;56(5):849-53.

246. Steil BP, Barton DJ. 2008. Poliovirus cis-acting replication element-dependent VPg Uridylation lowers the Km of the initiating nucleoside triphosphate for viral RNA replication. *J Virol.* 82(19):9400-8

247. Strebel PM, Sutter RW, Cochi SL, Biellik RJ, Brink EW, Kew OM, Pallansch MA, Orenstein WA, Hinman AR. 1992. Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clin. Infect. Dis.* 14: 568-79.

248. Supanaranond K, Takeda N, Yamazaki S. 1992. The complete nucleotide sequence of a variant of Cocksackievirus A24, an agent causing acute hemorrhagic conjunctivitis. *Virus Genes.* 6(2):149-58.

249. Szendroi A, El-Sageyer M, Mezey I, Berencsi G. 2000. Nucleotide sequences and mutations of the 5'-nontranslated region (5'-NTR) of natural isolates of an epidemic echovirus 11' (prime). *Arch Virol.*145(12):2575-600.

250. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-9.

251. Tariska I, Mázló M. 1980. [Neuropathology of encephalomyelitis caused by Enterovirus 71] *Orv Hetil.* 121(29):1739-43.
252. Tatem JM, Weeks-Levy C, Mento SJ, DiMichele SJ, Georgiu A, Waterfield WF, Sheip B, Costalas C, Davies T, Ritchey MB, Cano FR. 1991. Oral poliovirus vaccine in the United States: molecular characterization of Sabin type 3 after replication in the gut of vaccinees. *J. Med. Virol.* 35: 101-9.
253. Terry L. 1962. The association of cases of poliomyelitis with the use of type 3 oral poliomyelitis vaccines. Washington, DC: US Department of Health, Education, and Welfare.
254. Teterina NL, Egger D, Bienz K, Brown DM, Semler BL, Ehrenfeld E. 2001. Requirements for assembly of poliovirus replication complexes and negative-strand RNA synthesis. *J Virol.* 75(8):3841-50.
255. Thivolet C, Trepo C. 1988. [Virus and insulin-dependent diabetes mellitus. Etiopathogenic perspectives] *Pathol Biol (Paris)*. Feb;36(2):182-6.
256. Thoelen I, Moës E, Lemey P, Mostmans S, Wollants E, Lindberg AM, Vandamme AM, Van Ranst M. 2004. Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species. *J Clin Microbiol.* 42(3):963-71.
257. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 11;22(22):4673-80.
258. Townsend TR, Bolyard EA, Yolken RH, Beschoner WE, Bishop CA, Burns WH, Santos GW, Saral R. 1982. Outbreak of Coxsackie A1 gastroenteritis: a complication of bone-marrow transplantation. *Lancet.* 10;1(8276):820-3.
259. Tu PV, Thao NT, Perera D, Huu TK, Tien NT, Thuong TC, How OM, Cardoso MJ, McMinn PC. 2007. Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg Infect Dis.* 13:1733-41.
260. Umesha KR, Bhavani NC, Venugopal MN, Karunasagar I, Krohne G, Karunasagar I. 2008. Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India. *Int J Food Microbiol.* 20;122(3):279-86.
261. van Kuppeveld FJ, Hoenderop JG, Smeets RL, Willems PH, Dijkman HB, Galama JM, Melchers WJ. 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum

- membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J.* 16;16(12):3519-32.
262. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. 1961. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439: 344-8.
263. Vinjé J, Gregoricus N, Martin J, Gary HE Jr, Caceres VM, Venczel L, Macadam A, Dobbins JG, Burns C, Wait D, Ko G, Landaverde M, Kew O, Sobsey MD. 2004. Isolation and characterization of circulating type 1 vaccine-derived poliovirus from sewage and stream waters in Hispaniola. *J Infect Dis.* 1;189(7):1168-75.
264. Wang CY, Li Lu F, Wu MH, Lee CY, Huang LM. 2004. Fatal coxsackievirus A16 infection. *Pediatr Infect Dis J.*;23:275-6.
265. Wang JR, Tsai HP, Huang SW, Kuo PH, Kiang D, Liu CC. 2002. Laboratory diagnosis and genetic analysis of an echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. *J Clin Microbiol.* 40:4439-44.
266. Westrop GD, Wareham KA, Evans DM, Dunn G, Minor PD, Magrath DI, Taffs F, Marsden S, Skinner MA, Schild GC, Almond JW. 1989. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.* 63: 1338-44.
267. WHO. 1998. Acute flaccid paralysis surveillance: the surveillance strategy for poliomyelitis eradication. *Weekly Epidemiol Rec* 73:113-4.
268. WHO. 2004. World Health Organization. Polio laboratory manual, 4th edition, WHO/IVB/04.10 2004. Geneva, Switzerland.
269. Wimmer E, Hellen CU, Cao X. 1993. Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet.* 27:353-436.
270. Witsø E, Palacios G, Rønningen KS, Cinek O, Janowitz D, Rewers M, Grinde B, Lipkin WI. 2007. Asymptomatic circulation of HEV71 in Norway. *Virus Res.* 123(1):19-29.
271. HT jr, Landing BH, Lennette EH, McCallister RM. 1963. Fatal infection in an infant associated with Coxsackie virus group A, type 16. *N Engl J Med.*;9;268:1041-4.
272. Wright PF, Kim-Farley RJ, deQuadros CA, Robertson SE, Scott RN, Ward NA, Henderson RH. 1991. Strategies for the global eradication of poliomyelitis by the year 2000. *NEJM* 325:1774-9.
273. Xing L, Huhtala M, Pietiäinen V, Käpylä J, Vuorinen K, Marjomäki V, Heino J, Johnson MS, Hyypiä T, Cheng RH. 2004. Structural and functional analysis of integrin alpha2I domain interaction with echovirus. *J Biol Chem.* 19;279(12):11632-8.

274. Yakovenko ML, Cherkasova EA, Rezapkin GV, Ivanova OE, Ivanov AP, Eremeeva TP, Baykova OY, Chumakov KM, Agol VI. 2006. Antigenic evolution of vaccine-derived polioviruses: changes in individual epitopes and relative stability of the overall immunological properties. *J. Virol.* 80: 2641-53.
275. Yang CF, De L, Holloway BP, Pallansch MA, Kew OM. 1991. Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. *Virus Res.* 20: 159-79.
276. Yang CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba J, Ahmed N, Campagnoli R, van der Avoort H, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, Pallansch M, Kew O. 2003. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol.* 77(15):8366-77.
277. Yang CF, Chen HY, Jorba J, Sun HC, Yang SJ, Lee HC, Huang YC, Lin TY, Chen PJ, Shimizu H, Nishimura Y, Utama A, Pallansch M, Miyamura T, Kew O, Yang JY. 2005. Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of an immunodeficient patient. *J. Virol.* 79: 12623-34.
278. Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, Otonkoski T, Kandolf R, Hovi T, Roivainen M. 2004. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia.* 47(2):225-39.
279. Yoke-Fun C, AbuBakar S. 2006. Phylogenetic evidence for inter-typic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiol.* 30:6:74.
280. Zhao YN, Jiang QW, Jiang RJ, Chen L, Perlin DS. 2005. Echovirus 30, Jiangsu Province, China. *Emerg Infect Dis* 11:562-7.
281. Zhu Z, Xu WB, Xu AQ, Wang HY, Zhang Y, Song LZ, Yang HL, Li Y, Ji F. 2007. Molecular epidemiological analysis of echovirus 19 isolated from an outbreak associated with hand, foot, and mouth disease (HFMD) in Shandong Province of China. *Biomed Environ Sci.* 20(4):321-8.
282. Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM. 1992. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol.* 30(1):160-5.
283. Zuker M., Mathews D.H. and Turner D.H. 1999. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski and B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.

284. Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31: 3406-15.

8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Kapusinszky B**, Molnár Z, Szomor KN, Berencsi G. Molecular characterization of poliovirus isolates from children who contracted vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) following administration of monovalent type 3 oral poliovirus vaccine in the 1960s in Hungary. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 Oct 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19863665. IF 1.972
2. **Kapusinszky B**, Szomor KN, Farkas A, Takács M, Berencsi G. Detection of non-polio enteroviruses in Hungary 2000-2008 and molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16, and echovirus 30. *Virus Genes.* 2010 Jan 1. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20044791. IF 1.376

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

1. Younes AS, Csire M, **Kapusinszky B**, Szomor K, Takács M, Berencsi G. Heterogeneous pathways of maternal-fetal transmission of human viruses (review). *Pathol Oncol Res.* 2009 Sep;15(3):451-65. Epub. PubMed PMID: 19350418. IF 1.26
2. Szomor KN, **Kapusinszky B**, Rigó Z, Kis Z, Rózsa M, Farkas A, Szilágyi A, Berencsi G, Takács M. Detection of human bocavirus from fecal samples of Hungarian children with acute gastroenteritis. *Intervirology.* 2009;52(1):17-21. Epub 2009 Apr 7. PubMed PMID: 19349714. IF 1.418
3. Kis Z, Sas K, Gyulai Z, Tresó B, Petrovay F, **Kapusinszky B**, Csire M, Endresz V, Burian K, Mandi Y, Vecsei L, Gonczol E. Chronic infections and genetic factors in the development of ischemic stroke. *New Microbiol.* 2007 Jul;30(3):213-20. PubMed PMID: 17802898. IF 0.810
4. Pohl O, Brojnás J, Rusvai E, Ordög K, Siska I, Faludi G, **Kapusinszky B**, Csohán A, Lendvai K, Lengyel A, Mezey I, Berencsi G. Retrospective detection of a subclinical hepatitis A virus (HAV) epidemic affecting juvenile cohorts of the Hungarian population. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003 Aug 18;38(1):85-91. PubMed PMID: 12900060. IF 1.789
5. Ordög K, Szendrői A, Szarka K, Kugler Z, Csire M, **Kapusinszky B**, Xie J, Cszimadia K, Brojnás J, Rusvai E, Tempfli A, Berencsi G. Perinatal and intrafamily transmission of hepatitis B virus in three generations of a low-prevalence population. *J Med Virol.* 2003 Jun;70(2):194-204. PubMed PMID: 12696105. IF 2.371

Könyvfejezet:

Berencsi György, Szendrői Andrea, **Kapusinszky Beatrix**. Humán pikornavírusok (10. fejezet) In: Berencsi György (szerk.) „Orvosi molekuláris virológia” 180-191. old. Convention Budapest Kft., Budapest 2005.

Közlemények:

1. Berencsi György, **Kapusinszky Beatrix**, Szomor Katalin, Takács Mária. Újjonnan megjelenő humán vírusok Egészségtudomány, LII. évfolyam, Budapest, 2008 3. szám.
2. Berencsi György; Jankovics István; **Kapusinszky Beatrix**; Kis Zoltán; Rózsa Mónika. Újjonnan felfedezett vírusfertőzések és a felsőlégúti megbetegedések Tüdőgyógyászat. 2008. 2. évf. 1. sz., p. 5-9.
3. Molnár Zsuzsanna, Kaszás Katalin, **Kapusinszky Beatrix**. Acut flaccid paralysis surveillance, Magyarország 2004. In: Epiinfo. - 2005. 12. évf. 16. sz., p. 165-167.
4. Berencsi György, Ferenczi Emőke, Petrányi Gábor, **Kapusinszky Beatrix**, Younes Saleh Ali és Csire Márta 2005: „Újjonnan megjelenő fertőzések a világban, Virulens vírusok” Medical Tribune III.évf. 20.szám, 2005. Október 13. (12-13.oldal).

Ismeretterjesztő közlemények:

Berencsi György, **Kapusinszky Beatrix** és Csire Márta 2005: ”Az újdonság ereje, Köpönyegforgató vírusok” Élet és tudomány 26. szám 2005. Július 1. (812-814 oldal).

KONFERENCIA ELŐADÁSOK, POSZTEREK ÉS FOLYÓIRATBAN MEGJELENT KIVONATAIK:

Külföldön tartott előadások:

1. **Beatrix Kapusinszky**, Ágnes Farkas, Ilona Mezey, Katalin N. Szomor, Mária Takács, George Berencsi. Viral neuroinfections in Hungary. VI Conference on Neuroinfections 16-18 October, 2008. Białystok, Poland.
2. **Beatrix Kapusinszky**. Historical poliovirus type 3 isolates obtained from children suffering from vaccine associated paralytic poliomyelitis. RiViGene Meeting, 26 September, 2008. Frankfurt, Germany.
3. **Beatrix Kapusinszky**, George Berencsi, Olen Kew. Molecular analysis results of Hungarian Sabin-3 archived isolates from 1960-1962, 1967. CDC Meeting, 8 September, 2006. Atlanta, GA, USA.

4. **Kapusinszky, B.**, Vollain, M., Toth, E., Mezey, I., Berencsi, Gy. Detection of enteroviruses from diagnostic samples using 5'-NTR specific primers between 1st July 2000 and 31st December 2002 in Hungary, 1st Federal European Microbiology Society Conference, June 29-July 3, 2003, Ljubljana, Slovenia.

Hazai előadások, poszterek:

1. Kern Anita, **Kapusinszky Beatrix**, Bánfi Renáta, Barna Zsófia, Farkas Ágnes, Dr. Vargha Márta Vírusok kimutatása magyarországi felszíni vizekből. A Vízmikrobiológusok VII. Országos Konferenciájára, Budapest, 2008. november 18.

2. **Kapusinszky Beatrix**, Jakab Kálmán, Huszti Györgyike, Szomor Katalin, Farkas Ágnes, Takács Mária, Berencsi György. Coxsackie A16 vírus okozta kéz-láb-száj betegség járvány óvodai közösségben. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és a XI. Fermentációs Kollokvium, Helikon Hotel, Keszthely, 2008. október 15-17.

3. Szomor Katalin, **Kapusinszky Beatrix**, Kis Zoltán, Rigó Zita, Krisztalovics Katalin, Berencsi György, Takács Mária. Humán bocavírus kimutatása akut gastroenteritiszes magyarországi gyermekek székletmintáiból. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és a XI. Fermentációs Kollokvium, Helikon Hotel, Keszthely, 2008. 10. 15-17.

4. Kern Anita, **Kapusinszky Beatrix**, Farkas Ágnes, Barna Zsófia, Bánfi Renáta, Vargha Márta. Humán patogén vírusok kimutatása magyarországi felszíni vizekből. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és a XI. Fermentációs Kollokvium Helikon Hotel, Keszthely, 2008. október 15-17.

5. Benyó G., Tóth Á., Kállay K., **Kapusinszky B.**, Sinkó J., Trethon A., Kriván G., A Rota- és calicivírus fertőzések okozta elhúzódó hasmenéses állapotok vérképző-őssejt transzplantált gyermekekben. Differenciáldiagnosztikai és terápiás nehézségek. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 36. Kongresszusa Székesfehérvár, Vörösmarty Színház. 2008. október 9-11.

6. Berencsi György, **Kapusinszky Beatrix**, Szomor Katalin, Takács Mária. Újjonnan megjelenő humán vírusok Magyar Higiénikusok Társasága, XXXVIII. Vándorgyűlése, Balatonvilágos 2008. Szeptember 30 – október 2.

7. Kern Anita, **Kapusinszky Beatrix**, Vargha Márta. Humán patogén vírusok kimutatása magyarországi fürdővizekből. Magyar Higiénikusok Társasága, XXXVIII. Vándorgyűlése, Balatonvilágos 2008. Szeptember 30 – október 2.

8. Beatrix Kapusinszky, Anita Kern, Zsófia Barna, Katalin Szomor, György Berencsi, Márta Vargha. Detection of viruses in Hungarian surface waters.15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Hungary July 18-20, 2007.

9. Kapusinszky Beatrix, W. Allan Nix, Mary R. Fleminster, Domonkos Tatjana, Ferenczi Emőke, Berencsi György. Klasszikus szerológiával nem azonosítható enterovírusok Vizsgálata. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése Keszthely, okt.18-20.

10. Kapusinszky Beatrix, Domonkos Tányja, Jancsó Ágnes, Kósa Zsuzsa, Kubaszova Tamara, Molnár Erzsébet, Nagy Gábor, Berencsi György, Dömök István. A Sabin oltások hatékonysága és a lakosság védettsége a gyermekbénulás felszámolása során. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, Hotel Helikon, Keszthely 2004. október 7-9.

11. Kis Zoltán, Sas Katalin, Endrész Valéria, Burján Katalin, Petrovay Fruzsina, Tresó Bálint, **Kapusinszky Beatrix**, Gyulai Zsófia, Mándi Yvett, Vécsey László, Gönczöl Éva,

12. Berencsi György. Genetikai faktorok, fertőzések és a stroke betegség összefüggései Ideggyógyászat, Budapest, 2005. április 16.

13. Kis Zoltán, Sas Katalin, Endrész Valéria, Burián, Katalin, Petrovay Fruzsina, Nagy Ágnes, **Kapusinszky Beatrix**, Gyulai Zsófia, Veszely Gizella, Mándi Yvette,Vécsei László, Berencsi György, Gönczöl Éva. Perzisztens fertőzések szerepe a stroke kialakulásában. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, Hotel Helikon, Keszthely 2004. október 7-9.

14. Kapusinszky, B.,Vollain, M., Toth, E., Mezey, I., Berencsi, Gy. Detection Of Enteroviruses From Diagnostic Samples Using 5'- NTR Specific Primers Between 1st July 2000 and 31st December 2002 in Hungary.14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Balatonfüred, Hungary, October 9-11, 2003

15. Kapusinszky Beatrix, Brojnás Judit, Berencsi György. A klasszikus ELISA és a HBV antigének valamint a HCV ellenanyagok kimutatására előállított gyorsesztek összehasonlítása. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2000. évi Nagygyűlése, Keszthely, augusztus 24-26.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném megköszönni a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségét témavezetőmnek, Dr. Berencsi György főorvos úrnak, aki önzetlenül támogatott a munkámban, a tanulmányaim folytatásában és segített a nehézségek megoldásában.

Köszönöm osztályvezetőmnek, Dr. N. Szomor Katalinnak (Általános vírusdiagnosztikai osztály), hogy támogatott a dolgozatírás hajrájában.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Molnár Zsuzsannának és Kaszás Katalinnak (Járványügyi osztály) készséges közreműködésükért a járványügyi adatok gyűjtésében.

Hálával tartozom a közvetlen munkatársaimnak: Domonkos Tatjánának, Farkas Ágnesnek, Marchut Annának, Kozmáné Török Máriának, Szücsné Pulinka Ildikónak és Vincze Adriennek kitartó segítő munkájukért és biztatásukért.

Köszönet illeti a Virologiai Főosztály munkatársait, akik napi munkájukkal segítették az előrehaladásomat.

Köszönöm a CDC munkatársainak (Chen-Fu Yang, Su-Ju Yang, David Kilpatrick, Alan Nix, Barbara Andersson, Mary Fleminster, Mark Mandelbaum, Linda Venczel, Mark Pallansch, Steve Oberste), hogy a rövidtávú közös munkánk során szakmailag és emberileg mindig segítségemre voltak.

Köszönöm a WHO munkatársainak: Galina Lipskaya-nak, Eugene Gavrilin-nak a továbbképzésemben nyújtott támogatásukat.

Köszönöm a RiViGene pályázat (Risk Virus Gemome Database; SSPE-CT-2005-022639) anyagi támogatását, amely révén a teljes munkához szükséges tárgyi feltételeket meg tudtuk teremteni.

Köszönöm Galántha Gergelynek az ábrák elkészítésében nyújtott segítséget, és szüntelen baráti támogatását.

Köszönöm családtagjaimnak és hozzátartozóimnak a hitet és bizalmat, amely mindvégig éltetett a munkám elkészítése során.

10. ÖSSZEFOGLALÁS

Tizenhét Magyarországon 1960-1967 között kimutatott, gyermekbénulást okozó poliovírus 3 izolátumot vizsgáltunk. Az archivált minták 15 oltási *poliomyelitis*-ben szenvedő gyerektől származtak. Molekuláris módszerekkel igazoltuk a poliovírus 3 izolátumok vakcina eredetét.

Valamennyi genom 5'-NTR szakasza egyetlen pontmutációt szenvedett (U472C az IRES elem V. RNS-hurkában), ami az OPV3 vakcinavírus neurovirulens fenotípusának visszanyerését eredményezte. A nukleotidsorrend-vizsgálat megerősítette, hogy az A54V aminosavcsere a VP1 kapszómérben szintén kimutatható volt, ami az U472C mutációval együtt az oltási törzset, a vad poliovírus 3 példájára, hőrezisztenssé változtatta. Néhány izolátumban A54T aminosav cserét tudtunk kimutatni, amiről feltételezzük, hogy szintén szerepe lehet a hőrezisztencia visszanyerésében. Az izolátumok VP1 régiójában kimutatott mutációk száma egyetlen esetben sem haladta meg az 1%-ot, ezért mindegyiket a Sabin-szerű csoportba soroltuk. A VDPV (vakcina-eredetű poliovírus) csoportba, amely a hosszantartó vírusürítés indikátora, csak az 1%-ot meghaladó mutációval rendelkező vírusok tartoznak.

Az vizsgált izolátumok közül egy rekombinánsnak bizonyult. A rekombináns partner a Sabin 1-es típus volt, a 3D polimeráz régióban. VAPP betegből származó Sabin 3 rekombinánszt az irodalomban elsőként mutattunk ki.

A korábbi Sabin oltásokkal kapcsolatos eredmények (1962-1972) újraértékelése azt mutatta, hogy az OPV interferáló tulajdonsága miatt az oltási kampányok csaknem 5 hónapja alatt a non-polio enterovírus őrítő gyermekek száma a negyedére csökkent. Számolni lehet azzal, hogy az inaktivált védőoltás (IPV) bevezetését követően a non-polio enterovírusok járványügyi jelentősége nőni fog.

A non-polio enterovírus diagnosztikát 2000-től 2008-ig molekuláris módszerekkel végeztük. Így a nem tenyészthető vírusokat is vizsgálni lehetett. A mintákban az enterovírusok jelenlétét az 5'-NTR nested RT-PCR segítségével mutattuk ki. A vírusipizálást az 5'-NTR konzervatív régióban, és a szerotípussal szoros korrelációt mutató VP1 régióban nukleotidsorrend-meghatározással végeztük.

Tizenkét mintából coxsackievírus A16 (CV-A16) típus volt kimutatható. Magyarországon a CV-A16 2000-ben és 2008-ban okozott kéz-láb-száj betegség járványt. A vírus sporadikus formában szinte minden évben megjelent, és idegrendszeri megbetegedéseket okozott az 5 év alatti gyermekekben. A 2008-as óvodai járványban a vírus támadási rátája a vizsgált korcsoportokban 40% körül volt. Összefüggést kerestünk a CV-A16 okozta különböző klinikai kép, és a vírus RNS másodlagos szerkezetének módosulatai között. Az 5'-NTR RNS másodlagos szerkezetek vizsgálata alapján feltételezzük, hogy a szerkezetek közötti különbségek mutációk vagy rekombinációk következményei, ami hatással lehetett a vírusok kórokozó képességére.

Hat mintában enterovírus 71 (EV71) típus volt kimutatható. Magyarországon az EV71 idegrendszeri megbetegedéseket okozott. A 2000-2008 között izolált EV71 vírusok a **C1** és **C4** genotípusba tartoztak, szemben az 1978-ban Magyarországon izolált magas neurovirulenciájú EV71 vírussal, amely a **B1** genotípusba tartozott. Az 5'-NTR RNS másodlagos szerkezetének vizsgálatával 3 különböző másodlagos struktúrát kaptunk, amelyek a **C1**, **C4** és **B1** genotípusokhoz kapcsolódtak.

Az echovírus 30 (echo30) típus 11 mintában volt jelen. Az echo30 az egyik leggyakoribb kórokozója az *asepticus meningitis*-nek a 10 év körüli gyermekekben. Az echovírus 30 epidemiológiájára jellemző, hogy egy adott járványt a világon cirkuláló egy lineage okoz, amelyet idővel egy másik vált fel. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a Magyarországon 2000-2008 között kimutatott vírusok 3 lineage-be csoportosultak, és az európai izolátumokkal mutattak szoros rokonságot.

11. SUMMARY

Eighteen poliovirus type 3 isolates, isolated between 1960 and 1967 from paralytic patients in Hungary, were examined. The archived viruses were obtained from 15 VAPP patients. The objective of the examinations was based on the observation that the VAPP risk had been much higher after administration of Sabin type 3 vaccine, than that for types 1 and 2, but the molecular technologies had not been available at the time of vaccination.

First, it has been confirmed that all isolates were of vaccine origin. The nucleotide sequence of the 5'-NTR region of all genomes harbored one single point mutation (U472C within the hairpin-loop V. of the IRES element) responsible for the reversion of OPV3 viruses to wild type phenotype.

The nucleotide sequencing confirmed that the amino acid change A54V within the VP1 capsomere protein was also present. It was shown that it could change the PV3 thermosensitive properties together with the U472C mutation. An A54T replacement could be detected in some thermoresistant isolates, suggesting similar effect to the heat resistance. The number of mutations did not exceed 1% within the VP1 region, therefore, all isolates were classified as Sabin-like. Isolates can be grouped into the VDPV cluster in case the mutation rate is above 1%, indicating prolonged virus shedding.

One of eighteen isolates was shown to be a recombinant. The recombinant partner was Sabin type 1 within the 3D polymerase coding region. This is a first detection of Sabin 3 recombinant from VAPP patient.

In connection with the re-evaluation of the findings obtained in connection with the mOPV vaccination campaigns, the number of children shedding non-polio enteroviruses was reduced by a factor of 4 during the 5 months of the campaigns. One has to be aware, that upon the introduction of inactivated poliovirus vaccines the epidemiological importance of non-polio enteroviruses will increase.

Molecular methodology was used between 2000 and 2008 for the detection of non-polio enteroviruses in order to detect uncultivable viruses. The presence of enteroviruses was detected using 5'-NTR nested RT-PCR. The typing of the viruses was done by nucleotide sequencing of conservative 5'-NTR and the variable VP1 region being in good correlation with serotypes. The typing proved to be successful in the case of 29 samples.

Coxsackievirus A16 was present in 12 samples. CV-A16 caused epidemics of hand-foot and mouth disease in 2000 and 2008 in Hungary. Sporadic infections were identified in almost every year causing neurologic illnesses of children under 5 years of age. The attack rate in different age groups was about 40% in the outbreak in 2008. We suppose an association between the clinical manifestation and the secondary structure of the 5'-NTR regions of CV-A16. We also presume that the differences between the secondary structures of virus RNAs were probably caused by mutations or recombinations that may influence the pathogenic properties of the viruses.

Enterovirus 71 was detected in 6 samples. EV71 caused neurological illnesses in Hungary. EV71 isolates detected between 2000 and 2008 were defined taxonomically as genotypes **C1** and **C4**. The enterovirus 71 with high neurovirulence isolated in 1978 in Hungary had been classified as genotype **B1**. Nucleotide sequence data revealed that 5'-NTR secondary structures belonged to 3 three different genotypes: **C1**, **C4** and **B1** respectively.

Echovirus type 30, which is one of the most common non-polio enterovirus types that can cause *aseptic meningitis* in children around 10, was detected from 11 samples. Waves of echovirus 30 activity are associated with distinct new genomic lineages, which usually replace previously circulating ones. Three different echovirus lineages causing neurologic illnesses were detected between 2000 and 2008 in Hungary, all of which were closely related to other European strains.