



2019. XIX. évfolyam 1. szám

Tartalom:

A 2018-as nyugat-nílusi vírus hazai, humán diagnosztikai tapasztalatai

Nagy Anna¹, Mezei Eszter², Nagy Orsolya¹, Koroknai Anita¹, Csonka Nikolett¹, Kaposi Magdolna¹, Szomor Katalin¹, Rigó Zita¹, Takács Mária¹

¹Nemzeti Népegészségügyi Központ, Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály, Virologiai Laboratóriumi Osztály

²Nemzeti Népegészségügyi Központ, Járványügyi és Infekciókontroll Főosztály

Magyarországon előforduló, klinikai mintákból származó nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* izolátumok teljes genom szekvenálásának eredményei

Henczkó Judit, Tóth Ákos, Magyar Nóra, Balázs Andrea, Tóth Szilárd, Pályi Bernadett, Erdősi Tímea, Hegedűsné Richter Zsuzsa, Kis Zoltán

Nemzeti Népegészségügyi Központ, Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály

A Lymphocitás choriomeningitis vírus jelentősége a neuroinvazív fertőzések kialakulásában, és hazai vonatkozásai

Koroknai Anita¹, Nagy Anna¹, Nagy Orsolya¹, Mezei Eszter², Csonka Nikolett¹, Kaposi Magdolna¹, Takács Mária¹

¹Nemzeti Népegészségügyi Központ, Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály, Virologiai Laboratóriumi Osztály

²Nemzeti Népegészségügyi Központ, Járványügyi és Infekciókontroll Főosztály

Kiadja: Nemzeti Népegészségügyi Központ

A kiadó és a szerkesztőség székhelye: 1097 Budapest, Albert Flórián út 2-6.

Felelős kiadó: Dr. Szabó Enikő

Alapító szerkesztő:

Dr. Füzi Miklós (Ph.D.)

Dr. Gacs Mária

Felelős szerkesztő:

Pásztai Judit

Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály

Szerkesztő:

Áy Éva

Dr. Csire Márta (Ph.D.)

Erdősi Tímea

Dr. Tirczka Tamás

Dr. Tóth Ákos (Ph.D.)

Technikai szerkesztő:

Várkonyi Andrea

Olvasó szerkesztő:

Dr. Dencs Ágnes (Ph.D.)

Dr. Füzi Miklós (Ph.D.)

Készült a Nemzeti Népegészségügyi Központ nyomdájában
70 példányban

Nyomdavezető: Novák Anikó

ISSN 2063-9805 (Nyomtatott)

ISSN 2063-9813 (Online)

**A Mikrobiológiai Körlevelek az OEK honlapján
www.oek.hu elérhetőek**



A 2018-as nyugat-nílusi vírus hazai, humán diagnosztikai tapasztalatai

Nagy Anna¹, Mezei Eszter², Nagy Orsolya¹, Koroknai Anita¹, Csonka Nikolett¹, Kaposi Magdolna¹, Szomor Katalin¹, Rigó Zita¹, Takács Mária¹

¹Nemzeti Népegészségügyi Központ, Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály, Virologiai Laboratóriumi Osztály

²Nemzeti Népegészségügyi Központ, Járványügyi és Infekciókontroll Főosztály

Történeti áttekintés

A nyugat-nílusi vírus (WNV: *West Nile virus*) a *Flaviviridae* család Flavivirus nemzetségének szúnyogok által terjesztett, legszélesebb gazdaspektrummal és legnagyobb földrajzi elterjedéssel jellemezhető tagja, mely az Antarktisz kivételével mára valamennyi kontinensen elterjedt. Először 1937-ben izolálták egy lázas nő véréből Omogoban, Uganda West Nile nevű tartományában, innen kapta elnevezését (Hubálek & Halouzka, 1999). Európában először 1963-ban izolálták, a Rhóne folyó deltájában, majd később a Volga deltában (Hubálek & Halouzka, 1999). Nagyobb járványt először 1996-ban, Romániában okozott, majd pár évvel később, 1999-ben Volgográdban (Papa, 2017). A kórokozóra mégis az 1999-es New York-i járványt követően irányult nagyobb figyelem. A rákövetkező években a vírus gyorsan elterjedt az észak-amerikai kontinensen, több ezer emberi és ló megbetegedést okozva, de emellett jelentős elhullást idézett elő a madárpopulációkban is, mely néhány faj egyedszámában drámai csökkenést eredményezett (Beck et al., 2013). Ezzel szemben Európában 2007-ig kisebb járványkitörések, sporadikus megbetegedések, valamint az amerikaihoz képest mérsékeltebb madárelhullások jellemezték a vírus elterjedését. Az eltérő tendenciára magyarázatul szolgálhatott az újvilági madárfajok nagyobb fogékonysága a vírusfertőzésre, illetve a szúnyogfajok vektorkompetenciájában és az elterjedt vírustörzsek virulenciájában is mutatkoztak különbségek. Az elmúlt években ugyanakkor Európában is növekedés tapasztalható mind a humán esetek számában, mind pedig a virulenciában. A 2010-es év például Európa-szerte kiemelkedőnek számított, ekkor több országban is megugrott a bejelentett megbetegedések száma (Beck et al., 2013). Az Európai Unió tagállamai közül 2011 és 2013 között Görögország, míg 2014 és 2016 között Olaszország jelentette a legtöbb humán megbetegedést (Papa, 2017). Hazánkban 2004 óta rendelkezünk humán nyugat-nílusi vírusfertőzésekre vonatkozó laboratóriumi adatokkal (Krisztalovics et al., 2008; Szomor et al., 2011), saját néven pedig 2012 óta bejelentendő fertőző betegség (Epinfo 2014). A humán nyugat-nílusi



vírusfertőzések laboratóriumi diagnosztikájáért felelős Nemzeti Népegészségügyi Központ (NNK; a korábbi Országos Epidemiológiai Központ, majd Országos Közegészségügyi Intézet jogutódja) Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriumának (NRL) adatait tekintve évente átlagosan 20-30 megbetegedés kerül megerősítésre (2. ábra). Az esetszámban 2004 és 2017 között megfigyelhető növekvő tendencia (2. ábra) háttérben állhatott többek között az a tény, hogy a nyugat-nílusi vírusfertőzések hazai előfordulása – a fokozott médiafigyelemnek is köszönhetően – egyre inkább bekerül a köztudatba, ezért a klinikusok részéről is gyakrabban történik vizsgálatkérés, ennek következtében pedig több eset kerülhet laboratóriumi kivizsgálásra.

A kórokozó jellemzése

A nyugat-nílusi vírusnak legalább nyolc genetikai leszármazási vonala (úgynevezett lineage) ismert. Ezek közül az 1-es és 2-es genetikai vonalak hozhatók bizonyítottan összefüggésbe humán és állati megbetegedésekkel, míg a WNV 3-8 leszármazási vonalakhoz sorolt törzsek azonosítása vektor surveillance tevékenységhez köthető (Kemenesi et al., 2014; Pachler et al., 2014). Az 1-es leszármazási vonalhoz tartozó vírustörzsek elterjedtek a Mediterrán-térségben, Kelet-Európában, Észak-Amerikában, a Karibi-térségben, valamint Latin-Amerikában (Papa, 2017). Többek között a New York-i járvány kitörését is WNV lineage 1 vírustörzs okozta. Neuroinvaszív lineage 2 WNV törzs közép-európai megjelenését először Magyarországon igazolták. A vírust madaraktól: héjából (*Accipiter gentilis*) és karvalyból (*Accipiter nisus*) mutatták ki 2004-ben, majd 2005-ben (Bakonyi et al., 2013; Erdélyi et al., 2007). Korábban ez a genetikai leszármazási vonal csak Afrika szubszaharai térségében és Madagaszkáron volt elterjedt. A Magyarországon madaraktól izolált vírustörzs is közép és dél-afrikai WNV törzsekkel mutatta a legnagyobb hasonlóságot (Erdélyi et al., 2007). A különböző variánsok új földrajzi térségekben történő megjelenésében jelentős szerepet játszanak a vándormadarak, melyek Afrika felől évről évre új törzseket hurcolhatnak Európába. A 2-es leszármazási vonalhoz tartozó vírustörzsek az elmúlt években Európa-szerte elterjedtek, miközben újabb, neuroinvaszív fenotípusok evolválódtak (McMullen et al., 2013). Magyarországon mind az 1-es, mind pedig a 2-es genetikai vonal jelenlétét igazolták már állatorvosi területen (Bakonyi et al., 2013; Erdélyi et al., 2007; Kutasi et al., 2011). A humán fertőzések háttérben álló vírustörzsek azonosítását 2014-ben kezdte meg a Virális Zoonózisok NRL. A humán diagnosztika elmúlt négy évének eredményei pedig arra utalnak, hogy jelenleg a vírus 2-es leszármazási vonalához tartozó törzsek cirkulálnak a térségben, mely egybevág az állatorvosi területen tapasztaltakkal (Nagy et al., 2016; Nagy et al., 2017).



Járványtan

A nyugat-nílusi vírus terjedésének elsődleges módja fertőzött szúnyog csípése által bekövetkező vírustranszmisszió. A vektorok alapvetően ornitofil szúnyogfajok – főleg a *Culex* nemzetség tagjai –, melyek fertőzött madarakon történő táplálkozás során akvirálják a vírust (Ciota & Kramer, 2013). A fertőzött szúnyogok ugyanakkor véletlenszerűen csíphetnek emlősöket, így például az embert vagy lovakat is, ezzel átadva a kórokozót. Ezen tulajdonságuk miatt híd-vektoroknak is nevezik őket. Európában és Afrikában legfontosabb vektorok például a *Culex pipiens* (dalos szúnyog), *Culex modestus* (foltos szúnyog), *Culex univittatus*, *Culex antennatus* fajok (Hayes et al., 2005). A vírustranszmisszió intenzitása és a humán fertőzések száma függ a kompetens szúnyogok egyedsűrűségétől, az infekció prevalenciájától a szúnyogpopulációban, valamint a vektorok táplálkozási mintázatától. A vertikális vírustranszmisszió lehetősége is igazolt, illetve a vírust már hibernált nőtény szúnyogokból is sikerült izolálni, azaz a vírusperzisztencia fennmaradhat hidegebb éghajlatú területeken is. A vírus amplifikálásában és természetes ciklusának fenntartásában legfontosabb gazdaszervezetek a madarak. Jelentőségük azért is említésre méltó, mert a nem költöző madarak lokális helyváltoztatása, de különösen a vándorfajok hosszú távú migrációja elősegíti a vírus terjesztését új földrajzi területekre is. A *Passeriformes* (veréb- vagy énekesmadár-alakúak), *Charadriiformes* (lilealakúak), *Strigiformes* (bagolyalakúak), *Falconiformes* (sólyomalakúak) rendek madárfajai kifejezetten érzékenyek a nyugat-nílusi vírusfertőzésre, bennük megfelelő mértékű és ideig tartó viraemia alakul ki ahhoz, hogy megfertőzzék a rajtuk táplálkozó legtöbb szúnyogfajt (Hayes et al., 2005). Például varjúfélék (*Corvidae*), vagy a házi pirók (*Carpodacus mexicanus*) és a házi veréb (*Passer domesticus*) rendkívül hatékonyan képesek a vírust átadni a vektornak, továbbá ezeknél a fajoknál a vírusfertőzést követően a mortalitás mértéke akár a 40%-ot is meghaladhatja. A nyugat-nílusi vírust rágcsálókból, denevérből is izolálták már, azonban a legtöbb emlősfaj, így az ember sem képes olyan mértékű és tartós viraemiát produkálni, mely által a vírus átjuthatna a vektorba, ezért az emlősök úgynevezett fertőzési zsákutcának (*dead-end host*) tekinthetők. Jelen ismereteink szerint tehát vektor közvetítette vírustranszmisszió ember és ember között nyugat-nílusi vírus esetén nem lehetséges. A vírus nem vektor közvetítette emberről emberre történő terjedésére ugyanakkor van mód: transzfúzió, transzplantáció, transzplacentáris vagy szoptatás által bekövetkező vírusfertőzésre egyaránt olvashatók eseteleírások. A transzfúzió általi terjedés kockázatának jelentőségére felhívja a figyelmet, hogy 2003 és 2004 között több mint 1000 potenciális WNV viraemiás vérdonort sikerült kiszűrni csak az Egyesült Államokban, de az elmúlt években a szomszédos Ausztriában is azonosítottak aktuálisan fertőzött, viraemiás vérdonorokat a



donorok rutinszerű WNV NAT (*Nucleic Acid Amplification Testing*: nukleinsav amplifikációs teszt) szűrése eredményeként (Bakonyi et al., 2017; Pealer et al., 2003). A szezonális időszakban a rutinszerű szűrés mellett egy másik lehetőség az Európai Bizottság 2014/110/EU irányelvének megfelelően, a víruscirkulációban érintett területek 28 napos kizárása a véradásból. Magyarországon a 2018-as szezonális időszakban még ez utóbbi eljárást alkalmazták, melyhez elengedhetetlen volt az aktuális fertőzések minél gyorsabb bejelentése és a diagnosztikai laboratórium, a járványügyi szakemberek, valamint a vérellátó szolgálat közti szoros együttműködés.

Tünetek

A nyugat-nílusi vírusfertőzések többsége tünetmentesen vagy csak enyhe, aspecifikus tünetekkel zajlik (Hayes et al., 2005). Klinikai tünetek megjelenésekor, az expozíciót követően átlagosan 2-14 napos inkubációs idővel számolhatunk, bár a szünyogcsípés időpontját sokszor nehéz pontosan behatárolni. Tünetes fertőzések kapcsán az angolszász szakirodalom különbséget tesz az enyhébb lefolyású, nyugat-nílusi lázként (WNF: *West Nile fever*) definiált kórforma és a súlyosabb, neurológiai szövödményekkel járó, úgynevezett „nyugat-nílusi vírus neuroinvazív tünetegyüttes” (WNND: *West Nile neuroinvasive disease*) között. Előbbire jellemző a hirtelen felszökő láz, fejfájás, fáradtság, gyengeség, izom-, és ízületi fájdalom, rossz közérzet, valamint tranziens maculopapularis kiütések megjelenése a törzsön és a végtagokon (Hayes et al., 2005). A neuroinvazív kórforma kialakulása az esetek kevesebb, mint 1%-ára jellemző, míg a WNF esetek aránya 20% körül mozog (Barzon et al., 2015). Az enyhébb és kevésbé specifikus tünetekkel járó fertőzéseket azonban kisebb eséllyel ismerik fel és jelentik be, ezért ez az arány a valóságban magasabb is lehet. A WNV neuroinfekció általában serosus meningitis, encephalitis, esetleg meningoencephalitis, encephalomyelitis formájában zajlik (Barzon et al., 2015). A neurológiai tünetek súlyossága széles skálán változik, az enyhe dezorientáltságtól kezdve a súlyos tudatvesztéses állapotig vagy akár fatális kimenetelig. A vegetatív központok (agytörzs, nyúltvelő és híd) érintettsége a rekeszizom és a bordaközi izmok bénulását okozhatja, mely légzésbénuláshoz, esetenként a beteg halálához vezet (Hayes et al., 2005). A serosus meningitis legjellemzőbb tünetei a hirtelen felszökő magas láz, fejfájás, tarkóköttöttség, meningeális izgalmi jelek, photophobia. A fejfájás súlyos lehet, melyhez gyakran gastrointestinalis tünetek (hányinger, hányás) társulnak, melyek dehidratációt is okozhatnak. Az encephalitisben szenvedő betegeknél emellett jellemző az alternáló tudatállapot, ataxia, tremor és myoclonus (főleg a felső végtagok és az arc területén). Kialakulhat cerebralis ödéma és ennek következtében a koponyaűri nyomás fokozódása. A WNV encephalitis fontos komorbiditási



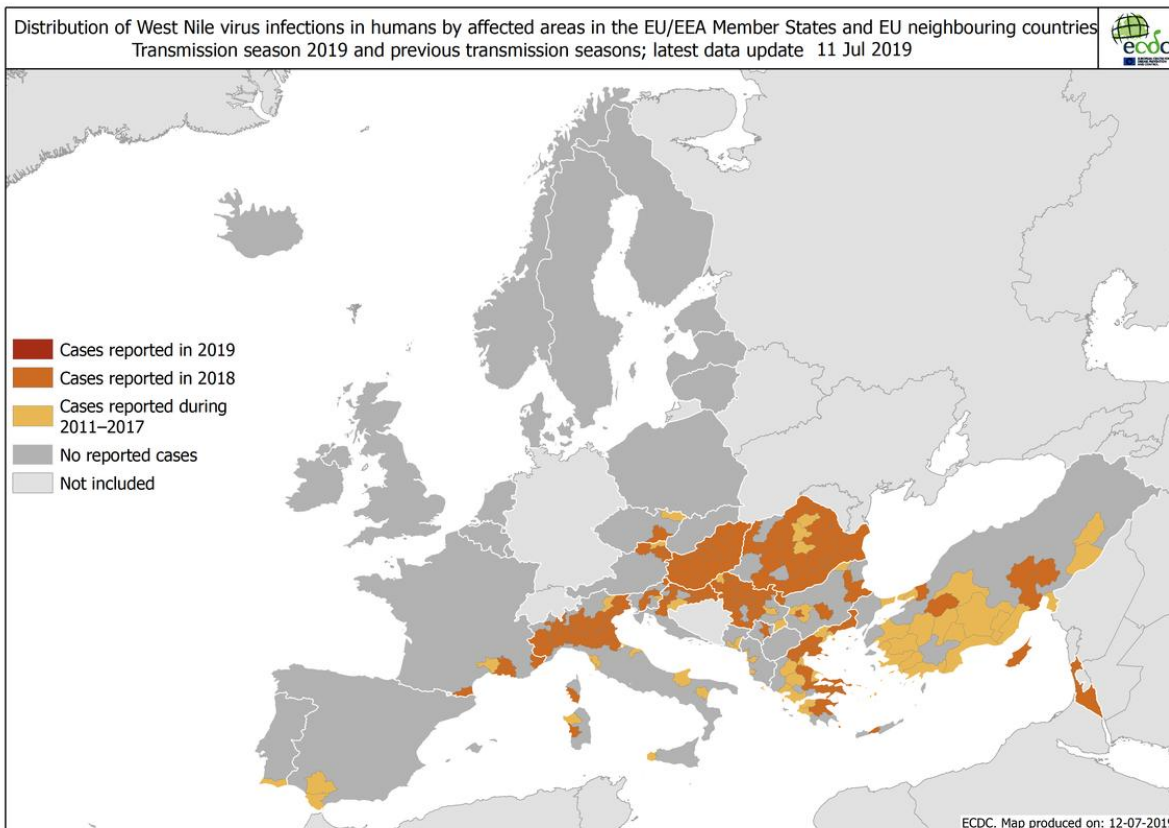
tényezője az életkor, idősebb korosztályban kialakulásának valószínűsége szignifikánsan megugrik: míg a WNND incidencia a 65 év felettek körében 1:50, addig 65 év alatt kialakulásának esélye jóval kisebb: 1:300 (Ludlow et al., 2016). A 75 év felettek korcsoportjában pedig a fatális kimenetelű megbetegedések száma is megnő. A szervtranszplantáció és az azzal járó immunszuppresszió, valamint daganatos betegségek megléte szintén jelentősen növeli a neurológiai kórkép kialakulásának kockázatát. Különösen szolid szervtranszplantáció recipienseinél a klinikai kép a spektrum súlyosabb vége felé tolódik (Kleinschmidt-DeMasters et al., 2004). Olyan krónikus betegségek, mint például a diabetes, a magas vérnyomás, veseelégtelenség, esetleg cerebrovascularis alapbetegségek, de a CCR5 kemokin receptor deficienciája szintén hozzájárulhatnak a WNND kialakulásához (Petersen et al., 2013). A WNND betegek kb. 13%-ánál jellemző a gerincvelői mozgató neuronok fertőződése, melynek következménye poliomyelitis-szerű aszimmetrikus flaccid paralysis kialakulása, amely igen gyorsan, a tünetek megjelenését követő 48 órán belül jelentkezik. Amennyiben a gerincvelő érintettsége kiterjedté válik, tetraplegia is kialakulhat. WNV fertőzéssel összefüggésben ascendáló, szimmetrikus végtaggyengeséggel és zsibbadással járó Guillain-Barré szindróma is jelentkezhet. Általánosságban a WNND mortalitási rátája 10% körülire tehető, de a súlyosabb encephalitis eseteknél akár a 10-30%-ot is elérheti. A felépülés lassú, legjobb prognózisra azon meningitises pácienseknél számíthatunk, akiknél a tudatállapotban komolyabb romlás nem következett be. A meningitisekből felépülő betegek gyakran számolnak be elhúzódó fejfájásról, izomfájdalmakról, gyengeségről. Encephalitist vagy focalis neurológiai manifesztációt követően hónapokig vagy akár évekig megfigyelhető perzisztens neurológiai deficit, szomatikus és kognitív panaszok (Ludlow et al., 2016; Murray et al., 2010).

A 2018-as nyugat-nílusi vírus járvány, hazai tapasztalatok

Arra, hogy a 2018-as szezonális időszakban az előző évekhez képest kiugrás várható a nyugat-nílusi vírusfertőzések és laboratóriumi igazolt esetek számában már az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC: European Centre for Disease Control and Prevention) is felhívta a figyelmet, az augusztus 10-én megjelenő gyors kockázatértékelésében. Ekkor az Európai Unió tagállamai és a környező országok összesen 335 humán esetet jelentettek (Olaszország n=123; Szerbia n=102; Görögország n=59; Magyarország n=23; Románia n=23; Franciaország n=3; Koszovó n=2). Viszonyításképpen 2014 és 2017 között az év ugyanezen időszakában átlagosan csak 5-45 eset került bejelentésre. Az első humán, igazolt fertőzést 2018-ban Görögország jelentette a 26. héten (június 25-július 1), azonban a betegség kezdeti időpontja sokkal



korábbra, május 31-re (22. hét) datálódott. A nyugat-nílusi vírusfertőzések real-time surveillance rendszere nagymértékben függ az esetek időben történő bejelentésétől, valamint a rendelkezésre álló adatok teljességétől (például tünetek kezdeti időpontjára vonatkozó információ). Figyelembe véve a korábbi évek adatait, nem csupán az esetszámban mutatkozott kiugrás, hanem a szezonális időszak kezdete is korábbra tolódott, melynek – a jelentési időpontokat is figyelembe véve az értékelés során – nem lehet magyarázata a surveillance rendszer javulása és az esetek gyorsabb bejelentése (Haussig et al., 2018). 2018. november 23-ig bezárólag az Európai Unió tagállamai 1499 humán, autochton esetet jelentettek (Olaszország n=577; Görögország n=309; Románia n=277; Magyarország n=214; Horvátország n=53; Franciaország n=25; Ausztria n=20; Bulgária n=15; Csehország n=5; Szlovénia n=3; Ciprus n=1). Míg az unión kívüli, környező országok összesen 557 esetet regisztráltak (Szerbia n=415; Izrael n=128; Koszovó n=14). Eddig 176 halálesetet tartanak számon, mely 8,56%-os mortalitást jelent. Összehasonlításképpen az Európai Unión belül 2017-ben összesen 204 humán fertőzést erősítettek meg, ami az esetszámban 2018-ban több mint hétszeres növekedést jelent. A humán nyugat-nílusi vírusfertőzések földrajzi eloszlása az 1. ábrán látható. Az európai központba történő jelentéskor kizárólag az adott országhoz tartozó autochton eseteket veszik figyelembe és tüntetik fel a térképen.

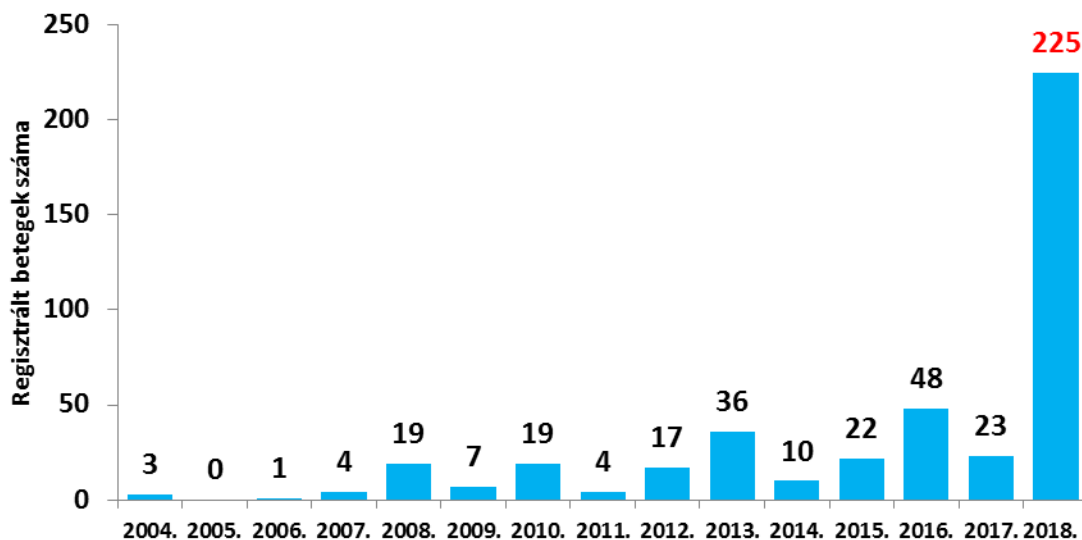




1. ábra A 2018-ban, valamint 2011-2017 között bejelentett humán nyugat-nílusi vírusfertőzések földrajzi eloszlása. A 2018-as járványban érintett területek narancssárga színnel jelöltek. (Forrás: ECDC: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2019-human-cases-compared-previous-seasons-updated-11-july>)

Magyarországon az első nyugat-nílusi láz megbetegedést, a korábbi évek átlagához képest 4-5 héttel korábban igazoltuk, a tünetek kezdeti időpontja a 27. hétre tehető (július 2-8.). A 45. hétig bezárólag összesen 215 autochton és 10 importált esetet azonosítottunk (2. ábra).

Az importált esetek minősítése a betegség kezdeti időpontját megelőző két héten belüli utazási anamnézis alapján történik. Eszerint 2018-ban az alábbi országokból valószínűsíthető a vírusfertőzés behurcolása: Ausztria/Szlovákia (n=1); Belgium (n=1); Horvátország (n=2); Románia (n=2); Szerbia (n=3); Törökország (n=1).



2. ábra A bejelentett autochton és importált nyugat-nílusi vírusfertőzések száma Magyarországon 2004 és 2018 között. (A 2018-as adat a 2018. november 23-ig bezárólag diagnosztizált esetek számát jelzi). A diagramot készítette: Mezei Eszter epidemiológus.

A laboratóriumi alátámasztott esetek területi eloszlását tekintve az ország valamennyi megyéje érintett, legerősebben azonban az alföldi régió. A 2018-as szezonban az egész országra vetített, 100 000 lakosra jutó megbetegedések száma, csak az autochton eseteket figyelembe véve: 2,2‰. A leginkább érintett megyék: Hajdú-Bihar megye (6,2‰); Békés megye (5,3‰); valamint Jász-Nagykun-Szolnok megye (5,1‰). Külön érdekesség, hogy Zala megyében 2018-ban



igazoltunk először humán nyugat-nílusi vírusfertőzést, noha ez nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a vírus már korábbi években is jelen volt a területen.

A 2018-as év laboratóriumi diagnosztikai tapasztalatai:

A laboratóriumiilag diagnosztizált nyugat-nílusi vírusfertőzések laboratóriumi esetminősítéskor (konfirmált vagy valószínűsíthető eset) fontos egy egységes szempontrendszer figyelembevétele. Ezért az esetek definiálásakor az Európai Parlament és Tanács által 2012-ben elfogadott határozatot tekintjük követendőnek (8.8.2012 C(2012) 5538, Brüsszel). Az alábbi feltételek legalább egy pontjának teljesülése szükséges a laboratóriumiilag konfirmált esetminősítéshez:

- A nyugat-nílusi vírus izolálása vérből vagy gerincvelői folyadékból.
- A nyugat-nílusi vírus nukleinsav kimutatása vérből vagy gerincvelői folyadékból.
- Nyugat-nílusi vírus specifikus IgM kimutatása gerincvelői folyadékból.
- Nyugat-nílusi vírus specifikus IgM magas titerének és nyugat-nílusi vírus specifikus IgG ellenanyagoknak kimutatása vérből és megerősítés vírusneutralizációs próbával.

Tehát abban az esetben, ha a vírust valamely más mintatípusból, például vizeletmintából mutatjuk ki, és emellett specifikus ellenanyagválaszt is detektálunk, de – időigénye miatt – a napi rutinban vírusneutralizációs vizsgálattal nem verifikálunk, csak laboratóriumiilag valószínűsített esetminősítés adható.

2018. november 23-ig bezáróan összesen 138 igazolt és 86 valószínűsített esetet diagnosztizált a referencialaboratórium. Szerokonverziót vagy szignifikáns ellenanyag titer emelkedést savópárban az esetek 22%-ában láttunk, ami felhívja a figyelmet a második vérminta beküldésének fontosságára. A beérkező gerincvelői folyadék minták 52%-ánál kaptunk nyugat-nílusi vírus IgM pozitív eredményt.

A betegek átlagéletkora 57,4 év volt (legfiatalabb beteg: 17 éves, legidősebb: 88 éves). A férfiak és nők aránya 57%; illetve 43% volt. A betegek többsége (70,2%) neurológiai tüneteket produkált, 28,9%-uknál az enyhébb lefolyású nyugat-nílusi láz kórforma jelentkezett. A betegek 0,9%-ánál a tünetekre vonatkozóan jelenleg nincsenek vagy csak hiányos adatok állnak rendelkezésre. A betegek 21,8%-ánál alakultak ki kiütések, 4,8%-nál a kiütések mellett neurológiai manifesztáció is fellépett.

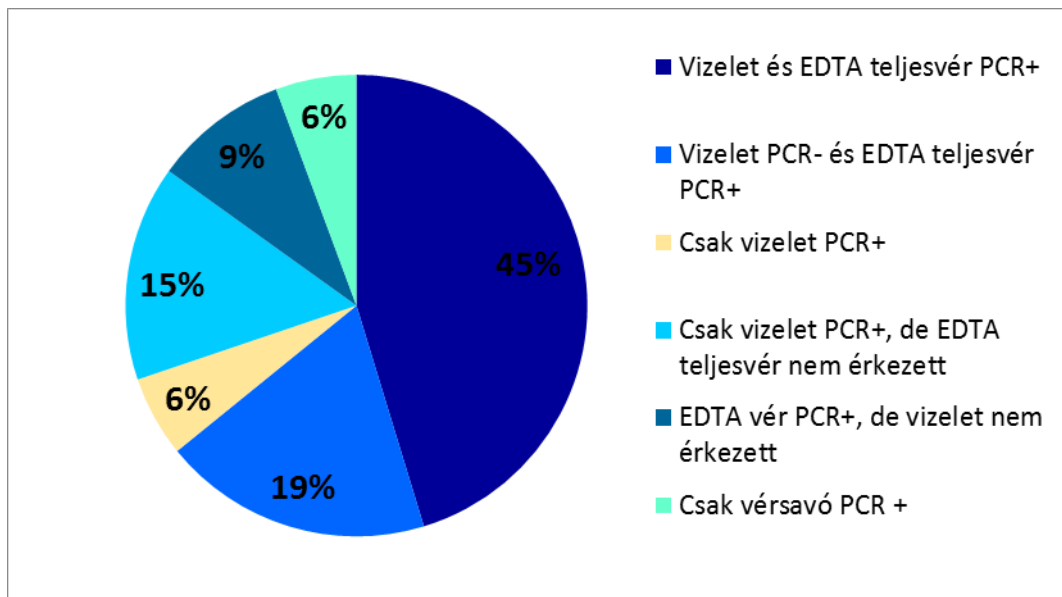
A kiütéses tünetes betegek laboratóriumi vizsgálatára a szezonális időszakban külön érdemes felhívni a figyelmet, mivel nem minden esetben kéri a nyugat-nílusi vírusfertőzés diagnosztizálására irányuló vizsgálatokat. Ezért a Kiütéses vírusbetegségek NRL és a Virális Zoonózisok NRL szoros együttműködést folytat



a WNV szezonális időszakban, annak érdekében, hogy a csak rubeola vagy kanyaró vírusfertőzés gyanúval érkező kiütéses betegeknél, előbbi vírusfertőzésekre nézve negatív eredmény esetén biztosan megtörténjen az aktuális nyugat-nílusi vírusfertőzés kizárására vagy megerősítésére irányuló vizsgálat is. Az együttműködés eredményeképpen 2018. július 1. és október 9. között összesen 69 beteget vizsgált közösen a két laboratórium. A 69 beteg közül egy esetben sem igazolódott aktuális rubeola vagy kanyaró vírusfertőzés, míg 23 esetben (33%) sikerült alátámasztani aktuális vagy közelmúltban zajlott nyugat-nílusi vírusfertőzést.

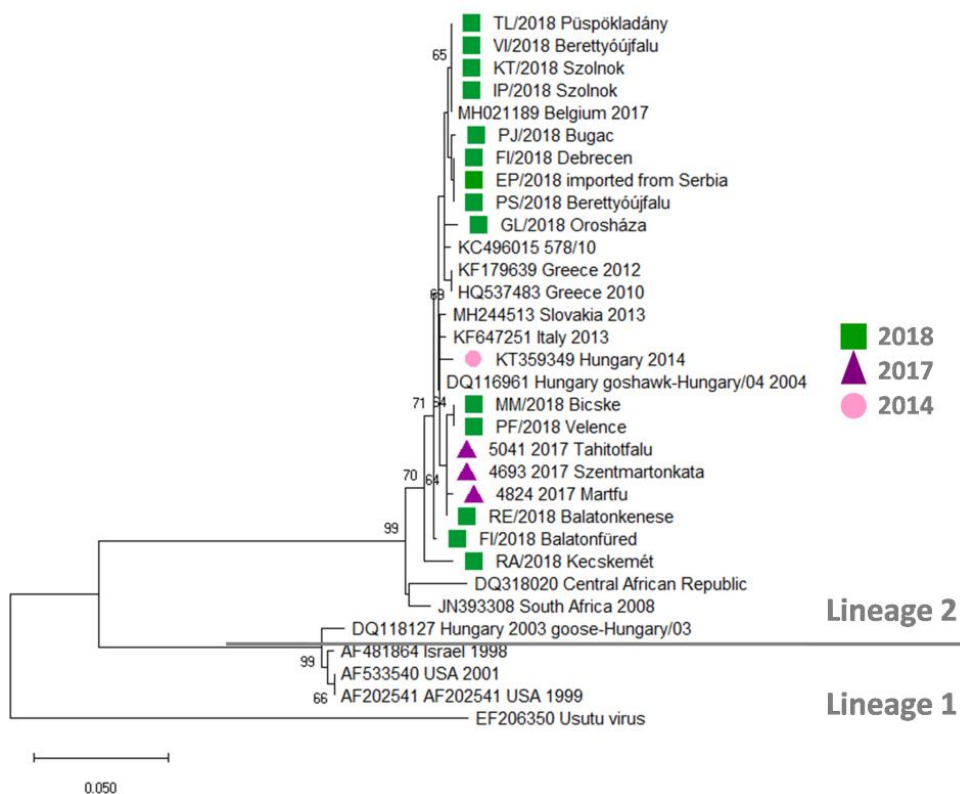
A Flavivirus nemzetség, így a nyugat-nílusi vírusfertőzések rutindiagnosztikájában sokszor kihívást jelent a víruskimutatás, mivel a viraemia rövid ideig áll fenn és többnyire alacsony szintű. Ezért a laboratóriumi diagnosztikát sokáig kizárólag ellenanyag kimutatásra alapozták. Ugyanakkor egy PCR pozitív eredmény segítheti a laboratóriumi eredmények interpretálását, mivel a nemzetségre jellemzőek a szerológiai keresztreakciók, ráadásul az országban a nyugat-nílusi víruson kívül másik két humán patogén flavivirus (Usutu vírus és kullancsencephalitis vírus) jelenléte is ismert. Az ellenanyag kimutatás során tehát fontos a szerológiai keresztreakciók kizárását és esetenként egy potenciális másodlagos flavivirus infekció fennállásának tisztázását megcélzó, körültekintő szemléletmód alkalmazása. Mindezek ellenére is előfordulhat, hogy az eredmények nem teljesen egyértelműek, ilyenkor a víruskimutatás segítheti a véleményezést. A diagnosztika támogatása mellett a víruskimutatás elvégzése a referencialaboratórium járványügyi céllal végzett tevékenységéhez is köthető. A laboratórium feladatai közé tartozik többek között a hazai humán nyugat-nílusi vírusfertőzéseket okozó törzsek azonosítása is, melynek eredményei – egyelőre még nem kötelező jelleggel – jelentésre kerülnek az ECDC felé. A Virális Zoonózisok NRL 2014-ben kezdte el a szerológiailag igazolt vagy valószínűsített nyugat-nílusi vírusfertőzöttek különböző mintáinak PCR vizsgálatát. Ezen betegek mindegyikénél megtörtént a vérsavó, és – amennyiben rendelkezésre állt – a gerincvelői folyadék, valamint a vizeletminták nyugat-nílusi vírus PCR vizsgálata. Az elmúlt négy év eredményeit összegezve vérsavó mintákból összesen 19%-ban, gerincvelői folyadékból pedig a betegek csupán 9%-ánál sikerült a vírust kimutatni. Ugyanakkor vizeletmintából a vizsgált betegek 48%-ánál volt sikeres a víruskimutatás, még úgy is, hogy ez a mintatípus jellemzően – a betegek legalább 50%-ánál – a tünetekhez képest későbbi időpontban került levételre és laboratóriumi vizsgálatra. A vizeletminták bevonása új szemléletet hozott a nyugat-nílusi vírusfertőzések rutindiagnosztikájába (Nagy et al., 2016), eredményeink korreláltak a nemzetközi tapasztalatokkal (Barzon et al., 2015).

2018-ban újabb mintatípus: a teljes vér vizsgálatát céloztuk meg, annak érdekében, hogy jobb eredményeket érjünk el a víruskimutatásban. Az új mintatípus bevezetését arra alapoztuk, hogy egyes publikációk szerint a vírus a vörösvértestekhez asszociáltan lehet jelen, ezért a víruskimutathoz az alakos elemeket is tartalmazó teljes vér alkalmasabb lehet, mint a szérum vagy vérplazma vizsgálata (Lustig et al., 2016). Ehhez EDTA-val kezelt, alvadásgátolt vérminták gyűjtésére volt szükség. A mintatípus a 2018-ban igazolt vagy valószínűsített WNF és WNND betegek 48%-ától érkezett. A PCR pozitív betegek 45%-ánál tapasztaltuk, hogy a teljes vér és vizeletmintából egyaránt kimutatható volt a vírus. Ezzel szemben negatív vizelet PCR eredmény mellett a vírus 19%-ban volt kimutatható teljes vérből. A PCR pozitív betegek 9%-ánál kimutatható volt a vírus teljes vérből úgy, hogy ugyanakkor vizeletminta nem érkezett a betegektől. A PCR eredmények mintatípusonkénti százalékos eloszlását a 3. ábra szemlélteti. PCR vizsgálatot 165 beteg mintájából végeztünk (az összes igazolt vagy valószínűsített eset 74%-a). Összesen 165-ből 53 betegnél (32%) kaptunk PCR pozitív eredményt, melyhez a 2018-as szezon tapasztalatai alapján a teljes vérminták felhasználása jelentős mértékben hozzájárult. A teljes vérminták használata az esetminősítések szempontjából is előnyös, mivel a vírus jelenlétének kimutatása vérből azonnal konfirmálja az aktuális fertőzés fennállását. Mindezek alapján a jövőben javasolt a mintatípus rutindiagnosztikai vizsgálatának folytatása és a klinikus kollégák számára, a mintabeküldésre vonatkozó figyelemfelhívó tájékoztató kiküldése.



3. ábra: A nyugat-nílusi vírus PCR pozitív eredmények megoszlása mintatípusonként. Az összes PCR pozitív beteg száma n=53.

PCR pozitívítás esetén az eredmények verifikálása konfirmáló (nested) PCR vizsgálattal, majd Sanger szekvenálással történik. Jelenleg 53 PCR pozitív beteg közül 49 esetben végeztük el a vírus szekvenálását, mely eredményeképpen minden esetben lineage 2 vírustörzs jelenlétét azonosítottuk (GenBank azonosító szám: MK224611-44). A genom NS3 régiójának 371 nukleotid hosszúságú szakaszának illesztésével készült filogenetikai fa (4. ábra) alapján azt láthatjuk, hogy a 2018-asszekvenciák nagyfokú hasonlóságot mutatnak és a korábbi évekhez képest jelentős eltérés nem tapasztalható.



4. ábra A 2018-as szezon 15 reprezentatív mintájának felhasználásával készült Neighbour-Joining filogenetikai fa (Kimura 2-paraméteres modell, 1000-szeres bootstrap tesztelés). A zöld négyzetek jelölik a 2018-as mintákat; a lila háromszög a 2017-es mintákat; a rózsaszín kör 2014-es mintát jelöl.

A 2018-as szezonális időszakban, Európa-szerte tapasztalt nyugat-nílusi vírus epidémia okainak tisztázása jelenleg is intenzíven foglalkoztatja a téma kutatóit. Egy lehetséges magyarázat, hogy bizonyos klimatikus viszonyok, mint például az áprilisi és májusi magasabb átlaghőmérséklet, valamint a csapadékeloszlás anomáliái kedveztek a vírust terjesztő szúnyogfajok gyors elszaporodásának. A magasabb hőmérséklet emellett fokozhatja a vírusreplikációt, lerövidítve az



extrinsic inkubációs periódus hosszát, mely szintén kedvez a vírustranzmisszióknak (Haussig et al., 2018).

Bár vakcina fejlesztésre már vannak törekvések, emberi felhasználásra alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható oltóanyag egyelőre még nem érhető el. Ezért a nyugat-nílusi vírusfertőzések ellen jelenleg az egyetlen védekezési mód a szúnyogcsípések elkerülése. Ez szúnyoggyérítéssel, repellensek használatával, szúnyoghálók felszerelésével vagy a ház körüli – szúnyogszaporodásnak kedvező – pangó vizek felszámolásával lehetséges, melyre érdemes a vírus szezonális időszakában felhívni a lakosság figyelmét.

Irodalom

- Bakonyi T, Ferenczi E, Erdélyi K, et al. (2013). Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary Microbiology*, 165(1–2), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.005>
- Bakonyi T, Jungbauer C, Aberle SW, et al. (2017). Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges. *Eurosurveillance*, 22(41), 17-00644. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644>
- Barzon L, Pacenti M, Ulbert S, et al. (2015). Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(3), 327–342. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1007044>
- Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, et al. (2013). Flaviviruses in Europe: Complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(11), 6049–6083. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116049>
- Ciota AT, & Kramer LD. (2013). Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus. *Viruses*, 5(12), 3021–3047. <https://doi.org/10.3390/v5123021>
- Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, et al. (2007). Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), 181–188. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0586>
- Epinfo 21. évfolyam 13. szám; 2014 április 04: Előzetes jelentés a Magyarországon előforduló, ízeltlábú vektorok által terjesztett zoonózisok 2013. évi járványügyi jellemzőiről. Epidemiológiai Információs Hetilap; Országos Epidemiológiai Központ
- Haussig J M, Young J J, Gossner CM, et al. (2018). Early start of the West Nile fever transmission season 2018 in Europe. *Eurosurveillance*, 23(32), 1–6. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.32.1800428>
- Haye EB, Sejvar JJ, Zaki SR, et al. (2005). Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1174–1179. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289b>
- Hubálek Z, & Halouzka J. (1999). West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 643–650.



- <https://doi.org/10.3201/eid0505.990506>
- Kemenesi G, Dallos B, Oldal M, et al. (2014). Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia unguiculata* mosquito, Hungary. *Virus Disease*, 25(4), 500–503. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0234-8>
- Kleinschmidt-DeMasters BK. (2004). Naturally Acquired West Nile Virus Encephalomyelitis in Transplant Recipients. *Archives of Neurology*, 61(8), 1210–1220. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.8.1210>
- Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnár Z, et al. (2008). West Nile Virus Infections in Hungary, August–September, 2008. *Eurosurveillance*, 13(45), 13–15. <https://doi.org/10.2807/ese.13.45.19030-en>
- Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, et al. (2011). Equine Encephalomyelitis Outbreak Caused by a Genetic Lineage 2 West Nile Virus Hungary. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(3), 586–591. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0715.x>
- Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al. (2003). Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002. *New England Journal of Medicine*, 349(13), 1236–1245. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030969>
- Ludlow M, Kortekaas J, Herden C, et al. (2016). Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathologica*, 131(2), 159–184. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1511-3>
- Lustig Y, Mannasse B, Koren R, et al. (2016). Superiority of west nile virus RNA detection in whole blood for diagnosis of acute infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(9), 2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.01283-16>
- McMullen AR, Albayrak H, May FJ, et al. (2013). Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *Journal of General Virology*, 94, 318–325. <https://doi.org/10.1099/vir.0.046888-0>
- Murray K, Walker C, Herrington E, et al. (2010). Persistent Infection with West Nile Virus Years after Initial Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(1), 2–4. <https://doi.org/10.1086/648731>
- Nagy A, Bán E, Nagy O, et al. (2016). Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Archives of Virology*, 161(7), 1797–1806. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2844-5>
- Nagy A, Nagy O, Bán E, et al. (2017). A nyugat-nílusi vírus kimutatása humán betegmintákból: nyomon követéses vizsgálatok a 2015. évi szezonális időszakban. *Orvosi Hetilap*, 158(20), 791–796. <https://doi.org/10.1556/650.2017.30760>
- Pachler K, Lebl K, Berer D, et al. (2014). Putative new west nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(12), 2119–2122. <https://doi.org/10.3201/eid2012.140921>
- Papa A. (2017). Emerging arboviral human diseases in Southern Europe. *Journal of Medical Virology*, 89(8), 1315–1322. <https://doi.org/10.1002/jmv.24803>
- Petersen LR, Brault AC, Nasci RS, et al. (2013). West Nile Virus : Review of the Literature. *Jama*, 310(3), 308–315. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.8042>
- Szomor K, Rigó, Z, Bán E, et al. (2011). Serologic evidence of West Nile virus infection in patients with exanthema in Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58(2), 157–167. <https://doi.org/10.1556/AMicr.58.2011.2.8>



Magyarországon előforduló, klinikai mintákból származó nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* izolátumok teljes genom szekvenálásának eredményei

Henczkó Judit, Tóth Ákos, Magyar Nóra, Balázs Andrea, Tóth Szilárd, Pályi Bernadett, Erdősi Tímea, Hegedűsné Richter Zsuzsa, Kis Zoltán

Nemzeti Népegészségügyi Központ, Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály

Bevezetés:

A *Vibrio cholerae* Gram-negatív baktérium, a *Vibrionaceae* család tagja. A kórokozót először Robert Koch írta le 1884-ben, Indiában. A kolera jelenleg az egyetlen olyan ismert kórokozó baktérium a bolygón, amely pandémiás. A fertőző betegségek mortalitási adatait tekintve még ma is vezető szerepet tölt be globálisan. Becslések szerint évente 120000 ember hal bele még napjainkban is kolera okozta megbetegedésbe.

Az O szomatikus antigén alapján, ma körülbelül 206 szerocsoportot különböztetünk meg, melyek között jellemző a nagyfokú genetikai diverzitás. A toxintermelő *Vibrio cholerae* O1 és az O139 Bengal szerocsoportok képesek nagykiterjedésű járványokat okozni, a koleratoxin (CT) és a toxin-koregulált pilus (TCP) expressziójának köszönhetően. Az eltérő toxinokat (például zonula occludens toxint, akcesszórikus kolera enterotoxint, cholix toxint, stb.) vagy toxinokat nem termelő szerocsoportokat nevezzük nem-O1/O139 szerocsoportoknak. Történelmileg az O1 és O139 szerocsoportokat tekintik koleratoxin (CT) termelőnek, de egyre több közlemény jelenik meg koleratoxint expresszáló egyéb szerocsoportokkal összefüggésben is (pl.: O75, O141, stb.) (Dutta et al. 2013).

A kolera évezredekken keresztül okozott epidémiát, majd 1817-ben vált pandémiássá. Az első hat pandémiát a klasszikus biotípusba sorolt *Vibrio cholerae* O1 okozta, jelenleg a hetedik pandémia zajlik, amelyet a *Vibrio cholerae* O1 El-Tor biotípusa okoz. Az El-Tor járvány 1961-re vált pandémiássá. A Bengáli-öbölben 1992-ben kitört kolera járványt a *Vibrio cholerae* O139 Bengal okozta, amely az El-Tor-ból, antigén shift (antigéncsuszamlás, antigenic shift) következtében alakulhatott ki és gyorsan kezdett terjedni a *Vibrio cholerae* O1 szerocsoportnak relatíve ellenálló populációban. Egyes kutatók szerint a *Vibrio cholerae* O139 Bengal olyan tulajdonságokkal rendelkezik (például a toktermelés képessége), amelyek a közeljövőben lehetővé teszik pandémiássá válását (Ramamurthy et al. 2016). A *Vibrio cholerae* O139 Bengal törzsek között



előfordulnak multirezisztencia (MDR) plazmidot hordozók is. A történelmi feljegyzésekből tudjuk, hogy a korabeli szakértők a *Vibrio cholerae* O1 El-Tor-t és a *Vibrio cholerae* O139 Bengal-t is apatogénnek tartották, amíg nem okoztak nagyobb kiterjedésű járványokat. Ezek az esetek jól példázzák, hogy igen érzékeny a határ a patogenitási tulajdonságok tekintetében, hiszen szelektív nyomás hatására, pl. horizontális géntranszfer révén a baktériumok rendkívül gyorsan képesek adaptálódni környezetükhöz. **Hazánkban a negyedik kolera pandémia idején**, 1872-1873-ban volt utoljára súlyos kolerajárvány, melynek kapcsán több mint 300000 megbetegedést jegyeztek le és több mint 100000 beteg belehalt a fertőzésbe. Napjainkban a fejlett országokban sikerült visszaszorítani a 'klasszikus' tünetekkel járó kolera okozta megbetegedéseket, a higiénés körülmények javításával, többek között a csatornahálózatok fejlesztésének és a modern víztisztítási technológiák elterjedésének köszönhetően.

Jellemző klinikai kép:

A *Vibrio cholerae* O1/O139 szerocsoportok által okozott megbetegedés a klasszikus értelemben vett kolera, amely egy heveny enterális megbetegedés. Az infektív dózis jellemzően 10^3 - 10^8 CFU között változik, a betegek általános egészségi állapotától függően. A viszonylag magas infektív dózis ellenére a kolera rendkívül fertőző, mivel a beteg széklete nagy csíraszámban tartalmazza a kórokozót. A lappangási idő néhány órától 5 napig terjed. A kórokozó a vékonybélben toxinjai révén fejt ki hatását. A vezető tünet a vizes, rizslé-szerű hasmenés, amely a bélhámsejtek víz-és ionszekréciójának jelentős növekedése miatt alakul ki. A só-és folyadékvesztés elérheti a napi 15-25 litert is. A hasmenést hányás is kíséri. A fejlődő országokban akár az esetek 50%-a lehet halálos kimenetelű az időben megkezdett adekvát terápia hiányában.

A *Vibrio cholerae* nem-O1/O139 szerocsoportok által okozott megbetegedések rendkívül változatos módon manifesztálódhatnak a behatolási kaputól függően. Nem rendelkezünk pontos adatokkal a lappangási idővel és az infektív dózissal kapcsolatban. A nem-O1/O139 szerocsoportok patogenitási mintázatuktól függően képesek gastroenteritist okozni, amely az esetek többségében önkorlátozó. Az infekció lehet tünetszegény, de akár súlyos profúz - sőt akár rizslé-szerű-hasmenéssel járó megbetegedés is. Az extraintestinalis infekciók esetében jellemzően a behatolási kapu közelében alakul ki **gyulladás** (fül-, seb-, lágyrész-, urogenitális, és- szemfertőzések, de előfordulnak központi idegrendszert érintő súlyos infekciók is), ugyanakkor immunszupprimált egyéneknél, főképp májbetegségben jelentős a kockázata a sepsis kialakulásának.



Vibrio cholerae diagnosztikája:

A diagnosztika „gold standard”-je még ma is a tenyésztés. A WHO előírásainak megfelelően, **minden** olyan Gram-negatív, oxidáz pozitív, 5% birkavért tartalmazó agaron béta-hemolízist mutató, szacharóz- pozitív baktériumot, amelynek mikroszkópos képe hajlott vessző-szerű, tovább kell vizsgálni *Vibrio cholerae* irányában. A szelektív tenyésztéshez TCBS (Tioszulfát citrát-epesó- szacharóz agar) lemezt, valamint lúgos peptonvizes dúsítást párhuzamosan kell alkalmazni. A TCBS-en jellemzően 24 órás inkubációt követően közepes-nagyméretű sárga telepek jelennek meg, amelyek jellemzően fényesek és domborúak, de bizonyos esetekben szárazak és gyűrtek is lehetnek, például a *Vibrio cholerae* O1 Ogawa szerotípus esetében. A tenyészetet minden esetben tárgylemez-agglutinációval, diagnosztikus *Vibrio cholerae* savóval meg kell vizsgálni. A nagyműszeres diagnosztika, például a MALDI-TOF MS (Mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria) elterjedése lehetővé teszi a gyors, költséghatékony azonosítást, ugyanakkor segítségével sem lehet biztonságosan elkülöníteni a bejelentésre kötelezett *Vibrio cholerae* törzseket, az alacsony patogenitású, vagy esetenként apatogén (környezeti) törzsektől. Amennyiben a különböző törzsek tömegspektrumait szeretnénk összehasonlítani, érdemes a direkt átvitel helyett a trifluór ecetsav (TFA), vagy etanol-acetonitril extrakciót alkalmazni.

Genom jellemzők és patogenitási tulajdonságok nem- O1/O139 szerocsoportok esetén:

A *Vibrio cholerae* genomja két cirkuláris kromoszómába rendeződik, mérete 3,9-4,2 megabázis pár. Számos esetben írtak le plazmid hordozást is és antibiotikum rezisztencia plazmid hordozás is ismert (Ceccarelli et al. 2017). A koleratoxint (*ctxAB*, CT) a CTX ϕ bakteriofág hordozza, amely a kromoszómá(k)ba integrálódva jellemzően több kópiában található a genomban. Ez egy tipikus kétkomponensű (AB-típusú), *ctxA*, *ctxB* (kolera-toxin A és B alegysége), ADP-riboziláló toxin, mely az ETEC (enterotoxikus *Escherichia coli*) izolátumokban az LT-nek (hőlabilis enterotoxin) felel meg. A toxin-koregulált pilus (*tcpA*, *tcpI*, TCP) a vibrio patogenitási sziget 1-en (VPI-1) kódolt, hatására például a vékonybél kolonizációja során mikrokolóniák (aggregátumok) jönnek létre (együtt működve a quorum sensing és a T3SS rendszerrel), amely lehetővé teszi a gyors-és hatékony inváziót. A *toxR* regulon a TCP-t szabályozza, hiányában az adott törzs kolonizációs képessége jelentősen csökken.



A nem-O1/O139 szerocsoportok általában nem termelnek koleratoxint, de esetenként előfordulhat a *ctxA*, *ctxB* és *tcpA* és *tcpI*, *toxR* gének hordozása pl. O75, O141 szerocsoportokban. (Dutta et al. 2013). A *zot* (zonula occludens toxin), *ace* (akcesszórius kolera enterotoxin) szintén a CTX ϕ fagon kódoltak és főként enterális tüneteket okozhatnak, de a zonula occludens toxint expresszáló törzsek azonosítása extraintestinalis infekciókból (pl. fülgyulladásból) fontos, mivel ismert ezen törzsek neurotropizmusa.

A patogenitás mértékét a patogenitási mintázatok jellemzésével lehet csak meghatározni, amely megítélése rendkívül nehéz annak ellenére, hogy egyre több publikáció jelenik meg a témában. A szakirodalmi adatok alapján jelentős patogén markereknek minősülnek: a *hlyA* (hemolizin A), a MARTX (repeat in toxin), jellemzően jelen van minden nem-O1/O139 szerocsoportban és citotoxikus, valamint hemolitikus tulajdonságú toxin. Hatását az *rtxC* (aktivátor) és *rtxBD* (transzporter) jelenléte befolyásolja. 2007-ben azonosították a diftéria-toxin csoportba tartozó mono-ADP-riboziláló faktort, a cholix toxint (*chxA*), amely hasonlóan a diftéria toxinhoz, az EF2-t (eukarióta elongációs 2 faktor) ribozilálja. Jelenlegi tudásunk szerint inkább az enterális infekciókban lehet szerepe. A szekréciós rendszerek közül, a 3-as típusú szekréciós rendszer (T3SS) kiemelkedő jelentőségű a patogenitás szempontjából, ugyanakkor hiányában sem tekinthető egy izolátum apatogénnek. A 6-os típusú szekréciós rendszer általában megtalálható minden izolátumban, de a hordozott gének száma és lokalizációja jelentősen eltérhet a különböző izolátumokban. A hőstabil enterotoxin (*stn*, NAG-ST)- amely az ETEC izolátumok ST-nak (hőstabil enterotoxin) felel meg egyértelmű markere a patogén izolátumoknak. A speciesre jellemző quorum sensing a gazdaszervezet inváziójában elengedhetetlen. A *hapA* (hemagglutinin/proteáz A) egy Zn-dependens metalloproteáz, a *nanH* (neuraminidáz H) a feltételezések szerint szinergikus hatású a koleratoxinnal, sokkal súlyosabb megbetegedés alakulhat ki a jelenlétében, mivel növeli a koleratoxin kötődését és penetrációját az enterocytákba. A bőr nekrotizáló (dermonecrotic/dermotoxin) toxin jelenléte is szignifikáns az izolátumokban (Siriphap et al.2017).

1. táblázat Nem-O1/O139 szerocsoportokban jellemző patogén markerek

Nem-O1/O139 <i>Vibrio cholerae</i> patogén izolátumokban asszociált patogén markerek		
	Megnevezés	Hatása/jelentőség
<i>hlyA</i> (hemolizin A)	hemolizin A	pórus- formáló toxin, hemolitikus aktivitás, kardiotoxicitás, citotoxicitás és enterotoxicitás
MARTX (multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin) citotoxin	repeat in toxin	pórus-formáló toxin, antifagociter hatás, citotoxicitás, gyulladásos reakció gátlása
<i>chxA</i> (cholix toxin)	cholix toxin	enterális infekcióban lehet szerepe egyéb virulencia faktorokkal együttesen fejt ki hatását.
<i>stn</i>	hőstabil enterotoxin	enterális infekcióban van szerepe
<i>hapA</i>	hemagglutinin/proteáz A	Zn-dependens metalloproteáz
<i>nanH</i>	neuraminidáz H	szinergikus hatása a koleratoxinnal enterális infekcióban
Dermonecrotic/dermotoxin	bőr nekrotizáló toxin	bőr nekrózis, valamint általános toxin hatás
T3SS	3-as típusú szekréciós rendszer	kulcsvirulencia nem-O1/O139 <i>Vibrio cholerae</i> törzsekben, gazda invázió, citotoxicitás
T6SS	6-os típusú szekréciós rendszer	
VPI-1	vibrio patogenitási sziget 1	A toxin- koregulált pilust (<i>tcpA</i> , <i>tcpI</i>) kódolja, az akcesszórius kolonizációs faktort (ACF), valamint a <i>ToxT</i> és <i>TcPH</i> virulencia regulátorokat
VPI-2	vibrio patogenitási sziget 2	P4-szerű integráz, kromozómális inszerció a tRNS szerin (VC1757.1) lókuszon, amelyet ismétlődések határolnak és markere minden ismert patogén kolera izolátumnak
VSP-1	vibrio hetedik pandémia patogenitási sziget 1	Csak az El-Tor és O139 törzsekben fordul elő, 11 gént hordoz, ebből 7 gén hipotetikus fehérjét kódol.
VSP-2	vibrio hetedik pandémia patogenitási sziget 2	26 gént hordoz, amelyből 7 csak El-Tor és O139 törzsekben fordul elő.



Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok:

A EUCAST-nak jelenleg nincs ajánlása a *Vibrionaceae* család antibiotikum érzékenységének meghatározásához. Az eredmények értékelését az *Enterobacterales* határértékeinek felhasználásával ajánlott végezni. A CLSI is csak származtatott cut-off értékeket ad meg. A szakirodalomban sok esetben láthatjuk, hogy az *in vitro* vizsgálatokban érzékenynek kiadott izolátumok esetében is sokszor van szükség a terápia módosítására. A probléma feloldásához mindenképpen szükséges egy ajánlás kidolgozása, amely felváltja a származtatott határértékek alkalmazását. Számos olyan szerocsoport ismert, ahol változatos rezisztencia mechanizmus került korábban leírásra és előfordulnak MDR (multidrog rezisztens) izolátumok is.

Napjainkban *Vibrio cholerae* okozta megbetegedés rendkívül ritka Magyarországon. Ennek ellenére, a tavalyi évben négy, extraintestinalis megbetegedésből származó klinikai izolátum érkezett megerősítésre a Nemzeti Népegészségügyi Központ (korábban Országos Közegészségügyi Intézet), Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály, Nemzeti Biztonsági Laboratóriumába *Vibrio cholerae* gyanújával. Két izolátum középfülgyulladásból, egy szepszisből és egy petefészek gyulladástól származott. Az előzetes vizsgálataink alapján, a négy izolátum *Vibrio cholerae* nem-O1/O139 szerocsoportba tartozott és egyik izolátumban sem voltak kimutathatók a koleratoxin termelésért felelős gének, azaz nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* okozta megbetegedésekről volt szó. A betegek anamnézisében ismert epidemiológiai kapcsolat, valamint releváns utazási anamnézis nem szerepelt, így **feltételezhető, hogy autochton megbetegedések fordulnak elő Magyarországon.** Mivel Magyarországon rendkívül szokatlanok a nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* okozta infekciók, így előkészítettük az izolátumokat teljes genom szekvenálásra. A szekvencia adatok elemzése során megállapított patogenitási mintázatok alapján, szeretnénk felhívni a figyelmet a potenciálisan Magyarországon is előforduló *Vibrio cholerae* nem-O1/O139 okozta fertőzések jelentőségére.

A fertőző betegségek és a járványok megelőzése érdekében szükséges járványügyi intézkedésekről szóló 18/1998. (VI. 3.) NM rendeletben meghatározottak szerint csak a *Vibrio cholerae* O1 és O139 szerocsoportok által okozott megbetegedések bejelentendők.

Anyag és módszer

Molekuláris megerősítő vizsgálatok

Az elsődleges izoláló diagnosztikai laboratóriumok a megerősítésre beérkezett 4 izolátumot MALDI-TOF MS és klasszikus mikrobiológiai módszerrel is identifikálták. Mivel a MALDI-TOF, valamint a klasszikus mikrobiológiai



módszerek segítségével nehéz elkülöníteni a magas patogenitású O1/O139 törzseket az alacsonyabb patogenitású/apatogén nem-O1/O139 törzsektől, így azonnal felvették a kapcsolatot a Nemzeti Népegészségügyi Központ, Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály Nemzeti Biztonsági Laboratóriumával (NBL). A beérkezést követően a nemzetközi előírásoknak megfelelően, azonnal megkezdtek a molekuláris biológiai vizsgálatokat, amelyek kizárják/ megerősítik a *Vibrio cholerae* O1/O139 jelenlétét az izolátumokban. A species szintű azonosításhoz az *ompW* (külső membrán fehérje) génre tervezett kereskedelmi forgalomban kapható, PrimerDesign (Primerdesign Ltd, Southampton, Egyesült Királyság) valós idejű PCR-t (polimeráz láncreakció) használtunk, amely mind a négy esetben pozitív eredményt adott. Ez a PCR képes elkülöníteni a *Vibrio cholerae*-t például a *Vibrio mimicus*-tól, vagy az invazív, magas mortalitású *Vibrio vulnificus*-tól, ugyanakkor nem képes diszkriminálni a szerocsoportok között. A toxintermelő törzsek azonosításában a kulcs a virulencia gének vizsgálata, a *ctxA* (koleratoxin A alegységének génje) és a *ctxB* (koleratoxin B alegységének génje) gének kimutatása szükséges, amely a NBL-ban az ezen génekre tervezett *in house* PCR segítségével történt.

Teljes genom szekvenálás

A minták előkészítése, teljes genom szekvenálása, valamint az adatok bioinformatikai elemzése, a Nemzeti Népegészségügyi Központban készült és a szerzők saját szellemi tulajdonát képezi.

Mintaelőkészítés:

A törzsek tárolása -20°C -on történt. A szekvenálást megelőző tenyésztést 5% birkavért tartalmazó agaron, valamint lemezagaron végeztük, 37°C -on, majd 24 órás inkubációt követően ellenőriztük a tenyészetek tisztaságát. A lemezagarról felvett kacsnyi tenyészetet $1000\ \mu\text{l}$ PCR tisztaságú vízbe helyeztük, majd 30 percen át 55°C -on inaktiválást végeztünk. A szuszpenzióból $200\ \mu\text{l}$ kiindulási mintát használtunk a DNS izoláláshoz.

DNS izolálás:

A DNS izolálást Qiagen DNA Mini Kit (Qiagen, Németország) alkalmazásával végeztük, a gyártó leírását követve. A DNS izolálást követően ellenőriztük a mintákban lévő DNS mennyiségét Qubit (ThermoFisher, USA) alkalmazásával.

Teljes genom szekvenálás Illumina Miseq2000 platformon:

A könyvtárkészítéshez az Illumina Nextera Flex Library Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), a szekvenáláshoz az Illumina MicroKit (Illumina

Inc., San Diego, CA, USA) került felhasználásra, követve a gyártó által megadott protokollt. A szekvenálást a Nemzeti Népegészségügyi Központ saját, Illumina Miseq2000 készülékén végeztük. A nyers szekvencia adatok elemzéséhez a GATK (Genome Analysis Toolkit) bioinformatikai elemző sémáját vettük alapul, természetesen az igényeinknek megfelelően alakítva. A draft genomok feltöltésre kerülnek a NCBI adatbázisába.

Eredmények:

Molekuláris vizsgálatok eredményei:

A *ctxAB* gén jelenléte mind a 4 esetben kizárható volt. További megerősítő identifikálást is végeztük *in house* *Vibrio* genusra tervezett multiplex PCR alkalmazásával. A molekuláris vizsgálatok eredménye alapján a 4 izolátum *Vibrio cholerae* nem-O1/O139-nek bizonyult (2. táblázat).

2. táblázat Nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* izolátumok molekuláris megerősítő vizsgálatának eredményei

Minták	Molekuláris megerősítő vizsgálatok eredményei			
	<i>ompW</i>	<i>ctxA, ctxB</i>	<i>Vibrio</i> multiplex genus	16S rRNS (Sanger szekvenálás)
1.	Pozitív	Negatív	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
2.	Pozitív	Negatív	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
3.	Pozitív	Negatív	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
4.	Pozitív	Negatív	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

A nyers szekvencia adatok (raw readok) minőség ellenőrzését a FastQC program segítségével végeztük. A species szintű identifikáláshoz kmer alapú azonosítást alkalmaztunk a nyers szekvencia adatok felhasználásával (KmerFinder). A nyers szekvencia adatokat (raw reads) *de novo* szereltük össze a SPADES 3.11.1 verziószámú program használatával. Az annotációt először RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), majd PROKKA programok segítségével végeztük. A különböző programok használatára azért van szükség, mert eltérő algoritmus alapján végeznek predikciót, ezért lehetnek, így akár lényeges eltérések is az eredményekben. A SPADES és PROKKA elemzések összefoglalt eredményei a 3. táblázatban találhatóak.

3. táblázat nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* draft genomok általános adatai

Nem-O1/O139 <i>Vibrio cholerae</i> izolátumok draft genom adatai				
	1	2	3	4
Draft genom mérete (bázispár)	3994328	4063258	4045116	4040306
Contigok száma (PROKKA adatokból)	70	94	107	170
GC tartalom %	47,7	47,4	47,2	47,4
Contig N50	325978	303180	181234	126117
CDS (prediktált fehérjét kódoló gén)	3575	3552	3559	3572
Gének (annotált gén)	1936	1945	1919	1909
tRNS	81	76	83	81
rRNS	0	0	0	0
CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)	0	0	7	2

Az összeszerelt szekvencia adatokból MLST (multilókusz szekvencia tipizálás) készült. A módszer a vizsgált háztartási gének allél variánsai szerint sorolja szekvencia típusokba a különböző izolátumokat. Hét háztartási gén vizsgálatát alkalmaztuk az elemzés során, Octavia és mtsai módszere alapján: *adk*, *gyrB*, *metE*, *mdh*, *pntA*, *purM*, és *pyrC*. Az MLST adatok beküldése, valamint az új allélvariánsok felvétele megtörtént (4-es táblázat) a *Vibrio cholerae* MLST adatbázisba (<https://pubmlst.org/vcholerae>). Az MLST mintázatok alapján, a négy izolátum különböző szekvencia típusba tartozik és csupán az 1-es számú izolátum szekvencia típusa szerepelt korábban is az adatbázisban.

4. táblázat Nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* izolátumok MLST eredményei

Nem-O1/O139 <i>Vibrio cholerae</i> MLST eredmények								
Minták	<i>adk</i>	<i>gyrB</i>	<i>mdh</i>	<i>metE</i>	<i>pntA</i>	<i>purM</i>	<i>pyrC</i>	ST
1	2	44	11	64	3	8	43	438
2	53	36	14	154	78	1	257*	új ST
3	129*	33	103	324*	184*	126*	140	új ST
4	2	36	159*	325*	18	127*	178	új ST

További érdekesség, hogy az adatbázis átvizsgálása közben találtunk 1 olyan klinikai izolátumot (ST501), amelyet 2017-ben töltöttek fel Németországból. Az adatok alapján a beteg hazánkban fertőződhetett meg és Németországban diagnosztizálták fülgyulladásal még 2012-ben.

A releváns patogenitási tulajdonságok további vizsgálatához saját összeállítású virulencia adatbázist hoztunk létre és összehasonlító elemzéseket végeztünk a RAST és PROKKA annotációk ellenőrzéseként. A szerocsoport specifikus gének vizsgálata (a pandémiás EL-Tor törzsre jellemző *rfbV* gén, valamint O139-re jellemző *wbfZO139*) szekvencia összehasonlítása megtörtént (5. táblázat).

5. táblázat Jelentős virulencia gének előfordulása a vizsgált genomokban

Jelentős virulencia gének <i>Vibrio cholerae</i> izolátumokban								
Minták	<i>ctxAB</i>	<i>tcpA/tcpI</i>	<i>ace</i>	<i>zot</i>	<i>toxR</i>	<i>toxS</i>	<i>rfbV</i>	<i>wbfZO139</i> (szekvencia homológia,%)
1.	-	-	-	-	-	-	-	96%
2.	-	-	+*	+	+	+	-	97%
3.	-	-	-	-	-	-	-	97%
4.	-	-	-	-	-	-	-	97%

Megjegyzés: **ace* annotáció során használt programokkal eltérő eredmény született: pozitív RAST, ugyanakkor a PROKKA és saját adatbázis szerint nem található a genomban.

A 2-es izolátum olyan virulencia géneket (*ace**, *zot*, *toxS*, *toxR*) hordoz, melyek általában a CTX ϕ fágon kódoltak. A fágokra jellemző szekvenciák jelenlétét PHAST programmal ellenőriztük, és az eredmények szerint az izolátumban csak KSF_1 ϕ fág található, de a CTX ϕ nem. Az *rtxA*, *chxA* mindegyik izolátumban kimutatható. A kolerára jellemző patogenitási szigetek közül, a VPI-1-en kódolt a patogenitás szempontjából másik kulcsgénnek tartott *tcp* egyik izolátumban sem

volt kimutatható. Ennek ellenére 3 izolátum rendelkezik VPI-1-n és VPI-2-n kódolt géekkel. A species esetében kiemelkedő patogenitási tulajdonság a gazda inváziójában kulcsszerepet betöltő quorum sensing rendszer mindegyik izolátumban kimutatható. A szekréción rendszer közül a 3-as típusú szekréción rendszert saját készítésű adatbázissal vizsgáltuk, a 6-os típusú szekréción rendszert pedig T6SS predictor program segítségével (6. táblázat).

6. táblázat Szekvenca elemzések során kapott, nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* izolátumokra jellemző jelentős virulencia gének eredményei

Nem-O1/O139 <i>Vibrio cholerae</i> jelentős patogenitási markerek eredményei										
Minták	<i>hlyA</i>	<i>rtxA</i>	<i>chxA</i>	<i>stn</i>	VPI1	VPI2	T3SS	T6SS	<i>hapA</i>	<i>nanH</i>
1.	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
2.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3.	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
4.	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-

Antibiotikum rezisztencia gének jelenléte:

A szerzett antibiotikum rezisztencia tulajdonságokat az annotációhoz használt programokon kívül a CARD programmal ellenőriztük. Az *in vitro* vizsgálatokban az izolátumok érzékenyek voltak minden vizsgált antibiotikum csoportra (EUCAST, *Enterobacterales* ajánlás), ugyanakkor két beteg anamnézisében láttuk, hogy az antibiotikum terápia módosítására volt szükség a nem múltó tünetek miatt. Az eredmények rámutattak, hogy fluorokinolon rezisztenciára utaló, a *gyrA* (DNS giráz, mutáció: S83I és D87N), valamint *parC* (Topoizomeráz IV alegység A, mutáció: S85L) és *parE* (Topoizomeráz IV, mutáció: D420N) géneket érintő mutációk vannak jelen a mintákban. Eredményeink teljes mértékben korrelálnak a nemzetközi adatokkal és megerősítik az új határértékrendszer kidolgozásának szükségességét.

Összegzés:

Globálisan a figyelem az O1/O139 nagy járványokat okozó szerocsoportokra irányul, ugyanakkor a *Vibrio cholerae* nem-O1/O139 szerocsoportok által okozott megbetegedések emelkedő tendenciát mutatnak világszerte (Dutta et al. 2013). Az európai adatok tekintetében is jelentős esetszám emelkedés figyelhető meg az utóbbi években, de fontos megjegyezni, hogy mivel jelenleg nem kötelezően bejelentendő megbetegedésekről van szó, így a publikált esetek csak a jéghegy csúcsát jelentik. Jellemzően a tenger-és óceánpartok mentén elhelyezkedő



országok érintettek, mivel a tengerek és óceánok felszíni hőmérséklete kritikus emelkedést mutat az utóbbi években, amely kedvez a *Vibrio* spp. megjelenésének. A szárazföldi területeken jellemzően a hőhullámoktól, valamint a csapadékhiánytól sújtott években szignifikáns az esetszám növekedés. Ausztriában például több olyan eset is ismert, ahol bizonyíthatóan ausztriai édesvízű tavakban történő fürdözést követően alakult ki megbetegedés (Hirk et al. 2016; Le Roux et al. 2016; Huhulescu et al. 2007). Austin és munkatársai 2017-ben, a nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* okozta infekciókat a klímaváltozás egyértelmű barométereinek nevezték, ami sajnos egyáltalán nem nevezhető költői túlzásnak, tekintve, hogy pl. hazánkban 2018-ban mérték 100 éve a legalacsonyabb vízállásokat.

Magyarországi adatok tekintetében Ralovich és munkatársai 1979 és 1981 közötti időszakban, kilenc, nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* törzset izolált a Balaton vizéből, amelyek ugyan nem expresszáltak koleratoxint, ugyanakkor egerek talpába oltva lokális nekrozis alakult ki, szopós egerekbe oltva pedig az állatok pusztulását okozták. A mi figyelmünket 2018-ban keltette fel a *Vibrio cholerae*, amikor is bevezetésre került laboratóriumunkban egy *Vibrio* genusra tervezett *in house* multiplex PCR (polimeráz láncreakció). A módszer validálása során revízió alá vontuk az Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Gyűjteményében (HNCMB) található, pontos taxonómia besorolással nem rendelkező *Vibrio* sp. törzset és egy 1973-ban beküldött, komáromi szennyvízből származó környezeti izolátumról bebizonyosodott, hogy koleratoxin géneket nem hordozó *Vibrio cholerae*. Ezt a törzset a korabeli technológiai szinten nem lehetett pontosan azonosítani, ugyanis olyan biokémiai tulajdonságokkal rendelkezett, amelyek nem feleltek meg az 1973-ban elfogadott *Vibrio cholerae* esetdefiníciónak.

Magyarországon a 2018-ban 4 esetben került izolálásra nem-O1/O139 *Vibrio cholerae*, különböző klinikai mintákból. Utazási anamnézis egyik esetben sem ismert, amely feltételezi, hogy autochton megbetegedésekről van szó. A *Vibrio cholerae* MLST adatbázis átvizsgálása során is találtunk egy hazánkhoz köthető megbetegedést 2012-ből, amely megerősíti azt a tényt, hogy Magyarországon is jelen vannak és minden kétséget kizáróan képesek humán megbetegedéseket okozni a *Vibrio cholerae* nem-O1/O139 szerocsoportú törzsek. A vizsgált izolátumok közül, a 2-es számú mindenképpen figyelemre méltó, ugyanis hordozza az *ace**, *zot*, *stn* (NAG-ST), *rtxA*, *chxA*, *hapA* és *nanH* géneket, ugyanakkor nem hordozza a 3-as típusú szekréciós rendszer génjeit.

Munkánk során elsőként Magyarországon, teljes genom szekvenálással jellemeztünk klinikai mintákból származó, hazánkban előforduló *Vibrio cholerae* nem-O1/O139 izolátumokat. Az MLST eredmények szerint az izolátumok eltérő szekvencia típusba tartoznak, amely megerősíti azt a tényt, hogy hazánkban genetikailag eltérő populációi vannak jelen a *Vibrio cholerae* nem-O1/O139

törzseknek. Az eltérő patogenitási mintázatok alapján elmondható, hogy a hazai klinikai izolátumok nem apatogének, akár intestinalis, akár extraintestinalis infekciót is képesek okozni. Az eredményeink tükrében megfelelő felbontóképességű diagnosztikai és bioinformatikai elemzési panel került beállításra, a kulcs-patogenitási génekre fókuszálva, amelynek segítségével már gyorsan és megbízhatóan elvégezhető a szekvencia adatok elemzése. A szélsőséges időjárási helyzetek mind gyakoribbá válása kedvezhet az újra felbukkanó (re-emerging) kórokozónak, így a nem-O1/O139 *Vibrio cholerae* okozta humán fertőzések megjelenésének, ezért számítani kell további esetek előfordulására. Szeretnénk felhívni a klinikusok figyelmét ezen kórokozók, mint potenciális etiológiai ágensek szerepére a különböző kórképek diagnosztikájában és kezelésében. Továbbá kérjük a mikrobiológus kollégák együttműködését a jövőben is.

Köszönetnyilvánítás

Külön köszönettel tartozunk a beküldő laboratóriumok- és az illetékes kormányhivatalok segítő együttműködéséért.

Felhasznált irodalom:

Ramamurthy T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. (2016). *Vibrio cholerae*O139 Bengal odyssey of a fortuitous variant. *Microbes Infect.* 2003;5:329–44 . 10.1016/S1286-4579(03)00035-2.

Hirk, S., Huhulescu, S., Allerberger, F., Lepuschitz, S., Rehak, S., Weil, S., Indra, A. (2016). Necrotizing fasciitis due to *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 after exposure to Austrian bathing sites. *Wiener klinische Wochenschrift*, 128(3-4), 141–145. doi:10.1007/s00508-015-0944-y.

Le Roux, F., Wegner, K. M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C. R., Amaro, C., Huehn, S. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). *Frontiers in microbiology*, 6, 830. doi:10.3389/fmicb.2015.00830.

Huhulescu S, Indra A, Feierl G, Stoeger A, Ruppitsch W, Sarkar B, et al. (2007). Occurrence of *Vibrio cholerae* serogroups other than O1 and O139 in Austria. *Wien Klin Wochenschr.* 119(7–8):235–241. doi: 10.1007/s00508-006-0747-2.

World Health Organization. (2003). Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Salmonella* serotype Typhi, *Shigella*, and *Vibrio cholerae* / Principal authors: Mindy J. Perilla [et al.]. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/68554>

Dalsgaard, A., Forslund, A., Bodhidatta, L., Serichantalergs, O., Pitarangsi, C., Pang, L., Echeverria, P. (1999). A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogenous non-O1, non-O139 O-serotypes. *Epidemiology and infection*, 122(2), 217–226.



Ceccarelli, D., Garriss, G., Choi, S. Y., Hasan, N. A., Stepanauskas, R., Pop, M., Colwell, R. R. (2017). Characterization of Two Cryptic Plasmids Isolated in Haiti from Clinical *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139. *Frontiers in microbiology*, 8, 2283. doi:10.3389/fmicb.2017.02283

Siriphap, A., Leekitcharoenphon, P., Kaas, R. S., Theethakaew, C., Aarestrup, F. M., Sutteinkul, O., & Hendriksen, R. S. (2017). Characterization and Genetic Variation of *Vibrio cholerae* Isolated from Clinical and Environmental Sources in Thailand. *PloS one*, 12(1), e0169324. doi:10.1371/journal.pone.0169324

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 15;30(14):2068-9.

Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., McArthur, A. G. (2016). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 45(D1), D566–D573. doi:10.1093/nar/gkw1004.

Deatherage, D.E., Barrick, J.E. (2014) Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using *breseq*. *Methods Mol. Biol.* **1151**: 165–188.

Dutta, D., Chowdhury, G., Pazhani, G. P., Guin, S., Dutta, S., Ghosh, S., Ramamurthy, T. (2013). *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerging infectious diseases*, 19(3), 464–467. doi:10.3201/eid1903.121156.

Awasthi, S. P., Asakura, M., Chowdhury, N., Neogi, S. B., Hinenoya, A., Golbar, H. M., Yamasaki, S. (2013). Novel cholix toxin variants, ADP-ribosylating toxins in *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains, and their pathogenicity. *Infection and immunity*, 81(2), 531–541. doi:10.1128/IAI.00982-12.

Onifade TJ, Hutchinson R, Van Zile K, Bodager D, Baker R, Blackmore C. (2011). Toxin producing *Vibrio cholerae* O75 outbreak, United States, Euro Surveill. 2011;16:19870 .

You Zhou, Yongjie Liang, Karlene Lynch, Jonathan J. Dennis, David S. Wishart. (2011).“PHAST: A Fast Phage Search Tool” *Nucl. Acids Res.*39(suppl 2): W347-W352.

A Lymphocitás choriomeningitis vírus jelentősége a neuroinvazív fertőzések kialakulásában, és hazai vonatkozásai

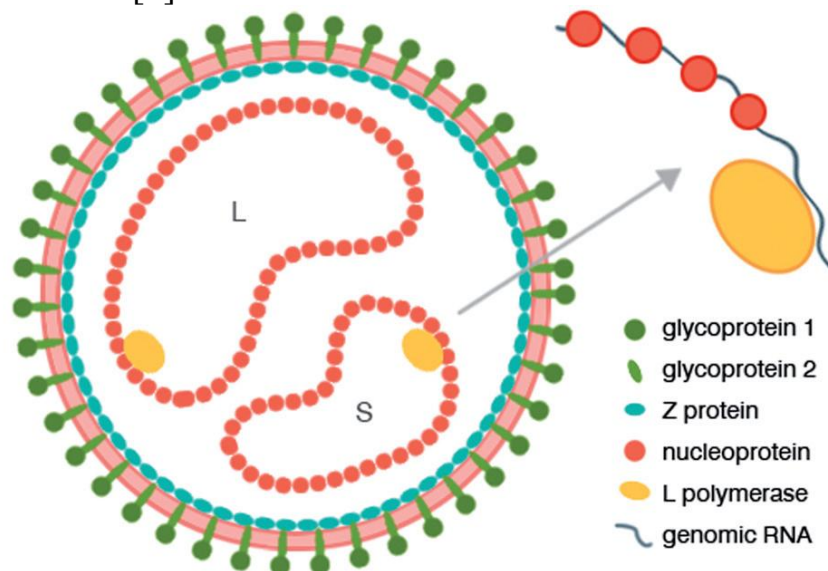
Koroknai Anita¹, Nagy Anna¹, Nagy Orsolya¹, Mezei Eszter², Csonka Nikolett¹, Kaposi Magdolna¹, Takács Mária¹

¹Nemzeti Népegészségügyi Központ, Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály, Viroológiai Laboratóriumi Osztály

²Nemzeti Népegészségügyi Központ, Járványügyi és Infekciókontroll Főosztály

Történeti áttekintés, járványtan:

A Lymphocitás choriomeningitis mammarena vírus (LCMV) a *Bunyavirales* renden belül az *Arenaviridae* családba, a *Mammarenavirus* nemzetségbe tartozik. Az LCMV az arénavírus család prototípus vírusa. Az arénavírusok burokkal rendelkező, negatív egyszálú RNS vírusok (5. ábra), genomjuk bi-szegmentált, egy kisebb S- (~3,4 kb) és egy nagyobb L-szegmentből (~7,2 kb) áll [1]. Elnevezésük a virionok elektronmikroszkópos képén látható elektrondenz szemcsészettségre utal (a latin „arenosus” szó jelentése: homokos). Szerológiai és filogenetikai adatok alapján el szokták különíteni az Óvilági- és Újvilági arénavírusokat. Előbbiek Európában és Ázsiában, utóbbiak Amerikában endemikusak. A patogén arénavírusok közül az Óvilági arénavírusokhoz tartozó LCMV okozza a legenyhébb fertőzést, míg több más arénavírus, mint pl. a Lassa vírus, vérzéses lázat okoz emberben. [2]



5. ábra: Az LCM vírus szerkezete. [2]



Az LCMV-t 1933-ban izolálta Armstrong és Lillie egy nőbeteg cerebroszpinális folyadékából, akiről úgy vélték, St. Louise encephalitis-e van [3]. A vírust azóta többször is azonosították az aszeptikus meningitis kórokozójaként, illetve beszámoltak már anyáról magzatra történő, ún. congenitális [4], és szervátültetéskor bekövetkezett fertőzésekéről is [5].

1996-ban Peter Doherty és Rolf Zinkernagel megosztott orvosi Nobel-díjat kaptak az LCMV-vel végzett munkájukért, mely a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC)-korlátozás, és így az adaptív immunválasz alapvető működésének megértéséhez vezetett [6,7].

A klinikailag jelentős humán LCMV fertőzések jelenlegi előfordulása pontosan nem ismert. Szerológiai tanulmányok kimutatták azonban, hogy az LCMV-specifikus ellenanyagok prevalenciája a megvizsgált területek többségén alacsonynak mondható. Az USA-ban kb. 5 % [8,9], Új-Skóciában 4% [10], Németország északi részén 9,1%, déli részén pedig 1,2% a szeropozitívak aránya [11]. Argentína városi övezeteiben 1998 és 2003 között 1 és 3,6% közötti volt az LCMV-specifikus ellenanyagok előfordulása az emberek között, míg 12,9% a házi egerek között [12]. Spanyolországban az LCMV prevalenciája egy 2003-as tanulmány szerint az embereknél 1,7%, a vadon élő rágcsálókban 9% [13]. Olaszországban erdészeti dolgozók szérum mintáinak vizsgálatakor a minták 2,5%-ánál, rágcsálók esetén a minták 5,6%-ánál azonosítottak LCMV-specifikus ellenanyagokat [14]. Ezzel szemben viszont Horvátországban (Vir szigetén) és Szlovákiában (Pozsonyban) az LCMV elleni antitestek 36%-os, illetve 37,5%-os előfordulási gyakoriságát mutatták ki [15,16].

Az eddigi legnagyobb LCMV járvány 1973-1974 folyamán zajlott, mely 12 államban 181 humán esetet számlált. A megbetegedéseket ugyanazon kisállatkereskedésből származó hörcsögökkel hozták összefüggésbe [17,18]. Egy 2005-ös transzplantáció-asszociált járványnak szintén egy házi kedvencként tartott hörcsög lehetett a kiindulási pontja [19].

A vírus terjedése:

A vírust a többi arénavírushoz hasonlóan rágcsálók, elsősorban a közönséges házi egér fajok (*Mus musculus*, *Mus domesticus*) terjesztik, de a vadon élő egerek, hörcsögök, illetve a házi kedvencként tartott rágcsálók is alkalmas rezervoárok lehetnek. A megfertőződött rágcsálók egész életük során hordozzák a vírust, és üríthetik azt az ürülékükkel, vizeletükkel, nyálukkal, illetve utódaikba is tovább adhatják intrauterin fertőződés eredményeképpen. Mivel az LCMV endemikus a vadon élő egerekben is, a vírus tulajdonképpen bárhol előfordulhat, ahol az egerek élnek, vagyis bármelyik kontinensen, az Antarktisz kivéve.



Az emberi, ún. „szerzett” (postnatalis, születést követő) fertőzések a fertőzött rágcsáló szekréumaival való közvetlen, vagy közvetett érintkezés során következhetnek be. Például pincék, padlások, nyaralók takarítása során a vizeletben lévő vírusok aeroszol formájában történő belélegzésével könnyen kialakulhat fertőzés, de történhet még expozíció fertőzött élelmiszer fogyasztásával, vagy a rágcsáló harapása által is. A fertőzés az év bármely szakában előfordulhat, de a legtöbb LCMV fertőzés a késő őszi, kora téli időszakra tehető, amikor a rágcsalók behúzódnak az emberi otthonokba a hideg elől. [20]

Congenitális, azaz veleszületett fertőzéstől beszélünk, ha az anya a várandósság során fertőződik meg a vírussal és a vírus a placentán keresztül a magzatba is átjut. A magzati fertőzés akár a szülés közben is bekövetkezhet [5].

Emberről emberre történő horizontális vírustranszmissziót eddig még nem írtak le, kivétel ez alól, mikor fertőzött szövet/szerv transzplantációja történik [5,21].

A humán LCMV fertőzések klinikai képe:

A „szerzett”, postnatalis LCMV fertőzés:

A vírus által okozott fertőzések kb. egyharmada tünetmentesen lezajlik, vagy csak enyhe tünetek figyelhetők meg a betegeknél. A tünetek az expozíciót követő 1-3 héten belül jelennek meg és az esetek többségében pár napon belül kezelés nélkül gyógyul a beteg. A betegek kb. egyharmadánál azonban jelentkezhetnek neurológiai tünetek, főképpen aszeptikus meningitis, encephalitis, meningoencephalitis formájában, de beszámoltak már LCMV fertőzés következtében kialakult myelitizról, Guillain-Barré szindrómáról, illetve hydrocepháliáról és idegi eredetű süketiségről is [22].

A klasszikus LCMV fertőzés egy bifázisos betegség, melynek kezdeti tünetei a következők lehetnek: láz, fejfájás, gyengeség, izomfájdalom, fotofóbia, hányinger, hányás, torokfájás, köhögés, nyirokcsomó duzzanat. Általában egy rövid átmeneti, láztalan periódust követően alakul ki ezután a neurológiai tünetegyüttes, de átmeneti szakasz nélkül is kialakulhat (vagy egyáltalán nem alakul ki). A második fázis tünetei az aszeptikus meningitisre jellemzően fejfájás, fotofóbia, láz, hányás, tarkókötöttség lehetnek. A kezdeti fázisban tapasztalható laboratóriumi eltérések a leukopenia, a thrombocytopenia, a májenzimek enyhe emelkedése, illetve mellkasröntgen eltérések is előfordulhatnak. A neurológiai tüneteket más, vírus indukálta meningitishez hasonlóan a liquorban megjelenő magas fehérvérsejt-szám jelzi. Az LCMV okozta meningitis esetében a liquorban lévő fehérvérsejtek legfőképpen limfociták, melyek száma elérheti a százas, ezres nagyságrendet is. Ezen kívül jellemző még a cerebrospinális folyadék normál vagy emelkedett glükóz szintje, és az enyhén emelkedett protein koncentráció is. Néhány betegnél megfigyeltek extraneurális tüneteket is, mint pl. a tüdőgyulladás,



mandulagyulladás, fültőmirigy-gyulladás, dermatitis [23], illetve bizonyos szembetegségekkel (chorioretinitis és keratitis) is összefüggésbe hozták már az LCMV-t [24].

Az esetek többségében az LCMV fertőzésen átesett betegek, ha hosszú idő után is, de teljesen felépülnek, a halálozás ritka.

Kivételt képeznek ez alól a szolid-szervtranszplantációs esetek, mikor a fertőzött szerv átültetése szinte minden esetben a recipiens halálához vezet. A transzplantáció után pár nappal a befogadó szervezetben különféle betegségek alakulnak ki, mint pl. az encephalopátia, trombocitopénia, láz, leukocitózis majd szerv kilökődés. A tünetek gyors megjelenése a legyengített immunrendszerre, különösen a T-sejtek hiányára vezethetők vissza. A T-sejt válasz ugyanis fontos szerepet játszik az LCMV elleni védekezésben, a vírus replikációjának megakadályozásában. [25]

A congenitális LCMV fertőzés:

Míg a postnatalis LCMV fertőzések akár tünetmentesek is lehetnek, vagy csak enyhe tünetekkel jelentkeznek, ez nem mondható el a congenitális LCMV fertőzésekről. A magzat fertőződése az első trimeszter során ugyanis gyakran spontán vetéléshez, magzati elhalálozáshoz vezet. A második és harmadik trimeszter folyamán bekövetkezett fertőzések esetén alakul ki az intrauterin congenitális LCMV fertőzés, amelynek eredményeképpen a magzatoknál látáskárosodás (chorioretinitis, vagy akár teljes látásvesztés) és agyi működési zavarok: microcephalia, macrocephalia, hydrocephalus, periventriculáris meszesedés, pszichomotoros retardáció, epilepszia alakulhatnak ki [26,27]. Az első congenitális fertőzést Angliában írták le Komrower és munkatársai 1955-ben. Azóta már számos esetben sikerült megerősíteni, hogy az LCMV fejlődési rendellenességeket okoz a magzatban [26-29]. Az esetek felénél mutatták ki, hogy az anyának a terhesség alatt influenza-szerű megbetegedése volt, valamint az esetek több mint harmadánál volt igazolható a rágcsáló kontaktus. A congenitális LCMV fertőzött gyermekek legnagyobb részénél hydrocephalust és chorioretinitist diagnosztizáltak. A fertőzött csecsemők kb. 35%-a hal meg a congenitális LCMV fertőzés komplikációinak következtében, és az életben maradt gyermekeknél is súlyos, hosszan tartó neurológiai és/vagy látáskárosodások maradnak fenn.

A congenitális LCMV fertőzések valódi prevalenciája jelenleg nem ismert, de feltételezhető, hogy sokkal gyakoribbak lehetnek, mint amennyit jelenleg azonosítottak. A diagnosztikát ugyanis nagymértékben nehezíti, hogy a fellépő tünetek nagyon hasonlítanak a congenitális citomegalovírus- és toxoplazma fertőzésekhez, amelyek szintén okozhatnak microcepháliát és chorioretinitist [30]. Emellett léteznek bizonyos kromoszóma-rendellenességek is (Aicardi-Goutieres



szindróma, pseudo-TORCH szindróma), melyek szintén hasonló tüneteket produkálnak [31].

Diagnosztika:

Az LCMV-fertőzés akut szakaszában a vírus ellen termelődött specifikus ellenanyag jelen van a szérumban és/vagy liquorban, így a vírus szerológiai módszerekkel megbízhatóan kimutatható. ELISA-val az IgG, IgM, indirekt immunfluoreszcens módszerrel az IgG, IgM és IgA ellenanyagok is detektálhatók. Mivel az LCM vírusok nehezen neutralizálhatók, a neutralizációs ellenanyagok csak későn, a gyógyulás során jelennek meg, ez a módszer nem igazán alkalmas a fertőzés megerősítésére. [32] Az akut lázas periódus folyamán az arénavírusok izolálhatók vérből. A vírusizolálás történhet szövettényeszetten (Vero sejtvonalak), vagy újszülött gerek intracraniális oltásával.

Több esetben sikeresen kimutatták már a vírus RNS-ét reverz transzkripció nested PCR-rel és real-time PCR módszerekkel is [33,34]. A rövid virémiás periódus miatt viszont a vírus nukleinsavát sok esetben már nem sikerül detektálni, illetve a vírus RNS kimutatását tovább nehezíti a vírus nagyfokú variabilitása is. Az LCMV fertőzésben kimutatható még virémia a meningitis fázisa alatt, ekkor azonban a liquor ad biztosabban pozitív eredményt.

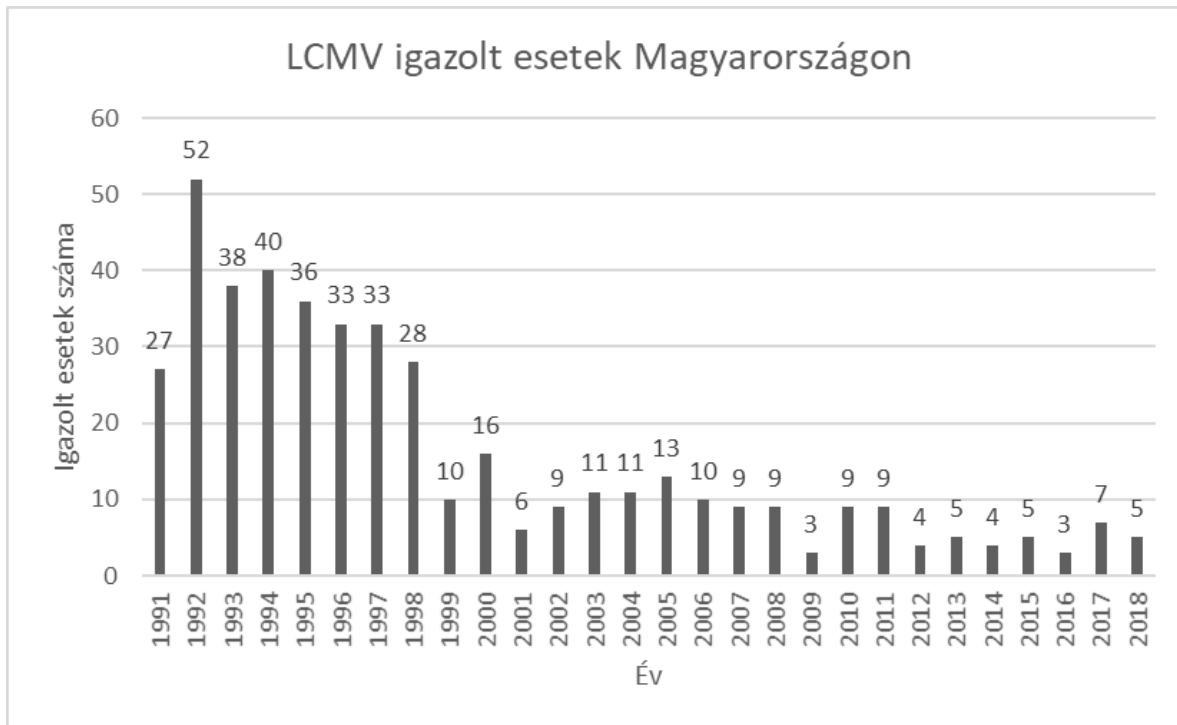
Hazai esetek:

Magyarországon 1950. óta bejelentendő fertőző betegség az encephalitis infectiosa és a meningitis serosa. Ezen diagnózissal jelentett megbetegedések adatait tehát úgynevezett szindróma alapú surveillance keretében gyűjtik. Az encephalitis infectiosa és a meningitis serosa néven bejelentett megbetegedések a LCMV által okozott megbetegedéseket is magukba foglalják. Az adatgyűjtés jogszabályi háttérét az egészségügyi adatok és a hozzájuk kapcsolódó személyes adatok kezeléséről és védelméről szóló 1997. évi XLVII. törvény biztosítja, melynek az 1. sz. mellékletében vannak felsorolva a kötelezően jelentendő fertőzések, fertőzéses eredetű betegségek, többek közt az LCM vírus is.

Hazánkban a rendelkezésre álló adatok szerint a Lymphociták choriomeningitis megbetegedés csak ritkán fordul elő. A Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriumában az utóbbi 10 évben (2008 és 2018 között) 63 esetben igazoltunk aktuális, vagy közelmúltban átvészelt Lymphociták choriomeningitis vírusfertőzést. A betegek kor szerinti eloszlása változó, minden korosztályból előfordultak betegek, de az igazoltak többsége a 20-40 év közötti korcsoportba tehető. A legfiatalabb beteg 2 éves, a legidősebb beteg 73 éves volt. Érdekes, hogy az igazolt esetek száma 1991 és 1998 között lényegesen több volt (27-52 eset/év),

majd ez a szám a 2000-es években lecsökkent 6-16 esetre, míg az utóbbi pár évben csak 3-7 igazolt esetet diagnosztizáltunk évente. (6. ábra)

Congenitális LCMV fertőzésről, illetve transzplantáció során bekövetkezett fertőzésről egyelőre nincsenek hazai adatok.



6. ábra: A laboratóriumiilag igazolt Lymphocitás choriomeningitis vírusfertőzések évenkénti száma Magyarországon.

A fertőzések konfirmálásának céljából tavaly laboratóriumunk is elkezdte vizsgálni a 2017/2018-ban LCMV igazolt mintáknál a vírus nukleinsavának kimutathatóságát reverz transzkripciósnested PCR-rel. Ennek eredményeképpen sikerült néhány mintából (köztük savó, liquor, és egy esetben vizelet mintából is) kimutatni a vírus S-szegmensének RNS-ét, melyet Sanger szekvenálással is meg tudtunk erősíteni.

Mivel az LCMV fertőzésre nem létezik speciális, csak tüneti kezelés és védőoltás sem áll rendelkezésre, a megelőzés az egyetlen mód a fertőzés elkerülésére. Fontos a lakóhelyek rágcsáló-mentesítése, illetve a kereskedelemben forgalmazott rágcsálótenyészetek folyamatos monitorozása.

A humán congenitális fertőzések differenciál diagnosztikájánál az LCMV-re is feltétlenül gondolni kell, és a várandósok figyelmét is fel kell hívni a rágcsálókkal való kontaktus kockázataira.

Irodalom:

1. Meyer BJ, de la Torre JC, Southern PJ. Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 262:139–57.
2. Laposová K, Pastoreková J, Tomášková J. Lymphocytic choriomeningitis virus: invisible but not innocent. *Acta virol* 2013; 57: 160-170.
3. Armstrong C, Lillie RD. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. *Public Health Rep* 1934; 49:1019–1027.
4. Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, Kotton CN, Srinivasan A, Marty FM, Comer JA, Guarner J, Paddock CD, DeMeo DL, Shieh WJ, Erickson BR, Bandy U, DeMaria A Jr., Davis JP, Delmonico FL, Pavlin B, Likos A, Vincent MJ, Sealy TK, Goldsmith CS, Jernigan DB, Rollin PE, Packard MM, Patel M, Rowland C, Helfand RF, Nichol ST, Fishman JA, Ksiazek T, Zaki SR, N. Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *Engl J Med* 2006; 354, 2235-2249.
5. Komrower GM, Williams BL, Stones PB. Lymphocytic choriomeningitis in the newborn: probable transplacental infection. *Lancet* 1955; 1:697-8.
6. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 1974; 248:701–702.
7. Zinkernagel RM, Doherty PC. H-2 compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. *J Exp Med* 1975; 141:1427–1436.
8. Childs JE, Glass GE, Korch GW, Ksiazek TG, Leduc JW. Lymphocytic choriomeningitis virus infection and house mouse (*Mus musculus*) distribution in urban Baltimore. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47, 27-34.
9. Childs JE, Glass GE, Ksiazek TG, Rossi CA, Oro JG, Leduc JW. Human-rodent contact and infection with lymphocytic choriomeningitis and Seoul viruses in an inner-city population. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44, 117-121.
10. Marrie TJ, Saron MF. Seroprevalence of lymphocytic choriomeningitis virus in Nova Scotia. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58, 47-49.
11. Ackermann R, In F. Lehmann-Grube (Ed.): Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses. *Springer-Verlag* 1973; 233-237.
12. Riera L, Castillo E, Del Carmen Saavedra M, Priotto J, Sottosanti J, Polop J, Ambrosio AM. Serological study of the lymphochoriomeningitis virus (LCMV) in an inner city of Argentina. *J Med Virol* 2005; 76, 285-289.
13. Lledo L, Gegundez MI, Saz JV, Bahamontes N, Beltran M. Lymphocytic choriomeningitis virus infection in a province of Spain: analysis of sera from the general population and wild rodents. *J. Med. Virol.* 2003; 70, 273-275.
14. Kallio-Kokko H, Laakkonen J, Rizzoli A, Tagliapietra V, Cattadori I, Perkins SE, Hudson PJ, Cristofolini A, Versini W, Vapalahti O, Vaheri A, Henttonen H. Hantavirus and arenavirus antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, Northern Italy. *Epid Infect* 2006; 134: 830-836,



15. Dobec M, Dzelalija B, Punda-Polic V, Zoric I. High prevalence of antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus in a murine typhus endemic region in Croatia. *J Med Virol* 2006; 78: 1643-1647.
16. Reiserova L, Kaluzova M, Kaluz S, Willis AC, Zavada J, Zavadova Z, Ciampor F, Pastorek J, Pastorekova S. Identification of MaTu-MX agent as a new strain of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and serological indication of horizontal spread of LCMV in human population. *Virology* 1999; 257, 73-83.
17. Gregg MB. Recent outbreaks of lymphocytic choriomeningitis in the United States of America. *Bull World Health Organ* 1975; 52(4-6): 549-53.
18. Hotchin J, Sikora E, Kinch W, Hinman A, Woodall J. Lymphocytic choriomeningitis in a hamster colony causes infection of hospital personnel. *Science* 1974; 185(4157): 1173-4.
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lymphocytic choriomeningitis virus infection in organ transplant recipients--Massachusetts, Rhode Island. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54(21): 537-9.
20. Lehmann-Grube F. Portraits of viruses: Arenaviruses. *Intervirology* 1984; 22: 121-145
21. MacNeil A, Stroher U, Farnon E, Campbell S, Cannon D, Paddock CD, Drew CP, Kuehnert M, Knust B, Gruenenfelder R, Zaki SR, Rollin PE, Nichol ST. Solid organ transplant-associated lymphocytic choriomeningitis, United States, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1256-1262.
22. Tindall GT, Gladstone LA. Hydrocephalus as a sequel to lymphocytic choriomeningitis. *Neurology* 1957; 7: 516-8
23. Lewis JM, Utz JP. Orchitis, parotitis and meningoencephalitis due to lymphocytic choriomeningitis virus. *N Engl J Med* 1961; 265:776-80.
24. Zinkernagel MS, Bolinger B, Krebs P, Onder L, Miller S, Ludewig B. Immunopathological basis of lymphocytic choriomeningitis virus-induced chorioretinitis and keratitis. *J Virol* 2009; 83(1):159-166.
25. Bonthius DJ. Lymphocytic choriomeningitis virus: an underrecognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin Pediatr Neurol* 2012; 19(3): 89-95
26. Barton LL, Peters CJ, Ksiazek TG. Lymphocytic choriomeningitis virus an unrecognized teratogenic pathogen. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 152-3.
27. Barton LL, Mets MB. Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 370-4.
28. Larsen PD, Chartrand SA, Tomashek KY, Hauser LG, Ksiazek TG. Hydrocephalus complicating lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 528-31.
29. Bechtel RT, Haught KA, Mets MB. Lymphocytic choriomeningitis virus: a new addition to the TORCH evaluation. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 680-1.
30. Wright R, Johnson D, Neumann M, Ksiazek TG, Rollin P, Keech RV, Bonthius DJ, Hitchon P, Grose CF, Bell WE, Bale JF Jr. Congenital lymphocytic choriomeningitis virus syndrome: a disease that mimics congenital toxoplasmosis or cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1997; 100: E9-14.
31. Bonthius DJ, Wright R, Tseng B, Barton L, Marco E, Karacay B, Larsen PD. Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: Spectrum of disease. *Ann Neurol* 2007; 62: 347- 355.



32. Bán E. Arenaviridae. In *Klinikai és Járványügyi Virologia*; Takács M; Vox Medica Kiadói Kft. Budapest, Hungary 2010; 208-215.
33. Park JY, Peters CJ, Rollin PE, Ksiazek TG, Gray B, Waites KB, Stephensen CB. Development of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay for diagnosis of lymphocytic choriomeningitis virus infection and its use in a prospective surveillance study. *J Med Virol* 1997; 51(2): 107-14.
34. McCausland MM, Crotty S. Quantitative PCR technique for detecting lymphocytic choriomeningitis virus in vivo. *J Virol Methods* 2008; 147(1): 167-76.