



**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem**  
**Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar**

## **A rubeola vírus filogenetikai törzsfája**

Szakdolgozat

**Készítette: Szabó Éva** egyetemi hallgató

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki kar, Biomérnök szak BSc

**Témavezető: Némethné dr. Szomor Katalin** biotechnológus mérnök

Országos Epidemiológiai Központ

Virologiai főosztály

**Konzulens: Dr. Sveiczzer Ákos** egyetemi docens

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Országos Epidemiológiai Központ

Budapest, 2012

## Tartalomjegyzék

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Rövidítések jegyzéke.....                                       | 4  |
| 1. Bevezetés.....                                               | 5  |
| 2. Irodalmi áttekintés.....                                     | 6  |
| 2.1. A Togaviridae víruscsalád.....                             | 6  |
| 2.2. A rubeola vírus.....                                       | 7  |
| 2.2.1. Szerkezeti felépítése.....                               | 7  |
| 2.2.2. Replikációs ciklus.....                                  | 9  |
| 2.2.3. A betegség lefolyása, tünetek és szövődmények.....       | 10 |
| 2.2.4. Laboratóiumi diagnosztika.....                           | 12 |
| 2.3. A WHO rubeola eliminációs programja.....                   | 14 |
| 2.3.1. Védőoltás.....                                           | 15 |
| 2.3.2. Filogenetikai analízis.....                              | 16 |
| 2.4. Járványügyi helyzet Magyarországon.....                    | 17 |
| 3. Anyagok és módszerek.....                                    | 19 |
| 3.1. Nukleinsav tisztítás.....                                  | 19 |
| 3.2. Reverz transzkripció.....                                  | 20 |
| 3.3. Polimeráz láncreakció.....                                 | 22 |
| 3.4. Agaróz gélelektroforézis.....                              | 27 |
| 3.5. Szekvenálás.....                                           | 28 |
| 3.5.1. A Sanger-féle szekvenálási módszer elméleti háttere..... | 28 |
| 3.5.2. PCR termék tisztítása.....                               | 30 |
| 3.5.3. Szekvenálási reakció.....                                | 30 |
| 3.5.4. Szekvenálási termék tisztítása.....                      | 32 |
| 3.5.5. Futtatás a szekvenáló gépben.....                        | 32 |
| 3.5.6. Az eredmények manuális javítása.....                     | 34 |
| 3.6. Filogenetikai törzsfa készítése.....                       | 37 |
| 3.6.1. Genomikai adatgyűjtés.....                               | 37 |
| 3.6.2. A filogenetikai fa megszerkesztése.....                  | 38 |
| 4. Eredmények.....                                              | 40 |
| 4.1. Vírusok kimutatása.....                                    | 40 |

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2. A szekvenálás értékelése.....                                                  | 43 |
| 4.3. A filogenetikai fa megszerkesztése.....                                        | 45 |
| 4.4. Kísérlet a hiányos szekvenciák genotípusának <i>in silico</i> meghatározására. | 49 |
| 4.5. A filogenetikai fa kiegészítése – kitekintés Európára.....                     | 50 |
| 5. Összefoglalás.....                                                               | 52 |
| 6. Irodalomjegyzék.....                                                             | 53 |
| 7. Melléklet.....                                                                   | 57 |
| Köszönetnyilvánítás.....                                                            | 66 |

## Rövidítések jegyzéke

|         |                                                                                         |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| AS      | aminosav                                                                                |
| bp      | bázispár                                                                                |
| C       | kapszid fehérje                                                                         |
| cDNS    | komplementer DNS                                                                        |
| CRS     | kongenitális rubeola szindróma                                                          |
| ddNTP   | didezoxi-nukleotid-trifoszfát                                                           |
| DNáz    | dezoxiribonukleáz                                                                       |
| dNTP    | dezoxi-nukleotid-trifoszfát                                                             |
| ECDC    | Európai Betegségmegelőzési Központ (European Centre for Disease Prevention and Control) |
| ELISA   | enzyme linked immuno sorbent assay                                                      |
| ER      | endoplazmás retikulum                                                                   |
| E1      | a rubeola vírus egyes számú burok fehérjéje                                             |
| E2      | a rubeola vírus kettes számú burok fehérjéje                                            |
| HAG     | hemagglutináció-gátlás                                                                  |
| IgG     | G típusú immunglobulin                                                                  |
| IgM     | M típusú immunglobulin                                                                  |
| IHR     | Nemzetközi Egészségügyi Rendszabályok                                                   |
| MMR     | kanyaró, mumpsz és rubeola elleni trivalens oltóanyag                                   |
| MMRV    | kanyaró, mumpsz, rubeola és bárányhimlő elleni tetraavalens oltóanyag                   |
| MuLV    | egér leukémia vírus                                                                     |
| NBCI    | National Center for Biotechnology Information                                           |
| nt      | nukleotid                                                                               |
| OEK     | Országos Epidemiológiai Központ                                                         |
| ORF     | nyitott leolvasási keret (open reading frame)                                           |
| OQ      | általános minőség (overall quality)                                                     |
| PCR     | polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)                                       |
| p150    | nem strukturális (korai) fehérje                                                        |
| p90     | nem strukturális (korai) fehérje                                                        |
| PRP     | progresszív rubeola panencephalitis                                                     |
| RA 27/3 | a vakcinációban elterjedten alkalmazott rubeola törzs azonosítója                       |
| RES     | retikuloendoteliális rendszer                                                           |
| RNáz    | ribonukleáz                                                                             |
| rpm     | percenkénti fordulatszám (revolutions per minute)                                       |
| RV      | rubeola vírus                                                                           |
| RT      | reverz transzkripció                                                                    |
| SPIHAd  | solid-phase immunosorbent haemadsorption                                                |
| U       | enzimaktivitási egység (unit)                                                           |
| UTR     | nemkódoló régió (untranslated region)                                                   |
| Vero    | afrikai zöld majom veséjéből származó sejtkultúra                                       |
| VTM     | vírus transzport médium                                                                 |
| WHO     | Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)                                 |

## 1. Bevezetés

A vírusbetegségek nagy szerepet játszottak az emberiség történelmében. Már az egyiptomi sírrajzokon is megjelenítették a gyermekbénulás tüneteit, a veszettség első leírását pedig ókori babiloni kódexben olvashatjuk. A háborúkat, környezeti csapásokat járványok követték, melynek egy részét vírusok okozták: elég csak a XX. század elején milliók életét követelő, spanyolnátha néven elhíresült influenza pandémiára gondolnunk.

Az első védőoltás előállítása a fertőző betegségek elleni harc egyik legfontosabb lépése volt. 1796-ban Jenner tehénhimlő vírussal immunizált embereket, ezzel fedezve fel a feketehimlő elleni védekezés legfontosabb eszközét. Emlékére az oltóanyagokat vakcinának nevezzük (a „vacca” szó latinul tehenet jelent). A himlőt mára sikerült teljesen eradikálni a Földről. Ez a sikertörténet arra biztatja az egészségügyi szervezetek szakembereit, hogy más kórokozókkal is hasonlóképpen vegyék fel a harcot.

Az egyik ilyen, vakcinációval hatásosan megelőzhető betegség a rubeola, más néven rózsahimlő. A védőoltás bevezetése előtt a vírus 5-9 évente világszerte okozott járványokat leginkább a fiatalabb korosztály képviselői között, spontán gyógyuló, súlyosnak nem mondható tüneteket produkálva. A vírus igazi jelentőségét csak a XIX. században ismerték fel, amikor észrevették a magzatra gyakorolt károsító hatását. Azóta a rubeola a szintén kiütéses tünetekben megnyilvánuló kanyaróval együtt felkerült az Egészségügyi Világszervezet által követett fertőző betegségek listájára. A hatékony oltóanyagok és kiterjedt oltási kampányok bevezetésével pedig elérhetővé válhat a cél, hogy a Földet rubeola vírus mentessé tegyék.

Szakedolgozatomban összefoglalt vizsgálataimat az Országos Epidemiológiai Központ Általános vírusdiagnosztikai osztályán végeztem, feladatom az utóbbi két évben sporadikusan megjelenő rubeola fertőzések filogenetikai analízise volt, melynek eredménye az európai járványkövetést segíti elő.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A *Togaviridae* víruscsalád

A *Togaviridae* a Baltimore szerinti osztályozási rendszer IV. csoportjába tartozó víruscsalád. Valamennyi speciese pozitív egyszálú, lineáris RNS genomot tartalmaz, melynek 5' végén metilált nukleotid sapka, 3' végén pedig poliadenilált farok található, tehát a mRNS-hez hasonló felépítésű.

Ikozahedrális szimmetriájú kapsziddal, és vírusspecifikus glikoprotein tüskékkel borított lipid peplonnal rendelkeznek. Erre a burokra utal a víruscsalád elnevezése is, hiszen a latin „toga” szó jelentése lepel, köpeny. A teljes víruspartikulák mérete általában 70 nm körüli.

A *Togaviridae* család két genust tartalmaz, melyek tagjai felépítésükben hasonlítanak, de patomechanizmusuk nagymértékben eltér.

Az *Alphavirus* nemzetségbe tartozó 29 vírusfaj<sup>1</sup> zoonózisos megbetegedéseket okoz változatos kórformákkal: láz, kiütés, ízületi gyulladás, encephalitis stb. Legtöbbször ízeltlábú vektorok (szúnyog, kullancs) közvetítésével terjednek, rezervoárjuk speciestől függően rágcsálók, madarak, emlősök lehetnek. Az *Alphavirus* család ismertebb képviselői a Chikungunya-, Sindbis-, O'nyong-nyong- és Semliki Forest vírus, valamint a keleti- és nyugati lóencephalitis vírus.

A *Rubivirus* nemzetségbe az *Alphavirus*októl eltérően csak egyetlen vírusfaj, a Rubeola vírus (RV) tartozik, melynek kizárólagos gazdaszervezete az ember. A légutakon keresztül fertőz, kiütéssel és általában nem túl magas lázzal járó akut kórformát okoz. Súlyosabb, maradandó károsodásokat magzati fertőződés esetén vált ki.

A *Rubivirus* és *Alphavirus* nemzetségek közös családba sorolását a hasonló replikációs tulajdonságaik és génjeik elrendezése indokolja.<sup>2</sup> Mindezek ellenére kevés homológ szakasz van a RV és az *Alphavirus*ok nukleinsav szekvenciájában, ami megnehezíti a két nemzetségbe tartozó vírusok kapcsolatának feltárását, és filogenetikai tanulmányozását.<sup>3</sup>

## 2.2. A rubeola vírus

A rubeola fertőzés lefolyásának első leírása két német orvostól, de Bergan és Orlow feljegyzéseiből származik az 1770-as évek közepéből. Mivel a kanyaróval rokon megbetegedésnek vélték, a fertőzés a German measles („német kanyaró”) nevet kapta. Csak 1814-ben ismerte fel George de Malton, hogy két különálló betegségről van szó.<sup>2</sup>

1941-ben Norman McAlister Gregg jegyezte fel először, hogy a rubeolavírus károsodásokat okoz a terhesség korai szakaszában fertőződésnek kitett magzatban. Az ausztrál szemész figyelmét felkeltették a gyakorivá váló veleszületett szemrendellenességek, melyek olykor egyéb deformitásokkal is társultak, és összefüggésbe hozhatóak voltak az Ausztráliában zajló rubeolajárványokkal.<sup>2,3</sup>

A vírust 1962-ben izolálta az Amerikai Egyesült Államokban két egymástól függetlenül működő laboratóriumi csoport.<sup>4,5</sup> Ez a felfedezés hozzásegítette a kutatókat a szerológiai kimutatási módszerek kifejlesztéséhez, és az aktív immunizálásra használható attenuált vírustörzsek létrehozásához.<sup>3</sup>

### 2.2.1. Szerkezeti felépítése

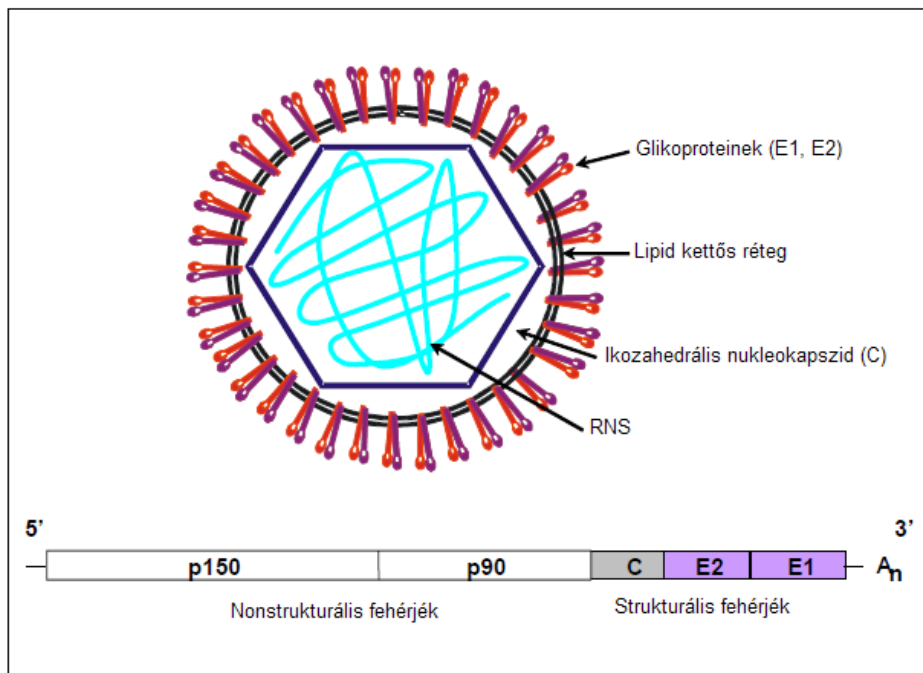
A teljes virion egy 60-70 nm átmérőjű partikula. Lipidtartalmú burok, úgynevezett peplon borítja, melynek felszínén helyezkednek el a vírusspecifikus peplomerek, a rubeola esetében ezek az E1 és E2 glikoproteinek. A peplonon belül helyezkedik el a fehérjékből felépülő víruskapszid, mely ikozahedrális szimmetriájú. Ezen a „fehérjekapszulán” belül található a vírusgenom, mely lineáris, pozitív értelmű, egyszálú RNS (1. ábra).

A víruskapszidot a diszulfid hidakkal összekapcsolt, 33-38 kDa tömegű kapszid (C) fehérje homodimerek építik fel. A fehérjék N-terminális végén prolinban és argininben gazdag hidofil szakasz található, melynek feltehetőleg szerepe van a kapszidban elhelyezkedő RNS rögzítésében. A fehérje egyéb részein is előfordulnak olyan aminosav szakaszok, amelyek képesek kölcsönhatásba lépni a nukleinsavval. A protein C-terminálisa hidrofób jellegénél fogva a vírusburokkal alakít ki kapcsolatot.<sup>2,3</sup>

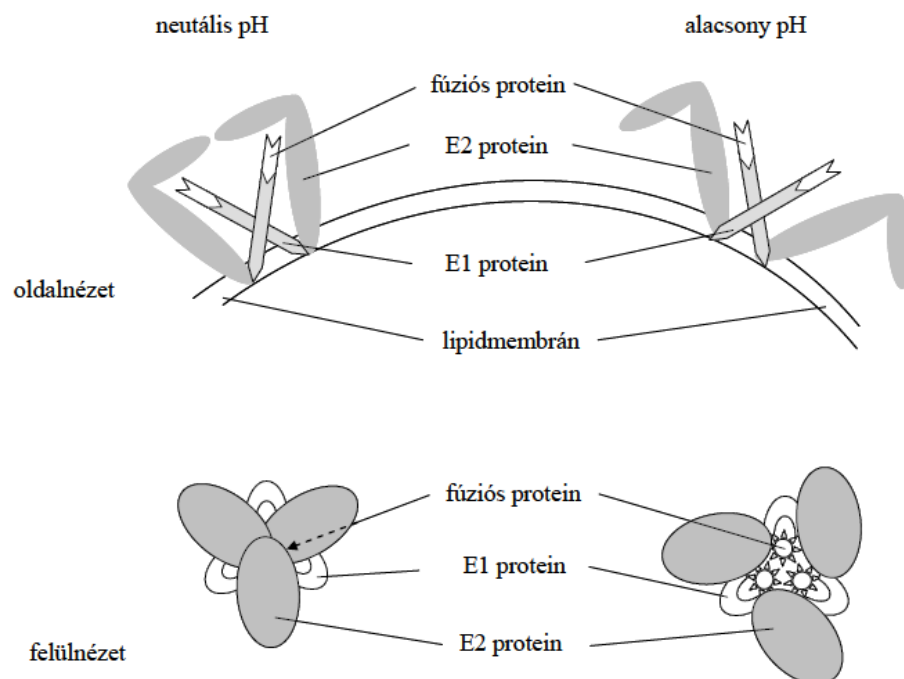
Az E1 és E2 transzmembrán fehérjék heterodimereket alkotnak, és a peplonburkon hármásával csoportosulva alkotják a vírus sejtbe jutásáért felelős komplexeket (2. ábra). Az E1 protein 81-109 aminosav (AS) régiója a

membránfúzióban és a két fehérje kapcsolódásában játszik szerepet.<sup>6,7</sup> Az E1 fehérje hordozza az antigén tulajdonságért felelős egységeket is: a fertőzéskor termelődő ellenanyagok az 245-284 AS szakaszon kötődnek, a 208-239 AS résznek pedig a hemagglutinációs és neutralizációs folyamatokban vesznek részt.<sup>8,9</sup>

### 1. ábra: A rubeola vírus felépítése és genomja<sup>10</sup>



### 2. ábra: Az E1-E2 fehérjekomplex elhelyezkedése a peplonon<sup>15</sup>

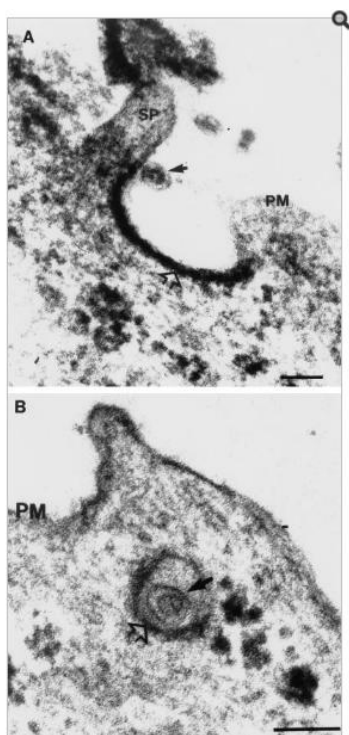


A rubeola vírus genomja egy 9762 nt hosszúságú, pozitív egyszálú RNS, mely két egymással nem átfedő nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz. Az 5' vég felé eső 6345 nukleotidos ORF a vírus nonstrukturális p150 és p90 fehérjéit, a 3' véghez tartozó 3189 nt hosszúságú ORF pedig a szerkezeti fehérjéket, tehát a C kapszomert és az E1, E2 peplomereket kódolja. A két leolvasási keret között ~118 nt-os nem kódoló régió (UTR) helyezkedik el. A metilált sapkával rendelkező 5' vég egy 40 nt-os, a poliadenilált 3' vég 59 nt-os UTR-rel rendelkezik. A rubeola vírusgenom különlegessége, hogy az eddig szekvenált RNS vírusok közül a legnagyobb mennyiségben, közel 70%-ban tartalmaz G+C bázispárokat.<sup>3,11</sup>

### 2.2.2. Replikációs ciklus

A rubeola bejutása a sejtbe nagy hasonlóságot mutat a sokat tanulmányozott Alphavirusok (pl. Sindbis vírus) folyamataival. A virion a célsejthez érve az E2 fehérjével kötődik a citoplazma membrán receptorján, majd endocitózist indukál. A képződő vakuólumban pH csökkenés hatására az E2 fehérje konformációja megváltozik (2. ábra), és szabaddá válik az E1 fehérje fúzióért felelős epitópja. A víruspeplon összeolvad a vakuólum membránnal, a víruspartikula a citoplazmába jut, majd dekapszidálódik.<sup>2</sup> Sejtbe belépő virionok képét mutatja a 3. ábra.

### 3. ábra: Rubeolával frissen fertőzött Vero sejt képe<sup>2</sup>



Jelmagyarázat:

- PM plazmamembrán
- ➔ virion
- ⇨ „coated pit”  
(a víruspartikulát tartalmazó vezikulum)
- viszonyítási szakasz (100 nm)

- A.) A plazmamembránhoz kapcsolódó virion közelében megkezdődik az endocitózis
- B.) Rubeola virion a citoplazma vezikulumában.

A sejt citoplazmájában a vírus RNS mRNS-ként funkcionál a nem strukturális fehérjéket kódoló ORF transzlációjakor. A keletkező fehérje prekursor (p200) proteolitikus hasítása után jönnek létre a katalitikusan aktív korai fehérjék (p150 és p90).<sup>12</sup> Ezek vesznek részt a vírus RNS átírásában, mely negatív szálú RNS-t (replikációs intermediér) eredményez. A (–)RNS szolgál templátként a vírusgenom megsokszorozásakor és a strukturális fehérjéket kódoló szubgenomiális RNS szintézisében.<sup>2,3</sup>

A szubgenomiális RNS funkcióját tekintve mRNS-ként működik a p100 poliprotein transzlációjakor. A Golgiban ko- és poszttranszlációs módosításokat követően ebből képződik a három strukturférfjére (C, E1, E2). A virion összeépülése is intracelluláris membrán (Golgi, ER) közvetlen környezetében zajlik, majd a víruspartikula bimbózással távozik a gazdasejtől.<sup>13,14</sup>

### **2.2.3. A betegség lefolyása, tünetek és szövódmények**

A rubeola cseppfertőzéssel terjedő betegség, mely a vakcináció bevezetése előtt Magyarországon 5-9 évente okozott nagyobb járványokat. Átadódhat közvetlen érintkezéssel, és a fertőző beteg váladékaival frissen szennyezett tárgyak közvetítésével is. Leggyakrabban légzési aeroszol útján kerül a felső légutakba, ahol megfertőzi a nasopharyngealis limfoid szövetek sejtjeit, majd áttérjed a regionális nyirokcsomókba.<sup>2</sup> Replikációt követően kerül a véráramba (elsődleges virémia). A vírus megfertőzi a RES (reticulo-endothelial system) sejtjeit, melyekből kiszabadulva újra a vérkeringésbe jut (másodlagos virémia). Ekkor jut el a vírus a célszervekhez, amik például a bőr, az ízületek és a placenta.<sup>10,15</sup>

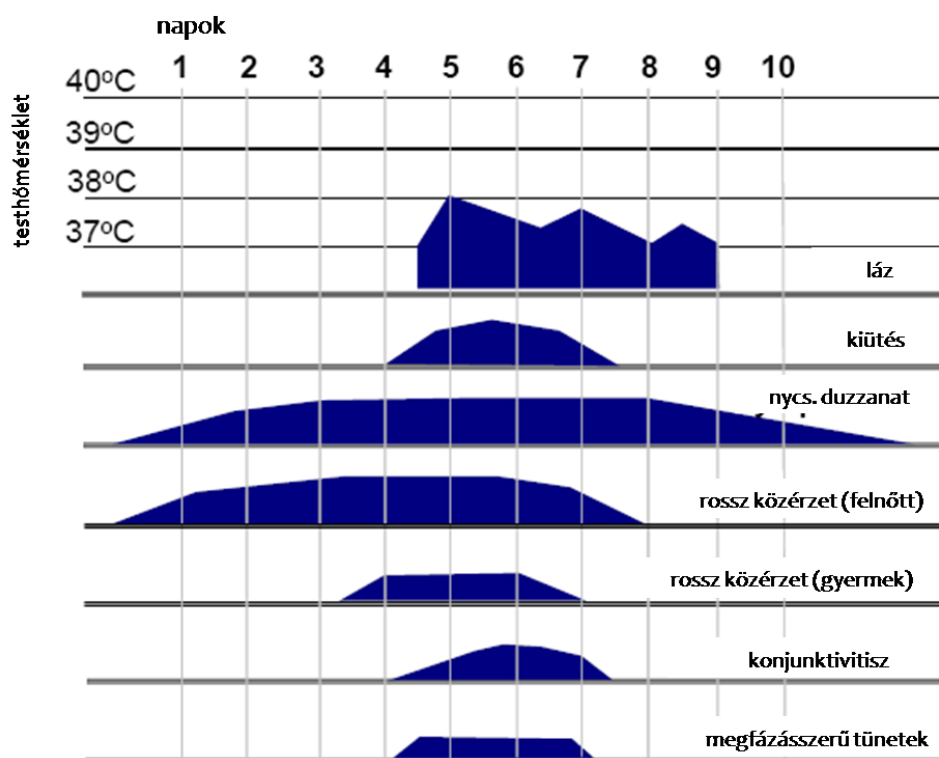
Az antitestek szintjének megnövekedésekor jelenik meg a betegség legjellemzőbb sajátossága: az immunpatológiai eredetű kiütés. Továbbá kialakulhat alacsony láz (<38°C), a virémia időszakában rossz közérzet, kötőhártya gyulladás (conjunctivitis), felső légúti hurut és nyirokcsomó-bántalom (lymphadenopathia)<sup>10</sup> (4. ábra).

A betegség felismerését nehezíti, hogy kórképének köszönhetően könnyen összetéveszthető más kiütéses betegségekkel, mint például a kanyaró (morbilli), parvovírus B19, coxsackievírus, skarlát, Rickettsia-fertőzés és egyes allergiás jellegű

bőrelváltozások. Továbbá a fertőzések nagyjából fele szubklinikus formában zajlik, tehát nem rendelkezik észrevehető klinikai tünetekkel.<sup>15</sup>

A betegség spontán gyógyul, antivirális kezelést nem igényel. A rubeola fertőzés átvészélése életre szóló, védő mennyiségű ellenanyagszintet eredményez az egészséges immunrendszerrel rendelkező emberekben.<sup>15</sup>

#### 4. ábra: A rubeola vírusfertőzés tipikus klinikai megnyilvánulásai és időtartamuk<sup>10</sup>



Szövődmények kialakulhatnak tünetes- és tünetmentes átvészeltséget követően is. Leggyakoribbak közülük az átmeneti trombocitaszám-csökkenés (trombocitopenia) és a leginkább nőknél jelentkező ízületi betegségek (arthropathia, arthralgia, arthritis). A rubeola fertőzés legsúlyosabb, de meglehetősen ritka szövődményei a központi idegrendszert érintik, ilyenek az agyvelősróvadás (para- és posztinfekciós encephalopáthia) és az agyvelőgyulladás (encephalomyelitis).<sup>15</sup>

A rubeola igazi veszélyét az intrauterin fertőződés jelenti. A vírus képes átjutni a placentán, így a fejlődésben lévő magzatot is megtámadhatja. Replikációs folyamatai során felborítja a sejtdifferenciálódási folyamatokat, így vetélést, vagy súlyos, maradandó károsodásokat okozhat. A magzati korban szerzett rubeola fertőzést követő

tünetegyüttest kongenitális rubeola szindrómának (CRS) nevezzük. A vele járó legjellemzőbb fejlődési rendellenességek a sükettség, szemproblémák (cataracta, glaucoma), szívhibák, máj- és lépmegegyesülődés. A gyermek mentális fejlődése idővel lemarad kortársaitól, késői szövődésként egyes típusú diabétesz, vagy a ritka és halálos progresszív rubeola panencephalitis (PRP) jelentkezhet. A fejlődési rendellenességek nagy része csak az első trimeszterben fertőződött magzatoknál alakulnak ki, a graviditás előrehaladtával egyre csökken az esélye a komolyabb károsodásoknak. A CRS járványügyi felügyelete kiemelten fontos, mert a beteg csecsemők nagy mennyiségben hónapokig, akár egy évig üríthetik a vírust, fertőzési veszélyt jelentve a környezetükben lévő fogékony személyekre.<sup>15</sup>

#### **2.2.4. Laboratóriumi diagnosztika**

A rubeola a 18/1998. (VI. 3.) NM rendelet értelmében be- és kijelentésre kötelezett, tehát a járványügyi szervezetek irányába jelzendő fertőző betegség. A rubeola klinikai kritériumainak teljesülése esetén betegetől vizsgálati anyagot kell küldeni laboratóriumi vizsgálatra az OEK Vírusdiagnosztikai osztályára, ahol a Kiütéses vírusbetegségek Nemzeti Referencia Laboratóriumában a beérkező minták vizsgálati eredményei alapján igazolják vagy kizárják a fertőzöttséget.

##### Szerológiai módszerek:

A szerológiai módszerek indirekt diagnosztikai eljárások, melyek során a kórokozó jelenlétére utaló antitestek vagy antigének mennyiségét mérik. A rubeola fertőzés diagnosztikájában a specifikus IgG és IgM ellenanyagok vérsavóból történő kimutatásának van jelentősége. Alkalmazott eljárások:

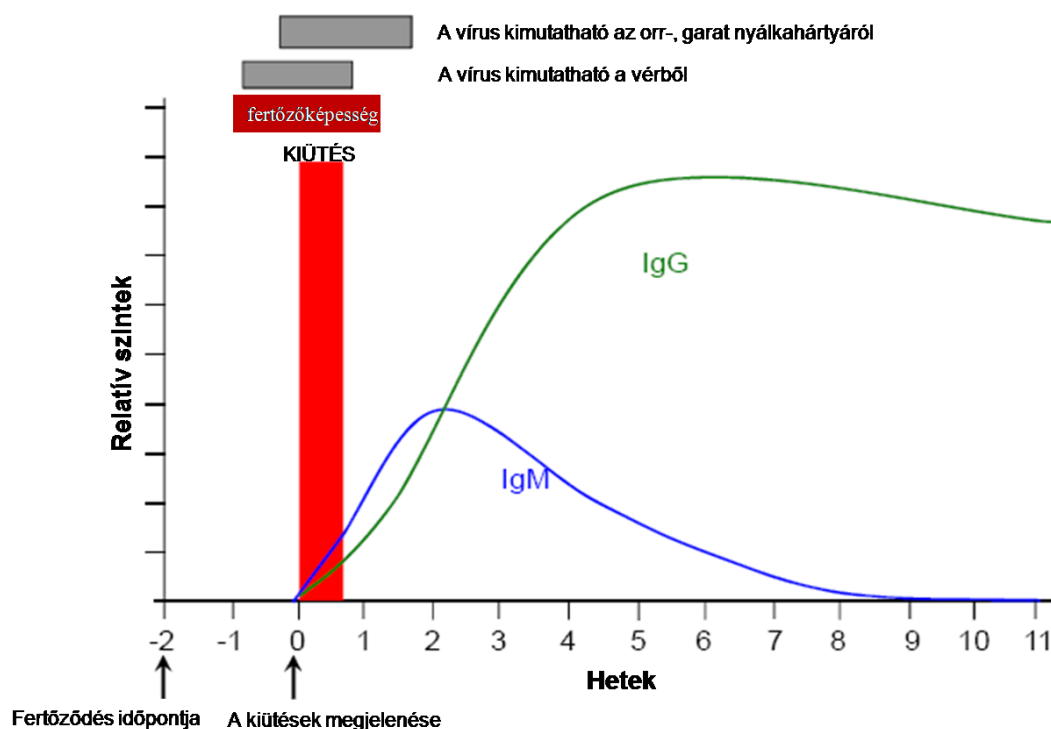
- Hemagglutináció-gátlás (HAG): IgG és IgM együttes szintjének mérése
- Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)
  - IgG szint mérés
  - IgM szint mérés
  - Aviditás mérés

Az IgG ellenanyagszint ismeretével önmagában csak azt állapíthatjuk meg, hogy a vizsgált személy immunrendszere találkozott-e már a RV antigénjével. 10-30 (optimálisan 10-14) nap különbséggel<sup>10</sup> levett savópár vizsgálatával lehet az aktuális

fertőzést kizárni (nincs titeremelkedés), vagy igazolni (legalább négyszeres titeremelkedés). Kimutatható IgM ellenanyagszint rendszerint csak a fertőzések korai stádiumában mutatkozik (maximum a 8-10. hétig kimutatható), azonban a túlérzékenyített IgM ELISA tesztek gyakran adnak reaktív eredményt, ezért a pozitív szerológiai eredményt lehetőség szerint más diagnosztikai módszerrel (pl. molekuláris kimutatás) is meg kell erősíteni. Az aviditás mérés során a mintában jelenlévő ellenanyag specifikusságát tudjuk mérni. Az alacsony aviditás érték (kevésbé specifikus ellenanyag) közelmúltban lezajlott rubeola fertőzésre utal.

A rubeola fertőzést követően megjelenő ellenanyagok szintváltozása az 5. ábrán látható.

**5. ábra: A rubeola fertőzés kiváltotta tipikus immunglobulin szint változás és a vírusürítés időbeli jellegzetességei<sup>10</sup>**



#### Vírus kimutatása:

A vírus közvetlen kimutatását a szerológiai vagy klinikai kritériumoknak megfelelő betegek mintáin végzik reverz transzkripcióval kombinált polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) (ld. 3.3. fejezet).

A vizsgálat nagyon specifikus, de csak a fertőzés megfelelő stádiumában (a kiütések megjelenésétől számított 0-7 nap) levett minta esetén alkalmazható (5. ábra). A rubeola vírus esetében az RT-PCR vizsgálat végezhető vérsavó, vizelet, garatmosó folyadék, vírus transzport médiumban érkező (VTM) torokváladék, magzatvíz, liquor mintákból.

#### Nukleotidsorrend meghatározás:

A nukleotidsorrend meghatározásának a rubeola fertőzés esetén nincs diagnosztikai jelentősége, mivel a vírus genotípusa nem befolyásolja a betegség klinikai lefolyását. A genotípus meghatározásának eredménye a járványügyi vizsgálatokban játszik szerepet (ld. 3.5. fejezet).

#### Vírus izolálás:

A rubeola vírus izolálása igényes, aprólékos munkát igénylő feladat. Gyakorlatban az afrikai zöld majom veséjéből származó sejtkultúrán (Vero, Vero/SLAM) történik, de a laboratóriumban nem alkalmazzák rutin diagnosztikai céllal.<sup>10</sup>

## **2.3. A WHO rubeola eliminációs programja**

Magyarország a WHO tagállamaként köteles részt venni az Egészségügyi Világszervezet által meghirdetett járványügyi surveillance programokban, köztük a 2005-ben elindított globális kanyaró és rubeola eliminációs programban. Ennek az Európai régióra kiterjedő határidejét először 2010-re tették, de később 2015-re módosították.<sup>16</sup> Magyarországon 2009-ben iktatták törvénybe a Nemzetközi Egészségügyi Rendszabályokat (IHR), mely jogilag is biztosítja az előírt járványügyi teendők pontos követését.

A kanyaró és a rubeola eliminációs program sikerességét több tényező garantálja:<sup>16</sup>

- A két vírus egyikének sincs állati rezervoárja, a vírus fennmaradása egyedül emberi szervezeten belül valósulhat meg.
- Pontos diagnosztikai módszerek állnak rendelkezésre.

- A meglévő vakcinációs stratégiák hatékonyak és biztonságosak.
- A fertőzések átvitelét már hosszabb időre sikerült megszakítani nagyobb területeken.

A program legfőbb stratégiai pontjai:<sup>16,17</sup>

- A >95%-os oltási lefedettség elérése és fenntartása olyan vakcinációs stratégiák kifejlesztésével, amelyek a „nehezen elérhető” populációs csoportokra (kisebbségi, földrajzilag elszigetelt, nomád életmódú/eltérő filozófiai gondolkodású csoportok stb.) is kiterjednek.
- A kanyaró ellen nem megfelelő immunitási szinttel rendelkező emberek oltása kiegészítő vakcinációs tevékenységek révén, különös figyelemmel a nagyobb közösségben (iskolák, egyetemek, katonaság, egészségügyi munkakörök) mozgó embercsoportokra.
- A rubeolára fogékony kisgyermek és a vakcinációs programok megkezdése előtt született, szülőképes korú nők immunizálása.
- A felügyeleti rendszerek és tevékenységek fejlesztése, a detektált fertőzőesetek pontos igazolása és járványügyi vizsgálata, amibe beletartozik a betegség forrásának felderítése és a genotípus megállapítása.
- A betegség megelőzési módjának, fontosságának és esetleges kockázatainak ismertetése a nyilvánosság tájékoztatásával. A rendelkezésre álló információkat elérhetővé kell tenni az egészségügyi szakemberek számára.

### 2.3.1. Védőoltás

Az 1964-1965-ben az Egyesült Államokban 12,5 millió megbetegedést (>2000 encephalitises és >20000 CRS esetet) okozó rubeola járványok vezettek a vírus elleni védőoltás kifejlesztésének megkezdéséhez.<sup>18</sup> 1965-ben Parkman és munkatársai sikeresen attenuálták a vad típusú vírust 77 ciklusban passzálva azt Vero szövetkultúrában. Pár éven belül már három vakcinát is kifejlesztettek az Egyesült Államokban: a HPV-77 jelzésű törzs állati szöveteken passzált két változatát, és a „Cendehill” törzset. Európában az RA 27/3, Japánban a Takahashi és Matsuura vakcinákat engedélyeztették.<sup>3</sup>

Az előállított vakcinatörzsek közül az RA 27/3 típust alkalmazzák leggyakrabban Európában. A törzs alapjául szolgáló vírust az 1964-es járvány idején izolálták, és emberi fibroblaszt sejten történő passzálási sorozat során attenuálták.<sup>19</sup>

Az élő attenuált vírust tartalmazó védőoltás élethosszig tartó, védő mennyiségű ellenanyag szintet alakít ki az emberben. A klinikai szerológiai vizsgálatok alapján a 12 hónaposan és idősebb korban oltott személyek 95%-ánál kimutatható volt az RV ellen biztos védelmet nyújtó immunglobulin mennyiség már egyszeri vakcinációt követően is. Az oltottak több mint 90%-a az elkövetkezendő 15 évben védettnek bizonyult a fertőzéssel szemben. A szerokonverziós arány nem különbözött a monovalens rubeola vakcina, a trivalens MMR (kanyaró, mumpsz, rubeola) és a tetraavalens MMRV (kanyaró, mumpsz, rubeola, bárányhimlő) oltás esetében.<sup>18,20</sup>

A WHO által az EU és EEU régióban 2012 január és március között regisztrált 10661 eset közül 1% volt bizonyítottan oltott, ilyen megbetegedéseket csak a 14 éven aluli korosztályban találtak. A 15 éves és annál idősebb fertőzöttek egyike sem volt bizonyítottan vakcinált. \* A 2012-es romániai rubeola járvány 13708 diagnosztizált esete közül is mindössze 377 (2,75%) esett át korábban RV elleni oltáson.<sup>21</sup>

### 2.3.2. Filogenetikai analízis

A WHO kanyaró és rubeola eliminációs programjának egyik fő pillére a betegségek terjedésének pontos követése, amely a járványügyi jelentések és a fertőzést okozó vírusok genotípusának meghatározásával valósul meg.<sup>16,17</sup>

A rubeola vírusának mindössze egy szerotípusa ismert, ezen belül 9 elismert és 4 ideiglenes genotípust tartanak számon (ld. 3.1.6. fejezet), melyek két nagyobb kládba sorolhatóak.<sup>22</sup> A rubeola RNS-e nem mutat nagy változatosságot, a nukleotidok 78%-a invariáns, a két legtávolabbi genotípusa is mindössze 8,74%-ban tér el egymástól.<sup>11</sup>

A rubeola vírus genotípusának meghatározására egy általánosan használható filogenetikai módszert ajánl a WHO. A leírás tartalmazza az elfogadott referenciaszekvenciákat és az újonnan izolált szekvenciák elnevezésére vonatkozó elveket.<sup>22</sup> Ezek egységes alkalmazása megkönnyíti a különböző országokban kapott eredmények összehasonlítását.

---

\* ECDC adatai:

[http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/rubella/epidemiological\\_data/pages/vaccinationstatus.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/rubella/epidemiological_data/pages/vaccinationstatus.aspx)

A filogenetikai analízis a szekvenciák közötti kapcsolatok vizsgálatának elterjedt módja. Segítségével vizsgálhatóak az evolúciós viszonyok, valamint nyomon követhetőek a szerkezeti és funkcionális változások. Az analízis végezhető fehérjék aminosav szekvenciája és kódoló illetve nem kódoló nukleinsav szekvenciák felhasználásával.

A filogenetikai fát különböző algoritmusok szerint készíthetjük el, ezek leggyakrabban alkalmazott formái a karakter alapú Neighbor-joining és Minimum Evolution, illetve a távolság alapú Maximum Parsimony és Maximum Likelihood módszer. A vizsgálat eredménye a filogenetikai törzsfa (megjelenített formáját dendogramnak nevezzük), mely a leszármazási viszonyok lehetséges (de nem feltétlenül helyes) kapcsolatait ábrázolja.

A vírusok filogenetikai analízise során pontos képet kaphatunk a vírus terjedési útvonaláról, kisebb járvány esetén a járvány kivizsgálása során kapott információk alapján akár a kiindulási pont is megállapítható.<sup>23</sup> A rubeola vizsgálata során a vírus RNS egyik hipervariábilis régióját elemezzük az E1 strukturális fehérjét kódoló génen (ld. 3.3. fejezet).

## **2.4. Járványügyi helyzet Magyarországon**

Magyarországon 1969 óta rutinszerűen végzik a rubeola szerológiai diagnosztikáját a Takátsy Gyula által kifejlesztett hemagglutináció-gátlás (HAG) vizsgálattal.<sup>24</sup> Később ez kiegészült az IgM kimutatására alkalmas SPIHAd (solid-phase immunosorbent haemadsorption), majd IgG, IgM és aviditás mérésére használható ELISA tesztekkel.\*

Az Országos Epidemiológiai Központ évkönyveinek statisztikai alapján az 1970-es évek elején a mérésre érkezett minták mindössze 60-70%-a mutatott szeropozitivitást. Ez az érték az 1973 október és 1974 július között zajló magyar rubeolajárványnak köszönhetően 90% felé ugrott, majd az azt követő években kis mértékben csökkent. A járvány idején 109717 megbetegedést jelentettek, a

---

\* Az Országos Epidemiológiai Központ adatai alapján

laboratóriumban 663 terhes nőnél szerológiaiilag igazolták a fertőzést. Az OEK 1975-ben javasolta a kísérleti oltási kampányok megkezdését.\*

Ma a hazai oltási rend alapján a magyar gyerekek 15 hónaposan kapják az első MMR (kanyaró, rubeola, mumpsz trivalens vakcina) oltást, majd 11 évesen a másodikat, amely az előző oltásból esetleg kimaradt egyének immunizációját teszi biztossá.<sup>25</sup>

2003-ban a WHO 17 európai ország rubeola elleni vakcinációjának sikerességét vizsgálta. A szeroepidemiológiai vizsgálatokat követően Magyarországot az 5 legjobban átoltott ország közé sorolta Ausztriával, Csehországgal, Szlovéniával és Szlovákiával együtt. A magyar gyerekek 97,8%-a és a fiatal felnőttek több mint 95%-a bizonyult szeropozitívnak. Alacsonyabb védettségi szintet (89,4%) a 30 és 39 éves közötti nőknél találtak, akik nem estek bele egyik oltási kampány célkorosztályába sem.<sup>26</sup>

A magyarországi átoltottság sikerességét mutatja, hogy a Romániában jellemző kiterjedt rubeola járványok nem terjednek át hazánkra. Az ilyenkor diagnosztizált szórványos esetek nagy részénél a szomszédos országba való utazás során történik a fertőződés, és hazatérésüket követően nem terjesztik el a betegséget közvetlen környezetükben sem.\*

---

\* Az Országos Epidemiológiai Központ adatai alapján

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Nukleinsav tisztítás

Valamennyi laboratóriumba beérkező minta összetett rendszer, melyből először ki kell vonni a vizsgálathoz szükséges nukleinsavakat. DNS és RNS izolálására gyakran alkalmazott módszer a sejtek lizálását követő fenol-kloroformos kicsapás.

##### Felhasznált anyagok, reagensok:

|                    |                                                                                                                       |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proteináz-K enzim: | Tritirachium albumból származó<br>37 U/mg fehérje aktivitású                                                          |
| Lízis puffer:      | 25 ml 200 mM EDTA<br>12 ml 5 M NaCl<br>40 ml 10%-os SDS<br>40 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5)<br>83 ml RNáz, DNáz mentes víz |
| Fenol (pH 4,3):    | 0,1 M citrát pufferrel telített                                                                                       |
| Kloroform:         | Analitikai tisztaságú                                                                                                 |
| 2-propanol:        | Analitikai tisztaságú                                                                                                 |
| Etanol (70 m/m%):  | 36,5 ml 96%-os etanol<br>13,5 ml bidesztillált víz                                                                    |
| Desztillált víz:   | DNáz, RNáz mentes                                                                                                     |

##### A munka menete:

Feliratozott 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe 395 µl lízis puffert, 160 µl mintát és 4 µl proteináz-K enzimet mértem a reagens-kimérő lamináris boxban. Vortexelés után egy órát inkubáltam 37°C-os termosztátban.

Az inkubációs idő letelte után elszívófülke alatt a mintákhoz pipettáztam 395 µl fenolt, majd 160 µl kloroformot. Homogenizálást követően 10000 fordulatszámon (rpm) 15 percig centrifugáltam.

Miután a fázisok szétváltak a vizes fázisú felülúszóból 3x160 µl-t pipettáztam tiszta, feliratozott Eppendorf csövekbe vigyázva, hogy a szennyező anyagokat

tartalmazó alsó szerves fázist és a két fázis határán összegyűlt fehérjéket ne vigyem át a felülúszóval. Az így kapott 480 µl elegyre azonos mennyiségű 2-propanolt mértem. A csövek tartalmát lassú forgatással kevertem össze, majd egy éjszakán át -20°C-os fagyasztóban inkubáltam, hogy az RNS kicsapódás teljesen végbemenjen.

A következő napon a mintákat 10000 fordulatszámon 15 percig centrifugáltam. Ezt követően a felülúszót leöntöttem róla, majd 400 µl 70%-os etanolt mértem rá. Vortexelés után az előbb említett paraméterekkel centrifugáltam. A keletkező csapadék a csövekben a forgástengelytől mért legtávolabbi pont környékén rakódik ki. Az Eppendorf csöveket befelé néző nyitófüllel, azonos pozícióban helyeztem el a rotorban, hogy a későbbiekben tudjam, hol található a szabad szemmel nem látható nukleinsav pellet.

A centrifugálás végeztével a felülúszót ismételten leöntöttem, majd a csöveket nyitott kupakkal száradni hagytam a lamináris boxban körülbelül egy óráig.

Amikor a mintákról teljesen elpárolgott az etanol, 8 µl RNáz és DNáz mentes vízzel oldottam fel a csövek falára tapadt nukleinsavat. Az oldatot -20°C-on tároltam.

### **3.2. Reverz transzkripció**

A rubeola vírus genomja pozitív szálú RNS. Amennyiben a vírust PCR reakcióval kívánjuk kimutatni, szükséges az RNS alapján előállítani a vele komplementer DNS szálát (cDNS), amely a reverz transzkripció folyamata alatt valósul meg. Az egér leukémia vírusból származó reverz transzkriptáz enzim, más néven RNS függő DNS polimeráz a mintában lévő RNS-hez kötődött primerekhez kapcsolódik, és 3' végüktől tovább haladva az RNS alapján szintetizálja meg a cDNS szálát.

#### Felhasznált anyagok, reagensok:

|                          |                                                        |
|--------------------------|--------------------------------------------------------|
| Desztillált víz:         | DNáz, RNáz mentes                                      |
| PCR puffer:              | 15 mM MgCl <sub>2</sub> tartalmú                       |
| MgCl <sub>2</sub> oldat: | 25 mM                                                  |
| dNTP:                    | 10 mM                                                  |
| Primer:                  | R7                                                     |
|                          | 200 nM/ml koncentrációjú törzsoldatból frissen hígítva |

RNáz inhibitor: 20 U/μl aktivitású  
MuLV reverz transzkriptáz: 50 U/μl aktivitású

R7 primer:

5' CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA 3'

A munka menete:

A szükséges reagensekből kiszámoltam a vizsgálandó minták számának (n) plusz egy reakciónak elegendő mennyiségeket (n+1). Utóbbi a munka közben a pipetta hegyekre tapadt reagens veszteségének ellensúlyozására szolgál, a folyamatok során reagens kontrollként is felhasználtam. (1. táblázat)

**1. táblázat: RT reakcióelegy összetétele egy mintára vonatkozóan**

| RT reakcióelegy komponens | Térfogat [μl] |
|---------------------------|---------------|
| Desztillált víz           | 1             |
| PCR puffer                | 2             |
| 25 mM MgCl                | 4             |
| dNTP                      | 8             |
| R7 (négyzetes hígítás)    | 1             |
| RNáz inhibitor            | 1             |
| Reverz transzkriptáz      | 1             |
| Összesen                  | 18            |

A reagens összemérő asztalon elkészítettem az R7 primer törzsoldat négyzetes hígítását RNáz és DNáz mentes vízzel. Egy 500 μl-es Eppendorf csőbe összemértem a kiszámolt reagens mennyiségeket.

A mixet vortexeléssel homogenizáltam, majd feliratozott 500 μl-es Eppendorf csővekbe 18 μl-enként szétmértem. Lamináris boxban hozzáadtam a mintákból kivont nukleinsav vizes oldatának 2-2 μl-ét. A reagens kontrollnak szánt utolsó csőbe nem mértem be plusz anyagot.

A jól lezárt Eppendorf csőveket a PCR gépbe helyeztem, és elindítottam az A44 jelzésű RT programot, melynek hőmérséklet profilja a 2. táblázatban olvasható. A program befejezése után a kész cDNS mintákat további felhasználásig -20°C-on tároltam.

**2. táblázat: Az RT hőmérsékletprofilja (A44 program)**

| Folyamat    | Hőmérséklet [°C] | Időtartam [min] |
|-------------|------------------|-----------------|
| Anelláció   | 42               | 5               |
| Extenzió    | 37               | 20              |
| Inaktiválás | 94               | 5               |

### **3.3. Polimeráz láncreakció**

A PCR (polimeráz láncreakció) során a mintánkban található vírus eredetű cDNS egy kiválasztott szakaszát sokszorozzuk meg DNS polimeráz enzim segítségével. A reakció pontosan beállított, ismétlődő hőciklusok során valósul meg.

Először magas hőfokon (>95°C) denaturáljuk a kettős szálakat. Ez az első körben a reverz transzkripció során szintetizálódott RNS-DNS hibrid szál elválasztását jelenti, az azt követő ciklusokban pedig kettős szálú DNS denaturációját. Ez után következik az anellációs szakasz, mely során a sokszorozni kívánt DNS szakaszt a két szálára specifikusan tervezett oligonukleotid szakaszokkal (primerek) hibridizáltatjuk. Ez a primerek olvadási hőmérsékletétől függő alacsonyabb hőfokon (55-65°C) történik. A primerek specifikus betapadása döntő fontosságú a PCR sikerességében.

A harmadik, elongációs szakasz a reakcióelegyben lévő termofil polimeráz optimumán (72°C) zajlik. Az enzim az egyszálú DNS szálakat kettős szálúvá egészíti ki a bekötődött primerek 3' végétől indulva. A három lépésből álló ciklus 25-35 alkalommal megismétlődik, legvégül kiegészül egy néhány perces 72°C-os lépéssel, amely során az esetlegesen félben maradt szálak teljesen megszintetizálódnak.

A PCR reakciók specifikusságát növeli, ha kétkörös, úgynevezett nested PCR reakciót végzünk, melynek második körében alkalmazott primerei az első körben sokszorosított DNS szakaszon belülre vannak tervezve. Így az első körben aspecifikusan keletkező nukleinsav szakaszok kisselektálódnak az elegyből.

A szakdolgozatom készítése során két eltérő nested PCR-t alkalmaztam, melyek primereikben és hőciklusukban is eltérnek. Az egyik eljárás a vírusgenom egyik konzervatív régiójára tervezett primereket felhasználó, rubeola vírus kimutatására alkalmazott nested PCR. A másik eljárást a kimutatási PCR során pozitívnak bizonyuló mintákon végeztem. Célja a minta szekvenálásra és filogenetikai analízisre alkalmas,

hipervariábilis nukleinsav szakaszának megsokszorozása. Erre a továbbiakban az egyszerűség kedvéért genotipizáló PCR-ként hivatkozom.

#### Felhasznált anyagok:

REDTaq<sup>®</sup> ReadyMix<sup>™</sup> (SIGMA) tartalmazza az összes szükséges reakció összetevőt köztük: dNTP, Taq polimeráz, MgCl<sub>2</sub> stb...

Primerek: R2, R7 (ld. a 4. táblázatban)  
R8C, R11 (ld. a 7. táblázatban)  
NOF, NOR (ld. a 9. táblázatban)  
NIF, NIR (ld. a 13. táblázatban)

Desztillált víz: DNáz, RNáz mentes

#### A munka menete:

A PCR I. helyiség reagens összemérő asztalán elkészítettem az első kör primereinek munkahígítását, és összemértem a reakcióelegyet a vizsgálandó minták számának (n) megfelelő, plusz egy reakció mennyiségben (n+1). Ez utóbbi a pipetták hegyén maradó veszteség kiegyenlítésére szolgál, de a továbbiakban is felhasználtam reagens kontrollként. Vortexelés után a reakcióelegyet szétmértem feliratozott, 200 µl-es Eppendorf csövekbe. (Az alkalmazott primereket és arányokat ld. a 3., 6., 9. és 12. táblázatban.)

A lamináris boxban a mintákból előállított cDNS-ből bemértem a csövekbe a megadott mennyiséget, szűrős pipettahegyet alkalmazva. A homogenizálást a beméréskor fel-le pipettázással végeztem. Ezt követően a csöveket lezártam, és ellenőriztem, hogy az elegy az Eppendorf csövek alján buborékmentesen, egy reakció-térfogatban helyezkedik el.

A csöveket a PCR II. helyiségben lévő PCR készülékbe helyeztem, és elindítottam a megfelelő programot. A reakció végezetével a terméket -20°C-on tároltam. (Az alkalmazott programokat és hőmérsékletprofiljukat ld. az 5., 8., 11. és 14. táblázatban.)

A nested PCR második köre az előzővel analóg módon zajlott az első kör termékét felhasználva.

**3. táblázat: A kimutatási PCR első körének reakcióelegye  
egy mintára vonatkoztatva**

| PCR reakcióelegy komponens     | Térfogat [μl] |
|--------------------------------|---------------|
| Desztillált víz                | 13            |
| Ready mix                      | 25            |
| primer: R2 (négyzetes hígítás) | 1             |
| primer: R7 (négyzetes hígítás) | 1             |
| <b>RT termék</b>               | <b>10</b>     |
| Összesen                       | 52            |

**4. táblázat: A kimutatási PCR első körének primerei**

| Primer       | Szekvencia (5' → 3')       | Pozíció a genomon <sup>27</sup> (nt) |
|--------------|----------------------------|--------------------------------------|
| R2 (forward) | CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC | 8807-8826                            |
| R7 (reverse) | CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA | 8991-8972                            |

A PCR termék várt hossza: 185 bp (8807-8991)

**5. táblázat: A kimutatási PCR első körének hőciklusa  
(RUBEOLA1 program)**

| Folyamat    | Hőmérséklet [°C] | Időtartam [s] | Ismétlődés |
|-------------|------------------|---------------|------------|
| Denaturáció | 94               | 30            |            |
| Anelláció   | 54               | 30            |            |
| Extenzió    | 72               | 60            | 25x        |
| Extenzió    | 72               | 300           | 1x         |

**6. táblázat: A kimutatási PCR második körének reakcióelegye  
egy mintára vonatkoztatva**

| PCR reakcióelegy komponens      | Térfogat [μl] |
|---------------------------------|---------------|
| Desztillált víz                 | 22            |
| Ready mix                       | 25            |
| primer: R8C (tízszerez hígítás) | 1             |
| primer: R11 (tízszerez hígítás) | 1             |
| <b>PCR I termék</b>             | <b>3</b>      |
| Összesen                        | 52            |

**7. táblázat: A kimutatási PCR második körének primerei**

| <b>Primer</b> | <b>Szekvencia (5' → 3')</b> | <b>Pozíció a genomon<sup>27</sup> (nt)</b> |
|---------------|-----------------------------|--------------------------------------------|
| R8C (reverse) | GAA TGG CGT TGG CAA ACC GC  | 8968-8949                                  |
| R11 (forward) | CTC GAG GTC CAG GTC CTG CC  | 8826-8845                                  |

A PCR termék várt hossza: 143 bp (8826-8968)

**8. táblázat: A kimutatási PCR második körének hőciklusa**

**(RUBEOLA2 program)**

| <b>Folyamat</b> | <b>Hőmérséklet [°C]</b> | <b>Időtartam [s]</b> | <b>Ismétlődés</b> |
|-----------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| Denaturáció     | 94                      | 30                   | 30x               |
| Anelláció       | 54                      | 30                   |                   |
| Extenzió        | 72                      | 60                   |                   |
| Extenzió        | 72                      | 300                  | 1x                |

**9. táblázat: A genotipizáló PCR első körének reakcióelegye**

**egy mintára vonatkoztatva**

| <b>PCR reakcióelegy komponens</b> | <b>Térfogat [μl]</b> |
|-----------------------------------|----------------------|
| Desztillált víz                   | 13                   |
| Ready mix                         | 25                   |
| primer: NOR (négyzetes hígítás)   | 1                    |
| primer: NOF (négyzetes hígítás)   | 1                    |
| <b>RT termék</b>                  | <b>10</b>            |
| Összesen                          | 50                   |

**10. táblázat: A genotipizáló PCR első körének primerei**

| <b>Primer</b> | <b>Szekvencia (5' → 3')</b> | <b>Pozíció a genomon<sup>*</sup> (nt)</b> |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| NOR (reverse) | CCA GGT CTG CCG GGT CTC     | 9574-9557                                 |
| NOF (forward) | CCC ACC GAC ACC GTG ATG A   | 8657-8675                                 |

A PCR termék várt hossza: 918 bp (8657-9574)

<sup>\*</sup>F-Therien szekvenciához viszonyítva (NC\_001545)

**11. táblázat: A genotipizáló PCR első körének hőciklusa  
(RUBGEN1 program)**

| Folyamat    | Hőmérséklet [°C] | Időtartam [s] | Ismétlődés |
|-------------|------------------|---------------|------------|
| Denaturáció | 94               | 300           | 1x         |
| Denaturáció | 94               | 60            | 30x        |
| Anelláció   | 62               | 60            |            |
| Extenzió    | 72               | 60            |            |
| Extenzió    | 72               | 300           | 1x         |

**12. táblázat: A genotipizáló PCR második körének reakcióelegye  
egy mintára vonatkoztatva**

| PCR reakcióelegy komponens      | Térfogat [μl] |
|---------------------------------|---------------|
| Desztillált víz                 | 22            |
| Ready mix                       | 25            |
| primer: NIR (tízszerez hígítás) | 1             |
| primer: NIF (tízszerez hígítás) | 1             |
| <b>PCR I termék</b>             | <b>3</b>      |
| Összesen                        | 52            |

**13. táblázat: A genotipizáló PCR második körének primerei**

| Primer        | Szekvencia (5' → 3')      | Pozíció a genomon* (nt) |
|---------------|---------------------------|-------------------------|
| NIR (reverse) | GCA GTG GTG TGT GTG CC    | 9549-9533               |
| NIF (forward) | GTG ATG AGC GTG TTC GCC C | 8669-8687               |

A PCR termék várt hossza: 881 bp (8669-9549)

\*F-Therien szekvenciához viszonyítva (NC\_001545)

**14. táblázat: A genotipizáló PCR második körének hőciklusa  
(RUBGEN2 program)**

| Folyamat    | Hőmérséklet [°C] | Időtartam [s] | Ismétlődés |
|-------------|------------------|---------------|------------|
| Denaturáció | 94               | 300           | 1x         |
| Denaturáció | 94               | 60            | 30x        |
| Anelláció   | 57               | 60            |            |
| Extenzió    | 72               | 60            |            |
| Extenzió    | 72               | 300           | 1x         |

### 3.4. Agaróz gélelektroforézis

A PCR reakció során keletkezett fragmentumok detektálására és elválasztására legáltalánosabban használt módszer az agaróz gélelektroforézis. A puffer oldatba helyezett, 2% agarózzal szilárdított gélben az elektromos tér hatására a DNS szakaszok negatív töltésüknek köszönhetően a pozitív töltésű anód felé vándorolnak. A haladás sebességét az adott fragmentumok hossza határozza meg, a kisebbek méretüknél fogva gyorsabban jutnak előre a térhálós szerkezetű gélben. A termék nagyságát a mintákkal együtt futtatott, ismert hosszúságú DNS szakaszokat tartalmazó molekulatömeg markerhez („létra”) viszonyítva becsülhetjük meg.

#### Felhasznált anyagok:

Agaróz

Etídium-bromid                      0,05%-os oldat

TBE puffer                            1 M Trisz

0,8 M Bórsav

0,01 M EDTA

Brómfenolkék                      0,05%-os oldat EDTA-val

DNS molekulatömeg marker 100 bp léptékkal

#### A munka menete:

Erlenmeyer lombikba bemértem 1,8 g agarózt, és hozzáadtam 90 ml-t a húszszorosára hígított TBE pufferből. Mikrohullámú sütőben 400 W-on melegítettem 4 percig. Ez idő alatt összeállítottam a gél öntéséhez szükséges tálat a megfelelő méretű zsebeket eredményező fésűvel.

Az áttetsző, még folyékony de nem forró agaróz oldathoz hozzáadtam 4,5 µl etídium-bromidot, majd a lombik lassú, körkörös mozdításával kevertem el. Az előkészített tálba öntöttem, a felszínen keletkező buborékokat pipettahegy segítségével eltávolítottam. A gél szobahőmérsékleten hagytam megszilárdulni, ez körülbelül 40-50 percet vesz igénybe. A kész gélből a fésű pufferbe merítve eltávolítható, és a gélöntő tálban +4°C-on, becsomagolva tárolható pár napig.

A gél a szintén húszszoros hígítású TBE puffert tartalmazó elektroforézises kádba helyeztem a megfelelő irányban. A zsebekbe a jegyzőkönyv szerinti sorrendben

pipettával bemértem a minták 12-12  $\mu\text{l}$ -ét. Mivel a PCR-hez használt Ready mix tartalmaz festékanyagot, és sűrűsége is nagyobb a kádban használt puffernél, a minták beméréséhez nem volt szükség brómfenolkék oldat adagolására. Az utolsó zsebbe 5  $\mu\text{l}$  brómfenolkék és 3,5  $\mu\text{l}$  DNS molekulatömeg marker keveréke került.

A tetőt ráhelyeztem a futtató kádra, majd 150 V feszültségen és 120 mA áramerősségen futtattam a gélen a mintákat 40-50 percig. A folyamat előrehaladását a molekulatömeg markerhez adott brómfenolkék és a minták festéktartalmának helyzetét („front”) figyelve ellenőrizhetjük. Amint a front a gél végét 0,5-1,0 cm-re megközelíti, a futtatást leállíthatjuk.

A futtatás befejezésekor a készüléket kikapcsoltam, a tető leemelése után a leolvasó készülék kamrájába helyeztem, majd UV fényt rákapcsolva a készülék digitális fényképezőgépével lefotóztam. A számítógépes rendszerre továbbított gélképről történt a kiértékelés.

### **3.5. Szekvenálás**

#### **3.5.1. A Sanger-féle szekvenálási módszer elméleti háttere**

A legszélesebb körben elterjedt DNS bázissorend meghatározási módszert az angol biokémikus, Frederick Sanger dolgozta ki 1975-ben.<sup>28</sup>

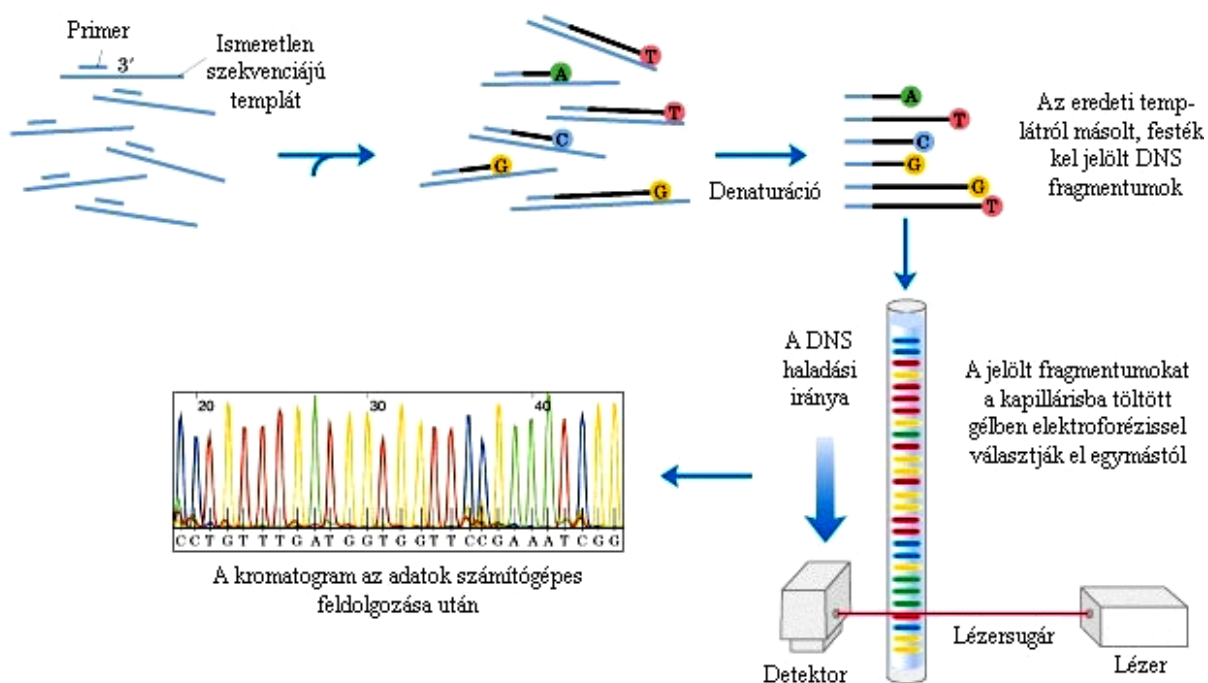
A szekvenálás során a PCR-hez hasonló ciklikus reakciósort végzünk tisztított DNS szakaszokkal. Lényeges különbség azonban, hogy egyszerre csak egy primert használhatunk, továbbá a reakcióelegybe didezoxinukleotid-trifoszfát (ddNTP) molekulák is kerülnek. Ezek a pentózegység 2' és 3' pozíciójában sem tartalmaznak -OH csoportot, így beépülésük után nem tud tovább szintetizálódni a DNS szál.

Működése során a DNS polimeráz enzim egyaránt beépít dNTP és ddNTP molekulákat, így a reakció előrehaladtával a nagy számok törvénye szerint minden egyes lánchosszhoz fog tartozni legalább egy termék. Ezek hosszát detektálva, és a termináló ddNTP jellegét ismerve megállapíthatjuk a vizsgált szakasz bázissorrendjét.

A detektálás a jelölési módtól függően többféleképpen is történhet:

- a.) Ha jelölés nélküli ddNTP áll rendelkezésünkre, akkor a reakciót mind a négy didezoxi-nukleotiddal külön végezzük el, és a kapott elegyeket poliakrilamid gélen elektroforézissel egymás mellett futtatjuk. A gélképen megjelenő sávok sorrendje megadja az analizálandó DNS szakasz nukleotid sorrendjét. A módszer megbízható, de munka- és időigényes, valamint hosszabb nukleinsavakra nehezen alkalmazható.
- b.) Ha a primeren radioaktív izotóp, vagy fluoreszcens jelző található, akkor a detektálás automatizálható. Ebben az esetben is nukleotidonként külön-külön el kell végezni mérést.
- c.) A bázisegységenként eltérő fluoreszcens jelöléssel ellátott ddNTP használata lehetővé teszi hogy a szekvenálási reakciót a ddNTP keverékkel hajtsuk végre. A terméket leggyakrabban kapilláris gélelektroforézissel választják el. A detektálás során a jelzőmolekulákat egy lézersugár gerjeszti, a detektor pedig a kibocsátott fény hullámhossza alapján azonosítja (6. ábra). Az Országos Epidemiológiai Központban is ezt a módszert használtuk bázissorrend meghatározására.

**6. ábra: A Sanger-féle szekvenálás sematikus ábrája<sup>15</sup>**



### 3.5.2. PCR termék tisztítása

A nested PCR elvégzése után termékként olyan elegy áll rendelkezésünkre, amely a kívánt kettősszalú DNS-en kívül tartalmazza az összes feleslegben megmaradó reagenst és egyéb melléktermékeket (pl. primerek, dezoxinukleotid-trifoszfátok, foszfátionok, enzim maradványok, stb.). A szekvenáló reakció előtt szükséges eltávolítani ezeket a reakció során zavaró anyagokat. Mérésiem során erre a célra a M Clean up System (Viogene) gyári kitet használtam a hozzá tarozó munkautasítások szerint.

A teljes PCR terméket átpipettáztam egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd az előírt puffer 0,5 ml-ével hígítottam. Az elegyet egy szilikagél tartalmú tisztító oszlopra pipettáztam, majd centrifugáltam. A gél porózus szerkezetében megkötődnek a hosszabb DNS szakaszok, viszont a primerek, nukleotidok és egyéb molekulák távoznak az oszlophoz tartozó gyűjtőcsőbe.

Három egymás utáni tisztítási lépésben ecetsav és etanol tartalmú mosópuffereket pipettáztam az oszlopokra, majd centrifugáltam, és leöntöttem a gyűjtőcsövek tartalmát. Ezek a lépések a gélben esetleg megrekedő szennyezőanyag eltávolítására szolgálnak.

Pár perc száradás után az oszlopokat steril Eppendorf csőre helyeztem, majd rájuk mértem 32  $\mu$ l eluáló puffert. Ez az oldat (pH 7,0-8,5) megváltoztatja a gélben lévő kölcsönhatások jellegét, a megkötött DNS szálak felszabadulnak, és centrifugálás után a gyűjtőként használt Eppendorf csőbe kerülnek.

A tisztított PCR termék  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tárolható.

### 3.5.3. Szekvenálási reakció

A szekvenálási reakció során történik a ddNTP végeket tartalmazó, eltérő hosszúságú egyszalú DNS szálak megszintetizálása. Az eljárást a PCR termék mindkét szálára szokás elvégezni. A két irányból történő szekvenálásra azért van szükség, mert a termékek detektálása egy bizonyos DNS-hossz felett (a rendelkezésünkre álló készülék esetében a határ körülbelül 500-600 nt) meglehetősen pontatlan, gyakran sikertelen. Ezért az általam vizsgált közel 800 bp nagyságú szakasz nukleotid sorrendjének megállapításához fontos a genotipizáló PCR-hez használt mindkét primert külön-külön

alkalmazva elvégezni a mérést. Az 1000 bp, vagy annál hosszabb DNS esetében pedig a terméket több kisebb szakaszra bontva érdemes szekvenálni.

#### Felhasznált anyagok:

|                         |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Primerek:               | NIR, NIF (ld. 3.3. fejezet, 13. táblázat)<br>200 nM/l-es törzsoldat 20x hígítása                                                                                         |
| Premix (GE Healthcare): | DYEnamic ET Dye Terminator Kit (MegaBACE)<br>tartalmazza a szükséges reakció összetevőket:<br>Thermo Sequenase <sup>TM</sup> II DNS polimeráz<br>dNTP<br>ddNTP<br>puffer |
| Desztillált víz:        | DNáz, RNáz mentes                                                                                                                                                        |

#### A munka menete:

A reakcióelegy összeállításakor a genotipizáló PCR termékek futtatásának gélfotója alapján döntöttük el, hogy hány µl-t mérjünk be mintánként a tisztított DNS-ből. A desztillált víz mennyiségét úgy választottuk, hogy az elegy végtérfogata 20 µl legyen.

Előkészítettem mintánként 2-2 db (külön a két primerhez) 200 µl-es Eppendorf csövet, majd bemértem a kiszámított desztillált vizet, ezt követően a 10 nM/l koncentrációjú primer 1 µl-ét. Hozzáadtam a DNS-t, legvégül 8 µl Premix oldatot pipettáztam rá. A csöveket pár másodpercig centrifugáltam, majd beleraktam a szekvenálási programra állított PCR készülékbe.

**15. táblázat: A szekvenálási reakció hőciklusa**

| Folyamat    | Hőmérséklet [°C] | Időtartam [s] | Ismétlődés |
|-------------|------------------|---------------|------------|
| Denaturáció | 95               | 20            | 35x        |
| Anelláció   | 55               | 30            |            |
| Extenzió    | 60               | 60            |            |

### 3.5.4. Szekvenálási termék tisztítása

A szekvenálási reakció termékeinek detektálása előtt ismételt tisztítani kell az elegyet, mivel a benne főlegben megmaradó jelölt ddNTP molekulák növelik a zajszintet, az egyéb szennyezők (enzim, primerek, dNTP stb.) pedig a futtatást zavarhatják.

#### Felhasznált anyagok:

|                                 |                                           |
|---------------------------------|-------------------------------------------|
| Ammónium-acetát:                | 7,5M                                      |
| Abszolút etanol:                | Analitikai tisztaságú                     |
| 70%-os etanol                   |                                           |
| Loading puffer (GE Healthcare): | DYEnamic ET Dye Terminator Kit (MegaBACE) |

#### A munka menete:

A reakciótermékek teljes térfogatát átmértem egy 96 lyukú lemez mélyedéseibe. Hozzáadtam 2 µl ammónium-acetátot és 55 µl abszolút etanolt. A lyukakat kupakkal lefedtem, majd 30 percig 4000 fordulatszámon centrifugáltam. Az elegyben lévő DNS szálak a művelet alatt kicsapódnak, és a centrifugális erő hatására a plate mélyedéseinek alján megtapadnak.

A felülúszót pipettával leszívtam, a lyukak aljában maradó folyadék a lemez fejjel lefelé történő ~30 s-os centrifugálásával távolítottam el (1500 rpm).

Ezt követően bemértem 150 µl 70%-os etanolt, és 1 percig centrifugáltam (4000 rpm). A felülúszót az előzőhöz hasonlóan eltávolítottam, majd a lemezt 2-3 percig szobahőmérsékleten szárítottam.

A DNS pellet visszaoldásához 10 µl Loading puffert használtam.

### 3.5.5. Futtatás a szekvenáló gépben

A szekvenálási reakció során nyert DNS szakaszok detektálása MegaBACE™ 1000 (Amersham) DNS szekvenáló készülékkel történt (7. ábra). A futtatás során kulcsfontosságú a minta ionerőssége és DNS koncentrációja, valamint az injektálás feszültsége és ideje. Az eredmények minőségét továbbá befolyásolja a minták

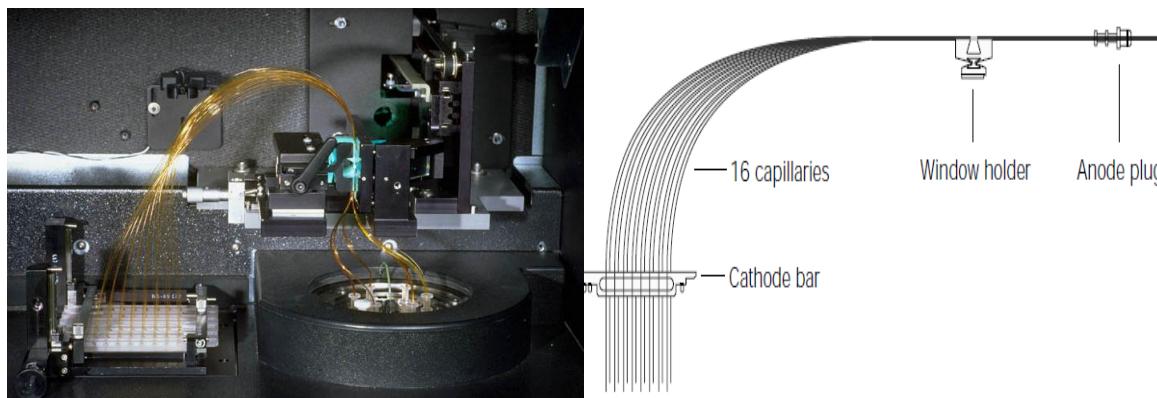
vezetőképessége, az elektroforézis hőmérséklete és a mátrix összetétele. Az optimális értékek megállapításához a készülékhez tartozó használati kézikönyv ad segítséget.<sup>29,30</sup>

#### 7. ábra: MegaBACE™ 1000 DNA Sequencing System (Amersham)<sup>29</sup>



A gépben az eltérő hosszúságú DNS szálak elválasztása kapilláris gélelektroforézissel történik. A készülékbe az igényektől függően  $n \times 8$  (maximum 96) üvegkapilláris helyezhető, melyeknek bemeneti végénél a katód, kimeneti végénél az anód csatlakozása található (8. ábra).

#### 8. ábra: A készülék kapilláris rendszere és detektora<sup>29,30</sup>



A DNS molekulák negatív töltésűek, az elektromos tér hatására a kapillárisba injektált poliakrilamid mátrixban az anód irányában vándorolnak. A legrövidebb DNS szakaszok érnek leghamarabb az anód előtti szakaszon található detektor ablakhoz. Ott egy lézersugár hatására a lánc végi ddNTP-k jelzései meghatározott hullámhosszú fényt emittálnak, amit a fluoreszcencia detektor érzékel, és elektromos jellé alakítva továbbít

a számítógépes rendszernek. A géphez tartozó szoftver kromatogramként jeleníti meg az eredményeket.

#### A mérés paramétereit:

|                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| Mátrix:                 | MegaBACE Long Read Matrix (LPA) |
| Futtató puffer:         | Loading puffer (GE Healthcare)  |
| Injektálási feszültség: | 2 kV                            |
| Injektálás ideje:       | 60 s                            |
| Futtatási feszültség:   | 8 kV                            |
| Futtatás ideje:         | 110 min                         |

### **3.5.6. Az eredmények manuális javítása**

A szekvenáló készülékhez tartozó software a detektált fluoreszcenciák alapján automatikusan elvégzi a szekvencia megállapítását, azonban ez sok esetben ellenőrzésre és javításra szorul. A nyers szekvencia a mérési paraméterekkel együtt \*.txt fájlban jelenik meg, melyben a leolvasás sikerességét egy Overall Quality (általános minőség) százalékos érték jellemzi. A mért szekvenciák közül az OQ>95 értékkel rendelkezőket igyekeztem kiválasztani, az ennél alacsonyabbakat csak szükség esetén, összehasonlításra alkalmaztam. A manuális javításra az \*.abd formátumban megjelenő kromatogram képeket és az internetről ingyenesen letölthető Finch TV (Version 1.4.0) programot használtam.

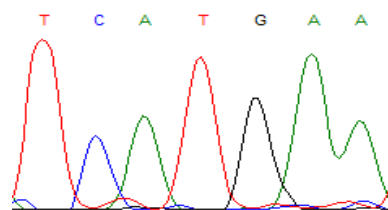
A helyes szekvencia megállapítását a párhuzamos- és ellentétes irányultságú mérések kromatogramjainak összevetésével végeztem. További támpontként szolgált a nemzetközi adatbázisról letöltött E1 protein DNS szakaszokkal való illesztése az online elérhető\* MultAlin programmal. Ez a művelet segített felismerni a detektálás hibájából származó deléciókat és inszerciókat. A kromatogram automatikus leolvasásának leggyakoribb hibáit a 9. ábra mutatja.

---

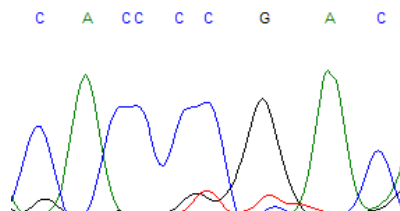
\* <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

## 9. ábra: A szekvenálási kromatogram software-es kiértékelésének gyakori hibái

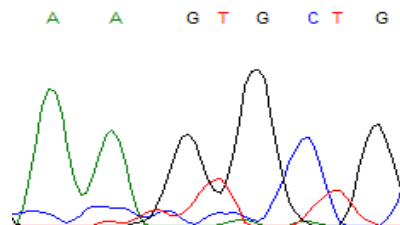
- a.) Könnyen kiértékelhető,  
jól leolvasott kromatogram



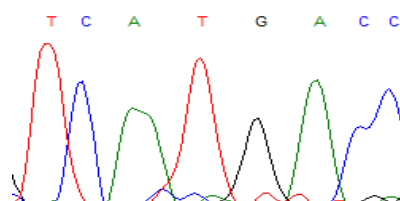
- b.) A csúcsok szélessége miatt  
túlolvasott kromatogram  
Korrigált szekvencia: CACCGAC



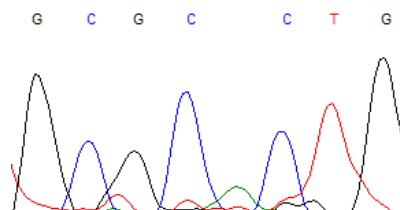
- c.) A nagy mérési zaj miatt  
túlolvasott kromatogram  
Korrigált szekvencia: AAGGCG



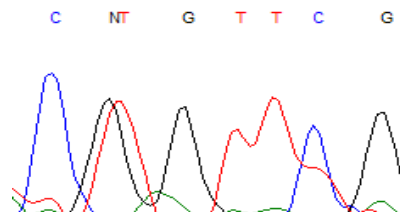
- d.) A csúcsok összeolvadása miatt  
alulolvasott kromatogram  
Korrigált szekvencia: TCAATGACC



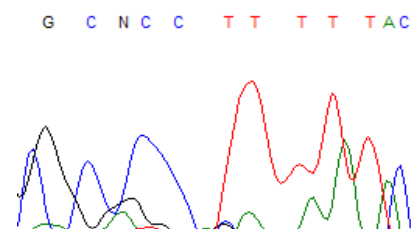
- e.) Alacsony jelintenzitás miatt  
alulolvasott kromatogram  
Korrigált szekvencia: GCGCACTG



- f.) Egymásra csúszott csúcsok  
a kromatogramon  
Korrigált szekvencia: CGTGTTTCG



- g.) Értékelhetetlen kromatogram



Minden beteg esetében kiválasztottam a leghosszabb szakaszon szabályos képet mutató reverz és forward irányú kromatogramokat. Ezek méréseim során minden betegnél azonos mintából, azonos munkafolyamatból származtak. Természetesen a szükség esetén újra mért minták eredményei a régiekkel kiegészíthetők.

Ha feltételezzük, hogy a betegben történt fertőzésért egyetlen vírus klón felelős, és a szervezetében nem történtek jelentős mennyiségben mutációk, akkor valószínűsíthetjük azt is, hogy a vírus genotipizálásának folyamatában a legnagyobb mennyiségben a fertőzésért felelős klón fog amplifikálódni. Ilyen feltételezések mellett az azonos betegtől származó, de eltérő jellegű minták (például vérsavó, garatmosó folyadék, vizelet) mért eredményei egyenértékűnek tekinthetők, egymással is kombinálhatóak.

A kiválasztott szekvencia kromatogramok esetében a forward és reverz irány is a legtöbbször 400-500 nukleotid hosszan leolvasott szakaszt jelentett a futtatás elejétől. A számomra fontos 739 nukleotidos szakasz megállapításához a két irányú eredményeket a 80-100 bázis hosszúságú, átfedő szakaszának segítségével összeillesztettem.

A kapott szekvenciát továbbá az interneten ingyen letölthető Serial Cloner (Version 2.5) programban is megvizsgáltam. A genom aminosavakra történő fordításakor a fehérjét kódoló szakaszon megjelenő STOP kodonok hibás javítást jelezhetnek. Az ilyen tripleteket tartalmazó szekvenciát lehetőség szerint célszerű újra szekvenálni.

#### Felhasznált programok:

|                   |                                                                                                                                                                  |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FinchTV 1.4.0     | Kromatogram kezelő és szerkesztő program<br>File formátum: *.ab1, *.abd                                                                                          |
| MultAlin          | Online elérhető szekvencia illesztő program <sup>31</sup><br><a href="http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/">http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/</a> |
| Serial Cloner 2.5 | Szekvencia kezelő és analízáló program<br>File formátum: *.xdna                                                                                                  |

### 3.6. Filogenetikai törzsfa készítése

A filogenetikai fa elkészítése során a mérések eredményeként kapott DNS szekvenciát egyéb minták vagy referenciák nukleinsav sorrendjével hasonlítjuk össze. A fertőző betegségek, így a vírusok esetében ez lehetőséget ad a genotípus meghatározására, a járványok terjedésének nyomon követésére és a vírus változásainak feltérképezésére.

#### 3.6.1 Genomikai adatgyűjtés

A rubeola filogenetikai törzsfájának készítésekor a WHO által ajánlott referencia szekvenciákat használtam (16. táblázat). Ezeket azonosító számuk alapján az online hozzáférhető\* National Center for Biotechnology Information (NCBI) genetikai adatbankból töltöttem le.

A WHO a rubeola vírus vad típusának 9 elismert és 4 ideiglenes genotípusát tartja számon, melyek két nagyobb kládba csoportosíthatóak. A genotípusok egyezményes jelölése a klád számjegyéből, és a genotípus betűjeléből áll.<sup>22</sup>

Elismert genotípusok:        1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G  
                                      2A, 2B, 2C

Ideiglenes genotípusok:    1a, 1h, 1i, 1j

A letöltött és a laboratóriumban mért szekvenciákat \*.txt formátumban megnyitva megkerestem a WHO által ajánlott 739 nt hosszúságú szakaszát, és egy közös „text” fájlba másoltam a megfelelő elnevezéssel.

#### A vizsgált genetikai szakasz adatai:

Hossz:                                739 nt  
Szakasz jellege:                kódoló (E1 protein)  
Pozíciója a teljes genomon: 8731-9469  
Pozíció az E1 régión:        475-1213 nt    (158-403 AS)

---

\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**16. táblázat: A WHO által ajánlott referencia szekvenciák<sup>22</sup>**

| <b>Genotípus</b> | <b>Szekvencia</b>                                                                          | <b>Génbanki azonosító szám</b>           |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1a               | RVi/BEL/63[1a]VAC<br>RVi/NJ.USA/61[1a]VAC<br>RVi/PA.USA/64[1a]VAC<br>RVi/Toyama.JPN/67[1a] | AF188704<br>M30776<br>L78917<br>AB047330 |
| 1B               | RVi/Jerusalem.ISR/75[1B]<br>RVi/Tiberias.ISR/88[1B]<br>RVi/BeneBerak.ISR/79[1B]            | AY968207<br>AY968209<br>AY968208         |
| 1C               | RVi/LosAngeles.USA/91[1C]<br>RVi/SLV/02[1C]<br>RVi/PAN/99[1C]                              | AY968212<br>AY968211<br>AY968217         |
| 1D               | RVi/Tokyo.JPN/90[1D]CRS<br>RVi/Saitama.JPN/94[1D]                                          | AY968214<br>AY968216                     |
| 1E               | RVi/Dezhou.CHN/02[1E]<br>RVi/MYS/01[1E]                                                    | AY968210<br>AY968221                     |
| 1F               | RVi/Linquing.CHN/00[1F]<br>RVi/Dangshan.CHN/00[1F]                                         | AY968213<br>AY968215                     |
| 1G               | RVi/UGA/20.01[1G]<br>RVi/Ontario.CAN/27.05[1G]<br>RVi/Minsk.BLR/29.04[1G]                  | EF588978<br>EF588970<br>AM258945         |
| 1h               | RVi/Minsk.BLR/29.04[1G]<br>RVi/Tomsk.RUS/05[1h]                                            | AM258953<br>DQ454161                     |
| 1i               | RVi/Milan.ITA/46.92[1i]<br>RVi/Pavia.ITA/21.91[1i]                                         | AY161360<br>AY161352                     |
| 1j               | RVs/Miami.FL.USA/32.02[1j]<br>RVi/Tochigi.JPN/04[1j]                                       | EF602117<br>AB238919                     |
| 2A               | RVi/Beijing.CHN/79[2A]<br>RVi/Beijing.CHN/80[2A]VAC                                        | AY258322<br>AY258323                     |
| 2B               | RVi/TelAviv.ISR/68[2B]<br>RVi/Wash.USA/16.00[2B]<br>RVi/Anqing.CHN/00/2[2B]                | AY968219<br>AY968220<br>AY968218         |
| 2C               | RVi/Moscow.RUS/67[2C]<br>RVi/Moscow.RUS/97[2C]                                             | DQ388279<br>DQ085340                     |

### 3.6.2. A filogenetikai fa megszerkesztése

A filogenetikai fa elkészítésének első lépése a többszörös szekvencia illesztés, melynek során a rendelkezésünkre álló szekvenciákat bizonyos algoritmus szerint

rangsorolva illesztjük egymáshoz. Erre a célra az online hozzáférhető\* ClustalW2 programot használtam. A kapott eredményeket \*.txt fájlként lementve, majd \*.aln formátumra átnevezve alkalmaztam a továbbiakban.

A törzsfa szerkesztéséhez MEGA (Version 5.10) programot használtam, mely a többszörös szekvencia illesztés során generált rokonsági sorrendet tovább finomítja. A programot a rendelkezésre álló távolság- és karakter alapú faépítő módszerekkel egyaránt lefuttattam. Eredményként gyökértelen törzsfákat kaptam, melyek közül azt a fát fogadtam el, amelyen a referencia szekvenciák a várt csoportokban jelennek meg.

#### Felhasznált programok:

|            |                                                                                                                       |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ClustalW2: | Többszörös szekvencia illesztő program <sup>32</sup><br><a href="http://www.clustal.org/">http://www.clustal.org/</a> |
| MEGA 5.10: | Molecular Evolutionary Genetics Analysis<br>Törzsfa szerkesztő program<br>File formátum: *.aln, *.meg, *.mts          |

A MEGA 5.10 programban beállított paraméterek:

|                       |                                                                          |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Szekvenciák adatai:   | Nukleotid szekvencia<br>Fehérje kódoló szakasz<br>Standard genetikai kód |
| Analízis paraméterei: | Bootstrap analízis, 1000 ismétlés<br>Kimura 2-paraméteres modell         |

---

\* <http://www.clustal.org/>

## 4. Eredmények

### 4.1. Vírusok kimutatása

A filogenetikai analízishez az OEK Kiütéses vírusbetegségek Nemzeti Referencia Laboratóriuma által szerológiaiilag igazolt rubeolás betegek mintáit használtuk fel (17. táblázat). A laboratóriumban az aktuális fertőzés szerológiai igazolása hemagglutináció gátlás (HAG) vizsgálattal, IgG és IgM ELISA módszerrel történő kimutatásával, és szükség esetén aviditás vizsgálattal történik (ld. 2.2.4. fejezet).

**17. táblázat: A molekuláris diagnosztikai vizsgálatokra kiválasztott betegek adatai és szerológiai eredményeik\***

| Beteg                   | Előzetes ismereteink                             | Szerológiai eredmények |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
|                         |                                                  | HAG                    | ELISA                                |
| N.T.T ♀<br>szül.: 2007. | tünetes<br>vietnámi születésű                    | <1:8 (szeronegatív)    | IgM kétes<br>IgG nem reaktív         |
| K.L. ♂<br>szül.: 1993.  | tünetes<br>Romániában járt<br>romániai születésű | <1:8 (szeronegatív)    | IgM kétes                            |
| P.E. ♀<br>szül.: 1973.  | tünetes                                          | 1:1024 (szeropozitív)  | IgG és IgM reaktív<br>Aviditás 7,97% |
| Á.M. ♀<br>szül.: 1975.  | tünetes                                          | <1:8 (szeronegatív)    | IgG nem reaktív<br>IgM reaktív       |
| K.ZS. ♂<br>szül.: 1972. | tünetes                                          | 1:8 (kétes)            | IgM kétes                            |
| P.B. ♀<br>szül.: 1966.  | tünetes                                          | 1:256 (szeropozitív)   | IgM reaktív<br>Aviditás 2,2%         |

A magyarországi oltási rendnek köszönhetően hazánkban évente csak néhány megbetegedés történik. Többnyire külföldről behurcolt, valamint vakcinációban nem részesült esetekkel találkozhatunk. A diagnosztizált fertőzöttek közül sem mindegyik mintája alkalmas molekuláris diagnosztikai vizsgálatra, hiszen a virémia és a vírusürítés rövid ideig tart egészséges immunrendszerrel rendelkező betegek esetében. A megfelelő

\* Az Országos Epidemiológiai Központ vizsgálati eredményei alapján

idejű mintavételezéshez az orvos és a beteg együttműködése szükséges, amit sokszor megghiúsíthat az, hogy az enyhe tünetekkel zajló megbetegedés esetén a fertőzöttek egyáltalán nem, vagy késve fordulnak orvoshoz.

A rubeola vírus kimutatására vizelet, vírus transzport médiumban érkező (VTM) torokváladék, garatmosó folyadék és vérsavó mintákat használnak. A vizsgálatra alkalmas a magzatvíz is, amelynek az intrauterin fertőződés gyanújakor van jelentősége, de a vizsgálataim idején ilyen minta nem érkezett.

A 2011-2012 között beérkező rubeolás betegek mintái közül azokat választottuk ki, melyeknek levétele a betegség tüneteinek megjelenésétől számítva 10 napon belül megtörtént (összesen 6 minta). A vizsgálatra alkalmas mintákat és eredményeiket a 18. táblázatban foglaltam össze.

**18. táblázat: A vizsgált minták jellemzői és molekuláris diagnosztikai eredményeik**

| Beteg, születési év | Betegség kezdete | Beérkezett minták |           |           | Molekuláris diagnosztikai eredmények |                  |             |
|---------------------|------------------|-------------------|-----------|-----------|--------------------------------------|------------------|-------------|
|                     |                  | Mintavétel        | Azonosító | Jelleg    | Kimutatási PCR                       | Genotipizáló PCR | Szekvenálás |
| N.T.T. ♀<br>2007.   | 2011.03.31.      | 2011.04.01.       | 1681/11   | vérsavó   | pozitív                              | negatív          | -           |
|                     |                  | 2011.04.08.       | 1764/11   | garatmosó | pozitív                              | negatív          | -           |
| K.L. ♂<br>1993.     | 2011.11.16.      | 2011.11.18.       | 4878/11   | vérsavó   | negatív                              | -                | -           |
|                     |                  | 2011.11.18.       | 4888/11   | vizelet   | pozitív                              | negatív          | -           |
|                     |                  | 2011.11.18.       | 4889/11   | VTM       | pozitív                              | pozitív          | hiányos     |
| P.E. ♀<br>1973.     | 2012.04.08.      | 2012.04.17.       | 1411/12   | vérsavó   | negatív                              | -                | -           |
| Á.M. ♀<br>1975.     | nincs információ | 2012.04.20.       | 1459/12   | vérsavó   | pozitív                              | pozitív          | sikeres     |
|                     |                  | 2012.04.20.       | 1460/12   | vizelet   | pozitív                              | pozitív          | hiányos     |
|                     |                  | 2012.04.20.       | 1461/12   | garatmosó | pozitív                              | pozitív          | hiányos     |
| K.ZS. ♂<br>1972.    | 2012.04.23.      | 2012.04.25.       | 1516/12   | vérsavó   | negatív                              | -                | -           |
|                     |                  | 2012.04.25.       | 1517/12   | vizelet   | pozitív                              | pozitív          | sikertelen  |
|                     |                  | 2012.04.25.       | 1518/12   | VTM       | pozitív                              | pozitív          | hiányos     |
| P.B. ♀<br>1966.     | 2012.04.20.      | 2012.04.26.       | 1587/12   | vérsavó   | negatív                              | -                | -           |

Filogenetikai analízisre alkalmas

A legvalószínűbb genotípus BLAST alkalmazásával megállapítható

Valamennyi betegnél jelentkeztek a rubeolára jellemző tünetek, a betegséget megelőzően többjük járt külföldön, vagy megemléített külföldi beteggel történt kontaktust. Négyen a kötelező rubeola vakcináció bevezetése előtt, ketten pedig

külföldön születtek, oltásukról nem áll rendelkezésre információ. A vizsgált betegek között egy házaspárt is találunk (személyiségi okok miatt nem jelzem a 18. táblázatban). A férj nagy valószínűséggel a tüneteket hamarabb produkáló feleségétől kaphatta el a betegséget, munkakörükből adódóan mindeketten sok külföldi emberrel találkoznak. Sikeres szekvenálás esetén várhatóan azonos szekvenciájú vírusnukleinsavat tudunk kimutatni mintáikból.

#### Megállapítások:

- A vizsgált 6 beteg esetében 4-nél kimutatható volt a rubeola vírus jelenléte.  
A két PCR negatívnak bizonyuló beteg esetében csak 1-1 vérsavó minta érkezett a Kiütéses vírusbetegségek Nemzeti Referencia Laboratóriumába, amelyeket a szerológiai vizsgálatok során többször kiolvasztottak és lefagyasztottak. Ez okozhatta az érzékeny RNS vírusok degradációját. A P.E. monogramú beteg esetében valószínűleg a késői (tünetek megjelenésétől számított 10. nap) mintavételezés is szerepet játszhatott abban, hogy vérmintája nem tartalmazott kimutatható mennyiségű viriont.
- A 6 betegtől levett 13 mintából 9 PCR pozitív lett a vírus kimutatásra alkalmazott PCR során, de ezek közül csak 6 mutatott pozitív eredményt a genotipizáló PCR-nél.  
Ennek az eltérésnek az okai között szerepelhet, hogy amíg a vírus kimutatására alkalmazott PCR a vírus genomjának egy konzervatív szakaszát amplifikálja, addig a genotipizáló PCR az E1 strukturális fehérje variábilis régióját kódoló génszakasz megsokszorozását végzi. Továbbá hatással lehet, hogy az utóbbi jóval hosszabb (több mint hatszoros) nukleinsav szakaszt eredményez, így a folyamat érzékenyebb a paraméterek változására.
- A 6 szekvenálásból mindössze 1 lett sikeres (ld. 4.2. fejezet)  
A Sanger-féle szekvenálás sikerességét nagymértékben befolyásolja a megfelelő PCR termékből való kiindulás. A felhasznált genotipizáló PCR módszert csak néhány hónapja alkalmazzák a laboratóriumban, optimalizálási kísérletekkel javítani lehetne hatékonyságát.

## 4.2. A szekvenálás értékelése

### 4889/11 minta:

A forward és reverse irányú szekvencia átfedést mutat egy ~50 bp hosszúságú szakaszon. A kettő összeillesztésével mégsem kaptam meg a várt 739 bp-os vizsgálati szekvenciát. A probléma kiderítése érdekében ClustalW2 programot használva többszörös illesztést végeztem a kettes kládba tartozó referenciákkal, amikor azt tapasztaltam, hogy a 333-490 nt pozíciójú szakasz teljesen mértékben hiányzik a 4889/11-es mintából származó szekvencián (Melléklet 1. ábra).

A genotipizáló PCR-t követő gélelektroforézis során a termék hosszúsága a DNS molekulatömeg markerhez viszonyítva megegyezett a várt mérettel (881 bp). A szekvenciavesztés a szekvenálási reakció során következhetett be. A rubeola vírus az ismert vírusok között a legnagyobb arányban (a vizsgált szekvencia részen 68-71%-ban) tartalmazza a hármass hidrogén-híd kötéssel kapcsolódó GC bázisokat. A vizsgálat sikertelenségét okozhatta, hogy a DNS kettősszál nem vált el ezen a kérdéses szakaszon.

A denaturációs hőmérséklet 1°C-os emelésével ismételni kellene a mérést, de a betegtől származó minta elfogyott, így erre nem volt lehetőség.

### 1459/12 minta:

A forward és reverse irányú szekvenálás egyaránt megfelelő hosszúságú leolvasást eredményezett. Az átfedő szakasznál összeillesztve a kapott szekvencia lefedi a WHO által filogenetikai analízisre javasolt 739 bp hosszúságú nukleinsav szakaszt.

### 1460/12 és 1461/12 minta:

A leolvasás mindkét irányból 350-400 bp hosszúságú értékelhető szekvenciákat eredményezett. Mivel az ugyanezen betegtől származó 1459/12-es vérsavóból sikeresen szekvenáltuk a vizsgált rubeola nukleinsav szakaszt, az ebből a két mintából származó adatok további vizsgálatára nincs szükségünk.

### 1517/12 minta:

A szekvenálási leolvasás nem mutatott detektálható jeleket sem a forward, sem a reverse irányú mérés során. Mivel a futtatásuk nem szomszédos kapillárisokban zajlott,

és a többi minta kromatogramján nem tapasztaltunk ilyen jellegű problémát, a készülék nem megfelelő működtetése kizárható a sikertelenség lehetséges okai közül.

A minta genotipizáló PCR vizsgálatnál gyengén pozitív eredményt mutatott. Az amplifikálás során keletkező DNS mennyiség valószínűleg a bemérési korrekció\* ellenére sem volt elegendő a sikeres szekvenálási reakcióhoz.

#### 1518/12 minta:

A leolvasott szekvencia kromatogram a 4889/11-es mintához hasonlóan a vizsgált 739 nt-os szakasz 330-490 nt közötti részén válik nehezen értelmezhetővé.

A kromatogramok szubjektív javításával sikerült megfelelően hosszú átfedő szakaszt készíteni, így a szükséges 739 bp hosszúságú szekvenciát létrehozni. Az aminosav sorrend vizsgálata viszont több eltérést mutatott ezen a régióban. Mivel a referencia szekvenciák egyikén sem találhatunk hasonló aminosav cserét, a kapott szekvencia eredményt nem tartom elég megbízhatónak a filogenetikai fán való feltüntetéséhez.

#### Megfigyelések:

A szekvenálás eredményei nem érték el a várt sikert, a vizsgálatra alkalmas 3 beteg közül csak egyiknél sikerült a filogenetikai analízishez szükséges szekvenciát előállítani. A MegaBACE 1000 szekvenáló készülék a tapasztalatok és a gyártói utasítások alapján 500-700 bp hosszúságú szakaszok megfelelő leolvasására alkalmas, de mintáink esetében ezt nem valósult meg.

Esetünkben a genotipizáló PCR, a szekvenálási reakció és a kapilláris elektroforézis paramétereinek optimalizálásával lehetne javítani a szekvenálás hatékonyságát, de a minták kis mennyisége és hiánya, valamint a mérések magas költségei miatt erre nem volt lehetőségem.

---

\* A szekvenálási reakció összemérését a genotipizáló PCR eredményéhez igazítottuk (ld. 3.5.3. fejezet).  
A 1517/12 bemért minta mennyisége: 9 µl.

### 4.3. A filogenetikai fa megszerkesztése

A sikeresen szekvenált minta és a WHO referencia szekvenciák felhasználásával gyökértelen filogenetikai fákat szerkesztettem a MEGA (Version 5.10) programban rendelkezésre álló algoritmusok mindegyikével, az eredmények összehasonlítása céljából. A fákat a könnyebb átláthatóság érdekében nem a megszokott radiális, hanem a gyökeres fák esetén alkalmazott rektanguláris módon ábrázoltam, ahogy a szakirodalomban is gyakran tapasztaltam.<sup>22,33,34,35</sup>

Az Á.M. monogramú beteg mintájából nyert rubeola vírus E1 fehérje kódoló szekvencia a filogenetikai fára a nemzetközi konvenciók szerinti jelzéssel került: RVs/Budapest.HUN/16.12. A jelölésnél megkülönböztetjük a sejt kultúrából izolált (RVi) és a klinikai mintából molekuláris módszerrel kinyert (RVs) majd szekvenált rubeola vírus nukleinsavat. Feltüntetésre kerül sorrendben az izolálás helyszíne (város, majd az ország háromjegyű azonosító jele) és ideje (nap-tá-é, majd év), szükség esetén (ha az adott nap-tá-é héten több beteg mintájából is sikerült vírust kimutatni) egy további sorszám. A nemzetközi adatbankba történő feltöltéskor ajánlott a 739 nt hosszúságú szakasz filogenetikai analízise során megállapított genotípust is az elnevezés végére írni szögletes zárójelben.

A referencia szekvenciákat a genotípus és az adatbanki azonosító feltüntetésével jelenítettem meg a dendrogramokon. A referencia szekvenciák nemzetközi elnevezését ld. a 3.6.1. fejezet 16. táblázatában.

#### Maximum Parsimony módszer

A referencia szekvenciák az 1a genotípus kivételével megfelelően csoportosulnak az ábrán, a két nagyobb klád (1 és 2) viszont nem mutat megfelelő elkülönülést. A kezdeti elágazások bootstrap értékei túlzottan alacsonyak (<10), ami nem jelent elfogadható eredményt. A fa utalást mutat a genotípusok 1C-ből történő leszármazottságára.

Az általam vizsgált szekvencia a 2B genotípusú referenciák csoportjába került, a legközelebbi hasonlóságot az AY968220 azonosítójú referencia szekvenciával mutatja.

(Melléklet 2. ábra)

#### UPGMA módszer:

A referenciák két fő kládja megfelelő elkülönülést mutat, az 1E és 1D genotípusokban viszont keveredést tapasztalhatunk, továbbá az 1a szekvenciák sem kerültek egy csoportba. A bootstrap értékek között több túlzottan alacsony érték található.

Az általam vizsgált szekvencia a 2B genotípusú referenciák csoportjába került, a legközelebbi hasonlóságot az AY968220 azonosítójú referencia szekvenciával mutatja.

(Melléklet 3. ábra)

#### Minimum Evolution módszer:

A referenciák két fő kládja megfelelő elkülönülést mutatja, csak az 1a genotípus szekvenciái nem kerültek egy csoportba. A bootstrap értékek magasabbak az előző módszereknél tapasztaltaknál.

Az általam vizsgált szekvencia a 2B genotípusú referenciák csoportjába került, a legközelebbi hasonlóságot az AY968220 azonosítójú referencia szekvenciával mutatja.

(Melléklet 4. ábra)

#### Maximum Likelihood módszer

Az összes közül a legidőigényesebb algoritmus. A program lefutása a 32 szekvenciával több mint 5 órát vett igénybe, szemben a többinél tapasztalt néhány perccel.

A két fő klád elkülönül. A referenciák a megfelelően csoportosulnak az 1a genotípus kivételével, amely az összes módszer közül ebben mutatja a legnagyobb szóródást a dendogramon. A bootstrap értékek közül csak négy alacsonyabb 50-nél.

Az általam vizsgált szekvencia a 2B genotípusú referenciák csoportjába került, a legközelebbi hasonlóságot az AY968220 azonosítójú referencia szekvenciával mutatja.

(Melléklet 5. ábra)

#### Neighbor-joining módszer:

A két fő klád és a genotípusok megfelelően elkülönülnek, csak az 1a genotípus oszlik két távolabbi szekcióra. A bootstrap értékek a számunkra fontos kettes kládnál mindenütt nagyobbak 80-nál, alacsony bootstrap értékek csak az egyes számú klád elágazásainál találhatóak.

Az általam vizsgált szekvencia a 2B genotípusú referenciák csoportjába került, a legközelebbi hasonlóságot az AY968220 azonosítójú referencia szekvenciával mutatja.

(Melléklet 6. ábra)

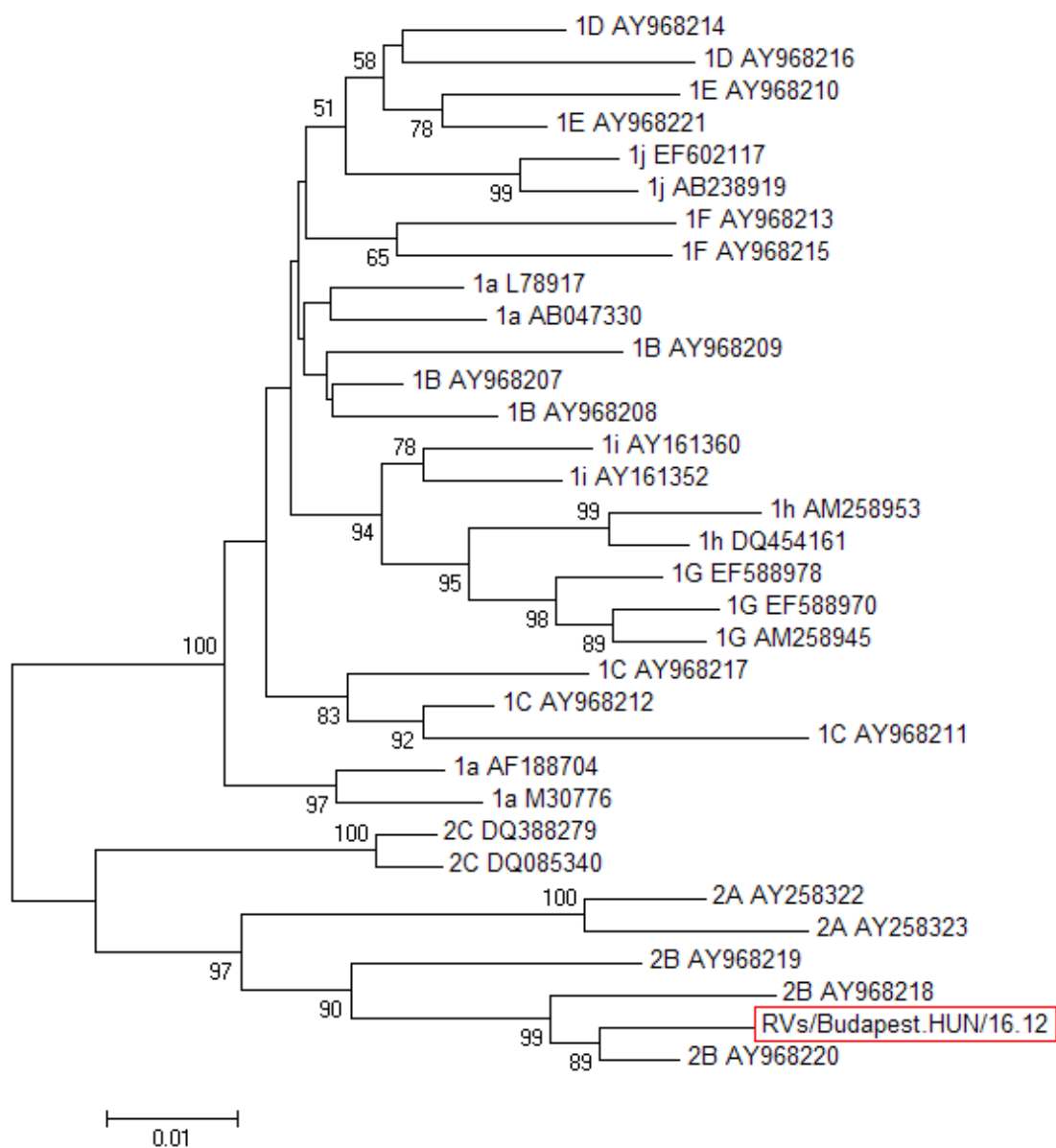
#### Megfigyelések:

Az általam vizsgált mintából izolált szekvencia minden szerkesztési módszer esetében a 2B genotípus csoportjába került, legnagyobb hasonlóságot az AY968220 azonosítójú RVi/Wash.USA/16.00[2B] referencia szekvenciával mutatja. Ezek alapján a mintánkban kimutatott rubeola vírus 2B genotípushoz tartozását bizonyítottanak tekinthetjük.

Az 1a ideiglenes genotípus referencia szekvenciái minden szerkesztési módszernél külön csoportokra oszlanak. Ez a genotípus sokszínű, a történelmileg fontos vakcina vírus szekvenciákat tartalmazza. A nem vad típusú genotípus elhelyezése a fán azért szükséges, hogy a vakcina törzs által okozott meglehetősen ritka megbetegedések is azonosíthatóak legyenek a filogenetikai analízissel.<sup>22</sup>

A Neighbor-joining és a Minimum Evolution módszer nyújtotta a legelfogadhatóbb fát. Ezekben egyformán jól különülnek el az azonos genotípusba tartozó referencia szekvenciák, és a fák ágai azonos rendeződést mutatnak. A kicsivel magasabb bootstrap értékei miatt a Minimum Evolution módszerrel készített filogenetikai törzsfát választom a vizsgálat végső eredményének (10. ábra).

# 10. ábra: A rubeola vírus filogenetikai törzsfája



#### 4.4. Kísérlet a hiányos szekvenciák genotípusának *in silico* meghatározására

A K.L. és K.ZS. monogramú betegek mintáiból származó hiányos E1 fehérje génszekvenciái nem alkalmasak a filogenetikai fa elkészítésére. A szekvenciariészeket az NCBI oldalán megtalálható BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritmust alkalmazó keresőprogram segítségével vizsgáltam.\*

A program az általunk beírt szekvenciát a nukleotid adatbázisban fellelhető szekvenciákhoz hasonlítva kiválasztja azokat, amelyek a legnagyobb valószínűséggel hasonlítanak hozzá. A találatok hasonlóságának szignifikancia szintjét egy E-értékkel (expect value) jellemzi, mely értéke annál kisebb, minél nagyobb az esélye, hogy a találat és a keresett szekvencia között található megegyezések nem a véletlennek köszönhetőek.

A keresést az NCBI Standard Nucleotid BLAST alkalmazásában a Nucleotid collection (nr/nt) adatbázist alapul véve és az alapértelmezett algoritmus beállításokat alkalmazva végeztem. Az eredményeket a 19. táblázatban foglaltam össze, melyen feltüntettem a legjobb találatokhoz tartozó E- és Identities értékek (a vizsgált szakasz nukleotidjai milyen mértékben felelnek meg a találati szakasznak), és az ezekhez tartozó szekvenciák számát.

19. táblázat: BLAST eredmények

| Minta sorszáma | Szekvenálás iránya | Vizsgált szakasz* (nt) | Expected value | Identities     | Szekvenciák száma (db) | Genotípus |
|----------------|--------------------|------------------------|----------------|----------------|------------------------|-----------|
| 4889/11        | forward            | 1-333                  | 5e-173         | 333/333 (100%) | 26                     | 2B        |
|                | reverse            | 485-739                | 8e-125         | 252/255 (99%)  | 15                     | 2B        |
| 1518/12        | forward            | 1-333                  | 2e-171         | 332/333 (99%)  | 26                     | 2B        |
|                | reverse            | 485-739                | 8e-130         | 255/255 (100%) | 15                     | 2B        |

\*A 739 nt hosszúságú vizsgálati szakaszon való elhelyezkedés pozíciója

A nukleotid BLAST első 50 találati eredménye mind a négy szakasz esetén kizárólag 2B genotípushoz tartozó rubeola vírus szekvenciákat tartalmazott. A legnagyobb hasonlóságot mutató szekvenciák a világ különböző területeiről származnak

---

\* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

(Anglia, Vietnám, Kína, Japán, Malajzia), és az utóbbi három év során izolálták őket egy-egy járvány időszakában.

Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a K.L és K.ZS. betegek fertőzéséért nagy valószínűséggel szintén a rubeola 2B genotípusa felelős.

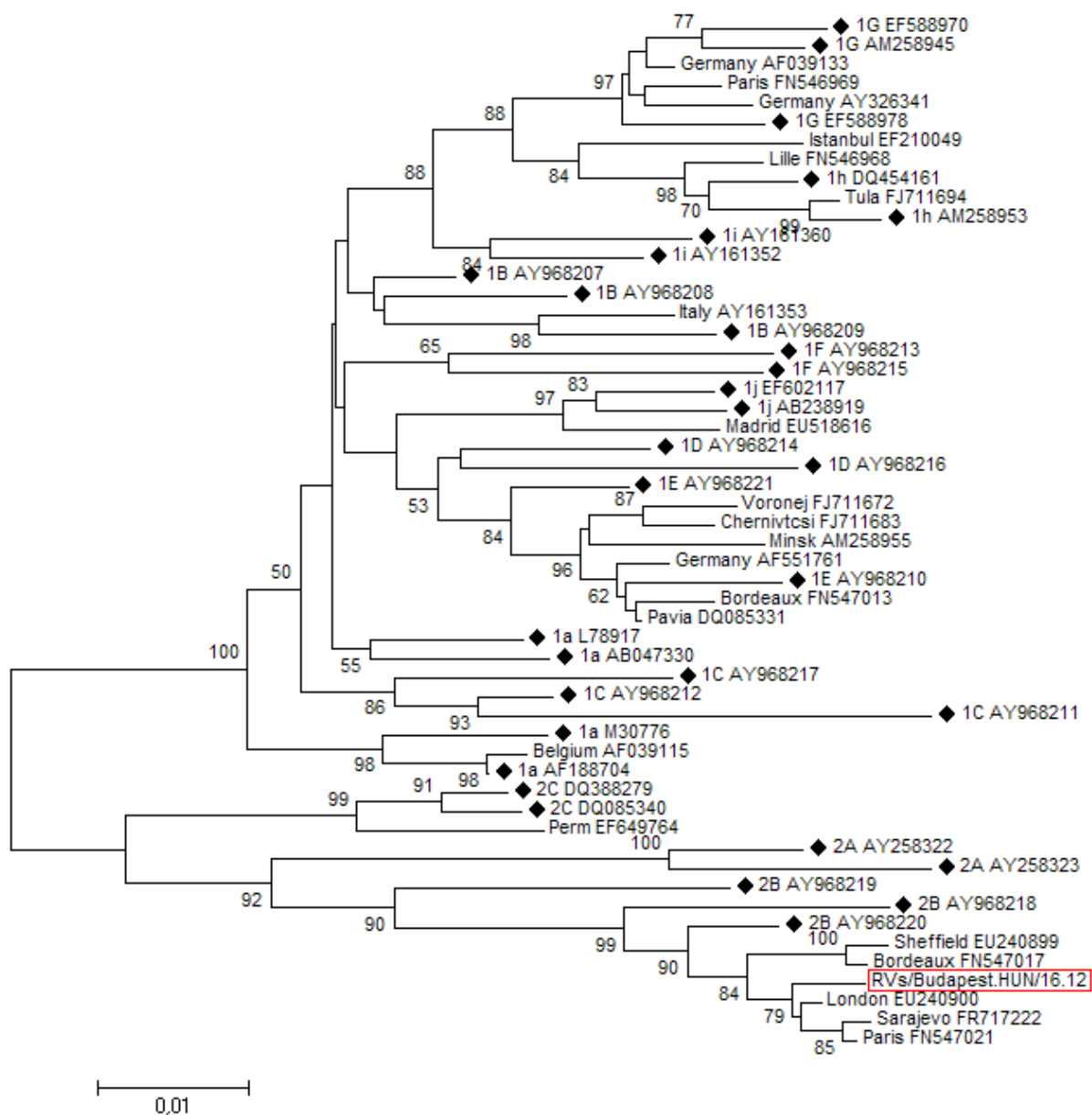
#### **4.5 A filogenetikai fa kiegészítése – kitekintés Európára**

Az Európában jellemző genotípusok és az európai járványügyi helyzet megismerése érdekében a filogenetikai törzsfát különböző országokból származó szekvenciákkal is elkészítettem.

Az általunk elemzett minták többnyire olyan betegektől származtak, akik a 2011-2012 években zajló romániai járvány ideje alatt rendelkeztek erdélyi kontaktussal. A járványügyi összefüggést a Romániában izolált vírusok szekvenciáival lehetne biztosabbá tenni, de ilyenek nem találhatók a nemzetközi adatbázisokban. A fát ezért különböző kelet- és nyugat-európai régiókból valamint Oroszországból származó szekvenciák felhasználásával készítettem el újra, Minimum Evolution módszert alkalmazva. Az eredményt a 11. ábra mutatja, a fa kiegészítéséhez használt szekvenciák listája a Melléklet 7. ábráján olvasható.

A szekvenciák kiválasztásakor igyekeztem minél több genotípust képviseltetni egy-egy példával. Továbbá elhelyeztem a fán a „Cendehill” elnevezésű szekvenciát (Belgium AF039115) ami nem betegtől származik, hanem az első attenuált vakcinatörzsek egyike.<sup>3</sup> A filogenetikai törzsfán ennek megfelelően a vakcina törzseket reprezentáló 1a genotípusú referencia szekvenciák mellé került.

11. ábra: Európában izolált szekvenciákkal kiegészített filogenetikai törzsfa



◆ WHO által ajánlott referencia szekvenciák (ld. 3.6.1. fejezet, 16. táblázat)

## 5. Összefoglalás

Bár a hazai oltási rendnek köszönhetően Magyarországon a rubeola járványügyi vizsgálatainak nincs nagy jelentősége, az itthon diagnosztizált szórványos esetek filogenetikai analízisével a WHO globális kanyaró és rubeola eliminációs programja szempontjából fontos információkhoz juthatunk. Az eddigi tapasztalatok azt mutatják, hogy Európa rubeola vírus mentesítése a több országban jellemző részleges átoltottságnak eredményeképpen még várat magára.

A WHO mind a sporadikus, mind a járványos esetek tekintetében eredményesen használható filogenetikai módszert ajánl a vírus genotípusának meghatározására. Bár az OEK Kiütéses betegségek Nemzetközi Referencia Laboratóriuma által alkalmazott rubeola genotipizáló PCR és szekvenáló módszer még optimalizálásra szorul, a szakdolgozatom készítésekor végzett filogenetikai analízist sikeresnek tekinthetjük.

### Eredmények:

- A filogenetikai vizsgálat alapján egy betegnél bizonyítottan, további két beteg esetében valószínűsíthetően a 2B genotípus okozta a megbetegedést.
- A Kiütéses vírusbetegségek Nemzeti Referencia Laboratóriuma jelentést küldött a megállapított genotípusról a WHO Regionális Referencia Laboratóriumába (Robert Koch Institut, Berlin).
- A vizsgálat eredményei a Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 40. kongresszusán (2012. szeptember 20-22., Budapest) is elhangzottak, az elkészített törzsfá az előadás poszterén megjelent.  
(Melléklet 8. ábra)

## 6. Irodalomjegyzék

- <sup>1</sup> **King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J.** Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press (2012)
- <sup>2</sup> **Lee J. Y., Bowden D. S.** Rubella Virus Replication and Links to Teratogenicity. Clin Microbiol Rev (2000) 13: 571–587.
- <sup>3</sup> **Banatvala J. E., Peckham C. S.** Rubella Viruses. Amsterdam: Elsevier (2006)  
ISBN-13: 978-0-444-50634-4
- <sup>4</sup> **Parkman P. D., Buescher E. L., Artenstein M. S.** Recovery of rubella virus from army recruits. Proc Soc Exp Biol Med (1962) 111: 225–230.
- <sup>5</sup> **Weller T. H., Neva F. A.** Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella-like illness. Proc Soc Exp Biol Med (1962) 111: 215–225.
- <sup>6</sup> **Qiu Z., Yao J., Cao H., Gillam S.** Mutations in the E1 Hydrophobic Domain of Rubella Virus Impair Virus Infectivity but Not Virus Assembly. J Virol. (2000) 74: 6637–6642.
- <sup>7</sup> **Hwang D., Qiu Z., Gillam S.** Effects of Mutations in the Rubella Virus E1 Glycoprotein on E1-E2 Interaction and Membrane Fusion Activity. J Virol. (1998) 72: 8747–8755.
- <sup>8</sup> **Wolinsky J. S., Sukholutsky E., Moore W. T., Lovett A., McCarthy M., Adame B.** An antibody- and synthetic peptide-defined rubella virus E1 glycoprotein neutralization domain. J Virol. (1993) 67: 961–968

- <sup>9</sup> **Chaye H., Chong P., Tripet B., Brush B., Gillam S.** Localization of the virus neutralizing and hemagglutinin epitopes of E1 glycoprotein of rubella virus. *Virology*. (1992) 189: 483-92.
- <sup>10</sup> Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection (Second edition) World Health Organization (2007) WHO/IVB/07.01
- <sup>11</sup> **Zhou Y., Ushijima H., Frey T. K.** Genomic analysis of diverse rubella virus genotypes. *J Gen Virol*. (2007) 88: 932-41.
- <sup>12</sup> **Liang Y., Yao J., Gillam S.** Rubella Virus Nonstructural Protein Protease Domains Involved in trans- and cis-Cleavage Activities. *J Virol*. (2000) 74: 5412–5423.
- <sup>13</sup> **Hobman T. C., Woodward L., Farquhar M. G.** The rubella virus E1 glycoprotein is arrested in a novel post-ER, pre- Golgi compartment. *J Cell Biol*. (1992) 118: 795-811.
- <sup>14</sup> **Risco C., Carrascosa J. L., Frey T. K.** Structural maturation of rubella virus in the Golgi complex. *Virology*. (2003) 312: 261-9.
- <sup>15</sup> **Takács M.** Klinikai és járványügyi virológia. VoxMedica (2010) ISBN 9639740204
- <sup>16</sup> Eliminating measles and rubella. Framework for the verification process in the who european region. World Health Organization (2012)
- <sup>17</sup> Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection. WHO European Region strategic plan 2005–2010 World Health Organization (2005) ISBN 92-890-1382-6
- <sup>18</sup> Rubella vaccines: WHO position paper. *Weekly epidemiological record* (2011) 86: 301–316

- <sup>19</sup> **Plotkin S. A., Farquhar J. D., Katz M., Buser F.** Attenuation of RA 27/3 Rubella Virus in WI-38 Human Diploid Cells. *Am J Dis Child.* (1969) 118: 178-85.
- <sup>20</sup> **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (Chapter 19: Rubella)**  
**The Pink Book: Course Textbook CDC (2012)**
- <sup>21</sup> A monthly publication on vaccine-preventable diseases and immunization data and analysis. *WHO Epidemiological brief* (2012) 26
- <sup>22</sup> Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses. *Weekly Epidemiological Record* (2007) 82: 216-22.
- <sup>23</sup> **Dencs A., Farkas A., Gyugos M., Kurcz A. et al.** Phylogenetic analysis of a nosocomial transmission of hepatitis B virus at a paediatric haematology ward. *Acta Microbiol Hung.* (2011) 58: 23-9.
- <sup>24</sup> **Takátsy Gy.** The use of spiral loops in serological and virological micro-methods. *Acta Microbiol Hung.* (1956) 1-2: 191.
- <sup>25</sup> Az országos epidemiológiai központ módszertani levele a 2012. évi védőoltásokról. *Epinfo* (2012) 19
- <sup>26</sup> **Nardone A., Tischer A., Andrews N., Backhouse J. et al.** Comparison of rubella seroepidemiology in 17 countries: progress towards international disease control targets. *Bulletin of the World Health Organization* (2008) 86: 81-160.
- <sup>27</sup> **Bosma T. J., Corbett K. M., O'Shea S., Banatvala J. E., Best J. M.** PCR for Detection of Rubella Virus RNA in Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* (1995) 33: 1075–9

- <sup>28</sup> **Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* (1977) 74: 5463-5467
- <sup>29</sup> The MegaMANUAL: A Guide for Sequencing with the MegaBACE 1000
- <sup>30</sup> MegaBACE Instrument Maintenance and Troubleshooting Guide, Version 2.4 User manual, Amersham biosciences
- <sup>31</sup> **Corpet F.** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* (1988) 16: 10881-90
- <sup>32</sup> **Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R. et al.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (2007) 23: 2947-48.
- <sup>33</sup> **Zhu Z., Cui A., Wang H., Zhang Y. et al.** Emergence and Continuous Evolution of Genotype 1E Rubella Viruses in China. *J Clin Microbiol.* (2012) 50: 353-63.
- <sup>34</sup> **Vauloup-Fellous C., Hübschen J. M., Abernathy E. S., Joseph Icenogle J. et al.** Phylogenetic Analysis of Rubella Viruses Involved in Congenital Rubella Infections in France between 1995 and 2009. *J Clin Microbiol.* (2010) 48: 2530-35.
- <sup>35</sup> **Martínez-Torres A. O., Mosquera M. M., Sanz J. C., B. Ramos, Echevarría J. E.** Phylogenetic Analysis of Rubella Virus Strains from an Outbreak in Madrid, Spain, from 2004 to 2005. *J Clin Microbiol.* (2009) 47: 158-63.

## 7. Melléklet

### 1. A 4889/11 (KL) szekvencia többszörös illesztése referencia szekvenciákkal

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
KL          GTTCCACACGGAAACCAGAACCGTCTGGCAGCTCTCCGTGGCCGGCGTGTCTGTGCAACGT 60
2B_AY968220 GTTCCATACAGAAACCAGGACCGTCTGGCAGCTCTCCGTAGCCGGCGTGTCTGTGCAACGT 60
2B_AY968218 GTTCCATACAGAAACCAGGACCGTCTGGCAGCTTTCCGTAGCCGGCGTGTCTGTGCAACGT 60
2B_AY968219 GTTCCATACAGAAACCAGGACCGTCTGGCAGCTCTCCGTAGCCGGCGTGTCTGTGCAATGT 60
2A_AY258322 GTTCCACACCGAAACCAGGACCGTGTGGCAACTCTCCGTAGCGGGCGTGTCTGTGCAACGT 60
2A_AY258323 ATTCCACACGGAAACCAGGACCGTGTGGCAACTCTCCGTAGCTGGCGTGTCTGTGCAATGT 60
2C_DQ388279 GTTCCACACGGAGACCAGGACCGTCTGGCAACTTTCCGTGGCCGGCGTGTCTGTGCAACGT 60
2C_DQ085340 GTTCCACACGGAGACCAGGACCGTCTGGCAGCTTTCCGTGGCCGGCGCGTGTCTGTGCAACGT 60
          ***** ** ** ***** ***** ** ***** ** ***** ***** **

KL          CACGACCGAACATCCGTTCTGCAACACGCCGCACGGACAACCTCGAGGTCCAGGTCCCGCC 120
2B_AY968220 CACGACCGAACATCCGTTCTGTAACACGCCGCACGGACAACCTCGAGGTCCAGGTCCCGCC 120
2B_AY968218 CACGACCGAACATCCGTTCTGCAACACGCCGCACGGACAACCTCGAGGTCCAGGTCCCGCC 120
2B_AY968219 CACAACCGAACACCCGTTCTGCAACACGCCGCACGGACAACCTCGAGGTTCAGGTCCCGCC 120
2A_AY258322 CACCACCGAACATCCGTTCTGCAACACGCCGCACGGACAACCTCGAGGTCCAGGTCCCGCC 120
2A_AY258323 CACCACCGAACATCCGTTTGTCAACACGCCGCACGGACAACCTCGAGGTCCAGGTCCCGCC 120
2C_DQ388279 TACCACTGAACACCCGTTCTGCAACACGCCGCACGGACAACCTCGAGGTCCAGGTCCCGCC 120
2C_DQ085340 CACCCTGAACACCCGTTCTGCAACACGCCGCACGGACAACCTCGAGGTCCAGGTCCCGCC 120
          ** ** ***** ***** ** ***** ***** ***** *****

KL          CGACCCCGGGCAGCTGGTTGAGTACATCATGAATTACACCGGCAACCAACAGTCCCGGTG 180
2B_AY968220 CGACCCCGGGCAGCTGGTTGAGTATATCATGAATTACACCGGCAACCAACAGTCCCGGTG 180
2B_AY968218 CGACCCCGGGCAGCTGGTCGAGTACATCATGAATTACACCGGCAACCAACAGTCCCGGTG 180
2B_AY968219 CGACCCCGGTGACCTAGTTGAGTATATCATGAATTACACCGGCAACCAACAGTCCCGGTG 180
2A_AY258322 TGACCCTGGGGACCTAGTCGAGTACATCATGAATTACACCGGCAACCAACAGTCCCGGTG 180
2A_AY258323 TGACCCTGGGGATCTAGTCGAGTATATCATGAATTACACCGGCAACCAACAGTCCCGGTG 180
2C_DQ388279 CGACCCTGGGGACCTGGTTGAGTACATTATGAATTACACCGGCAACCAACAGTCCCGGTG 180
2C_DQ085340 CGACCCTGGGGACCTGGTTGAGTACATTATGAATTACACCGGCAACCAACAGTCCCGGTG 180
          ***** ** ** ** ** ***** ** ***** ***** ***** *****

KL          GGGCCTCGGGAGCCCGAACTGCCACGGCCCCGACTGGGCCTCCCCGGTTTGCCAGCGCCA 240
2B_AY968220 GGGCCTCGGGAGCCCGAACTGCCACGGCCCCGACTGGGCCTCCCCGGTTTGCCAGCGCCA 240
2B_AY968218 GGGCCTCGGGAGCCCGAACTGTACGGCCCCGACTGGGCCTCCCCGGTTTGCCAGCGCCA 240
2B_AY968219 GGGCCTCGGGAGCCCGAACTGTACGGCCCCGACTGGGCCTCCCCGGTTTGCCAGCGCCA 240
2A_AY258322 GGGCCTCGGGAGCCCGAACTGTACGGCCCCGATTGGGCCTCTCCGGTTTGCCAGCGCCA 240
2A_AY258323 GGGCCTCGGGAGCCCGAACTGTACGGCCCCGATTGGGCCTCCCCGGTTTGCCAGCGCCA 240
2C_DQ388279 GGGCCTCGGGAGCCCGAACTGTACGGCCCCGACTGGGCCTCCCCGGTTTGCCAGCGCCA 240
2C_DQ085340 GGGCCTCGGGAGCCCGAACTGTACGGCCCCGACTGGGCCTCCCCGGTTTGCCAGCGCCA 240
          ***** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** *****

KL          CTCTCCAGACTGTTTCGGGCTCGTGGGGGCCACGCCAGAGCGCCCCGGCTGCGCTCTCGT 300
2B_AY968220 CTCTCCCGACTGTTTCGGGCTCGTGGGGGCCACGCCAGAGCGCCCCGGCTGCGCCTCGT 300
2B_AY968218 TTCTCCCGACTGTTTCGGGCTCGTGGGGGCCACGCCAGAGCGCCCCGGCTGCGCCTCGT 300
2B_AY968219 CTCCCTGACTGTTTCGGGCTCGTGGGGGCTACGCCAGAGCGCCCCGGCTGCGCCTCGT 300
2A_AY258322 CTCCCCGACTGTTTCGGGCTCGTGGGGGCCACGCCAGAGCGCCCCGGCTGCGCCTCGT 300
2A_AY258323 CTCCCCGACTGTTTCGGGCTCGTGGGGGCCACGCCAGAGCGCCCCGGCTGCGCCTCGT 300
2C_DQ388279 CTCCCCGACTGTTTCGGGCTCGTGGGGGCCACGCCAGAGCGTCCCCGGCTGCGCTTGT 300
2C_DQ085340 CTCCCCGACTGTTTCGGGCTCGTGGGGGCCACGCCAGAGCGTCCCCGGCTGCGCCTTGT 300
          *** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****

KL          CGATGCTGACGACCCCTTCTGCGCACTGCCCC----- 333
2B_AY968220 CGATGCTGACGACCCCTTCTGCGCACTGCCCCGGGGCCGGGCGAGGTGTGGGTACAGCC 360
2B_AY968218 CGATGCTGACGACCCCTTCTGCGCACTGCCCCGGGGCCGGGCGAGGTGTGGGTACAGCC 360
2B_AY968219 CGATGCTGATGACCCCTTCTGCGCACTGCCCTGGGCCCGGCGAGGTGTGGGTACAGCC 360
2A_AY258322 CGACGCTGACGACCCCTTCTGCGCACTGCCCTGGGGCCGGGCGAGGTGTGGGTACAGCC 360
2A_AY258323 CGATGCTGACGACCCCTTCTGCGCACTGCCCTGGGGCCGGGCGAGGTGTGGGTACAGCC 360
2C_DQ388279 CGACGCCGACGACCCCTTCTGCGCACTGCCCTGGGGCCGGGCGAGGTGTGGGTACAGCC 360
2C_DQ085340 CGATGCCGACGACCCCTTCTGCGCACTGCCCTGGGGCCGGGCGAGGTGTGGGTACAGCC 360
          *** ** ** ***** ***** *****
```

```

KL
2B_AY968220 TGTTCATAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGC GGACTCCACATACGCGCCGGACCGTACGGCCA 420
2B_AY968218 TATCATAGGCTCGCAGGCGCGCAAAATGCGGACTTCACATACGCGCCGGACCGTACGGCCA 420
2B_AY968219 TGTTCATAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGC GGACTCCACATACGCGCCGGACCGTACGGCCA 420
2A_AY258322 TGTTCATAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGC GGACTCCACATACGCGCCGGACCGTACGGCCA 420
2A_AY258323 CGTCATAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGTGGACTCCACATACGTGCCGGACCGTACGGCCA 420
2C_DQ388279 CGTCATAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGC GGACTCCACATACGCGCCGGACCGTACGGCCA 420
2C_DQ085340 CGTCATAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGC GGACTCCACATACGCGCCGGACCGTACGGCCA 420

KL
2B_AY968220 CGCCACTGTGCGAAATGCCTGAGTGGATCCACGCCCACACCACCAGCGATCCCTGGCACCC 480
2B_AY968218 CGCCACCGTGC AAAATGCCTGAGTGGATCCACGCCCACACTACCAGTGATCCCTGGCACCC 480
2B_AY968219 TGCCACCGTGC AAAATGCCTGAGTGGATCCACGCCCACACCACCAGTGACCCCTGGCACCC 480
2A_AY258322 CGCCACTGTGCGAAATGCCTGAGTGGATCCACGCCCACACCACCAGCGACCCCTGGCACCC 480
2A_AY258323 CGCCACTGTGCGAAATGCCTGAGTGGATCCACGCCCACACCACCAGCGACCCCTGGCACCC 480
2C_DQ388279 CGCCACCGTGC AAAATGCCTGAGTGGATCCACGCCCACACCCTAGCGACCCCTGGCACCC 480
2C_DQ085340 CGCCACCGTGC AAAATGCCTGAGTGGATCCACGCCCACACCCTAGCGACCCCTGGCACCC 480

KL
2B_AY968220 -----TTGGGACTCAAGTTCAAGACAGTCCGCCCGGTGGTCTGCCACGAGCGTG 383
2B_AY968218 GCCCGGCCCCCTTGGGACTCAAGTTCAAGACAGTCCGCCCGGTGGTCTTACCACGCGCGTT 540
2B_AY968219 GCCCGGCCCCCTTGGGACTCAAGTTCAAGACAGTCCGCCCGGTGGTCTTACCACGCGCGTT 540
2A_AY258322 GCCCGGCCCCCTTGGGACTGAAGTTCAAGACGGTCCGCCCGGTGCGCTTGCCACGCGCGTT 540
2A_AY258323 GCCCGGCCCCCTTGGGACTGAAGTTCAAGACGGTCCGCCCGGTGCGCTTGCCACGCGCGTT 540
2C_DQ388279 GCCCGGCCCCCTTGGGACTGAAGTTTAAAGACGGTTCGCCCGGTGGCCCTGCCGCGCGCGTT 540
2C_DQ085340 GCCCGGCCCCCTTGGGACTGAAGTTTAAAGACGGTTCGCCCGGTGGCCCTGCCGCGCGCGTT 540
***** * ***** ***** ** ***** * * * * * * * * *

KL
2B_AY968220 AGCGCCCCCTCGCAACGTGCGCGTAAC TGGCTGCTACCAGTGCGGTACCCCCGCGTGTT 443
2B_AY968218 AGCGCCCCCTCGCAACGTGCGCGTAAC TGGCTGCTACCAGTGCGGTACCCCCGCGTGTT 600
2B_AY968219 AGCGCCCCCTCGCAACGTGCGCGTAAC TGGCTGCTACCAGTGCGGTACCCCCGCGTGTT 600
2A_AY258322 AGCGCCCCCTCGCAACGTGCGGTGTGACCGGTGCTACCAGTGCGGCACTCCCGCGTGTT 600
2A_AY258323 AGCGCTCTCGCAACGTGCGGTGTGACCGGTGCTACCAGTGCGGCACTCCCGCGTGTT 600
2C_DQ388279 AGCGCCACCCCGCAACGTGCGCGTAAC TGGCTGCTACCAGTGCGGCACTCCCGCGTGTT 600
2C_DQ085340 AGCGCCACCCCGCAACGTGCGCGTAAC TGGCTGCTACCAGTGCGGCACTCCCGCGTGTT 600
***** ** ***** ***** ** * ***** ***** ** *****

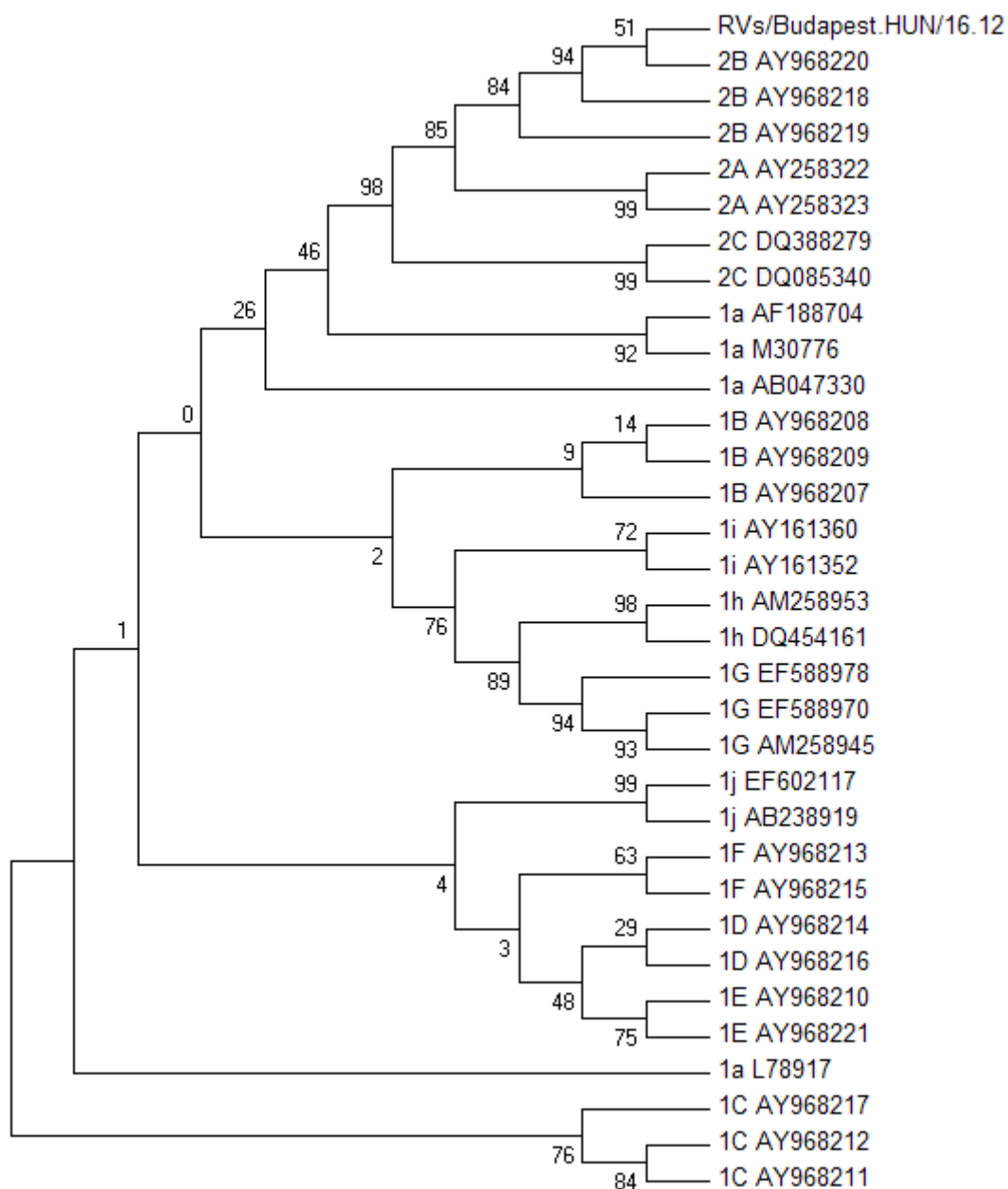
KL
2B_AY968220 GGAGGGCCTCGCCCCAGGAGGAGGGAAC TGCACCTCACC GTCAACGGCGAGGACGTGCG 503
2B_AY968218 GGAGGGCCTTGCCCCAGGAGGAGGGAAC TGCACCTCACC GTCAACGGCGAGGACGTGCG 660
2B_AY968219 GGAGGGCCTCGCCCCAGGAGGAGGGAAC TGCACCTCACC GTCAATGGCGAGGACGTGCG 660
2A_AY258322 GGAAGGCCTCGCCCCAGGGGGTGGCAAT TGCACCTCACC GTCAATGGCGAGGACGTGCG 660
2A_AY258323 GGAAGGCCTCGCCCCAGGGGGCGGCAAT TGCACCTCACC GTTAATGGCGAGGACGTGCG 660
2C_DQ388279 GGAAGGCCTCGCCCCGGGGGGAGGGAAT TGCATCTTACC GTCAACGGCGAGGACGTGCG 660
2C_DQ085340 GGAAGGCCTCGCCCCGGGGGGAGGGAAT TGCATCTTACC GTCAACGGCGAGGACGTGCG 660
*** ***** ***** ** * * * * * ***** ** ***** *****

KL
2B_AY968220 CGCCTTCCCCCTGGGAAGTTCGTACCGCGCCCTCCTCAACACCCCCCGCCCTACCA 563
2B_AY968218 CGCCTTCCCCCTGGGAAGTTCGTACCGCGCCCTCCTCAACACCCCCCGCCCTACCA 720
2B_AY968219 CGCCTTCCCCCTGGGAAGTTCGTACCGCGCCCTCCTCAACACTCCCCCGCCCTACCA 720
2A_AY258322 CGCCTTCCCCCTGGGAAGTTCGTACCGCGCCCTCCTCAACACTCCACCGCCCTACCA 720
2A_AY258323 CGCCTTCCCCCTGGGAAGTTCGTACCGCGCCCTCCTCAACACTCCACCGCCCTACCA 720
2C_DQ388279 CGCCTTCCCCCTGGGAAGTTTGTACCGCGCCCTCCTGAACACCCCCCGCCCTACCA 720
2C_DQ085340 CGCCTTCCCCCTGGGAAGTTCGTACCGCGCCCTCCTGAACACCCCCCGCCCTACCA 720
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

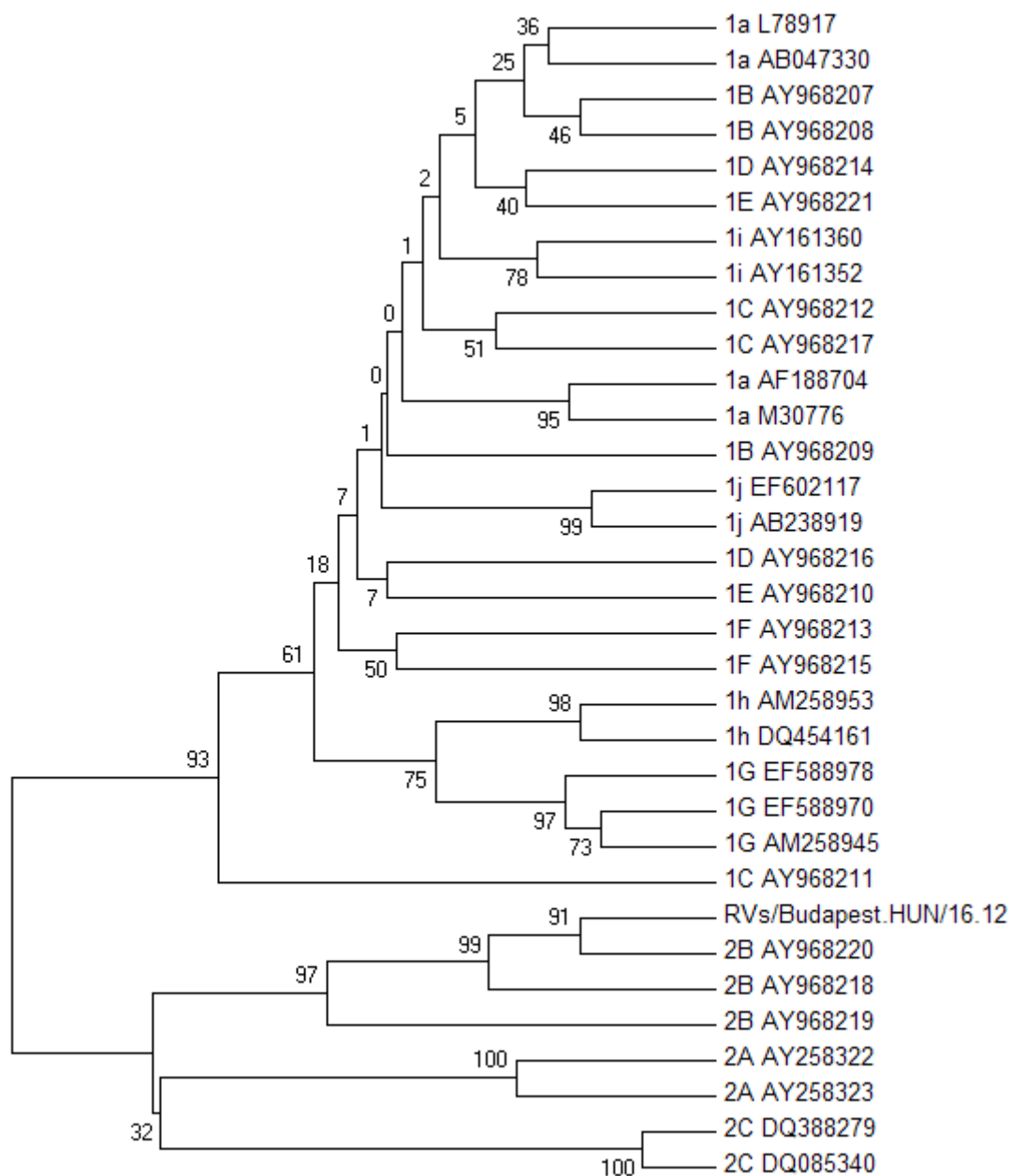
KL
2B_AY968220 AGTGAGTTGCGGGGGTGAG 582
2B_AY968218 AGTGAGTTGCGGGGGTGAG 739
2B_AY968219 GGTGAGTTGCGGGGGCGAG 739
2B_AY968219 AGTGAGTTGCGGGGGCGAG 739
2A_AY258322 AGTGAGTTGCGGGGGTGAG 739
2A_AY258323 AGTGAGTTGCGGGGGTGAG 739
2C_DQ388279 AGTGAGCTGCGGGGGCGAG 739
2C_DQ085340 AGTGAGCTGCGGGGGCGAG 739
***** ***** *****

```

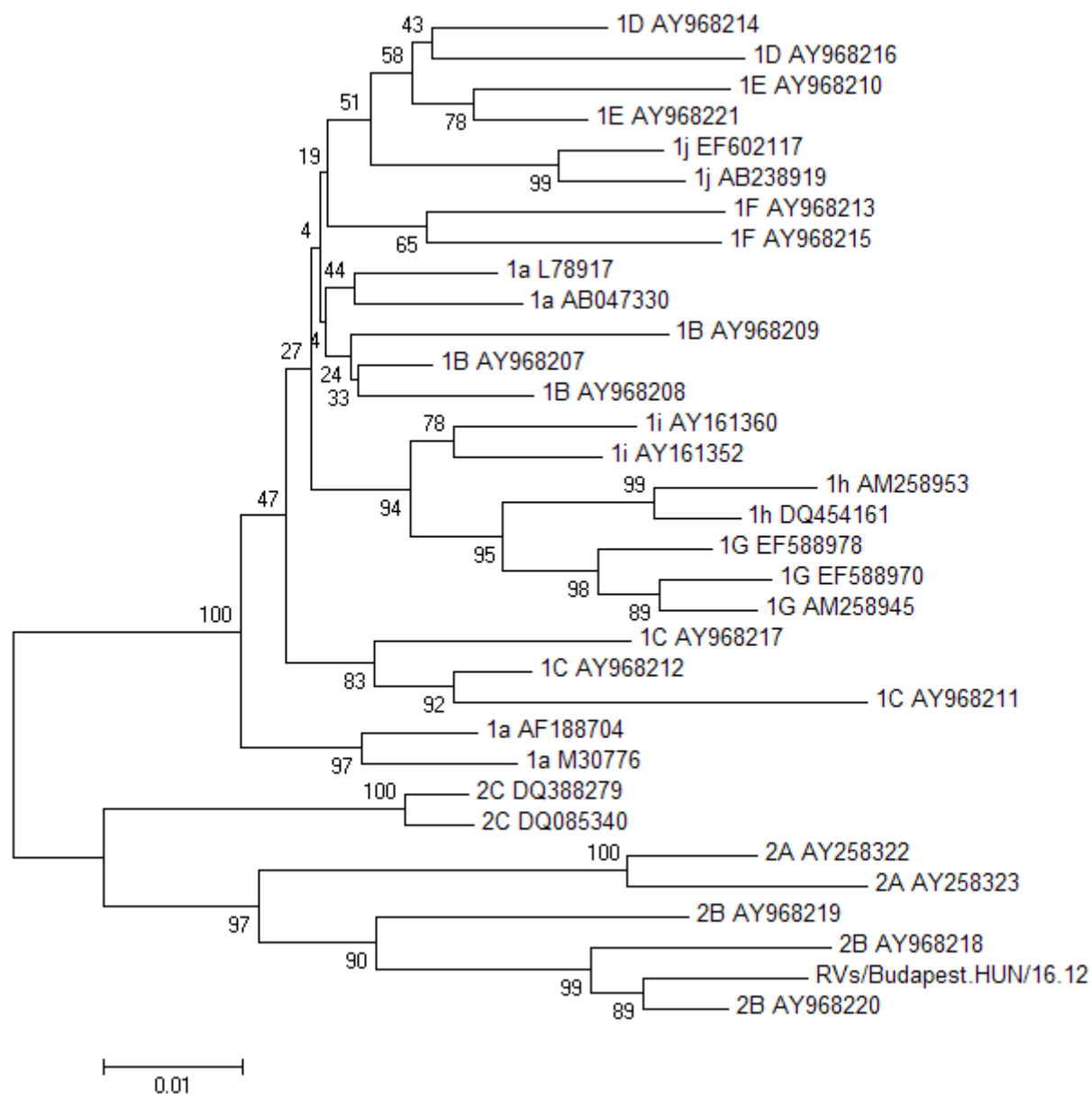
## 2. Maximum Parsimony módszerrel készített filogenetikai törzsfa



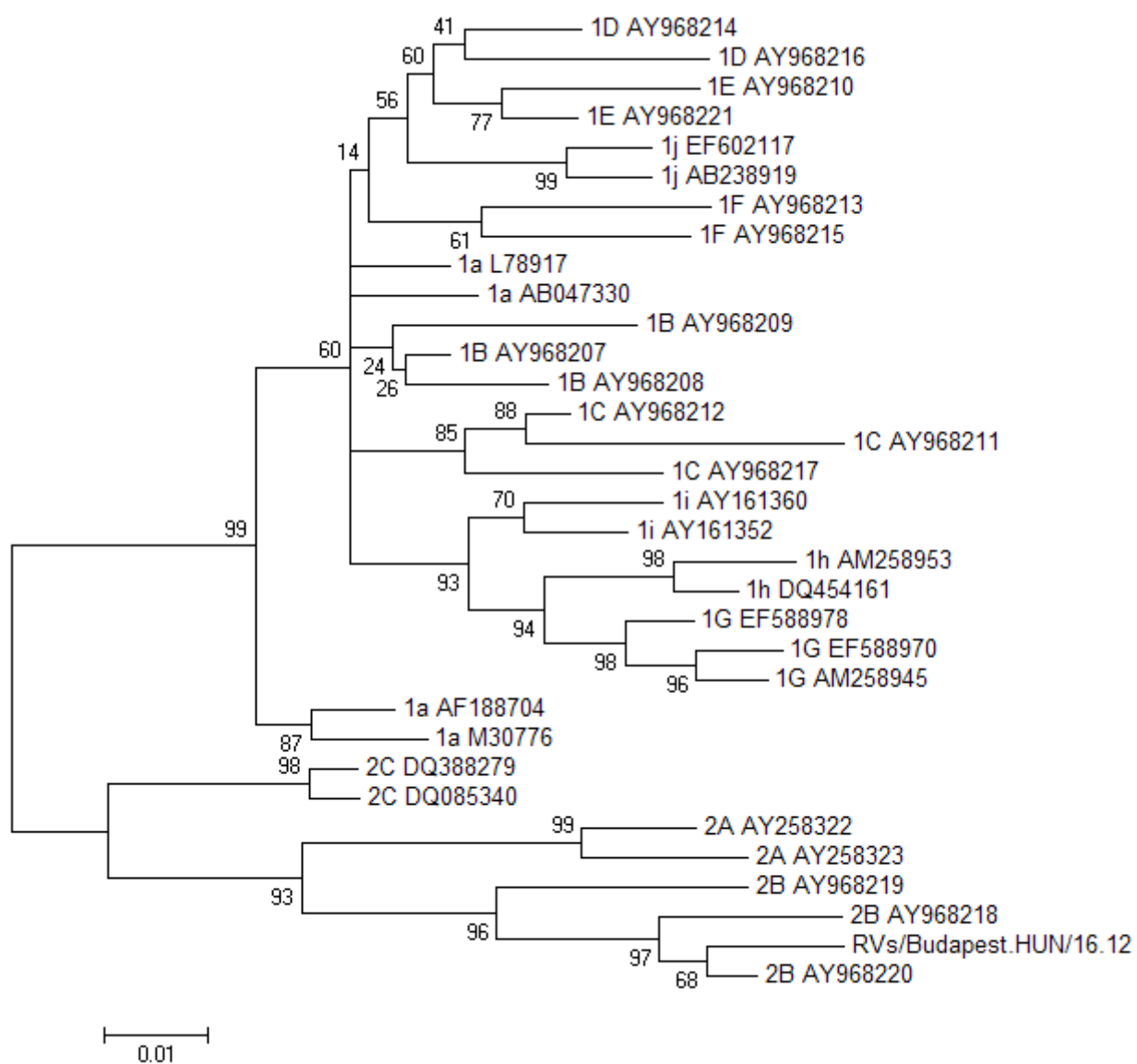
### 3. UPGMA módszerrel készített filogenetikai törzsfá



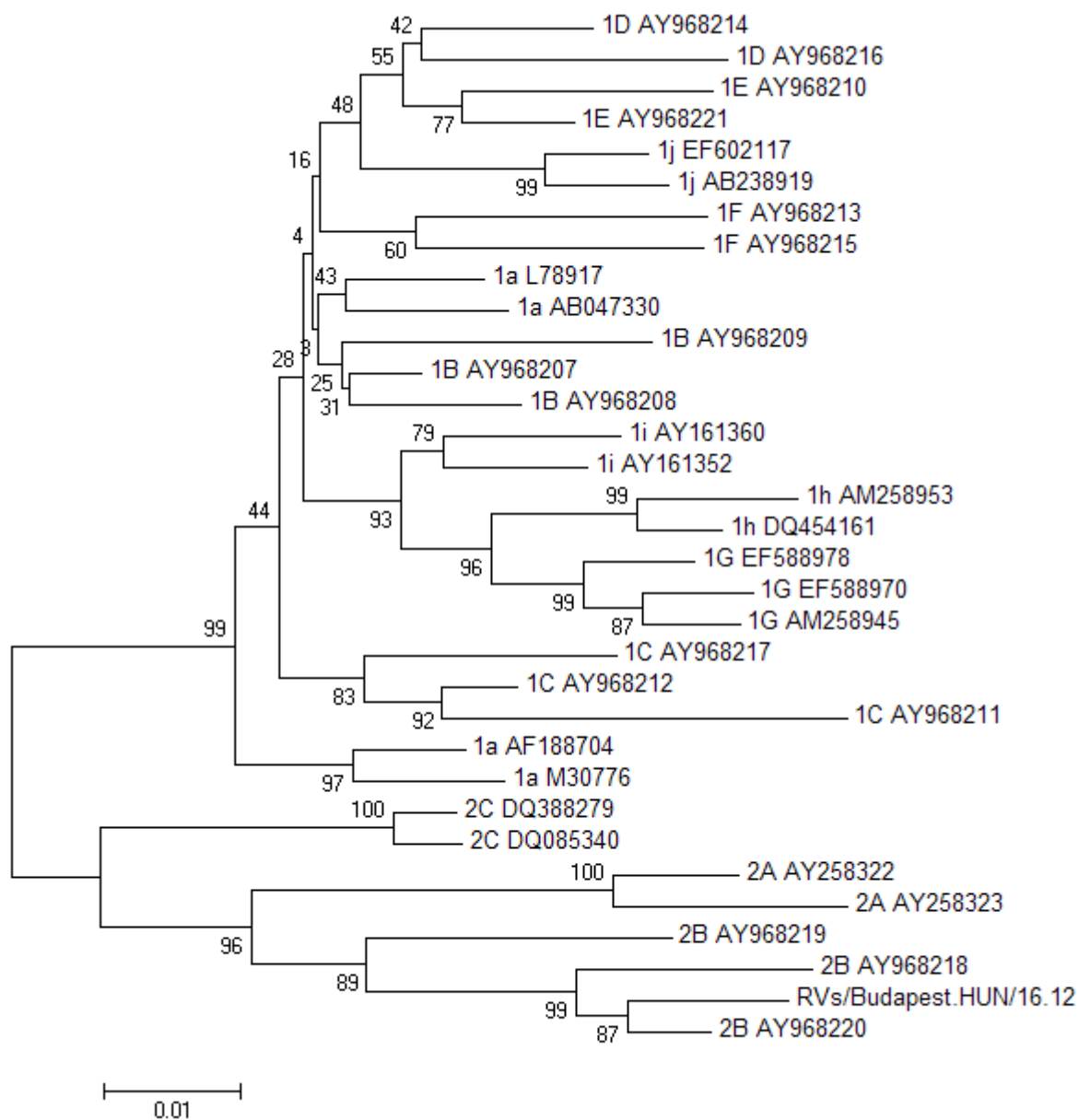
#### 4. Minimum Evolution módszerrel készített filogenetikai törzsfa



## 5. Maximum Likelihood módszerrel készített filogenetikai törzsfa



## 6. Neighbor-joining módszerrel készített filogenetikai törzsfa



## 7. A nemzetközi adatbankból letöltött rubeola szekvenciák adatai

| Azonosító szám | Izolálás helyszíne | Szekvencia elnevezése          |
|----------------|--------------------|--------------------------------|
| AF039115       | Belgium            | Cendehill (1963)               |
| AF039133       | Germany            | INS (1995)                     |
| AF551761       | Germany            | G432-GER99                     |
| AM258955       | Minsk              | RVi/Minsk.BLR/18.05/2[1E]      |
| AY161353       | Italy              | 3994-ITA91                     |
| AY326341       | Germany            | BCM/-GER91                     |
| DQ085331       | Pavia              | 6431_PAVIA, ITALY 1997         |
| EF210049       | Istanbul           | RVs/Istanbul.TUR/01/3          |
| EF649764       | Perm               | LSM15Perm-2005RU [2c]          |
| EU240899       | Sheffield          | RVs/Sheffield.GBR/13.07[2B]CRS |
| EU240900       | London             | RVs/London.GBR/25.07[2B]       |
| EU518616       | Madrid             | RVs/Madrid.SPA/10.05/5[1j]     |
| FJ711672       | Voronej            | Rvi/Voronej.RUS/7.08           |
| FJ711683       | Chernivtcsi        | Rvs/Chernivtcsi.UKR/13.07      |
| FJ711694       | Tula               | Rvs/Tula.RUS/06.06             |
| FN546968       | Lille              | RVs/Lille.FRA/38.95[1h]        |
| FN546969       | Paris              | RVs/Paris.FRA/18.96[1G]        |
| FN547013       | Bordeaux           | RVs/Bordeaux.FRA/45.02[1E]     |
| FN547017       | Bordeaux           | RVs/Bordeaux.FRA/27.04[2B]CRS  |
| FN547021       | Paris              | RVs/Paris.FRA/26.09[2B]        |
| FR717222       | Sarajevo           | RVi/Sarajevo.BIH/10.10/2[2B]   |

## 8. Poszter a Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 40. kongresszusára (2012. szeptember 20-22., Budapest)



### Morbili és rubeola — nemzetközi kitekintés és hazai helyzet

N. Szomor Katalin<sup>1</sup>, Rigó Zita<sup>1</sup>, Farkas Ágnes<sup>1</sup>, Géresi Adrienn<sup>1</sup>, Szabó Éva<sup>1</sup>, Nagy Orsolya<sup>1</sup>, Molnár Zsuzsanna<sup>2</sup>, Takács Mária<sup>1</sup>

1 Országos Epidemiológiai Központ, Virologiai főosztály, Kiütéses Vírusbetegségek Nemzeti Referencia Laboratóriuma (KV-NRL), Budapest

2 Országos Epidemiológiai Központ, Járványügyi osztály, Budapest

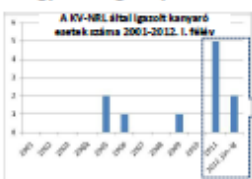
**BEVEZETÉS** A WHO által 2015-re kitűzött cél – a kanyaró és a kongenitális rubeola szindróma eliminációja az Európai Régióból – akkor valósítható meg, ha a tagállamok mindegyikében megvalósul a fogékony korosztályok legalább 95%-ának 2 dózisú MMR-rel történő oltása. Magyarországon hagyományosan magas (> 90%) az átoltottság. Az utóbbi években mind a kanyaró, mind pedig a rubeola megbetegedések száma nőtt Európában, és szemben a korábbi néhány év tapasztalatával, 2010 óta Magyarországon ismét igazoltunk mind behurcolt eseteket, mind pedig –feltehetően– ezen betegek kontaktjai között előforduló hazai megbetegedéseket.

#### KANYARÓ

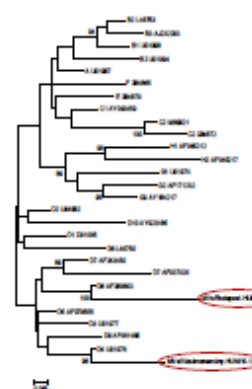
##### Európai helyzet



##### Magyarországi helyzet



| Év   | Magyarországi esetek száma | Európai esetek száma | Magyarországi esetek aránya az európaiakhoz képest (%) |
|------|----------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------|
| 2001 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2002 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2003 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2004 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2005 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2006 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2007 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2008 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2009 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2010 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2011 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2012 | 1                          | 1                    | 100                                                    |



##### Genotipizálási eredmények

Az eredmények összehasonlíthatósága érdekében WHO ajánlás:

- az azonos génszakasz (N - nukleoproteint kódoló gén C-terminális régió, min. 450 bp) szekvenálása
- ugyanazon referencia törzsekhez való viszonyítás

##### Morbillivírus genotípusok előfordulása Európában:

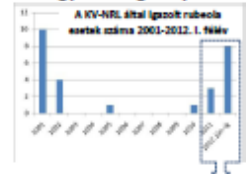


#### RUBEOLA

##### Európai helyzet



##### Magyarországi helyzet



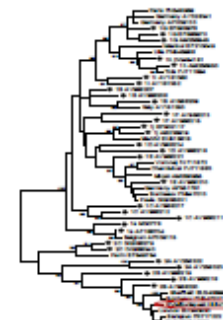
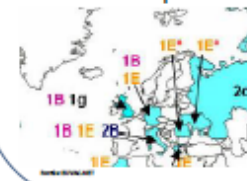
| Év   | Magyarországi esetek száma | Európai esetek száma | Magyarországi esetek aránya az európaiakhoz képest (%) |
|------|----------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------|
| 2001 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2002 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2003 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2004 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2005 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2006 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2007 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2008 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2009 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2010 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2011 | 1                          | 1                    | 100                                                    |
| 2012 | 1                          | 1                    | 100                                                    |

##### Genotipizálási eredmények

Az eredmények összehasonlíthatósága érdekében WHO ajánlás:

- az azonos szakasz (a hemagglutinációs aktivitásért is felelős E1 - envelope glikoproteint kódoló régió min. 739 bp) szekvenálása
- ugyanazon referencia törzsekhez (jelölésük a törzsfán: ●) való viszonyítás

##### Rubeolavírus genotípusok előfordulása Európában:



**ÖSSZEFOGLALÁS** A fogékony korosztályok magas átoltottságának köszönhetően Magyarországon az elmúlt évtizedben évi néhány behurcolt kanyaró és rubeola esettől eltekintve nem fordult elő – a KV-NRL által is- megerősített hazai megbetegedés. Az utóbbi két évben bejelentett/igazolt esetek egy részében nem érkezett megfelelő minta [helyes időpontban vett, RNS kimutatásra alkalmas: korai vér/szöv, garattörlet VTM-ben (vírus-transport-medium), vizelet] a laboratóriumba, amely a molekuláris kimutatás és a WHO által elvárt genotipizálás alapját képezné.

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szomor Katalinnak szakmai támogatásáért, és Dr. Takács Máriának, aki lehetővé tette, hogy szakdolgozatomat az Országos Epidemiológiai Központ Vírusdiagnosztikai osztályán készítsem el.

Köszönettel tartozom konzulensemnek, Dr. Sveiczter Ákosnak, aki szakdolgozatom megírása során hasznos tanácsokkal látott el, továbbá Farkas Ágnesnek, aki a laboratóriumban töltött idő alatt munkámat koordinálta és segítette.