



2016. XVI. évfolyam 3-4. szám

Tartalom:

A mikrobiológiai adatok jelentősége az Országos Szakmai Információs Rendszer Járványügyi szakrendszerében és felhasználási területei
Krisztalovics Katalin

**Ritkán izolálható Gram-negatív, opportunista kórokozó baktériumok
II. Korábban a *Pseudomonas* genusba sorolt, ritkán izolálható, nem fermentáló opportunista kórokozók**
Szabó Zsuzsanna

Az új-generációs szekvenálás jelentősége a virológiában
Áy Éva, Várkonyi Andrea, Kis Zoltán, Hettmann Andrea, Nagy Anna

*A Mikrobiológiai Körlevél ezen számának megjelentetését
A Magyar Epidemiológia Fejlesztéséért Alapítvány támogatta*

Kiadja: Országos Epidemiológiai Központ

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

Felelős kiadó: Dr. Visontai Ildikó, osztályvezető főorvos

Alapító szerkesztő:

Dr. Füzi Miklós (Ph.D.)

Dr. Gacs Mária

Felelős szerkesztő:

Dr. Visontai Ildikó

Szerkesztő:

Dr. Csire Márta (Ph.D.)

Dr. Tirczka Tamás

Dr. Tóth Ákos (Ph.D.)

Technikai szerkesztő:

Ertlne Czinege Ildikó

Huszár Csilla

Olvasó szerkesztő:

Dr. Gacs Mária

Készült az Országos Tisztifőorvosi Hivatal nyomdájában
120 példányban

Nyomdavezető: Novák Anikó

ISSN 2063-9805 (Nyomtatott)

ISSN 2063-9813 (Online)

A Mikrobiológiai Körlevelek az OEK honlapján

www.oek.hu elérhetőek

A mikrobiológiai adatok jelentősége az Országos Szakmai Információs Rendszer Járványügyi szakrendszerében és felhasználási területei

Krisztalovics Katalin

Országos Epidemiológiai Központ

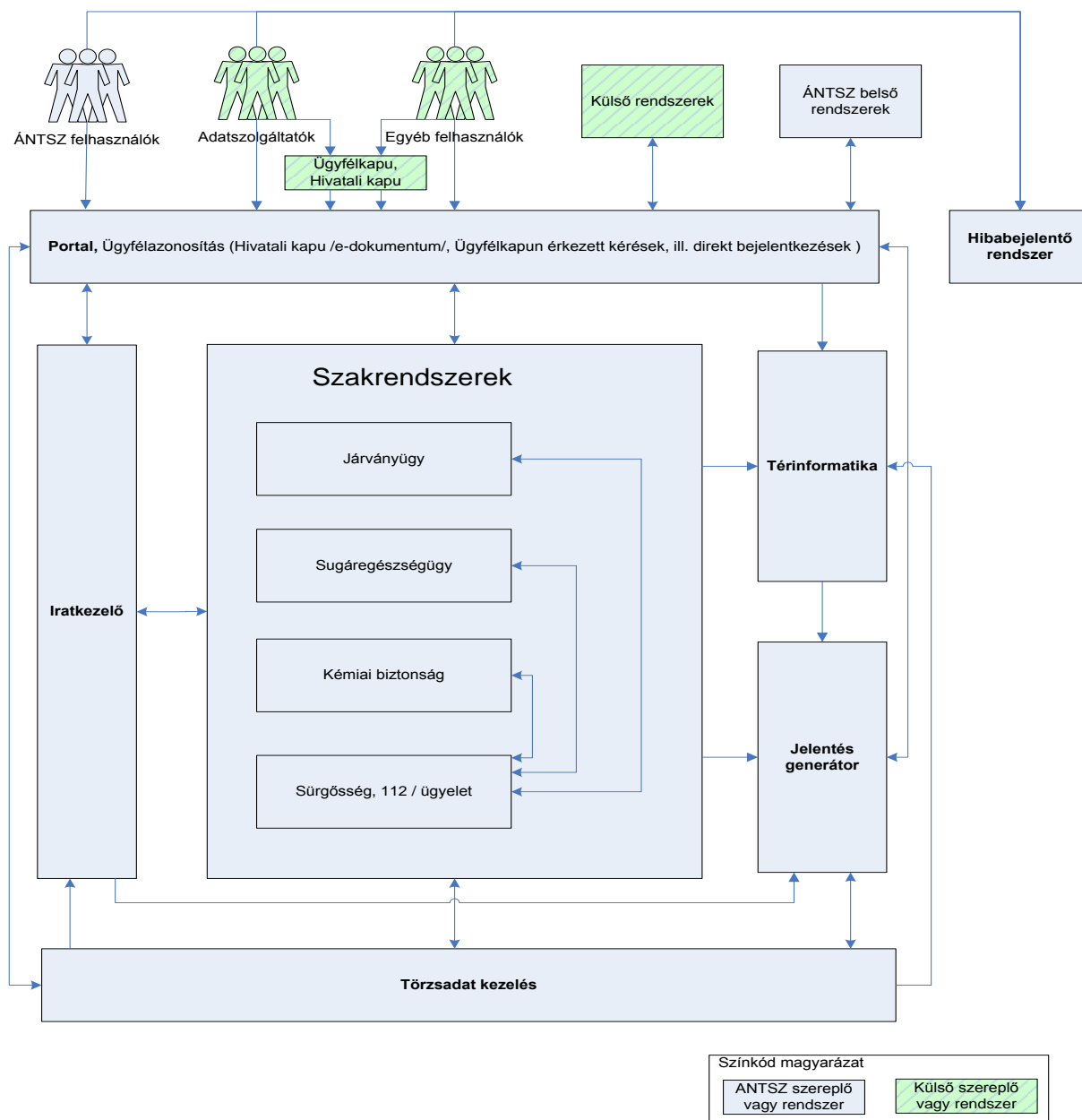
Az Országos Szakmai Információs Rendszer (OSZIR) az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat egyik elektronikus információs rendszere, amely 2014 végén kezdte meg a működését, de tervezése már 2009-ben elkezdődött, és koncepciójának kialakításánál az előző informatikai rendszer (Epidemiológiai Felügyeleti Rendszert kiszolgáló Informatikai Rendszer – EFRIR) tapasztalatait is hasznosították. Ezen új fejlesztés célja az volt, hogy a XXI. századi **információs technológiát** használva már ne csak a népegészségügy egyes szereplői (járásai, megyei, országos intézmények) között, hanem **külső felhasználók** (egészségügyi szolgáltatók – klinikusok és laboratóriumok) **által szolgáltatott információkról** is **gyorsan** szolgáltasson az adott szakterületen hasznosítható **nagymennyiségű, pontos adatot** a szakma döntéshozóinak. Ennek új eredményeként pedig elektronikusan összekapcsolhatóak legyenek a fertőző betegekre vonatkozó klinikai és mikrobiológiai adatok. (A fertőző betegek papíralapú jelentése – „piros lap” - 1931. óta, a bejelentendő fertőző betegségekre vonatkozó mikrobiológiai eredmények jelentése pedig 1973. óta kötelező Magyarországon.)

Az OSZIR-nak több szakrendszere van, közülük a mikrobiológiai laboratóriumok számára a **Járványügyi szakrendszernek** van jelentősége (ezt írja körül a fertőző betegek jelentéséről szóló jogszabály a „ÁNTSZ elektronikus járványügyi felügyeleti rendszere” fordulattal), de emellett működik Kémiai biztonsági, Sugáregészségügyi, illetve Veszélyes Rendellenességek Nyilvántartási, valamint Humán Vízhasználatok Környezet-egészségügyi szakrendszere, Születésértesítő rendszer, Ritka betegségek nyilvántartása, HENYIR, stb. (1. sz. ábra)

1. sz. ábra

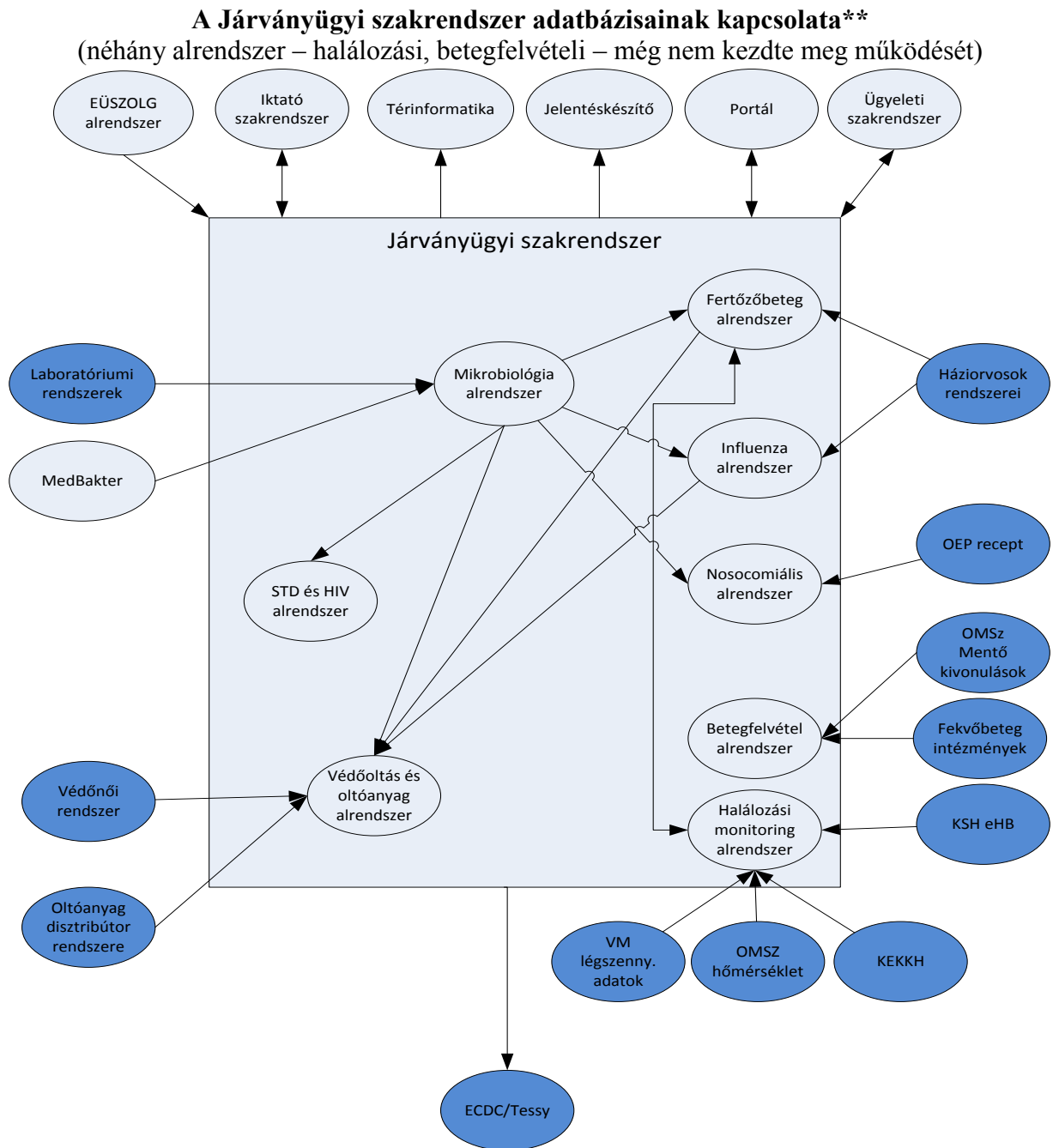
Az OSZIR szakrendszerei és egyéb támogató funkciói*
(portál, felhasználó-azonosító, iratkezelő, statisztika-készítő stb.)

Magas szintű folyamat ábrázolás



***Forrás:** OSZIR Járványügyi szakrendszer logikai rendszerterve

A Járványügyi szakrendszeren belül különféle adatbázisok/alrendszerek (mikrobiológiai, fertőzőbeteg-jelentő, HIV-STD, nosocomiális, stb.) kapcsolódnak külső adatszolgáltatókhoz és egymáshoz. Látható, hogy a Járványügyi szakrendszer középpontjában a Mikrobiológiai alrendszer áll, mely majdnem minden más alrendszert kiszolgál. (2. sz. ábra)



**Forrás: OSZIR Járványügyi szakrendszer logikai rendszerterve

Jogi alapok

A rendszer működése két jogszabályon alapszik: az egészségügyi és a hozzájuk kapcsolódó személyes adatok kezeléséről és védelméről szóló 1997. évi XLVII. törvényben leírtakon és a fertőző betegségek jelentésének rendjéről szóló 1/2014. (I. 16.) EMMI rendeleten. A **törvény** 15.§-ában és 1. sz. mellékletében azt írja elő, hogy mely kórokozókra vonatkozóan kell jelentést tennie a humán

mikrobiológiai laboratóriumnak (akkor is, ha kémiai laboratóriumként van nyilvántartva, de mikrobiológiai vizsgálatokat is végez), a **rendelet** pedig azt, hogy kinek a feladata a jelentés (3.§) és pontosan milyen adatokat kell szolgáltatni (4/A-5. és 9. sz. melléklet).

Ezek szerint a humán mikrobiológiai laboratóriumoknak a leletkiadást követő 24 órán belül jelenteniük kell (rendszer-rendszer kapcsolat – ún. interfész révén) az OSZIR Mikrobiológiai alrendszerébe a törvény **1. sz. mellékletének A) pontjában** nevesített kórokozókra vonatkozó pozitív eredményeket, illetve az 1/2014.(I.16.) EMMI rendelet 5. sz. mellékletében szereplő kórokozó tekintetében a negatív eredményeket is **személyazonosító adatokkal együtt**. A 9. sz. melléklet azokat a járványügyi szempontból kiemelt jelentőségű kórokozókat sorolja fel, melyek sürgősséggel (tehát telefonon is) jelentendők, ha azok megállapításra kerülnek.

A kifejlesztett alkalmazás lehetőséget ad arra, hogy a klinikus által bejelentett fertőző betegség klinikai gyanújának információit tartalmazó űrlapot össze lehessen elektronikusan kapcsolni a laboratóriumból érkező lelettel, ami a személyazonosítók alapján az adott fertőző beteghez tartozik, így **a klinikai és a laboratóriumi adatokból** létrejön egy **szintetizált információ**, amely szerint **a megbetegedések EU esetdefiníciója alapján** minősíthetők [18/1998.(VI.3.) NM rendelet fogalom-magyarázata és 1. sz. melléklete].

A klinikai és a laboratóriumi adatgyűjtés (surveillance) párhuzamosan működik, és ha a klinikus a betegség gyanúját nem, vagy késve jelentette, az adatbázisba beküldött mikrobiológiai laboratóriumi eredmény alapján – ha az illetékes járványügyi szakemberek egyeztettek a vizsgálatot kérő klinikussal, és az megerősíti, hogy valóban heveny fertőző megbetegedés diagnózisát állapította meg a laboratórium, akkor – a kórokozó terjedésének a megfékezésére haladéktalanul bevezetik az adott kórokozó által okozott fertőző betegséggel kapcsolatos első járványügyi intézkedéseket a beteggel vagy a környezetében élő személyekkel kapcsolatban. Így tehát az informatikai támogatással **felgyorsul az információáramlás, és rövidebb idő szükséges az intézkedések elrendeléséhez**.

Mikrobiológiai laboratóriumok feladatai

A humán mikrobiológiai laboratóriumoknak az OSZIR Mikrobiológiai alrendszerébe történő jelentéshez tanúsítványt kellett beszerezniük, mely igazolja, hogy rendszer-rendszer kapcsolat (interfész révén) képesek informatikai kapcsolatot teremteni az OSZIR megfelelő alrendszerével.

A laboratóriumoknak azonban nem minden, a jogszabályban nevesített kórokozóra vonatkozó pozitív eredményt kell jelenteniük az ÁNTSZ informatikai rendszerébe, hanem csak azokat, amelyek valóban a heveny fertőző betegség gyanúját vetik fel. Ennek különösen a szerológiai vizsgálati eredmények esetében van jelentősége, hisz egy betegség átvészelését mutató eredmények még

önmagukban nem vetik fel a betegség akut formájának fennállását. Ezért a laboratóriumoknak a leletek adatbázisba küldésénél erre is figyelemmel kell lenniük (releváns vizsgálati eredmény).

Az említett rendelet 5. sz. melléklete előírja azt is, hogy bizonyos, személyes adatokkal jelentendő kórokozók esetén a negatív vizsgálati eredményt is jelenteni kell az OSZIR-ba. Erre azért van szükség, mert ezek olyan – járványügyi szempontból fontos – fertőző betegségek, melyek gyanúja tehát klinikailag felmerült (ezért kérte a klinikus a vizsgálatot), de azt nem sikerült mikrobiológiai módszerekkel megerősíteni. A járványügyi szakemberek ezekről a vizsgálatokról két okból szeretnék időben értesülni: egyrészt lehet, hogy a mintavétel még korai volt/nem alkalmas (rosszul tárolt, nem adekvát) mintát vizsgált a laboratórium, ezért végződött a vizsgálat negatív eredménnyel, másrészt lehet, hogy a vizsgáló módszer típusa, vagy kivitelezési módja volt alkalmatlan a kórokozó direkt vagy indirekt kimutatására, és ugyan negatív az eredmény, de valójában a keresett kórokozó idézte elő a tüneteket.

Van a kórokozóknak egy olyan köre, mellyel kapcsolatban anonim módon kell jelenteni a leletek adatait (törvény 1. sz. mellékletének B) pontja - HIV, STD-kórokozók). Ezekhez generált kódok alapján kapcsolódnak a fenti csoportba tartozó megbetegedésekre vonatkozó anonim klinikai bejelentések.

A kórokozók antibiotikum-rezisztenciájának vizsgálati eredményei is jelentendők anonim módon.

Mikrobiológiai adatbázis haszna

A mikrobiológiai leletek egyrészt tehát a fertőzőbeteg-jelentés minőségét biztosítják azáltal, hogy az egyes bejelentendő fertőző betegségek esetdefinícióit [18/1998.(VI.3.) NM rendelet fogalom-magyarázata és 1. sz. melléklete] figyelembe véve kell az eseteket az adatbázisban nyilvántartani, tehát a mikrobiológiai adatbázisnak közvetlen járványügyi haszna van: részben a járványügyi **intézkedések megalapozását**, részben a **járványügyi helyzet megítélését** teszik lehetővé.

Másrészt a leletek adatokat szolgáltatnak a hazánkban előforduló kórokozókra vonatkozóan (nem csak arra, hogy pl. Salmonella törzset izoláltak, hanem annak a szerotípusára vonatkozóan is). Ez lehetőséget ad a mikrobiológusoknak időben és térben tisztábban látni a hazánkban **cirkuláló kórokozók mélyebb jellemzőit**. Harmadrészt az antibiotikum-rezisztencia adatok képet adnak a Magyarországon **cirkuláló kórokozók rezisztencia-jellemzőiről** is, amire alapozottan szakmapolitikai döntéseket lehet hozni az **antibiotikumok biztonságos alkalmazásának hazai szabályairól**.

Az OEK szakemberei, akik a mikrobiológiai adatbázisba jogosultak betekinteni, láthatják továbbá, hogy **mely laboratóriumok milyen diagnosztikus módszereket alkalmaznak** az adott kórokozó kimutatására, és **körkísérletek**

tervezésével és szervezésével bizonyosodhatnak meg arról, hogy a működési engedéllyel rendelkező laboratóriumok milyen minőségben végzik diagnosztikus munkájukat. Ők a felelősök azért is, hogy a referencia-laboratóriumok révén **új diagnosztikus módszereket** vezessenek be, követve a szakterület fejlődését.

Kapcsolódó irodalom:

- Az egészségügyi és a hozzájuk kapcsolódó személyes adatok kezeléséről és védelméről szóló 1997. évi XLVII. törvény
- A fertőző betegségek jelentésének rendjéről szóló 1/2014. (I. 16.) EMMI rendelet
- A fertőző betegségek és a járványok megelőzése érdekében szükséges járványügyi intézkedésekről szóló 18/1998. (VI.3.) NM rendelet
- 2012/506/EU: A Bizottság végrehajtási határozata (2012. augusztus 8.) az Európai Parlament és a Tanács 2119/98/EK határozata értelmében a közösségi hálózatnak jelentendő fertőző betegségek esetdefinícióinak megállapításáról szóló 2002/253/EK határozat módosításáról
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=CELEX%3A32012D0506>
- Országos Szakmai Információs Rendszer
https://www.antsz.hu/portal/felso_menu/oszir?transactionid=8614602302036024523

Ritkán izolálható Gram-negatív, opportunista kórokozó baktériumok

II. Korábban a *Pseudomonas* genusha sorolt, ritkán izolálható, nem fermentáló opportunista kórokozók

Szabó Zsuzsanna

A *Pseudomonas* genusha, illetve az ezzel kapcsolatba hozható (kézikönyvekben és cikkekben ma is gyakran „*Pseudomonas related*” kifejezéssel említett) nem fermentáló baktériumok genusaiba sorolhatók napjaink legjelentősebb Gram-negatív opportunista kórokozói (pl. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*). Mivel a *Pseudomonas* genus rendszertana hosszú ideig vitatott volt, az egyszerű besorolási kritériumok (aerob, nem fermentáló, Gram-negatív, spórát nem képző, poláris csillóval mozgó pálcák) alapján nagyszámú, extrém tápanyagigényű baktérium került a genusha. Később ezeket az rRNS-DNS hibridizációs vizsgálatok alapján 5 csoportba sorolták, az I csoportban találhatóak a *Pseudomonas sensu stricto* képviselői, a II - V csoportok képviselői pedig a taxonómiai revízió után újonnan leírt 27 genusha tartoznak (1). Ezek közül az opportunista kórokozó baktériumok – az osztály és a korábbi rRNS csoportok megjelölésével – a következő 13 genusha sorolhatók: *Brevundimonas*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* (*Alphaproteobacteria* osztály – korábban rRNS IVcsoport), *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Delftia*, *Herbaspirillum*, *Pandoraea*, *Ralstonia* (*Betaproteobacteria* osztály – korábban rRNS II és III csoport), *Shewanella* és *Stenotrophomonas* (*Gammaproteobacteria* osztály – korábban rRNS V csoport). Mivel jelenleg nincs egyetlen olyan nagyobb rendszertani egység, amelyet valamennyi genus besorolására meg lehet nevezni és e genusok a „*Proteobacteria*” törzs (nem elfogadott rendszertani kategória) több osztályába, illetve az osztályokon belül is több rendbe és családba tartoznak, az alfabetikus sorrendben ismertetett genusok neve után a genus feletti taxonómiai szintek (osztály > rend > család) minden esetben szerepelnek.

A genusok ismertetésénél a hagyományos mikrobiológiai módszerekkel kimutatható tulajdonságok ugyan szerepelnek, de ezek csak tájékozódásra szolgáló adatok, mivel e genusok képviselőit ilyen módszerekkel rendszertanilag azonosítani szinte lehetetlen. Ugyanakkor a taxonokba való besorolás igen fontos a klinikai gyakorlatban, nemcsak epidemiológiai szempontból, de a gyakran észlelhető nosocomialis fertőzések elleni hatékony intézkedések érdekében is. A hagyományos félautomata azonosító rendszerek adatbázisában az alábbi genusok képviselői gyakran nem is szerepelnek. Emiatt, továbbá mivel a különböző genusok képviselői között igen szoros a genetikai kapcsolat, az ilyen berendezések alkalmazása során gyakran születnek félrevezető eredmények. A modern molekuláris alapú módszerek éppen ezért nélkülözhetetlenek e genusok taxonómiai vizsgálatához.

A korszerű rendszertani azonosítások céljaira ma már világszerte MALDI-TOF MS készüléket használnak, amelynek beszerzési és karbantartása költsége ugyan magas, azonban működtetési költsége alacsony és üzemeltetésével megtakarítható a hagyományos és félautomata rendszerekkel végzett taxonómiai vizsgálatok kivitelezéséhez szükséges, sokszor tetemes költség. Használatával pl. nincs szükség a többféle és nagy mennyiségű táptalaj alkalmazására, előzetes vizsgálatok végrehajtására, a vizsgálatok elvégzése után pedig csak kevés hulladékot kell ártalmatlanítani. Előnyei közé sorolható még, hogy faji, sőt akár törzsi szintű azonosítást eredményez, amely igen gyorsan interpretálható és ez fontos körülmény a klinikai gyakorlatban. A rendszer alkalmas továbbá a ritka előfordulású kórokozók taxonómiai azonosítására. A legfrissebb szakirodalom áttekintése alapján, a jelen közlemény valamennyi genusának képviselőit azonosították már MALDI-TOF MS készülék segítségével (pl. 2, 3), de olyan közlemény ma még ritkán jelenik meg, amely ezek közül egy-egy genusba tartozó fajok összehasonlító vizsgálatának eredményeit tárgyalja (4). A klinikai laboratóriumok hatékonyságát növeli, hogy MALDI-TOF MS készülékkel ma már a pozitív hemokulturákból és más, különben steril testfolyadékokból közvetlenül lehet a kórokozókat azonosítani (5). Magyarországon is több klinikai mikrobiológiai laboratórium számára elérhető már MALDI-TOF MS készülék. Három hazai orvosegyetem munkatársai, a rendszer alkalmazásával nyert több éves tapasztalataikról, továbbá a MALDI-TOF MS egyéb, a jövőben jól kiaknázható alkalmazási lehetőségeiről (pl. antibiotikum-rezisztencia vizsgálata) is beszámoltak (6).

Az alább ismertetett kórokozókkal szemben alkalmazható terápiás lehetőségek szakirodalmi adatai – a *Stenotrophomonas maltophilia*-t kivéve – nagyon hiányosak. Az új kórokozók taxonómiai leírását tartalmazó közlemények esetleírásokat, terápiára vonatkozó javaslatokat sokszor nem is tartalmaznak. Az esetleírások és az adott kórokozó korábbi előfordulásának áttekintését adó közlemények esetén az izolált törzsek antibiotikumokkal szembeni érzékenységét ugyan meghatározzák, azonban már az empirikus módon megkezdett, gyakran kombinált (általában anti-pseudomonas hatású plusz széles spektrumú) hatóanyagokkal történő terápia megkezdését követően. Ezeknek a ritkán izolálható kórokozóknak az antibiotikumokkal szembeni érzékenységi vizsgálatára és a megfelelő határértékekre – a *S. maltophilia* kivételével – nincs megfelelő protokoll, így a hozzáférhető adatokat nehéz összevetni. Napjainkban azonban egyre több közleményben szerepel már széles spektrumú hatóanyagokkal szemben tapasztalható rezisztenciájuk (pl. 7, 8) továbbá multidrog-rezisztenciájuk, így esetükben is nagy szükség lenne a gyorsan, pl. MALDI-TOF MS készülékkel kivitelezhető rezisztencia vizsgálatok kidolgozására.

Rövidítések

ADH = arginin-dihidroláz; CDC = Centers for Disease Control and Prevention (USA); CF = cysticus fibrosis; ESBL = kiterjedt spektrumú β -laktamáz (extended spectrum β -lactamase); LDC = lizin-dekarboxiláz; MALDI-TOF MS = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; ODC = ornitin-dekarboxiláz; ONPG = orto-nitrofenil- β -D-galaktozidáz; PCR = polimeráz-láncreakció; PHB = poli- β -hidroxibutirát; TMSX = trimethoprim-sulfamethoxazol

Acidovorax (*Betaproteobacteria* > *Burkholderiales* > *Comamonadaceae*)

A genusba jelenleg 15 faj sorolható, melyek többsége vizekben, talajokban, növények gyökerén található; termelhetnek növekedést serkentő anyagokat vagy akár lehetnek növényi kórokozók. A fajok közül az *A. avenae* (korábban *Pseudomonas avenae* és *P. rubrilineans*), az *A. delafieldii* (korábban *P. delafieldii* illetve CDC EF group 13), az *A. facilis* (korábban *P. facilis*) és az *A. temperans* (korábban CDC EF group 16) különböző klinikai anyagokból (orrgarat-váladék, vér, vizelet, sebek) rutin technikák segítségével izolálhatók. Ezen kívül újabban, az *A. oryzae* és az *A. wautersii* törzseit – szepszis kórokozójaként – vérből izolálták (9, 10). A fajok mozgásképeséggel rendelkező sejtjei, a mikroszkópos vizsgálatok alkalmával, egyenes vagy enyhén hajlott pálcák, magánosan, párokban vagy rövid láncokban, méretük 0,2-0,7 x 1-5 μ m közé esik. Anyagcseréjük szigorúan oxidatív, kataláz- és oxidáz-pozitívak. Eszkulint nem hidrolizálnak. A kórokozó fajok, az *A. wautersii* kivételével nitrátot redukálnak és az *A. temperans* kivételével ureáz pozitívak.

Brevundimonas (*Alphaproteobacteria* > *Caulobacterales* > *Caulobacteraceae*)

A *Brevundimonas* genus 26 fajtát általában vizekből, talajokból lehet kitenyészteni, de egyes fajok; *B. diminuta*, *B. vesicularis* – korábban *Pseudomonas diminuta*, *P. vesicularis* – és *B. vancouveritii*, mint opportunist kórokozók ismertek, melyeket különböző klinikai anyagokból (vér, vizelet, peritonealis, pleurális, cerebrospinalis és synovialis folyadék, tályogok, elfertőzött sebek, fertőzött szájüreg és szem váladéka) izoláltak (11-13). Fertőzést leggyakrabban immunhiányos állapotokban okoznak, de az esetek száma immunkompetencia esetén is egyre növekedik. *Brevundimonas* törzseket kórházi környezeti mintákból (pl. vizes oldatok és különböző biológiai eredetű folyadékok, szövetkultúrák) is kitenyészttettek már. Mikromorfológiai vizsgálatuk alkalmával egyenes és enyhén hajlott, 0,4-0,5 x 1-2 μ m pálcákkal jellemezhetőek (a *B. diminuta* sejtjei – különösen megfelelő tenyésztési eljárás után – olyan kicsiny méretűek, hogy ATCC 19146 jelzésű törzsét membrán-filterek minőségellenőrzéséhez alkalmazzák). A *B. vancouveritii* sárgásfehér, a *B. vesicularis* karotenoid természetű (sárga, narancsszínű vagy rózsaszín) pigmentet termel, a *B. diminuta* nem pigmentált. Kataláz-pozitívak, szigorúan oxidatív anyagcserét folytatnak. Nutrient agaron, 37 °C-on, csak 48 óra után növekednek.

Kevéssé reaktívak, az indol, ureáz, phenilalanin-deamináz, ADH, LDC és ODC tesztek negatív eredményt adnak, általában nitritet sem redukálnak. Eltérések a kórokozó fajok között: a *B. vancanneytii* és *B. vesicularis* galaktózt, glükózt, maltózt és L-szerint hasznosít, a *B. diminuta* ezeket nem bontja, adonitot csak a *B. vancanneytii* képes, az L- aszparagint viszont a *B. vesicularis* nem képes hasznosítani. A ceftazidim és TMSX hatóanyagokkal szembeni rezisztenciát a *B. vesicularis* esetén már észlelték (7).

A ***Burkholderia*** (*Betaproteobacteria* > *Burkholderiales* > *Burkholderiaceae*) genusról és a genuson belül elkülönített – a CF megbetegedésben nagy szerepet játszó – *Burkholderia cepacia* komplexről az elmúlt években olyan nagyszámú és sokrétű (taxonómiai, ökológiai, epidemiológiai, stb.) közlemény jelent meg, hogy ezeket érdemes egy önálló összefoglaló közleményben részletezni a Mikrobiológiai Körlevél következő számában.

Comamonas (*Betaproteobacteria* > *Burkholderiales* > *Comamonadaceae*)

A *Comamonas* genus napjainkig leírt 21 fajának ismert élőhelyei a szennyezett és nem szennyezett talajok, iszapok és vizek, a *C. testosteroni*-t (korábban *P. testosteroni*) szennyvíztisztító berendezés eleven iszapjából is izolálták. Opportunista kórokozó a *C. kerstersii* és a *C. testosteroni* (14, 15), melyeket kórházi környezetből (intravénás szerelék, vizeletes katéter, párologtató) és különböző klinikai mintákból (pl. vér, genny, vizelet, cerebrospinális és peritoneális folyadék, szemváladék, perforált vakbél) tenyésztettek ki, de endocarditist és újszülöttkori fertőzéseket is okozhatnak. A perforált vakbél egyébként hajlamosító tényező lehet a *Comamonas* fajokkal történő fertőzésekre. Mikromorfológiája: egyenes és enyhén hajlott, 0,3-0,8 x 1,1-4,4 µm mozgó pálcák, magánosan vagy párokban. Kataláz- és oxidáz-pozitívak, kemoorganotrófok. A törzsekre szigorúan oxidatív anyagcsere jellemző. Bár a *C. testosteroni* képes lebontani a poliaromás heterociklusos szénhidrátokat, a két kórokozó faj viszonylag kevés szénhidrátot értékesít. Az indol, ureáz, ADH, LDC és ODC tesztek negatív eredményt adnak, nitrátot viszont redukálnak. Jól megkülönböztethetők az alapján, hogy a *C. testosteroni* az L-alanin és tesztoszteron vegyületeket hasznosítja, míg a *C. kerstersii* nem, továbbá az utóbbi faj 42-44 °C-on növekedik, míg a *C. testosteroni* csak 40 °C alatt.

Cupriavidus (*Betaproteobacteria* > *Burkholderiales* > *Burkholderiaceae*)

A genus 17 fajt tartalmaz, a *C. oxalaticus*-t korábban *P. oxalaticus*-ként tartották számon, később több genusba (*Ralstonia*, *Wautersia*) is besorolták, ahogy más *Cupriavidus* fajokat is. Közülük opportunistá kórokozók a *C. basiliensis*, *C. gilardii*, *C. metallidurans*, *C. pauculus* (korábban CDC group IV c-2), *C. respiraculi* és *C. taiwanensis*, melyeket – egyéb megbetegedéseken túlmenően – a CF betegek gyakran végzetes kimenetelű légúti fertőzésének kórokozójaként is rendszeresen izolálnak (16, 17). Új kutatási eredmény, hogy amíg az egészséges

emberek alsó légúti traktusában a *Streptococcus*-ok dominálnak, a tüdőtuberkulózisban szenvedő betegek esetén itt *Cupriavidus* fajok dominanciája tapasztalható, melyek így a másodlagos fertőzésekért felelősek (18). A természetben a *Cupriavidus* fajok a növények gyökerén élő N₂-fixáló szimbionták. Mivel rezisztensek a nehézfémekre és nagy szerepet játszanak a rekalcitrant anyagok lebontásában is (bár az egyszerű szénvegyületeket, pl. laktóz vagy glükóz, nem hasznosítják), a szennyezett talajok helyreállításában (bioremediáció) kiemelkedő jelentőségük van. Mikroszkópos vizsgálatuk alkalmával a sejtek 0,5-1,0 x 1-5 µm hosszú, peritrich csillózáttal mozgó pálcikák. Általában lassú növekedésűek, a táptalajokon látható kolóniákat esetenként csak 72 óra után képeznek. Kataláz- és oxidáz-pozitívak, nitrátot redukálnak, indol-negatívak. A *Cupriavidus* fajok hagyományos rendszertani azonosítása gyakran ütközik nehézségekbe, leggyakrabban a *B. cepacia* komplex képviselőivel téveszthetőek össze. A fertőzések terápiás kezelésénél érdemes figyelembe venni, hogy a szakirodalom már beszámolt aminoglikozidokkal és carbapenemekkel szemben rezisztens *Cupriavidus* törzsekről (17).

***Delftia* (Betaproteobacteria > Burkholderiales > Comamonadaceae)**

A genusba jelenleg 5 faj sorolható, melyek talajból, felszíni vizekből és szennyvizekből, azok üledékéből, szennyvíztisztító berendezés eleveniszapjából, nyersolajból izolálhatók. A *D. acidovorans* (korábban *Pseudomonas acidovorans*, majd *Comamonas acidovorans*), *D. lacustris* és *D. tsuruhatensis* fajok esetén egyre nő azoknak a közleményeknek a száma, melyben ezeket opportunistá kórokozókként írják le (19, 20). Okozhatnak többek között véráramfertőzést, endocarditist, keratitist, peritonitist, húgyúti és szemfertőzéseket, immunhiányos állapotok esetén pedig nosocomiális fertőzéseket. A humán kórokozó fajok egyébként a természetben nemcsak a toxikus vegyületek lebontására képesek, hanem serkentik a növények növekedését és peptidoglikán-bontó képességük révén a növények kórokozó baktériumait is gátolják (21). Az egyesével vagy párokban álló sejtek a mikroszkópos kenetben egyenes vagy hajlott pálcikák, méretük: 0,4-1,2 x 2,5-4 µm, de alkalmanként 7 µm hosszúak is lehetnek. PHB-t akkumulálnak. Mozgásképességgel rendelkeznek, kataláz- és oxidáz-teszt pozitív. Nitrátot redukálnak. Ureáz, indol és ADH teszt negatív. A *Delftia* genusba tartozó fajok törzsei aminoglikozidokkal szemben rezisztenciát mutatnak (19, 20).

***Herbaspirillum* (Betaproteobacteria > Burkholderiales > Oxalobacteraceae)**

A taxonómiai revíziót megelőzően két faj is a *Pseudomonas* genusba tartozott: *H. huttiense* ssp. *huttiense* (korábban *P. huttiensis*) és *H. rubrisubalbicans* (korábban *P. rubrisubalbicans*). A genusnak ma 11 faja ismert, főleg fűfélék gyökerében, szárában és levelében endofita életmódot folytatnak. Humán kórokozóként a *H. huttiense* ssp. *huttiense*, továbbá a *H. frisingense* és *H. seropedicae* fajokat CF esetén azonosították, de előfordulhatnak más betegek vér- és köpetmintáinak

egyéb kórokozókat is tartalmazó vegyes tenyészetében, továbbá immunhiányos állapotokban krónikus, évekig fennálló fertőzéseket is okozhatnak (4). A humán opportunisták kórokozó fajok ugyanakkor a növényekkel is szoros kölcsönhatásban állnak, nemcsak nitrogén-fixációjuk, hanem növényi hormonok termelése miatt is (22). Az általában 0,6-0,7 μm átmérőjű, mozgó sejtek vibroid, esetenként spirilloid alakúak, hosszúságuk 1,5-5,0 μm lehet. A humán patogén fajok esetén az ureáz, kataláz, oxidáz és ADH tesztek pozitívak, az indol, LDC, ODC tesztek negatívak. Nitrátból gázt nem képeznek. A *H. frisingense* és *H. seropedicae* nitrátot nitritté redukál, a *H. huttiense* alfajai viszont erre nem képesek. A humán kórokozó törzsek szénforrás értékesítési spektruma sokkal tágabb a környezeti izolátumokhoz képest, de fajon belül ez igen változékony. A *Burkholderia* fajokkal való szoros filogenetikai rokonságuknak és fenotípusos hasonlóságuknak köszönhetően azokkal könnyen összetéveszthetők.

Methylobacterium (*Alphaproteobacteria* > *Rhizobiales* > *Methylobacteriaceae*)

A genus 50 faja közül a *Pseudomonas* genusba tartoztak: *M. mesophilicum* (korábban *P. mesophilica*), *M. radiotolerans* (korábban *P. radora*), *M. rhodinum* (korábban *P. rhodos*). A genus képviselői ubiquiter fajok; talajokban, vizekben, levegőben, növények felületén mindenütt megtalálhatók. Klinikai környezetből eddig izolált és opportunisták kórokozóként leírt fajok: *M. aminovorans*, *M. extorquens* (korábban *Protomonas extorquens*), *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. oryzae*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum* (korábban *M. lusitanum*), *M. thiocyanatum*, *M. zatmanii*. A fajokat leggyakrabban vérből izolálják, a fertőzés forrása legtöbbször intravénás katéter, mivel ezek a baktériumok biofilm képzésére képesek és több fertőtlenítőszerrel (pl. 2%-os glutáraldehid) illetve a kiszáradással szemben igen ellenállóak (23, 24). A mikroszkópos vizsgálatok alkalmával a nagyméretű (0,8-1,2 x 1,0-8,0 μm), pleomorf pálcákban vakuolumokat és PHB felhalmozódást figyelhetünk meg. Gram-negatívak, de a festődési folyamat során a szintelenítési lépésnek ellenállnak, így Gram-variabilisak is lehetnek. Mozgásképességgel rendelkeznek. A fajok korál vagy rózsaszínű, karotinoid pigmenteket termelnek, a telepek UV abszorpciót mutatnak. MacConkey agaron általában nem nőnek, más táptalajokon a lassan növekedő kolóniák szárazak. A metanolt oxidatív körülmények között savképzéssel, fakultatív módon hasznosítják. Ez a tulajdonság és az UV-abszorpció jól elkülöníti a *Methylobacterium* fajokat az egyéb, nem fermentáló és rózsaszín pigmentációt mutató genusok (pl. *Roseomonas*) képviselőitől, ennek ellenére az izolátumok száma alábecsült lehet.

Pandoraea (*Betaproteobacteria* > *Burkholderiales* > *Burkholderiaceae*)

A genus leírását csak 2000-ben javasolták Coenye és mtsai (25), mégpedig olyan baktériumok összehasonlító vizsgálatának eredményei alapján, melyek előbb az rRNS II-es csoportba tartoztak, majd utána a *Burkholderia* illetve a *Ralstonia* genusba. Ezekről a genusoktól való elkülönítésük – molekuláris módszerek

nélkül – alig lehetséges. A genus 9 fajja közül 5 oportunista kórokozó: *P. apista*, *P. norimbergensis*, *P. pnomenusa*, *P. pulmonicola*, *P. sputorum*. Ezeket különböző klinikai mintákból (köpet, vér, felső légutak, tüdőszövet, vizelet, sebek) főleg CF betegek esetén izolálták, de környezeti mintákban (talaj, iszap, víz) is elterjedtek. Invazív potenciáljuk több esetben is kimutatható, emberről emberre való terjedésük miatt pedig a velük fertőződött betegeket célszerű elkülöníteni a többi betegtől (26). Mikromorfológiája: a 0,5-0,7 x 1,5-4,0 µm méretű pálcák egy poláris csillóval mozognak. A törzsek jól növekednek *Burkholderia cepacia* szelektív táptalajon. A kataláz pozitív, az indol, ADH, LDC, ODC teszt negatív. A kórokozó fajok közül oxidáz-pozitív a *P. norimbergensis* és *P. pulmonicola*, ureáz-pozitív a *P. apista* és *P. pnomenusa* (a *P. pulmonicola* ureáz-negatív), de az ebben a felsorolásban nem említett fajok – az oxidáz-, ureáz- és más tesztek esetén is – a taxonon belül változó eredményeket adnak. A CF betegek terápiája kapcsán súlyos gondot jelent a *Pandoraea* fajok izolátumainak gyakran tapasztalt multidrog-rezisztenciája.

Ralstonia (*Betaproteobacteria* > *Burkholderiales* > *Burkholderiaceae*)

A genus három képviselője (*Ralstonia pickettii*, *R. solanacearum*, *R. syzigii*) korábban a *Pseudomonas* genusba tartozott. Ma hat faj sorolható a genusba (kilenc korábban idetartozó faj a *Cupriavidus* genusba került), ezek közül humán patogén a *R. insidiosa* és *R. mannitolilytica* (korábban még *R. pickettii* biovar 3/‘*thomasi*’), de a fertőzések túlnyomó többségéért a *R. pickettii* a felelős. A fajok izolálhatók felszíni és ivóvizekből, talajokból, növényekből illetve azok felszínéről, ezen túlmenően az egészséges emberek szájürege és felső légúti traktusa kommenzalista baktériumflórájának képviselői. Immunszuppresszív állapotban lévő és CF betegek esetén főleg légúti fertőzéseket okoznak, de a szepszis is gyakori, továbbá súlyos megbetegedések (pl. osteomyelitis, meningitis) is előfordulhatnak (27). Oligotrófok, vagyis képesek tápanyagszegény környezetben szaporodni, nehézfémekkel és számos fertőtlenítőszerrel (pl. chlorhexidin) szemben ellenállóak, továbbá biofilmet képezhetnek; így a kórházak intenzív részlegeiben használatos eszközöket és folyadékokat gyakran kolonizálják, ami által nosocomiális járványokat okozhatnak. Mikromorfológiája: 0,5-1,0 x 1-5 µm, egyenes vagy kissé hajlott, mozgásképesseggel rendelkező pálcák. MacConkey agaron elég jól növekednek, véres agaron azonban látható kolóniákat inkább csak 72 óra után képeznek. Oxidáz és kataláz pozitívak, indol és ONPG tesztek negatívak. Említésre méltó, hogy egyes *Ralstonia* törzsek ESBL-termelők, továbbá rezisztensek lehetnek carbapenemekkel és aminoglikozidokkal szemben is.

Shewanella (*Gammaproteobacteria* > *Alteromonadales* > *Shewanellaceae*)

Napjainkban már 64 fajuk ismert, melyek vizekben (főleg tengervízben) széles körben elterjedt, szaprofita, ubiquiter baktériumok. Talajokból, iszapokból is izolálhatók, továbbá előfordulhatnak (főleg tengeri eredetű) élelmiszerekben

(halakból izoláltak már a súlyos mérgezést okozó tetrodoxin termelésére képes szimbióta *Shewanella* törzseket is). A *S. algae* és a *S. putrefaciens* (korábban *Pseudomonas*, majd *Alteromonas putrefaciens*) kórokozókként széles klinikai spektrumot mutató, esetenként fatális kimenetelű fertőzéseket idézhetnek elő (28). A legújabb közlemények szerint a már ismert, főleg bőr- és légúti fertőzések száma folyamatosan emelkedik (29), eddig nem észlelt megbetegedések is jelentkeznek, továbbá a fentieken kívül más fajok (pl. *S. haliotis*, *S. xiamenensis*) is felkerültek a kórokozó *Shewanella* fajok listájára. A fertőzések főleg tengerpart környezetében fordulnak elő a trópusokon illetve a mérsékelt égövön a nyári hónapokban, így az utazók esetén egyre gyakoribbá válnak. A talajokban élő *Shewanella* fajok kígyómarás alkalmával is már több esetben okoztak fertőzést. A pleomorf pálcák 0,5-0,8 x 0,7-2,0 µm méretűek, mozgásképesekkel rendelkeznek. A telepek jellegzetessége a véres vagy az ún. „tengeri” agaron a halvány barna, narancsos rózsaszínű vagy lazacszínű pigmentáció. Kataláz-, oxidáz- és ODC-teszt pozitívak, kénhidrogént termelnek, nitrátot redukálnak. Indol- és ureáz-képzés negatív. Bár a kórokozó törzsek között pl. a β-hemolízis és a 42 °C-on tapasztalható növekedés alapján lehet különbséget tenni (az *S. algae* és a *S. haliotis* esetén ezek pozitívak), ez alapján a rendszertani azonosítás nem elég pontos. A félautomata azonosító rendszerek adatbázisában csak a *S. putrefaciens* szerepel, így a többi kórokozó *Shewanella* faj előfordulása alulbecsült lehet. A *Shewanella* fajok klinikai izolátumai rezisztensek lehetnek imipenemmel és meropenemmel szemben, de esetenként multidrog-rezisztens törzseik is előfordulnak (29).

Sphingomonas

(*Alphaproteobacteria* > *Sphingomonadales* > *Sphingomonadaceae*)

Az 1990-ben leírt genus két képviselője, köztük a *S. paucimobilis*, korábban a *Pseudomonas* genusba tartozott. A genus 2001-ben 4 önálló genusra választották szét, ezek közül a *Sphingomonas* ma már több mint 80 fajjal rendelkezik. Ezek vízből és talajból izolálhatók, számos makromolekula szintézisére és lebontására képesek, ezért biotechnológiai alkalmazásuk széleskörű. Tápanyagszegény környezetben is képesek szaporodni, vízben a klórozást túlélnek és biofilm képzésére képesek, így a kórházi környezetben könnyen okozhatnak fertőzést. A *S. paucimobilis* (korábban *P. paucimobilis* illetve *Flavobacterium devorans*) közismert opportunist kórokozó, amely egyaránt okozhat nosocomialis és közösségi eredetű fertőzéseket (30). A megbetegedések között főleg véráramfertőzés fordul elő, ritkábban peritonitis, osteomyelitis, endophthalmitis. Az utóbbi időben két korábban szaprofitaként ismert faj – *S. koreensis* és *S. mucosissima* – meningitist, peritonitist illetve véráramfertőzést okozott. A *Sphingomonas* fajok 0,3-0,8 x 1,0-1,9 µm méretű pálcákkal rendelkeznek, mozgásképeségük gyenge. A törzsek mély-sárga színű endopigmentet képeznek, emiatt könnyen összetéveszthetőek a flavobaktériumokkal. Az oxidáz és a nitrát-redukció általában pozitív, de oxidáz-

negatív törzseket is izoláltak és a *S. mucosissima* nitrátot nem redukál. A kataláz-reakció mindig pozitív, az ADH, indol és ureáz tesztek pedig negatívak. A sejtek külső membránján glikoszfinbolipidek találhatóak, innen a Gram-negatív baktériumokra jellemző lipopoliszacharid réteg hiányzik. Ennek tulajdonítják viszonylag alacsony kórokozó képességüket, bár nem ritka a fatális kimenetelű *Sphingomonas* fertőzés. Virulencia-faktoraik között kiemelhető a biofilm képzés, amely felelős pl. a tápanyagban szegény vizekben történő hosszabb túlélésükért (31). A *Sphingomonas* fertőzéseket bemutató eseteírások alapján elmondható, hogy az izolált törzsek aminoglikozidokkal, carbapenemekkel, fluorokinolonokkal, harmadik generációs cephalosporinokkal szemben mutathatnak rezisztenciát és multidrog-rezisztens törzseik is előfordulnak.

Stenotrophomonas

(*Gammaproteobacteria* > *Xanthomonadales* > *Xanthomonadaceae*)

A genusba 12 faj sorolható, közülük egyedül a *S. maltophilia* (korábban *Pseudomonas beteli*, *P. hibiscicola*, *P. maltophilia*, továbbá *Xanthomonas maltophilia* illetve *S. africana*) opportunista humán kórokozó. A genus valamennyi képviselőjének élőhelye (felszíni vizek, talaj- és szennyvizek, talaj, komposzt, hulladék, növények felszíne és gyökérkörlete, állatok) és ott kifejtett aktivitásuk egyaránt különleges és igen széles skálán mozog; pl. elősegítik a növények csírázását és növekedését, gátolnak számos, főleg eukarióta növényi kórokozót, extracelluláris enzimeket termelnek, stb. (32). Ezek ismeretében, a legaktívabbnak bizonyuló ubiquiter és kozmopolita *S. maltophilia* törzseinek felhasználásával, a szennyezett talajok és a növényi populáció helyreállítása (bioremediáció és fitoremediáció) és a nehezen lebontható szerves anyagok eltávolítása terén több eljárást is kidolgoztak (33). Az 1980-as évek elejétől azonban egyre több közlemény számolt be arról, hogy a *S. maltophilia* – különösen immunhiányos állapotok (rosszindulatú megbetegedések, szervátültetések, HIV-fertőzés, CF, hosszas kórházi és intenzív őrzőben történő ellátás, mesterséges légzés, hosszú ideig alkalmazott katéterek, különböző okok miatt szükséges kortikoszteroid vagy immunszuppresszív anyagokkal illetve antibiotikummal történő terápia) esetén – klinikai megbetegedéseket okozhat. Leggyakoribb a légzőszervi fertőzés, a véráramfertőzés, ritkább a bőr- és lágyrészi, csont- és ízületi, epe- és húgyúti fertőzés, az endophthalmitis, endocarditis és meningitis. Gyakorivá váltak azok a pl. a dializáló szerelékek, kontaktlencse ápoló szerek, hűtésre szolgáló jég készítéséhez alkalmazott berendezések, aeroszol-készülékek, inhalációs terápiára szolgáló készülékek használata kapcsán észlelt nosocomiális fertőzések is, melyeknek kóroktani hátterét felderítve, ennek a baktériumnak a szerepét igazolták. Az izolátumok egyébként származhatnak testfelszínek kolonizációjából is. A nosocomiális fertőzéseken kívül számos közösségi eredetű fertőzést is leírtak, ezek azonban általában ugyancsak immunhiányos állapotokban következtek be. Az esetek számához viszonyítva a halálozási ráta rohamosan emelkedik, amely kapcsolatos

a *S. maltophilia* multidrog-rezisztenciájával (34). Napjainkban a klinikai mintákból származó, glükózt nem fermentáló baktériumok között az *S. maltophilia* az „előkelő” harmadik helyet foglalta el, a *P. aeruginosa* és az *Acinetobacter baumannii* után (35).

A *S. maltophilia* sejtek a mikroszkópos kenetben viszonylag kicsi, 0,4-0,7 x 0,7-1,8 μm méretűek, egyesével vagy magánosan figyelhetők meg. PHB-t nem akkumulálnak, poláris flagellumokkal mozognak. A kolóniák sárgák vagy halványzöldek, később barna színűek lehetnek. Véres agaron a kolóniák ammónia szagúak és gyenge β -hemolízis tapasztalható. Az oxidáz általában negatív, csak a törzsek ötödénél tapasztalható esetleg lassú oxidáz-pozitivitás. Ez utóbbi és makromorfológiai tulajdonságai a *P. aeruginosa*-tól jól elkülönítheti. A laktózt hasznosítja a növekedéséhez; ez a tulajdonság is nagyon ritka a *Pseudomonas*-ok esetén. Obligát aerob, de a nitrátot – oxigén hiányában – mint terminális elektronakceptort hasznosítja (denitrifikáció nem fordul elő). Indol, ureáz és keményítő hidrolízise negatív. A kataláz teszt pozitív, erős lipolitikus aktivitása van, a DN-áz és zselatináz tesztek pozitívak. Kiemelhető még, hogy komplex táptalajon, aerob körülmények között savat képez maltózból, de glükózból nem. A hagyományos táptalajokkal szemben a *S. maltophilia* törzsek izolálásának az arányát az ún. Steno medium agaron történő kitenyésztés nagymértékben megnöveli (36). Bár fenotipusos jellemzői alapján elég jól felismerhető és a félautomata identifikáló rendszerek adatbázisában is szerepel, az összehasonlító vizsgálatok elvégzéséhez gyakran alkalmaznak molekuláris módszereket. A vizsgálandó törzsek előzetes azonosítása általában a hagyományos módszerekkel történik, mivel a többi nem fermentáló Gram-negatív baktériumtól való gyors elkülönítés fontos; a *Pseudomonas*-ok ellen hatékony antibiotikumok alkalmazása ugyanis jelentős kockázati tényező a fertőzések kezelése terén (37).

A *S. maltophilia* nagyszámú virulencia-faktora és ezek genetikai háttere napjainkban egyre inkább előtérbe kerül (38). Ezek közül itt most csak a biofilm-képzés képessége szerepel, amely nemcsak a nosocomiális fertőzések szempontjából jelentős (39), hanem az ún. biofilm-fertőzések kialakulását és kezelését is nagymértékben befolyásolja (40). A biofilmet képező sejtek elektronmikroszkópos vizsgálata alkalmával kb. 40-50 nm széles flagellum-szerű filamentumok és vékony, 5-7 nm széles fibrilláris struktúrák láthatóak a sejtek között illetve a különböző természetű biotikus (pl. epiteliális sejtek a növények rizoszférájában vagy a humán légutakban) és abiotikus (pl. üveg, műanyag) kolonizált felületekhez kapcsolódva (34). A *S. maltophilia* nagymértékű virulenciája összefügg azzal, hogy bármilyen felülethez igen gyorsan és jól kötődik, továbbá extracelluláris polimer anyagokat termel, amelybe a sejtek beágyazódnak. A biofilmben található baktériumok jelentős mértékben nagyobb antibiotikum-rezisztenciát mutathatnak, mint a „planktonikus” kórokozók. Éppen ezért szükség van olyan standardizált biofilm érzékenységi tesztek kidolgozására, amelyek e speciális esetben pontosabb információkat szolgáltatnak az antibiotikumok alkalmazását illetően (41).

A *S. maltophilia* által okozott fertőzések antibiotikum terápiaja terén jelent meg talán a legtöbb közlemény az utóbbi években. A klinikai és a környezeti izolátumok összehasonlító vizsgálata igazolta, hogy multirezisztenciájuk számos esetben intrinsic természetű és nem a klinikai antibiotikum használat következtében alakult ki (38, 42). A *S. maltophilia* törzsek, többek között, rezisztensek a β -laktám antibiotikumokkal, a harmadik generációs cephalosporinokkal, az aminoglikozidokkal és a carbapenemekkel szemben (az intrinsic imipenem-rezisztencia régóta ismert és a *S. maltophilia* izolátumok elkülönítése terén diagnosztikus bélyegként is alkalmazták). A *S. maltophilia* törzsek ellen leghatékonyabbak a fluorokinolonok és a TMSX (43). Ugyanakkor a terápiás lehetőségek első vonalába tartozó antibiotikumokkal szembeni rezisztencia világszerte növekedik, a TMSX esetén pl. ez a legnagyobb mértékű az ázsiai országokban. Mivel geográfiai szempontból eltérő lehet a különböző hatóanyagokkal szembeni rezisztencia, érdemes kiemelni, hogy magyar szerzők szerint érdemes különböző hatóanyagok (ceftazidim/colistin és fluorokinolonok) *in vitro* szinergista hatását vizsgálni, ami alapján esetleg kombinációs terápiás eljárást lehet adni (44). A gyors rezisztencia kialakulása miatt – különösen immunhiányos állapotú betegek esetén – a monoterápia egyébként sem megfelelő. Wei és mtsai szerint a *S. maltophilia* fertőzések kezelésének terén a TMSX és a minocyclin a terápiás hatóanyagok első vonalába tartozó antibiotikumok, míg a második vonalba a tigecyclin, moxifloxacin, levofloxacin és ticarcillin-clavulansav hatóanyagok tartoznak (45). Time-kill metodikát alkalmazó vizsgálataik alapján a súlyos esetek kezelésére a TMSX és moxifloxacin illetve a minocyclin és moxifloxacin együttes alkalmazását ajánlják.

Megjegyzés

Bár ezeknek a genusoknak a képviselői viszonylag ritkán izolálhatók, a klinikai eseteket számtalan közlemény ismerteti. Ezek közül az irodalomjegyzékben csak azok szerepelnek, amelyeket nemrég közöltek és/vagy a legtöbb információt tartalmazzák, továbbá elérhetők az interneten. Az irodalomjegyzék kézikönyveket sem tartalmaz, mivel ezekben a fenti genusokról kevés az információ, továbbá rendszertani szempontból sem aktuálisak.

Irodalom

1. Peix A, Ramirez-Bahena M-H, Velázquez E: Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Inf Gen Evol* 2009, 9: 1132-47.
2. Almuzara M, Barberis C, Traglia G et al.: Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for species identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli. *Journal of Microbiological Methods* 2015, 112: 24-7.

3. Boutin S, Graeber SY, Weitnauer M et al.: Comparison of microbiomes from different niches of upper and lower airways in children and adolescents with cystic fibrosis. PLoS ONE 2015, 10(1): e0116029. doi: 10.1371/journal.pone.0116029.
4. Marques ACQ, Paludo KS, Dallagassa CB et al.: Biochemical characteristics, adhesion, and cytotoxicity of environmental and clinical isolates of *Herbaspirillum* spp. J Clin Microbiol 2015, 53: 302-8.
5. Tian Y, Zheng B, Wang B et al.: Rapid identification and multiple susceptibility testing of pathogens from positive-culture sterile body fluids by a combined MALDI-TOF mass spectrometry and Vitek susceptibility system. Front Microbiol 2016, 7:523. doi: 10.3389/fmicb.2016.00523.
6. Nagy E, Ábrók M, Bartha N et al.: Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén. Orvosi Hetilap 2014, 155: 1495-1503.
7. Zhang C-C, Hsu H-J, Li C-M: *Brevundimonas vesicularis* bacteremia resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime in a tertiary hospital in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Inf 2012, 45: 448-52.
8. Chawla K, Vishwanath S, Munim FC: Nonfermenting Gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. causing respiratory tract infections in a tertiary care center. J Glob Infect Dis 2013, 5: 144-8.
9. Osborne C, Hardy A, Isalska B et al.: *Acidovorax oryzae* catheter-associated bloodstream infection. J Clin Microbiol 2014, 52: 4421-4.
10. Vaneechoutte M, Janssens M, Avesani V et al.: Description of *Acidovorax wautersii* sp. nov. to accommodate clinical isolates and an environmental isolate, most closely related to *Acidovorax avenae*. Int J Syst Evol Microbiol 2013, 63: 2203-6.
11. Shang S-T, Chiu S-K, Chan M-C et al.: Invasive *Brevundimonas vesicularis* bacteremia: two case reports and review of the literature. J Microbiol Immunol Inf 2012, 45: 468-72.
12. Estrela AB, Abraham W-R: *Brevundimonas vancouverensis* sp. nov., isolated from blood of a patient with endocarditis. Int J Syst Evol Microbiol 2010, 60: 2129-34.
13. Lu B, Shi Y, Zhu F et al.: Pleuritis due to *Brevundimonas diminuta* in a previously healthy man. J Med Microbiol 2013, 62: 479-82.
14. Biswas JS, Fitchett J, O'Hara G: *Comamonas kerstersii* and the perforated appendix. J Clin Microbiol 2014, 52: 3134.
15. Parolin M, Baraldi M, Valentini E et al.: *Comamonas testosteroni*-associated peritonitis in a pediatric peritoneal dialysis patient. World J Nephrol 2016, 5: 220-3.
16. Marchandin H, Michon A-L, Jumas-Bilak E: Atypical bacteria in the CF airways: diversity, clinical consequences, emergence and adaptation. pp. 225-

251. In: Cystic fibrosis – Renewed hopes through research. Sriramulu D (Ed.) InTech Europe, Rijeka, 2012.
17. D’Inzeo T, Santangelo R, Fiori B et al.: Catheter-related bacteremia by *Cupriavidus metallidurans*. *Diagn Microbiol Inf Dis* 2015, 81: 9-12.
 18. Zhou Y, Lin F, Cui Z et al.: Correlation between either *Cupriavidus* or *Porphyromonas* and primary pulmonary tuberculosis found by analysing the microbiota in patients’ bronchoalveolar lavage fluid. *PLoS ONE* 2015, 10(5): e0124194. doi: 10.1371/journal.pone.0124194.
 19. Bilgin H, Sarmis A, Tigen E et al.: *Delftia acidovorans*: a rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Can J Inf Dis Med Microbiol* 2015, 26: 277-9.
 20. Sohn KM, Baek JY: *Delftia lacustris* septicemia in apheochromocytoma patient: case report and literature review. *Inf Dis (Lond)* 2015, 47: 349-53.
 21. Morel MA, Iriarte A, Jara E et al.: Revealing the biotechnological potential of *Delftia* sp. JD2 by a genomic approach. *AIMS Bioeng* 2016, 3: 156-175.
 22. Straub D, Rothballer M, Hartmann A et al.: The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. *Front Microbiol* 2013, 4: 168. doi: 10.3389/fmicb.2013.00168.
 23. Yano T, Kubota H, Hanai J et al.: Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathroom. *Microbes Environ* 2013, 28: 87-95.
 24. Choudhury MA, Marsh N, Banu S et al.: Molecular comparison of bacterial communities on peripheral intravenous catheters and matched skin swabs. *PLoS ONE* 2016, 11 (1): e0146354. doi: 10.1371/journal.pone.0146354.
 25. Coenye T, Falsen E, Hoste B et al.: Description of *Pandoraea* gen nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp, nov. *Pandoraea pnomenus* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000, 50: 887-99.
 26. Degand N, Lotte R, Decondé Le Butor C et al.: Epidemic spread of *Pandoraea pulmonicola* in a cystic fibrosis center. *BMC Inf Dis* 2015, 15: 583. doi: 10.1186/s12879-015-1327-8.
 27. Ryan MP, Adley CC: *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 2014, 33: 291-304.
 28. Vignier N, Barreau M, Olive C et al.: Human infection with *Shewanella putrefaciens* and *S. algae*: report of 16 cases in Martinique and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg* 2013, 89: 151-6.
 29. Jampala S, Meera P, Vivek V et al.: Skin and soft tissue infections due to *Shewanella algae* – An emerging pathogen. *J Clin Diagn Res* 2015, 9: DC16-DC20.
 30. Bayram N, Devrim I, Apa H et al.: *Sphingomonas paucimobilis* infections in children: 24 case reports. *Med J Hematol Inf Dis* 2013, 5: e2013040, doi: 10.4084/MJHID.2013.040.

31. Gusman V, Medic D, Jelesic Z et al.: *Sphingomonas paucimobilis* as a biofilm producer. Arch Biol Sci Belgrade 2012, 64: 1327-31.
32. Berg G, Martinez JL: Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? Front Microbiol 2015, 6: 241. doi: 10.3389/fmicb.2015.00241.
33. Mukherjee P, Roy P: Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. Front. Microbiol 2016, 7: 967. doi: 10.3389/fmicb.2016.00967.
34. Brooke JS: *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev 2012, 25: 2-41.
35. Chang Y-T, Lin C-Y, Chen Y-H et al.: Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. Front Microbiol 2015, 6:893. doi: 10.3389/fmicb.2015.00893.
36. Goncalves-Vidigal P, Grosse-Onnebrink J, Mellies U et al.: *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: improved detection by the use of selective agar and evaluation of antimicrobial resistance. J Cystic Fibrosis 2011, 10: 422-7.
37. Hotta G, Matsumura Y, Kato K et al.: Risk factors and outcomes of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia: a comparison with bacteraemia caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. PLoS ONE 2014, 9 (11): e112208. doi: 10.1371/journal.pone.0112208.
38. Alavi P, Starcher MR, Thallinger GG et al.: *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. BMC Genomics 2014, 15:482. doi: 10.1186/1471-2164-15-482.
39. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ et al.: ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. Clin Microbiol Inf 2014, 20 (Suppl. 1): 1-55.
40. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C. et al.: ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. Clin Microbiol Inf 2015, 21 (Suppl. 1): 1-25.
41. Wang A, Wang Q, Kudinha T et al.: Effects of fluoroquinolones and azithromycin on biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia*. Sci Rep 2016, 6: 29701. doi: 10.1038/srep29701.
42. Youenou B, Favre-Bonté S, Bodilis J et al.: Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles. Genome Biol Evol 2015, 7: 2484-505. doi: 10.1093/gbe/evv161.
43. Juhász E, Krizsán G, Lengyel G et al.: Infection and colonization by *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial susceptibility and clinical

- background of strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014, 13: 333. doi: 10.0086/s12941-014-0058-9.
44. Juhász E, Pongrácz J, Iván M et al.: Antibiotic susceptibility of sulfamethoxazole-trimethoprim resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2015, 62: 295-305.
45. Wei C, Ni W, Cai X et al.: Evaluation of trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), minocycline, tigecycline, moxifloxacin, and ceftazidime alone and in combinations for SXT-susceptible and SXT-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* by in vitro time-kill experiments. *PLoS ONE* 2016, 11(3): e0152132. doi: 10.1371/journal.pone.0152132.

Az új-generációs szekvenálás jelentősége a virológiában

Áy Éva (1. és 3. pont), Várkonyi Andrea (1. pont), Kis Zoltán (2. pont), Hettmann Andrea (4. pont), Nagy Anna (5. pont)
Országos Epidemiológiai Központ

Rövidítésjegyzék

EBV	Epstein-Barr vírus
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (Európai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ)
HCV	hepatitis C vírus
HIV	humán immundeficiencia vírus
HPV	humán papillomavírus
NGS	Next-Generation Sequencing (új-generációs szekvenálás)
NIH	National Institutes of Health
RAV	rezisztencia asszociált variánsok
SMRT	single molecule real time
WGS	Whole Genome Sequencing (teljes genom szekvenálás)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
WNV	West-Nile vírus

Bevezetés

A vírusok Földünk legnagyobb számban előforduló organizmusai. Jelen vannak az élővilág legkülönbözőbb rendszereiben, ökoszisztémáiban, a tengeri algáktól kezdve a talajon át a növényi, állati, emberi szervezetig. Metagenomikai vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy bioszféraünk domináns organizmusai a vírusok. Mélyszekvenálási technika alkalmazásával kimutatták, hogy a tengervízben milliliterenként 10^6 - 10^9 vírusrészecske található. Rendkívül érdekes, hogy az ezekből a kísérletekből származó readok körülbelül 90%-ban olyan fehérjéket kódolnak, amelyeket eddig más szervezetekben nem azonosítottak (Kristensen et al., 2010; Mizuno et al., 2013). Ez a tény is mutatja, mennyire ismeretlen még számunkra a vírusok diverzitása. A víruskutatás legfontosabb területe az általuk okozott betegségek vizsgálata, hiszen ezen betegségek óriási száma a közegészségügyi következményei mellett az országok gazdasági életére is súlyos hatással lehetnek. A fertőző betegségek okozta halálozások száma évente 15 millióra tehető, a halálesetek kétharmada körülbelül 20 faj (főként vírusok és baktériumok) kóroki következménye (Dye, 2014; Dye et al., 2013).

A korai szekvenálások fő célja az organizmusok genomjának feltérképezésében bontakozott ki. Az új-generációs szekvenálási módszerekkel keletkezett nagy mennyiségű adat azonban utat nyitott egyéb eljárások rutinszerű alkalmazásához, mint például a járványok terjedésének vagy a vírusok gazdaszervezeten belül történő diverzitásának vizsgálatához.

1. Az új-generációs szekvenálás klinikai jelentősége

Az NGS (next-generation sequencing) technológiát széles körben alkalmazzák a teljes genom szekvenálások során, új vírusok felfedezésében, genom diverzitás vizsgálatokban, metagenomikában, epigenetikában, génexpressziós vizsgálatokban, járványügyi és klinikai kivizsgálásokban (Kasibhatla et al., 2016; Radford et al., 2012; Houldcroft et al., 2017; Capobianchi et al., 2013; Barzon et al., 2013a). A vírusok gazdán belüli és gazdák közötti változatosságának genetikai elemzésével információt kaphatunk a gyógyszerrezisztens variánsokról, a vírusok genotípusáról, az általuk okozott fertőzés molekuláris epidemiológiájáról, valamint technológiai háttérrel nyújtanak az antivirális gyógykészítmények és vakcinák (ki)fejlesztéséhez.

Egy vakcina tervezése során rengeteg szempontot szükséges figyelembe vennünk: meg kell ismerni a gazda immunrendszerének válaszát az adott kórokozóra, fel kell térképezni a gazda-patogén közötti interakciókat, a virális variánsokat, a patogénnek az immunrendszer előli menekülési mechanizmusait. Az új-generációs szekvenálás lehetőséget nyújt a reverz vakcinológiai stratégiák fejlesztésére és alkalmazására, ilyenkor a patogénekből nyert szekvencia adatok felhasználásával felszíni epitóp predikciókat végeznek, amelyeket később kísérletesen bevizsgálják. Az NGS hatékony eszközként szolgál a gyorsan evolválódó patogének nyomon követésében, amely nélkülözhetetlen például az influenza vírus elleni vakcina évenkénti felülvizsgálatához és újratervezéséhez. Az attenuált virális vakcinák biztonságának ellenőrzésére is használhatunk NGS analízist, egyrészt a virulens mutációk, másrészt a szennyeződések detektálására (Luciani et al., 2012; Victoria et al., 2010).

Klinikai minták vizsgálata esetén szükség lehet a kis mennyiségben jelen lévő célkórokozó feldúsítására. Ez történhet egyrészt targetált PCR amplifikációval vagy specifikus átfedő nukleinsav próbák hibridizációs reakciójával (Houldcroft et al., 2017).

1.1. Teljes genom szekvenálás

Annak ellenére, hogy a virális genomok relatíve kis mérettel rendelkeznek (a cirkovírusok kb. 1,7 kilobázisos genomjától a pandoravírusok kb. 2500 kilobázisos genomjáig), tudományos értékük és klinikai jelentőségük nagy. A teljes genom szekvenálás egyre fontosabb szerepet tölt be az alapkutatóban épp úgy, mint a klinikai alkalmazásban. Az új-generációs szekvenálással meghatározott teljes genom szekvenciák analízise gyorsabb és költséghatékonyabb, mint ha ugyanazon genom több fragmentjét hagyományos, úgy nevezett Sanger féle targetált szekvenálással vizsgáljuk. Ezen kívül többlet információt nyerhetünk a vírus genotípusáról, gazdán belüli és gazdák közötti evolúciójáról, rekombinálódásáról, új, gyógyszerrezisztens variánsokról, az epitópokban történt változásokról, az általuk okozott betegség és a vírus genomja közötti összefüggésekről, vírus-gazda interakciókról.

Teljes genom szekvenálással könnyebben követhetjük nyomon az egyes járványok kitörését, terjedését, átviteli útvonalait (Houldcroft et al., 2017; Barzon et al., 2013a; Radford et al., 2012). A molekuláris filogenetikai analízist széles körűen alkalmazzák a taxonómiában, szisztematikában, valamint a vírusok genotípusának meghatározására (Kasibhatla et al., 2016). Számos illesztés alapú és illesztésmentes genotipizáló programot fejlesztettek ki, amelyek gyakran egy-egy organizmusra specializálódott adatbázisra épülnek (pl.: FluGenome, WNV Typer).

1.2. Targetált szekvenálás a vírusok gyógyszerek elleni rezisztencia profiljának és a gazdaszervezet immunrendszeréhez történő adaptációjának vizsgálatára

A vírusokra jellemző magas evolúciós ráta, rövid generációs idő és bizonyos vírusok esetében (pl. HIV, influenza, HCV) a polimeráz enzim hibajavító mechanizmusának hiánya miatt a gazdaszervezetben úgynevezett „kvázispeciesek”, közeli leszármazási kapcsolatban lévő virális variánsok csoportja lehet jelen egyidejűleg. A fennálló diverzitás egyfajta rezervoárt képez, a megváltozott körülményekhez (mint például gyógyszeres kezelés, immunválasz) alkalmazkodva a kis számban jelen lévő legnagyobb fitnessű variánsok gyorsan dominánssá válhatnak (gyógyszerrezisztencia, illetve „immune escape” mutációkat hordozó variánsok elszaporodása), ezzel elősegítve a vírus adaptációját és fennmaradását a megváltozott környezetben. Ez a szelekció gyakran az alkalmazott antivirális terápia sikertelenségéhez vezet, valamint a számos cirkuláló genotípus okozta antigén sokféleség tehető felelőssé azért, hogy több kórokozó esetében a hatékony vakcina fejlesztési kísérletek kudarcba fulladtak (Capobianchi et al., 2013; Radford et al., 2012).

PCR amplifikációval és Sanger szekvenálással csak azok a variánsok mutathatók ki, amelyek körülbelül 20%-nál nagyobb gyakorisággal vannak jelen a populációban. NGS esetében ez a kimutathatósági határ körülbelül 1%-ra csökkent (Radford et al., 2012; Gibson et al., 2014).

A PCR amplifikációt követő NGS szekvenálás előnye, hogy specifikus eredményt ad, valamint meglehetősen érzékeny módszer, még alacsony vírus kópiával rendelkező mintából kiindulva is jó átszekvenáltságú genomot nyerhetünk. A módszer hátránya, hogy nagy genomérettel rendelkező vírusok esetén a kivitelezés költséges és sok laboratóriumi munkát igényel, primer kapcsolódási problémák miatt a nagy diverzitással rendelkező kórokozók esetén az amplifikáció nehézségekbe ütközhet, valamint az eltérő amplifikációs potenciállal rendelkező variánsok arányai eltolódhatnak (Radford et al., 2012; Houldcroft et al., 2017).

1.3. Virális metagenomika

A metagenomikai megközelítést széles körben alkalmazzák új vírusok felfedezésére, valamint környezeti és klinikai minták mikrobiális diverzitás vizsgálatához. A módszer során közvetlenül a mintából nyerünk ki genetikai információt, nincs szükség sem előzetes izolálásra, tenyésztésre, sem a célszekvencia ismeretére (Radford et al., 2012; Capobianchi et al., 2013; Houldcroft et al., 2017).

Mivel a mintában jelenlévő összes nukleinsav szekvenálása megtörténik, klinikai minták esetén a vizsgálat érzékenységének növelése érdekében szükség lehet a gazdából származó (főként humán eredetű) szennyező nukleinsavak eltávolítására, vagy a vírusok dúsítására filtrációval, ultracentrifugálással vagy nukleinsav próbák hibridizációs reakciójával (lásd a 4. pontot a Hepatitis C vírusnál leírtakat). A célzott víruskimutatások esetében a vírus specifikus readek (az adott szekvenálási technológiával megszakítás nélkül leolvasott, egyedi nukleotid szekvenciák) aránya meglehetősen alacsony a metagenomikai vizsgálatokban, EBV esetén például mindössze 0,008% egészséges felnőttek vérmintáit vizsgálva, Zika vírus esetén dúsítás után is csupán 0,3% (Houldcroft et al., 2017).

Az NGS technológia forradalmasította a metagenomikát, hiszen egyszerre nagy mennyiségű, nagy felbontású genetikai információt vagyunk képesek kinyerni egy mintából költséghatékonyan. Azonban a rengeteg információ egyben nagy kihívást is jelent, mivel egyszerre számos genomot kell összeszerelnünk különféle bioinformatikai módszerekkel. Általában két fő módszert alkalmaznak a metagenomikai minták karakterizálására: a szekvencia-hasonlóságot és a szekvencia-összetételt. Az illesztés nélküli szekvencia-összetétel alapú módszerrel jobb eredményt érhetünk el a virális minták osztályozásában, mint a szekvencia-hasonlóság alapú módszerrel, ami a readek legfeljebb 30%-át képes osztályozni (Kasibhatla et al., 2016).

Új betegségek megjelenése esetén a háttérben álló kórokozók azonosítása és feltérképezése elengedhetetlen a megfelelő diagnosztikai és terápiás eljárások kifejlesztéséhez. Az NGS technológia vírusok egyre bővülő csoportjainak felfedezését teszi lehetővé, de sok esetben nem sikerül az általuk okozott betegséghez való társítás, ezek az úgynevezett orphan-vírusok. A kóroki szerep igazolására alkalmazhatunk klasszikus fertőzések vizsgálatokat, vagy olyan nagy mintaszámú eset-kontroll vizsgálatokat, amelyekben összehasonlítjuk az egészséges (kontroll) és beteg csoportban azonosított virális szekvenciák gyakoriságait. Az új-generációs szekvenálás utat nyithat a vírusok eddig ismeretlen szerepeinek feltárásához, a humán virom és kommenzalista vírusok megismeréséhez (Radford et al., 2012).

Az új-generációs szekvenálás a technikai kihívások mellett komoly nehézségeket okozhat a kiértékelést végző személynek. Etikai kérdéseket vethet fel, ha a vizsgálatunkkal olyan nem várt betegségeket tárunk fel, ami nem volt az eredeti kivizsgálás része. Fontos megemlíteni, hogy a detektált nukleinsav nem

jelenti feltétlenül a betegség kialakulását, ezért megerősítő vizsgálatokra is szükség lehet. A beteg vizsgálat előtti tájékoztatásával és a megfelelő tanácsadással elkerülhetőek a később felmerülő problémák. A helyes klinikai és molekuláris laboratóriumi gyakorlatot követve törekednünk kell a módszer érzékenységének növelésére, standardizálására, a kontaminációk elkerülésére. A reprodukálhatóság érdekében érdemes mind a laboratóriumi mind a bioinformatikai folyamatokra irányelveket, munkafolyamatokat kidolgoznunk. Az adatok kiértékeléséhez fontos, hogy megfelelő adatbázisokat válasszunk, esetleg a fejlesztésükben részt vegyünk (Houldcroft et al., 2017).

1.4. Epigenetika

Epigenetika alatt olyan, a DNS molekulát és ehhez asszociálódott fehérjéket érintő reverzibilis biokémiai módosítások tanulmányozását értünk, amelyek nem változtatják meg a nukleotid szekvenciát, de transzkripciós mintázatként átörökíthetőek. A DNS szálaban lévő citozinok metilációjával, illetve a DNS lánchoz kapcsolódó hisztonok deacetilációjával a gének expressziója szabályozható. Ezek a változások befolyásolják a kromatin szerkezetét, elősegítve a promóterek csendesítését vagy aktiválását (Meaburn és Schulz, 2012). Az epigenetikai szabályozásban bekövetkező zavarok patológiás folyamatokat idézhetnek elő, valamint a kórokozók is hozzájárulhatnak a gazdasejtjük pato-epigenetikai változásaihoz (Niller et al., 2012). Egyre nyilvánvalóbb, hogy a normális és kóros fejlődési folyamatokban meghatározó szerepe van az epigenomnak (pl. bizonyos tumorok kialakulása (Sharma et al., 2010), cukorbetegség (Rehan, 2016), autoimmun betegségek (Quintero-Ronderos és Montoya-Ortiz, 2012)). Egyre több információ áll rendelkezésünkre olyan vírusokról is, amelyek befolyásolják az epigenetikai regulációs folyamatokat [HIV (Ay et al., 2013), HPV (Leonard et al., 2012), EBV (Niller et al., 2014)]. A pontos hatásmechanizmusok megértéséhez, az epigenom terápiás célú módosításához szükség van annak feltérképezésére, ezért az NIH (National Institutes of Health) 2008-ban létrehozott egy epigenetikai folyamatokat feltérképező konzorciumot (NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium). Az együttműködés célja, hogy NGS alapú technikák segítségével meghatározott DNS metilációs, hiszton modifikációs, kromatin hozzáférhetőségi és kis RNS vizsgálatok alapján katalogizálja az egyes epigenetikai mintázatokat különböző sejt és szövet típusokban (<http://www.roadmapepigenomics.org>).

2. Influenza vírus

Az influenza vírusok az *Orthomyxoviridae* családba tartozó, negatív irányítottságú, egyszálú, szegmentált RNS-sel rendelkező burkos vírusok, amelyek emberekben légúti megbetegedések, évenkénti, gyakran magas mortalitással és morbiditással járó járványok okozói. A WHO becslése szerint az influenza vírus évente 3-5 millió súlyos megbetegedést okoz, körülbelül 250-300 ezer halálessel. Orvosi szempontból két nemzetségnek van jelentősége, az

influenza A-nak és az influenza B-nek. Az influenza B természetes körülmények között csak embereket betegít meg, és nem képes világvjárványt okozni. Míg az influenza B-nek csak két vonala (*lineage*) létezik, addig az influenza A-t a 2 fő felszíni fehérje, a hemagglutinin és a neuraminidáz alapján altípusokba lehet sorolni. Az influenza A típus elsősorban madarakat (leginkább vízi szárnyasokat) fertőz, de vannak olyan törzsei, amelyek emlősöket, köztük az embert. Bár néhány influenza A törzs képes a fajok közti korlátokat áttörni és megfertőzni az embert, azonban a legtöbb emberi fertőzést, az évenkénti járványokat az emberhez adaptálódott törzsek okozzák. Ezek a törzsek folyamatosan változnak, állandó problémát okozva a népegészségügynek. A vírus genetikai változékonyságáért leginkább két tulajdonsága felelős. Az egyik a magas mutációs rátával dolgozó RNS függő RNS polimeráz, amely az egyedben belül számos kvázispecies kialakulását eredményezheti. A másik a vírus azon tulajdonsága, hogy ha két altípus ugyanazt a sejtet fertőzi meg, akkor az egyes szegmenseik kicserélődnek (reasszortáció jelensége), új törzset hozva létre. Zoonózis során a sertés vagy a madár influenza vírusa megfertőzi az embert és adaptálódhat az gazdaszervezethez, vagy kialakulhat egy olyan reasszortáns vírus, amely képes megbecsülhetetlen nagyságú és súlyosságú világvjárványt okozni. Ugyanakkor, egy az emberi populációban már régóta cirkuláló törzs elsősorban a fő felszíni fehérjéiben bekövetkezett sorozatos mutációjával olyan törzset hozhat létre, amellyel szemben a populációs immunitás kicsi, ezzel endémiát okozva. A vírus genetikai instabilitása miatt a cirkuláló influenza vírusok nyomon követése (surveillance) a járvány megelőzés, a járvány monitorozása, a vakcina termelés és a klinikum szempontjából is kiemelt jelentőségű (Vemula et al., 2016, Rutvisuttinunt et al., 2013).

Az influenza vírus genetikai surveillance-a sokáig a hagyományos, úgynevezett Sanger szekvenáláson alapult, amelyben a vírus szegmenseinek nukleotid sorrendjét átfedő fragmentek segítségével kerül meghatározásra. Azonban ennek a módszernek számos hátránya van. Az egyik, hogy sok minta esetén időigényes, a körülbelül 13 kb nagyságú genom átfedéssel történő szekvenálása drága, munkaigényes, illetve egy bizonyos szinten ismerni kell a megszekvenálendő szakaszt. További problémát okoz, hogy az influenza izolálása során, már egy passzálás után is genetikai változások történnek a vírus genomban, amelyek befolyásolhatják a genom analízist és az ebből levonható következtetéseket (pl. receptor kötőhely változása a hemagglutinin molekulában). A hagyományos (Sanger) szekvenálással a mutációval rendelkező vírust csak akkor lehet kimutatni, ha annak aránya eléri a körülbelüli 20%-ot az adott víruspopulációban. Ezzel szemben az NGS relatíve nagyobb szekvenálási sebességet és sokkal nagyobb áteresztő képességet garantál, valamint alkalmas az influenza genom közvetlen szekvenálására is (Plant et al., 2016).

Az influenza teljes genom szekvenálást és analízist az influenza kutatás számos területén használják. Szerepel az ECDC Roadmapján, egyike a három

leginkább célba vett teljes genom szekvenáláson alapuló surveillance rendszernek (ECDC 2016).

Egyre szélesebb körben használatos a WGS az emberi, a madár és a sertés influenza evolúciójának tanulmányozásakor. Segített megérteni, hogy például milyen változások következtek be H6N1 törzsek szegmenseiben vadkacsákról pulykára történő adaptálódás alatt, vagy megbecsülni a cirkuláló Eurázsiai sertés influenza vírusok reasszortációs rátáját (Mateau et al., 2014). Ugyancsak fontos szerepe van az emberi influenza törzsek mikroevolúciójának vizsgálatában, nemcsak emberről emberre történő terjedés során fellépő, de az egyes egyedeken belül a vírus szegmenseiben bekövetkezett genetikai változás megértésében is. Így segít például új variánsok egyeden belüli felfedezésében, neutralizáló ellenanyagok célpontjául szolgáló target epitópok analízisében, a reasszortáció, a replikatív fitness, az influenza vírus - gazdatest interakció jobb megértésében, immun-szőkevény, kompenzációs és gyógyszerrezisztens mutánsok kimutatásában, azok transzmissziójában (Leung et al., 2016).

A WGS a különböző influenza szubtípusokban megjelenő antivirális rezisztencia meghatározására, surveillance-ra is használható. A kisebbségben lévő rezisztens variánsok a terápia során dominánssá válhatnak befolyásolva az antivirális kezelés sikerességét, ezért a WGS-nek, mint ezeket a kis százalékban (<1.5%) előforduló populációt is kimutató módszernek fontos szerepe van nemcsak a klinikumban, de az antivirális surveillance-ban is. A valós idejű PCR vizsgálatok csak egy-két mutációs helyet tudnak kimutatni, szemben a WGS-sel, ahol mind a neuraminidáz, mind a mátrix proteinben bekövetkezett ún. minor rezisztencia helyek is kimutathatók (Leung et al., 2016, Barzon et al., 2011, Mateau et al., 2014).

A WGS utat nyitott a virom tanulmányozásához, aminek eredményeképpen számos új vírus mellett sikerült felfedezni például denevérek influenza vírusát (H17N10, H18N11), a környezeti minták analízisével a madárinfluenza vírusok cirkulációját, reasszortációját vagy feltárni lehetséges koinfekciókat. Számos alkalommal, például a nyugat-afrikai Ebola járvány, vagy a kínai H10N8 járvány esetében segített a WGS egy járvány eredetének, kiterjedtségének meghatározásában (Plant et al., 2016, Mateau et al., 2014).

A WGS az influenza vakcina előállításánál is hasznos eszköz. Az influenza vakcina gyártás során használt vírusok olyan reasszortánsok, amelyek magas titerben termelhetők az adott sejtkultúrán vagy embrionált csirkeembrióban. Azonban a kultúrához történő adaptálódás során megváltozhatnak a vírus receptor kötő helyei vagy a protektív epitópjai. Ezért a genetikai stabilitás monitorozása a vakcinagyártók számára fontos, hogy megbizonyosodjanak arról, az antigén struktúra változatlan maradt (Plant et al., 2016).

Nem szabad megfeledkezni a gazdáról sem. Az emberi genom és transzkriptjainak WGS-sel történő tanulmányozása hozzájárul a gazdatest által adott immunválasz jobb megértéséhez, azoknak a polimorfizmusoknak a

felderítéséhez, amelyek megléte egy influenza fertőzést súlyosabbá tehet. Ilyen például az IRF7 vagy az IFITM3 gén polimorfizmusa (Ciancanelli et al., 2016).

Az influenza vírus WGS segíti a szegmensek különböző szezonok alatti és közötti genetikai változásának, az antigén jellemzőinek, az antivirális szer rezisztenciájának, a tropizmus markereinek és a reasszortációs eseményeknek a jobb megértését.

3. Humán immundeficiencia vírus (HIV)

A humán immundeficiencia vírus (HIV) a *Retroviridae* családba tartozó, pozitív egyszálú RNS vírus. Az UNAIDS/WHO adatai szerint a világon 36,7 millió HIV fertőzött él (2015-ös adat, <http://www.who.int/gho/hiv/en/>), Magyarországon a járvány hazai megjelenése óta 3291 HIV fertőzöttet tartanak nyilván (Epinfo, 2016. III. negyedévi adat).

Az új-generációs szekvenálás jelentős mértékben hozzájárult a HIV diverzitásának és patogenitásának, a gyógyszerrezisztencia kialakulásának és evolúciójának megértéséhez, valamint a vírus koreceptor használatának pontosabb meghatározásához. A különböző új-generációs szekvenálási módszerekkel meghatározott nagy lefedettségű, teljes hosszúságú vírus genomok analízise hozzájárult a gazdán belüli diverzitás egyre részletesebb megismeréséhez. A tetemes mennyiségű adat egyre több információt szolgáltat a kvázispeciekről, a vírus természetes gazdán belüli evolúciójáról, az antiretrovirális szerek szelekciós nyomásaként kialakuló mutációs mintázatokról, a vírus és az immunrendszer kapcsolatáról, a felülfertőződés folyamatáról (Gibson et al., 2014).

A HIV nagyfokú genetikai változatossága több tényezőnek köszönhető: a vírus reverz transzkriptáz enzimének nincs hibajavító mechanizmusa, így a replikációkor hibásan beépült nukleotidok új variánsokat eredményezhetnek; magas a vírus replikációs rátája, valamint különböző altípusok között rekombináció jöhet létre. A fertőzött egyének komplex és diverz víruskészlettel rendelkeznek, amelyben minden vírus egy vagy több mutációban különbözik egymástól.

A HIV adszorpciójához és sejtbe való bejutásához CD4 receptor mellett koreceptorok is szükségesek. A vírusokat koreceptor használatuk alapján X4 és R5 törzsekre oszthatjuk fel. Az X4 vírustörzsek T-sejteket fertőznek, koreceptorként CXCR4 α -kemokin receptort használnak, gyorsan szaporodnak és magas titert érnek el. Az R5 törzsek CCR5 β -kemokin receptort használnak koreceptorként, makrofágokat fertőznek, többnyire nagyobb arányban találhatóak meg a fertőzés korai szakaszában. HIV-fertőzöttekben a betegség előrehaladása során tropizmus váltás történik, a makrofág-tróp R5 vírusokat először kettős tropizmusú, majd T-limfotrop X4 vírusok váltják fel (Fauci és Desrosiers, 1997; D.Tóth, 2002). A tropizmus meghatározása nélkülözhetetlen, ha a beteget koreceptor antagonistával (maraviroc) kívánják kezelni. Az *env* génben található V3-as régió mélyszekvenálásával a CCR5-tróp vírusok mellett kis számban jelen

lévő CXCR4-tróp vírusokat is képesek vagyunk detektálni, amelyek a betegben CCR5 koreceptor antagonistával történő kezelés esetén gyorsan felszaporodhatnak és dominánssá válhatnak, ezzel hozzájárulva a terápia kudarcához. A mélyszekvenálással kapott koreceptor tropizmus predikciók egybehangzó eredményeket adtak a fenotípusos vizsgálatokkal, valamint nagyobb érzékenységgel detektáltak R5-től eltérő variánsokat, mint a hagyományos szekvenálási módszerekkel (Gibson et al., 2014).

Teljes HIV genomok filogenetikai elemzésével 4 divergens csoportot azonosítottak (M, O, N, P). A pandémiáért felelős M csoportban kilenc altípust különítettek el (A-D, F-H, J, K). Az altípusok közötti rekombináció eredményeként kialakult több mint 80 cirkuláris rekombináns formát (CRF) tartanak nyilván (<https://www.hiv.lanl.gov/content/index>). A vírus diverzifikációja nem csak egyéni szinten, hanem nagyobb földrajzi régiókban is megfigyelhető. Míg Európában és Észak-Amerikában az elmúlt 20 év folyamán a B altípus volt a domináns, fokozatosan növekszik a nem-B altípushoz tartozó törzsek általi HIV fertőzések száma. Oroszországban jelentősen nőtt a HIV pozitív esetek száma, a korábban domináns A altípus mellett CRF03_AB rekombináns forma is megjelent. A vírus dinamikus evolválódó természete mellett az utazási és szociális szokásokban történt változások együttesen járulnak hozzá a HIV globális diverzifikációjához, ezért folyamatos surveillance-ra van szükség (Luk et al., 2015).

Az első rezisztens HIV törzsek azonosítása után nyilvánvalóvá vált a betegek klinikai monitorozásának szükségessége. A kialakuló antivirális szerek iránti csökkent érzékenység nem csak a betegek terápiás elégtelenségéhez vezethet, hanem fertőzéskor ezek a rezisztens törzsek egyik egyénről a másikra átvihetők. Európai és hazai tanulmányok alapján a kezeletlen betegek körülbelül 10%-a HIV ellenes gyógyszerek elleni rezisztenciát okozó mutációt hordozó vírussal fertőződött (Hofstra et al., 2016; Mezei et al., 2011). Ezért az antiretrovirális terápia megkezdése előtt, illetve terápiás elégtelenség esetén javasolt a betegekben található vírustörzsek genetikai elemzése.

Különböző fenotípus és genotípus alapú vizsgálatok állnak rendelkezésünkre a HIV ellenes antivirális terápiás szerek iránt érzékenység és a koreceptor tropizmus megállapítására. Genotípus alapú tesztekkel a vírus nukleinsav sorrendjét határozzuk meg a kívánt régiókban, az ismert pozíciókban detektált mutációk hozzájárulhatnak a csökkent gyógyszerérzékenységhez vagy a vírus tropizmus váltásához. A módszer nagy előnye, hogy gyorsabb és költséghatékonyabb a fenotípus alapú tesztekénél, valamint a kvázispeciesek detektálásával olyan genetikai változásokat is kiszűrhetünk, amelyek fenotípusos változást még nem indukáltak. Különböző NGS platformok alkalmazásával körülbelül 1%-ban előforduló variánsok is kimutathatóak a virális populációból (Gibson et al., 2014, Radford et al., 2012). A fenotípus alapú módszerek jellemzően sejtes alapú vizsgálatok, amelyekben megállapítják, hogy a betegből származó vírusok replikációs képessége hogyan változik különböző koreceptorral

rendelkező sejteken, vagy különböző antiretrovirális szerek jelenlétében. Ez a módszer jól alkalmazható, ha még nem ismerjük az adott szerre jellemző rezisztenciát okozó mutációkat (új gyógyszer bevezetése), vagy a genom analízise nehézségekbe ütközik (Gibson et al., 2014).

Az ECDC nagy hangsúlyt fektet különböző kórokozók molekuláris tipizálásának egy európai szintű surveillance és járványügyi készenléti rendszerbe történő integrálására. A 2016-2019-es ütemterv alapján fel kell mérni a tagállamok technikai kapacitását a teljes HIV genomok rutinszerű meghatározásának kivitelezhetőségét illetően, valamint szükség van egy olyan stratégia kidolgozására, amely feltérképezi és monitorozza az antivirális rezisztencia alakulását térben és időben. A tagállamok által szolgáltatott HIV szekvencia adatok hozzájárulnak egy európai szintű átviteli hálózat feltérképezéséhez, valamint pontosabb és összetettebb képet kapunk a HIV elleni gyógyszerrezisztencia alakulásáról (ECDC 2016).

4. Hepatitis C vírus (HCV)

A hepatitis C vírust 1989-es felfedezésekor olyan non-A non-B hepatitiszt okozó vírusnak gondolták, amelynek kicsiny a jelentősége, és csupán a rendszeresen vérkészítményt kapókat illetve az intravénás droghasználókat veszélyezteti. Mára azonban világossá vált, hogy a hepatitis C vírus globális problémát jelent. Becslések szerint világszerte mintegy 170 millió embert érint a megbetegedés. A fertőzések mintegy 80%-a válik krónikussá, melyek hosszú távon májkárosodáshoz, cirrózishoz, az esetek 1-5%-ában pedig hepatocelluláris karcinómához vezetnek (Lavanchy, 2011).

A hepatitis C vírus fertőzés kezelését nagyban megnehezíti a vírus nagyfokú változékonysága. A jelenlegi taxonómia szerint a hepatitis C vírusnak hét genotípusa és 67 szubtípusa van, bár az utóbbi szám folyamatosan növekszik. A genotípusok között nagyobb, mint 15% a különbség a kódoló régiók szekvenciájában, a szubtípusok között a különbség kisebb, mint 13% (Smith et al., 2014). Magyarországon jellemzően az 1b genotípus terjedt el, emellett kis számban 1a és 3-as genotípus fordul elő, melyet irodalmi adatok és a saját laboratóriumunk eredményei is alátámasztanak (Gervain et al, 2003, Dencs et al, 2011).

A vírus változékonysága nemcsak a geno- és szubtípusok nagy számában, hanem az egyénen belül is megnyilvánul. A vírus pozitív egyszálú RNS genommal rendelkezik, és RNS függő RNS polimeráza, amely a replikációért felelős, hibajavító mechanizmus híján elég gyakran „téveszt”, ami kvázispeciesek kialakulását eredményezheti egyénen belül. Ezek a variánsok olyan genetikai hátteret biztosítanak, amelyből a szelekciós nyomásnak köszönhetően könnyen alakulhatnak ki az aktuálisan alkalmazott terápiával szemben ellenálló változatok.

A vírus nagyfokú változékonyságának köszönhetően nehéz olyan terápiát találni, ami egyformán hatásos az egyes geno- és szubtípusok esetében. Napjainkban azonban a krónikus HCV fertőzések terápiája forradalmi változáson

megy át. 2011 előtt csak nem specifikus terápia állt rendelkezésre, ami pegilált interferon és egy guanozid analóg, a ribavirin kombinációjából állt. Ezzel a kezeléssel azonban a nálunk elterjedt 1b genotípus esetében a 48 hetes terápiában csak az esetek 40-45%-ában sikerült elérni a tartós vírusválaszt (sustained virologic response, SVR), vagyis azt, hogy a vírusnukleinsav kimutatás hat hónappal a terápia befejezése után is negatív eredményt adjon. Emellett a terápiának kifejezetten súlyos mellékhatásai voltak. 2011-től vezették be az ún. hármas terápiát, ami a fent említett két szer mellett már specifikus proteáz gátlókat is tartalmazott. A telaprevirrel vagy boceprevirrel kiegészített kezelés határfoka egyes genotípus esetén elérte a 66-80%-os SVR-t. A terápia sikerét azonban jelentősen korlátozta, hogy a gyakori – és esetenként igen súlyos – mellékhatások miatt a gyógyszereket a betegek egyharmada az optimálisnál alacsonyabb dózisban és/vagy rövidebb ideig kaphatta (Hunyady et al., 2011).

A HCV kezelésében forradalmi áttörést jelentett az interferonmentes terápia lehetősége, amely során a terápia a vírus működésére specifikusan ható direkt hatású antivirális készítmények kombinációjából áll. Ezen készítmények mindegyike valamelyik vírusspecifikus fehérje működését gátolja. Ezek az enzimek lehetnek az NS3 proteáz gátlói („previr” végződésű készítmények), az NS5A replikációs komplex működését gátló készítmények („asvir” végződésű készítmények), valamint a vírus RNS függő RNS polimerázának, az NS5B-nek a gátlói („buvir” végződéssel). A készítményeket kombinációban adják, növelve ezzel a hatékonyságot, csökkentve a kezelés idejének hosszát és az esetleges rezisztencia kialakulásának valószínűségét (Asselah et al., 2016). Bár a terápiának magasak a költségei, a kezelési idő csak 12 hét, és a mellékhatásprofil is sokkal kedvezőbb a korábban használt készítményeknél. Ráadásul a várható SVR 90% fölötti, így a hosszú távú előnyöket is figyelembe véve az interferonmentes terápia költséghatékonyabb, mint a korábbi kezelések (Makara és Hunyady, 2015). Magyarországon azonban, bár a szakmai ajánlás mindenki számára elsődlegesen az interferonmentes terápia, a korlátozott OEP finanszírozás miatt nem minden beteg kaphatja meg a legmodernebb kezelést. Így jelenleg a cél a rendelkezésre álló keretből a legsúlyosabb állapotú betegek és a lehető legtöbb beteg meggyógyítása. Emiatt, ha azt a finanszírozási okok szükségessé teszik, alkalmazzák a hagyományos terápiákat is különféle szabályok betartásával (Hunyady et al., 2015).

A modern interferonmentes terápia magas költségei azonban szükségessé teszik azoknak a betegeknek a kiszűrését, akiknél a terápia kisebb valószínűséggel lenne sikeres. Az alkalmazott szerek nem hatnak egyformán minden genotípusra, mely főleg a hármas és a változatos hatos genotípus kezelésében jelent problémát. További nehézséget okoz, hogy a készítmények rezisztenciaküszöbe alacsony, vagyis sokszor egy pontmutáció elég a rezisztencia kialakulásához (ez különösen igaz az NS5A működését gátló készítményekre). Éppen ezért a kezelés megkezdése előtt és közben fontos tudni, hogy nincsenek-e jelen/nem szaporodnak-e fel olyan víruspopulációk, amelyek rezisztensek a

kezelésre (rezisztencia asszociált variánsok – RAV). A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható, RAV kimutatására alkalmas kitek hagyományos PCR alapon működnek, melyeknél egy adott régió konzervatív szakaszára terveznek primert, és szaporítják fel azokat a régiókat, melyeknek szerepük lehet a rezisztencia kialakulásában. Ez a módszer azonban feltételezi, hogy a kimutatni kívánt geno-, vagy szubtípus megfelelően reprezentált a nukleinsav adatbázisokban, és így tervezhető rájuk egy megbízhatóan működő PCR módszer, ez a ritkább genotípusok esetében azonban nincs mindig így. További problémát jelent a hagyományos PCR-en, majd direkt (Sanger) szekvenáláson alapuló módszereknél, hogy a kis mennyiségben jelen lévő víruspopulációkat nem mutatja ki megbízhatóan. Ezért az új-generációs szekvenáló módszerek alkalmazása egyre inkább előtérbe kerül (Wei et al., 2016).

Az NGS módszerek virológiai alkalmazásánál lehetőség van ún. metagenomikus megközelítésre, mikor mindenféle szelektálás nélkül az összes klinikai mintában lévő nukleinsav szekvenálása megtörténik. Így elkerülhető, hogy a különféle válogató mechanizmusok alkalmazásával esetlegesen „kedvezzünk” a jelen lévő víruspopulációk valamelyikének, ami egyes variánsok felülreprezentálódását eredményezhetné a kapott szekvenciákban. A módszer hátránya azonban, hogy a szekvenciák többsége humán eredetű, hiszen annak aránya az eredeti mintában nagyságrendekkel nagyobb a virális nukleinsavénál, így a kapott szekvenciák nagy része nem szolgál releváns információval. Ennek elkerülése érdekében az alkalmazott NGS módszerek nagyobb részénél a szekvenálást egy, a virális nukleinsav feldúsítását célzó lépés előzi meg. Ennek egyik változatában a HCV genomok „kihalászása” történik oligonukleotid próbák segítségével, a másik lehetőség a humán rRNSek, mint a legnagyobb mennyiségben jelen lévő RNS depléciója a könyvtárkészítési lépés előtt. Lehetőség van a teljes HCV genom szekvenálására egymással átfedő PCR reakciók tervezésével, majd a kapott amplikonok megszekvenálásával valamilyen NGS platformon. Thomson és munkatársai a fent említett módszereket hasonlították össze érzékenység, a kapott kvázispeciesek diverzitása, a koinfekciók kimutatása, illetve a RAV kimutatás hatékonyságát figyelembe véve. Az eredmények azt mutatták, hogy a readok száma arányos volt a kezdeti vírusréteggel mind a metagenomikus megközelítés, mind pedig a HCV genomok „feldúsítása” esetén, ez azonban nem volt igaz a PCR alapú módszernél. Az alacsonyabb mennyiségű vírust tartalmazó minták esetében a metagenomikus megközelítés nem volt elég hatékony. A kvázispeciesek detektálásában a PCR alapú módszer valamint a metagenomikus megközelítés szignifikánsan gyengébb eredményt adott, mint a HCV genomok feldúsításán alapuló módszerek. A különböző kevert fertőzések esetében a módszerek érzékenysége nem tért el lényegesen egymástól, mindegyik esetben függött a kimutathatóság a kevert genotípusok jelenlétének arányától. A RAV detektálásban tehát a HCV genomok feldúsításán alapuló módszerek teljesítettek legjobban, bár itt volt különbség az alkalmazott módszerek hatékonyságában.

Ezek alapján a virális nukleinsav kihalászásával történő feldúsítás bizonyult a leghatékonyabbnak az alkalmazott eljárások közül (Thomson et al., 2016). A legmodernebb, ún. harmadik generációs szekvenálási eljárások megjelenése további lehetőségeket teremt a kezelésre rezisztens mutánsok kimutatásában. Ezek az eljárások az NGS módszerek rövid szekvenciáival (max. 1 kb) szemben hosszú DNS molekulák olvasására képesek (akár 100 kb). Ezek a repetitív elemek hatékonyabb szekvenálásával sokkal teljesebb genom rekonstrukciót tesznek lehetővé. A harmadik generációs single molecule real time (SMRT) módszer alkalmazásával a korábbinál hatékonyabban tudtak RAV-okat kimutatni, így a 0,2%-ban jelen lévő variánsok is kimutathatóak voltak (Bergfors et al., 2016).

Ma Magyarországon az interferonmentes terápia elkezdésének feltétele egy genotípus meghatározás, ami történhet real time PCR módszerrel, hibridizációs próbával például, de az Országos Epidemiológiai Központban PCR termék direkt (Sanger) szekvenálásával határozzuk meg a genotípust. Egyelőre Magyarországon nem történik meg a kezelés sikerességét esetlegesen befolyásoló mutációk rutinszerű vizsgálata, vagy a kezelés előtt jelen lévő víruspopulációk feltérképezése. Nincsen lehetőség a kezelés során megjelenő rezisztencia asszociált variánsok monitorozására sem. Az új-generációs szekvenálás virológiai alkalmazásainak bevezetésével ezek a vizsgálatok lehetővé válnának, ami tovább javíthatna a kezelések hatékonyságán, és ezen vizsgálatok széles körű elterjedése segítene a még hatékonyabb direkt ható antivirális terápiák kifejlesztésében.

5. Nyugat-nílusi vírus (West-Nile vírus, WNV)

A nyugat-nílusi vírus (West Nile vírus) a *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségéhez tartozó virális zoonózis, arbovírus, tehát terjesztésében elsősorban ízeltlábú vektorok vesznek részt. A vírust először 1937-ben izolálták egy lázas nő véréből, Uganda „West Nile” nevű tartományában, elnevezését is innen kapta (Barzon et al., 2015). Az elmúlt évtizedekben a vírus a trópusi területeken kívül is megjelent, mára pedig világszerte elterjedté vált. Többek között Európa számos országában is endémiás kórokozónak számít, amely éves rendszerességgel okoz emberi megbetegedéseket. Magyarország szinte teljes egészében érintett, azonban a laboratóriumiilag is igazolt fertőzések számában kiemelkedő fontossággal bír a középső, keleti és délkeleti országrész.

A vírusnak eddig 9 feltételezett genetikai leszármazási vonalát (úgynevezett *lineage*) azonosították. Ezek közül az 1-es és 2-es *lineage*, amelyek eddigi ismereteink szerint bizonyíthatóan összefüggésbe hozhatók emberi megbetegedésekkel (Barzon et al., 2015). Az elmúlt évek humán diagnosztikai eredményei és állatorvosi területen nyert adatai szerint Magyarországon elsősorban *lineage-2* nyugat-nílusi vírus cirkuláció figyelhető meg, ezért feltételezhetően az emberi infekciók hátterében is ezen leszármazási vonalhoz tartozó vírustörzsek állhatnak (Erdélyi et al., 2006; Kutasi et al., 2011; Nagy et al., 2016). Ugyanakkor korábban már volt példa *lineage-1* vírustörzs által okozott

állati megbetegedésekre is. (2003-ban egy lúdfarmon kitört járvány esetén azonosítottak 1-es leszármazási vonalhoz tartozó vírustörzset a fertőzések háttérében.) Ezért *linegae-1* vírustörzsek előfordulása és humán kóroki szerepük sem zárható ki egyértelműen (Bakonyi et al., 2005; Bakonyi et al., 2006). Az elmúlt években pedig egy feltételezett, új, 9. genetikai vonal megjelenését is igazolták Ausztriában és egyidejűleg hazánkban is, egyelőre csak szúnyogokban (Kemenesi et al., 2014; Pachler et al., 2014).

A vírus transzmissziójában elsősorban a *Culex* nemzetséghez tartozó szúnyog vektorok vesznek részt, melyek alapvetően madarakon táplálkoznak, azonban véletlenszerűen emlősöket is csíphetnek, ezzel átterjesztve a fertőzést madarokról például lóra vagy emberre (Barzon et al., 2015). Az ember ugyanakkor fertőzési zsákutcának tekinthető, a szúnyogcsípés általi emberről emberre történő terjedés ez idáig nem ismert. Szakirodalmi adatok szerint ritkább transzmissziós lehetőség a transzplacentáris, laktáció általi, vagy transzfúzióhoz, esetleg szervdonációhoz köthető fertőződés (Sambri et al., 2013; Sampathkumar, 2003). Az inkubációs idő változó hosszúságú lehet, átlagosan 2-14 nap, azonban fontos megjegyezni, hogy a szúnyogcsípés pontos időpontja sokszor nehezen meghatározható. A betegség előfordulása, a vektorok élelciklusából adódóan szezonális jellegű, a laboratóriumi is igazolt akut fertőzések halmozottan jelennek meg az augusztustól októberig terjedő időszakban (Krisztalovics et al., 2008). Az esetek jelentős hányada szubklinikai, aspecifikus tünetekkel kísért, ezért sokszor nem kerül felismerésre, majd mikrobiológiai kivizsgálásra. A klinikailag manifesztálódó megbetegedések egy része enyhébb lefolyású, tipikus tünetek a láz, ízületi-és izomfájdalmak, maculopapularis és roseoliform exanthemák (Barzon et al., 2015; Szomor et al., 2011). Az enyhébb klinikai tünetekkel jellemezhető formát a szakirodalom nyugat-nílusi láz (*West Nile fever*) néven tartja számon. Az esetek egy kisebb százalékában kialakulhat a súlyosabb kórlefordulású neurológiai tünetegyüttes (*West Nile neuroinvasive disease*), mely túlnyomó részt magas lázzal kísért aszeptikus meningitis, encephalitis, ritkábban *poliomyelitis-szerű* flaccid paralysis, Guillain-Barré szindróma formájában zajlik, de kialakulhat tudatvesztés is, amely súlyosabb esetekben fatális kimenetelű is lehet (Barzon et al., 2015, Sambri et al., 2013). Neurológiai érintettség esetén nem ritka a neuropszichiátriai maradványtünetek kialakulása sem, mint például fáradékonyság, depresszió, gyengeség, halláskárosodás. A neurológiai kórforma kialakulásában rizikócsoporthoz számít az idősebb – 65 év feletti – korosztály, esetükben a prognózis is sokkal rosszabb. Bár már vannak törekvések humán használatra alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható vakcina fejlesztésére, ez jelenleg még nem érhető el, mint ahogyan specifikus terápia sem áll rendelkezésre. Jelenlegi ismereteink szerint az egyetlen terápiás lehetőség a tüneti kezelés alkalmazása (Sampathkumar, 2003).

A laboratóriumi diagnosztika elsősorban szerológiai vizsgálatokra épül, amely kapcsán fontos megjegyezni, hogy hazánkban a nyugat-nílusi vírus mellett egy másik humán fertőzést okozó flavivírus, a kullancsencephalitis vírus is

endémiás, emellett az utóbbi időben a trópusi területekről importálható egyéb flavivírus-fertőzések (Dengue-, Zika-, sárgaláz vírus) irányába is megnőtt a vizsgálatkérések száma. Mindez abból a szempontból érdekes, hogy a laboratóriumi differenciál diagnosztikát jelentősen komplikálhatják a szerológiai keresztreakciók, mely a flavivírus nemzetségre jellemző jelenség és a gyakorlatban valamennyi szerodiagnosztikai eljárásban tapasztalható. A szerológiai vizsgálatokat nehezíti továbbá, hogy flavivírus fertőzést követően – az egyébként akut infekciót indikáló – IgM ellenanyagok akár hónapokig is perzisztálhatnak, míg másodlagos flavivírus fertőzéskor az IgM válasz elmaradhat (vagy a detektálhatósági határ alatt marad) és emellett a *buster* hatásnak köszönhetően a primér fertőzést okozó vírusra specifikus IgG szintje emelkedik gyorsabb ütemben. Ezért az akut flavivírus fertőzések szerológiai differenciál diagnosztikája sokszor komoly körülményt igényel. Részben éppen a szerodiagnosztika kiegészítéseként, a diagnózis megerősítéséhez, részben pedig járványügyi szempontból releváns információk nyeréséhez, az Országos Epidemiológiai Központ Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriuma 2014-től a molekuláris diagnosztikai eljárásokat is bevezette a nyugat-nílusi vírushatások rutindiagnosztikájába. Az elmúlt három év tapasztalata pedig azt mutatja, – a korábban elterjedt vélekedéssel szemben – hogy a vírus jó eséllyel mutatható ki akut fertőzötték vizeletmintájából, több esetben sikeres vírusizolálással is megerősítve a diagnózist (Nagy et al., 2016). Célunk hosszú távon a hazai törzsek izolálása és egy törzsbank létrehozása, majd az izolált törzsek teljes genomjának meghatározása. Az így szolgáltatott adatok pedig elengedhetetlenek a korszerű, molekuláris diagnosztikai módszerek fejlesztéséhez.

Jelenleg a vírusgenom egy kis részletének szekvenálására van csak lehetőségünk, melynek segítségével ugyan megállapítható, hogy a beteg mintájából kimutatott vírustörzs mely genetikai leszármazási vonalhoz tartozik, ennél részletesebb elemzésre azonban már nem alkalmas. Ugyanakkor az egyes genetikai leszármazási vonalakhoz tartozó vírustörzsek változásának nyomon követése és a virulenciát befolyásoló genetikai háttér kutatása értékes információt szolgáltat a nyugat-nílusi vírus biológiájának megismeréséhez. Korábban a vírus 1-es genetikai leszármazási vonalát gondolták virulensebbnek a neuroinvazív kórforma kialakulása szempontjából. Többek között az Egyesült Államokban tapasztalt 1999-es encephalitis járvány háttérében is *lineage-1* nyugat-nílusi vírustörzs állt, mely járványt követően jelentős figyelem irányult a korokozóra (Kutasi et al., 2011). Azóta azonban világossá vált, hogy mindkét humán fertőzést okozó genetikai vonalhoz tartoznak eltérő virulenciával jellemezhető törzsek (Kutasi et al., 2011).

Különböző *lineage-1* nyugat-nílusi vírustörzsek jelenléte már az 1950-es évektől ismert Európa-szerte. Patogén *lineage-2* vírustörzs közép-európai megjelenését azonban 2004-ben regisztrálták először Magyarországon (Bakonyi et al., 2005; Bakonyi et al., 2006; Erdélyi et al., 2006; Kutasi et al., 2011).

A rákövetkező években az állatorvosi területen lovak encephalitis-es megbetegedése és –Európa több országában– humán fertőzések háttérében is bebizonyosodott a 2-es genetikai leszármazási vonalhoz tartozó vírustörzsek etiológiai szerepe (Kutasi et al., 2011).

Eddigi teljes genom szekvenciákon alapuló filogenetikai vizsgálatok szerint valószínűsíthető, hogy a hazánkban azonosított *lineage-2* vírustörzs trópusi területekről (Afrikából) Európába történő bejutását követően fokozatosan terjedt át a környező országokba és vált dominánssá, miközben a helyi ökológiai nichekhez adaptálódva kialakultak divergens, virulensebb változatok (McMullen et al., 2013). Emellett egy évenkénti cirkuláció is elképzelhető: a járványügyi szempontból fontos vándormadarak migrációjuk során újabb vírustörzseket hurcolhatnak be Európa, így Magyarország területére is. Az egyes vírustörzsek elterjedésének, a virulencia változásának, valamint annak nyomon követésére, hogy mindez milyen hatással lehet a humán fertőzések súlyosságára a teljes vírusgenom megismerése ad lehetőséget.

A vizeletből történő víruskimutatás a diagnosztika új és korszerű eszköze, az eddigi saját (és külföldi publikációkban leírt) tapasztalatok szerint a vírus hosszabb ideig is magasabb koncentrációban mutatható ki vizeletmintákból, mint egyéb mintatípusokból, például vérsavó vagy liquor mintákból (Barzon et al., 2013b; Barzon et al., 2015; Nagy et al., 2016). Vizeletből emellett a vírusizolálás is sikeresen elvégezhető (Barzon et al., 2014). Rágcsálók kísérletes fertőzését követően és egyes tanulmányokban bemutatott humán esetek kapcsán is leírták már a vizelettel történő hosszú távú vírusürítést (Gibney et al., 2010; Murray et al., 2010; Tesh et al., 2005). Arra vonatkozóan, hogy kialakulhat-e perzisztens vírusherzesség, és ha igen ezt milyen genetikai faktorok befolyásolják mind a vírus, mind pedig a gazdaszervezet részéről, és mindez milyen hosszú távú egészségügyi kockázatot jelenthet, a virológia egy jelenleg is nyitott kérdése (Murray et al., 2008; Nolan et al., 2010). Az új-generációs szekvenálási technikák alkalmazásával a vírus szöveti tropizmusa, valamint esetleges kvázispeciezes együttes jelenléte is megfigyelhető, mely lehetővé teszi azon genetikai faktorok, változások azonosítását, amelyek hatással lehetnek a szöveti affinitásra és egy esetleges perzisztens fertőzés kialakulására is.

Az ECDC az európai szinten megvalósuló, teljes genom szekvenciákon alapuló surveillance rendszer felállítására vonatkozó ütemtervében a 2018-as évet irányozta elő a nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos stratégia átgondolására és kialakítására (ECDC 2016). Ezért 2018-ig szeretnénk a módszert előkészíteni, majd alkalmazni a hazai vírustörzsek teljes genomjának meghatározására, hogy a jövőben megfeleljünk az európai-szintű követelményeknek és csatlakozhassunk a tervezett surveillance rendszerhez.

Összességében tehát a nyugat-nílusi vírustörzsek teljes genomjának új-generációs módszerrel történő szekvenálásának gyakorlati célja a hazai törzsbank részletes jellemzése, tudományos szempontból a virulencia, a virulenciát

befolyásoló genetikai tényezők, valamint az új változatok megjelenésének nyomon követése.

Amennyiben pedig a nyugat-nílusi vírus teljes genom szekvenálásával már kellő tapasztalatokkal rendelkezünk, a módszer hosszútávon kiterjeszhető egyéb, az országban endémiás vagy behurcolt flavivírus fertőzések további genom szintű vizsgálataira is.

Irodalomjegyzék

Asselah T, Boyer N, Saadoun D, Martinot-Peignoux M, Marcellin P: Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int.* 2016; 36 Suppl 1: 47-57.

Ay E, Banati F, Mezei M, Bakos A, Niller HH, Buzás K, Minarovits J: Epigenetics of HIV infection: promising research areas and implications for therapy. *AIDS Rev.* 2013; 15(3): 181-8.

Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N: Novel Flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(2): 225-31.

Bakonyi T, Ivanics É, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N: Lineage 1 and lineage 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12 (4): 618-23.

Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palù G: Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. *J Clin Virol.* 2013a; 58(2): 346-50.

Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int J Mol Sci.* 2011;12(11):7861-84.

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, Cusinato R, Palù G: Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis.* 2013b; 208 (7):1086-92.

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Sinigaglia A, Ulbert S, Cusinato R, Palù G: Isolation of West Nile Virus from urine samples of patients with acute infection. *J.Clin Microbiol.* 2014; 52(9):3411-3.

Barzon L, Pacenti M, Ulbert S, Palù, G: Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2015; 13(3):327-42.

Bergfors A, Leenheer D, Bergqvist A, Ameer A, Lennerstrand J: Analysis of hepatitis C NS5A resistance associated polymorphisms using ultra deep single molecule real time (SMRT) sequencing. *Antiviral Res.* 2016; 126: 81-9.

Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G: Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19(1): 15-22.

Ciancanelli MJ, Abel L, Zhang SY, Casanova JL: Host genetics of severe influenza: from mouse Mx1 to human IRF7. *Curr Opin Immunol.* 2016; 38: 109-20.

D. Tóth F: A humán immunodeficiencia vírus. In: Bánhegyi D, D. Tóth F, Füst Gy (Eds.), HIV fertőzés – AIDS. Melánia Kiadói Kft, Budapest, 2002; pp: 5-29.

Dencs A, Hettmann A, Martyin T, Jekkel C, Bányai T, Takács M: Phylogenetic investigation of nosocomial transmission of hepatitis C virus in an oncology ward. *J Med Virol.* 2011; 83(3): 428-36.

Dye C, Mertens T, Hirnschall G, Mpanju-Shumbusho W, Newman RD, Raviglione MC, Savioli L, Nakatani H: WHO and the future of disease control programmes. *Lancet.* 2013; 381(9864): 413-8.

Dye C: After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014; 369(1645): 20130426.

Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Szeredi L, Rátz F, Skáre J, Bakonyi T: Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006; 7(2): 181-8.

European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC roadmap for integration of molecular and genomic typing into European –level surveillance and epidemic preparedness – Version 2.1, 2016-19. Stockholm: ECDC; 2016.

Fauci AS, Desrosiers RC: Pathogenesis of HIV and SIV. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (Eds.), *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1997, pp: 587-635.

Gervain J, Simon Jr G, Simon J; Hungarian Viral Hepatitis Group: Genotype distribution of hepatitis C virus in the Hungarian population with chronic viral hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 15(4): 449-50.

Gibney KB, Lanciotti RS, Sejvar JJ, Nugent CT, Linnen JM, Delorey MJ, Lehman JA, Boswell EN, Staples JE, Fischer M: West Nile virus RNA not detected in urine of 40 people tested 6 years after acute West Nile virus disease. *J Infect Dis.* 2010; 203(3): 344-7.

Gibson RM, Schmotzer CL, Quiñones-Mateu ME: Next-Generation Sequencing to Help Monitor Patients Infected with HIV: Ready for Clinical Use? *Curr Infect Dis Rep.* 2014; 16(4): 401.

Hofstra LM, Sauvageot N, Albert J, Alexiev I, Garcia F, Struck D, Van de Vijver DA, Åsjö B, Beshkov D, Coughlan S, Descamps D, Griskevicius A, Hamouda O, Horban A, Van Kasteren M, Kolupajeva T, Kostrikis LG, Liitsola K, Linka M, Mor O, Nielsen C, Otelea D, Paraskevis D, Paredes R, Poljak M, Puchhammer-Stöckl E, Sönnernborg A, Staneková D, Stanojevic M, Van Laethem K, Zazzi M, Zidovec Lepej S, Boucher CA, Schmit JC, Wensing AM: SPREAD Program: Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe. *Clin Infect Dis.* 2016; 62(5): 655-63.

Houldcroft CJ, Beale MA, Breuer J: Clinical and biological insights from viral genome sequencing. *Nat Rev Microbiol.* 2017; 15(3): 183-192.

<http://www.roadmapgenomics.org>

<http://www.who.int/gho/hiv/en/>

<https://www.hiv.lanl.gov/content/index>

Hunyady B, Gervain J, Horváth G, Makara M, Pár A, Szalay F, Telegdy L, Tornai I: Hepatitis C-vírus-fertőzés: diagnosztika, antivirális terápia, kezelés utáni gondozás - Magyar konszenzusajánlás *Orv Hetil.* 2014; 155 Suppl: 3-24.

Hunyady B, Kovács B, Battyáni Z: A krónikus hepatitis C-vírus-fertőzés hagyományos pegilált interferon+ribavirin és proteázgátló direkt antivirális hatású szerekek kiegészített kezelésének mellékhatásai *Orv Hetil.* 2011; 152(50): 1997-2009.

Kasibhatla SM, Waman VP, Kale MM, Kulkarni-Kale U: Analysis of Next-generation Sequencing Data in Virology - Opportunities and Challenges. In: Kulkarni JK (Ed.), *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*, InTech, 2016, pp: 173-203.

Kemenesi G, Dallos B, Oldal M, Kutas A, Földes F, Németh V, Reiter P, Bakonyi T, Bányai K, Jakab F: Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia unguiculata* mosquito, Hungary. *VirusDis.* 2014; 25(4): 500-3.

Kristensen DM, Mushegian AR, Dolja VV, Koonin EV: New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1): 11-9.

Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnár Z, Csohán Á, Bán E, Zöldi V, Kaszás K: West Nile virus infections in Hungary, August-September. *Euro Surveill.* 2008; 13(45):pii:19030.

Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, Biksi I, Ferenczi E, Bahuon C, Sardi S, Zientara S, Szenci O: Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *J Vet Intern Med.* 2011; 25(3): 586-91.

Lavanchy D: Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(2): 107-15.

Leonard SM, Wei W, Collins SI, Pereira M, Diyaf A, Constandinou-Williams C, Young LS, Roberts S, Woodman CB: Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis.* 2012; 33(7): 1286-93.

Leung P, Eltahla AA, Lloyd AR, Bull RA, Luciani F: Understanding the complex evolution of rapidly mutating viruses with deep sequencing: Beyond the analysis of viral diversity. *Virus Res.* 2016. pii: S0168-1702(16)30458-0.

Luciani F, Bull RA, Lloyd AR: Next generation deep sequencing and vaccine design: today and tomorrow. *Trends Biotechnol.* 2012; 30(9): 443-52.

Luk KC, Berg MG, Naccache SN, Kabre B, Federman S, Mbanya D, Kaptué L, Chiu CY, Brennan CA, Hackett J Jr: Utility of Metagenomic Next-Generation Sequencing for Characterization of HIV and Human Pegivirus Diversity. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0141723

Makara M, Hunyady B: A hepatitis C-vírus-fertőzés és kezelésének költségvonzata *Orv Hetil.* 2015; 156(21): 862-8.

McMullen AR, Albayrak H, May F, Davis CT, Beasley DW, Barrett AD: Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *J Gen Virol.* 2013; 94(2): 318-25.

Meaburn E, Schulz R: Next generation sequencing in epigenetics: insights and challenges. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; 23(2): 192-9.

Mezei M, Áy E, Koroknai A, Tóth R, Balázs A, Györi Z, Bánáti F, Marschalkó M, Kárpáti S, Minárovits J: Molecular epidemiological analysis of *env* and *pol* sequences in newly diagnosed HIV type 1-infected, untreated patients in Hungary. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011; 27(11): 1243-7.

Mizuno CM, Rodriguez-Valera F, Kimes NE, Ghai R: Expanding the marine virosphere using metagenomics. *PLoS Genet.* 2013; 9(12): e1003987.

Murray K, Walker C, Herrington E, Lewis JA, McCormick J, Beasley DWC, Tesh RB, Fisher-Hoch S: Persistent infection with West Nile virus years after initial infection. *J Infect Dis.* 2010; 201(1): 2-4.

Murray KO, Garcia MN, Rahbar MH, Martinez D, Khuwaja SA, Arafat RR, Rossmann S: Survival analysis, long-term outcomes, and percentage of recovery up to 8 years post-infection among the Houston West Nile virus cohort. *PLoS One*. 2008; 9(7): e102953.

Nagy A, Bán E, Nagy O, Ferenczi E, Farkas Á, Bányai K, Farkas S, Takács M: Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Arch Virol*. 2016; 161(7):1797-806.

Niller HH, Banati F, Ay E, Minarovits J. Microbe-induced epigenetic alterations. In: Minarovits J, Niller HH (Eds.), *Patho-Epigenetics of Disease*. Springer, New York, 2012, pp: 419-455.

Niller HH, Szenthe K, Minarovits J: Epstein–Barr virus–host cell interactions: an epigenetic dialog? *Front Genet*. 2014; 5: 367.

Nolan MS, Podoll AS, Hause AM, Akers KM, Finkel KW, Murray KO: Prevalence of chronic kidney disease and progression of disease over time among patients enrolled in the Houston West Nile virus cohort. *PLoS One*. 2012; 7(7): e40374.

Országos Epidemiológiai Központ. HIV/AIDS – Magyarország 2016 szeptember 30. *Epinfo* 2016; 23(45): 549-552.

Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z, Nowotny N: Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(12):2119-22.

Plant EP, Zagorodnyaya T, Rodionova E, Voskanian-Kordi A, Simonyan V, Ye Z, Laassri M: Application of the New Generation of Sequencing Technologies for Evaluation of Genetic Consistency of Influenza A Vaccine Viruses. *Steps Forwards in Diagnosing and Controlling Influenza*. Chapter 2. Intech 2016.

Quiñones-Mateu ME, Avila S, Reyes-Teran G, Martinez MA: Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. *J Clin Virol*. 2014; 61(1): 9-19.

Quintero-Ronderos P, Montoya-Ortiz G: Epigenetics and autoimmune diseases. *Autoimmune Dis*. 2012; 2012:593720.

Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N: Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol*. 2012; 93(Pt 9): 1853-68.

Rehan MK: Epigenetics and diabetes mellitus. *Egypt J Intern Med*. 2016; 28: 39–51.

Rutvisuttinunt W, Chinnawirotpisan P, Simasathien S, Shrestha SK, Yoon IK, Klungthong C, Fernandez S: Simultaneous and complete genome sequencing of

influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform. *J Virol Methods*. 2013; 193(2): 394-404.

Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, Fyodorova M, Gaibani P, Gould E, Niedrig M, Papa A, Pierro A, Rossini G, Varani S, Vocale C, Landini MP: West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19(8): 699-704.

Sampathkumar P: West Nile virus: Epidemiology, Clinical presentation, Diagnostic, and Prevention. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78(9): 1137-44.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA: Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 27–36.

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P: Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014; 59(1):318-27.

Szomor KN, Rigó Z, Bán E, Nagy L, Szalkai T, Balogh Z, Ferenczi E, Takács M: Serologic evidence of West Nile virus infection in patients with exanthema in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2011; 58(2): 157-67.

Tesh RB, Siirin M, Guzman H, Travassos da Rosa AP, Wu X, Duan T, Lei H, Nunes MR, Xiao SY: Persistent West Nile virus infection in the golden hamster: studies on its mechanism and possible implications for other flavivirus infections. *J Infect Dis*. 2005; 192(2): 287-95.

Thomson E, Ip CL, Badhan A, Christiansen MT, Adamson W, Ansari MA, Bibby D, Breuer J, Brown A, Bowden R, Bryant J, Bonsall D, Da Silva Filipe A, Hinds C, Hudson E, Klenerman P, Lythgow K, Mbisa JL, McLauchlan J, Myers R, Piazza P, Roy S, Trebes A, Sreenu VB, Witteveldt J; STOP-HCV Consortium, Barnes E, Simmonds P: Comparison of Next-Generation Sequencing Technologies for Comprehensive Assessment of Full-Length Hepatitis C Viral Genomes. *J Clin Microbiol*. 2016; 54(10): 2470-84.

Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I: Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses*. 2016; 8(4): 96.

Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL: Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol*. 2010; 84(12): 6033-40.

Wei B, Kang J, Kibukawa M, Chen L, Qiu P, Lahser F, Marton M, Levitan D: Development and Validation of a Template-Independent Next-Generation Sequencing Assay for Detecting Low-Level Resistance-Associated Variants of Hepatitis C Virus. *J Mol Diagn*. 2016; 18(5): 643-56.