

# Összehasonlító molekuláris genetikai vizsgálatok a norovírusok diagnosztikájában

Ph.D. értekezés tézisei

**Kele Beatrix**

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet



Szeged

2011



# **Összehasonlító molekuláris genetikai vizsgálatok a norovírusok diagnosztikájában**

Ph.D. értekezés tézisei

**Kele Beatrix**

Témavezető: Prof. Dr. Deák Judit

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet

Szeged

2011

**RÖVIDÍTÉSEK**

BSA	Bovine Serum Albumin
ELISA	enzim-függő immunológiai vizsgálat
EtBr	etídium-bromid
GGI:	I. genocsoport
GGII:	II. genocsoport
HuCV	humán calicivírus
IEM	immunelektronmikroszkópia
NLV	Norwalk-szerű vírusok
Nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret
PCR	polimeráz-láncreakció
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripcióval kapcsolt polimeráz-láncreakció

## BEVEZETÉS

A humán calicivírus fertőzések közegészségügyi fontosságát az elmúlt pár évben ismerték fel. A norovírusok tehetők felelőssé a nem bakteriális eredetű közösségi járványok 70-90%-áért és a sporadikus esetek 20%-áért. A járványok gyors terjedésének oka egyrészt a vírusok nagymértékű rezisztenciája hőmérséklettel, étellel, savval és fertőtlenítőszerekkel szemben (rezisztensek 60°C-on történő inkubálásra 30 percig, 20%-os étellel szemben 4°C-on 18 órán át, pH 2.7-en szobahőmérsékleten 3 órán át), másrészt az alacsony infektív dózis (10-100 vírupartikulum) már elegendő a fertőzés kialakításához. Nagyon gyakran a fertőzés után még rövidtávú immunitás sem alakul ki, ezért gyakori a reinfekció.

A humán calicivírusokat 1929-ben Zahorsky fedezte fel, és írta le először az általuk kiváltott betegséget, a "winter vomiting disease-t". 1968-ban az Ohio állambeli Norwalk városában az egyik általános iskola tanárai és diákjai fertőződtek meg a vírussal, a betegség jellemző tünetei a hányás, hasmenés, abdominális fájdalom és diszkomfortérzés voltak. A járványt okozó vírust 1972-ben Kapikiannak sikerült azonosítani immunoelektronmikroszkópos technika segítségével. A norovírusokat elnevezték kis kerek struktúrált vírusoknak (SRSV-small round-structured viruses) és ekkor még elkülönítették a keheleszerű bemélyedést mutató saporovírusoktól. 1998-ban, a vírusgenom szekvenálása után derült fény arra, hogy a noro- és saporovírusok külön nemzetségbe, de ugyanazon családba, a *Caliciviridae* családba tartoznak.

A humán calicivírusok 27-40nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, burok nélküli partikulumok, melyeknek genetikai információtartalmát pozitív, egyszálú RNS alkotja. A vírus kapszid 90 dimerből épül fel, melyet 180 kapszomer alkot. A genom 3 nyitott leolvasási keretből áll, az ORF1 kódolja az RNS-függő RNS polimerázt, az ORF2 a kapszid proteint, az ORF3 feltehetően szintén struktúrális fehérjét kódol. A virális nukleinsavra jellemző a nagyfokú genetikai variabilitás, melynek következtében a norovírus diagnosztika számos nehézségbe ütközik.

A norovírus laboratóriumi diagnosztikára elsősorban székletminta alkalmas, de lehetőség van hányadékból, anyatejből és élelmiszerekből történő víruskimutatásra is. A vírus szövetkultúrán nem szaporítható, ezért kimutatása és vizsgálata hosszú ideig akadályokba ütközött. A diagnosztika kezdetben IEM segítségével valósult meg, ez azonban költséges, szakképzett személyzetet igénylő eljárás, melynek szenzitivitása alacsony, nagy mennyiségű,  $10^6$  partikulum/ml szükséges a sikeres diagnosztikához. Az utóbbi években kereskedelmi forgalomban is kapható norovírus antigén kimutatására alkalmas kitek kerültek bevezetésre a

norovírusok diagnosztikájára, melyeknek érzékenysége jobb, mint az IEM, már  $10^4$ - $10^5$  partikulum/ml elegendő a sikeres kimutatáshoz. Járványokból származó, nagyszámú minta egyidejű vizsgálatára kiválóan alkalmas az ELISA technika. A norovírus diagnosztika "gold-standard" módszere az RT-PCR. A vírus nagyfokú variabilitásának köszönhetően azonban ennek a technikának is megvannak a buktatói, kulcsfontosságú a megfelelő specificitású és szenzitivitású primer-pár használata a PCR vizsgálat során.

## CÉLKITŰZÉSEK

- 1) Norovírus RT-PCR módszer alapvető követelménye, hogy megfelelő tisztaságú és mennyiségű vírus RNS álljon rendelkezésünkre a vizsgálathoz, ezért célul tűztük ki a leghatékonyabb RNS izolálási módszer kifejlesztését.
- 2) A norovírus RT-PCR módszer bevezetése után célul tűztük ki a real-time RT-PCR módszer bevezetését.
- 3) Mind a hagyományos, mind a real-time módszer alkalmazásánál a Jiang és mtsai által tervezett primer-párokat használtuk. Vizsgálataink során derült fény arra, hogy sok aspecifikus terméket kaptunk a reakciók során, ezért célul tűztük ki egy új, specifikus primer-pár tervezését, mellyel a Magyarországon cirkuláló törzsek diagnosztikája szenzitívebbé és specifikusabbá tehető.
- 4) A nagyszámú székletminta egyidejű vizsgálatára a PCR technika drága és időigényes, ezért célul tűztük ki egy antigén-ELISA teszt bevezetését. Az ELISA módszert összehasonlítottuk két, kereskedelmi forgalomban kapható PCR kittel is.
- 5) A megfelelő diagnosztikai eljárások birtokában célul tűztük ki a norovírusok valós kóroki helyzetének megismerését elsősorban sporadikus esetekben, mert 2002.-ben még nem volt nemzetközi irodalmi adat ilyen megfontolásból végzett vizsgálatokra, továbbá halmozott előfordulás, valamint lokális járványos előfordulás eseteiben Szegeden és környékén.

## **ANYAGOK és MÓDSZEREK**

### ***Széketminták***

A minták csecsemőktől, kisdedekektől, gyermekektől és felnőttektől származtak (házi orvosok betegei és/vagy a Szegei Tudományegyetem ambulanciáin és osztályain ápolt betegek), akik akut gastroenteritis miatt kerültek ellátásra. A tanulmányból kizárásra kerültek azok a minták, melyekből ismert, enterális kórokozó (egyéb vírus, baktérium, féreg vagy parazita) volt kimutatható. Minden betegről egy székletmintát gyűjtöttünk a fertőzés akut szakaszában, melyet a mintavétel napján feldolgoztunk, a feldolgozásig +4°C-on tároltuk. A mintákat feldolgozás után -20°C-ra helyeztük. Minden székletmintából 10-50%-os szuszpenziót készítettünk 1 ml steril PBS-ben, majd a mintákat 12.000g-vel 15 percig centrifugáltuk. Az RNS izoláláshoz a minták felülúszóját használtuk.

### ***RNS izolálás***

5 különböző RNS izolálási eljárást hasonlítottunk össze a vizsgálataink során. Minden eljárással ugyanazt a 100 mintát dolgoztuk fel a gyártó által megadott paraméterekkel. Az RNS izolálási metodikák sorrendben a következők voltak:

1. Trizol-alapú módszerek:
  - a) Trizol-Genetron metodika
  - b) TRI Reagent (Sigma, Saint Louis, USA)
2. V-Gene Total RNA Preparation kit
3. V-Gene viral RNA/DNA Preparation kit
4. Roche Total RNA Preparation kit

A kereskedelmi forgalomban kapható RT-PCR kitekhez a nukleinsav-izolálást a QIAmp Viral RNA Mini kit-tel végeztük, mivel a gyártók erre az RNS izolálási metodikára validálták a kitjeiket.

### ***Hagyományos RT-PCR vizsgálat***

Vizsgálatainkhoz kezdetben a Jiang és mtsai által 1999-ben tervezett primer párt használtuk: HuCV sense primer p289, 5'-TGACAATGTAATCATCACCATA (nt pozíció: 4865-4886) és az antisense primer p290/a, melynek nukleotid sorrendje még nem publikált. Az általunk

tervezett norovírus primer-pár: 5'-CCCTAGAAATCATGGT-3' (nt pozíció 46-60) és 5'-CCAGTGGGCGAT-3' (nt pozíció 196-185).

### ***Reverz-transzkripció***

Az RT-mix végtérfogata 47,5 µl volt, melyhez 3 µl tisztított RNS-t mértünk, majd az elegyet 42°C-on 1 órán át inkubáltuk. Negatív kontrollnak steril PBS-t, pozitív kontrollnak ismert szekvenciájú HuCV-t tartalmazó mintát használtunk.

### ***PCR***

50 µl PCR master-mixet mértünk a fent említett RT-mixhez, majd a következő PCR programot alkalmaztuk a Perkin Elmer GeneAmp PCR 9600 System-en: denaturáció 94°C-on 1 perc, annealing 37°C-on 2 percig majd extenzió 72°C-on 1 percig. A végső extenzió 72°C-on 10 percig tartott.

### ***Agaróz gél elektroforézis***

A várható PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélben elektroforetizáltuk, majd UV fény alatt EtBr-os festéssel vizsgáltuk. A gélfotókat Kodak EDAS 290 készülékkel készítettük, molekulasúly markerként 100bp-os DNS-létrát használtunk. A várt DNS termék mérete a Jiang által tervezett primer párral dolgozva 310bp, az általunk tervezett primer párral dolgozva 130bp volt.

### ***Szekvencia analízis***

Az amplifikált termékek nukleotid sorrend meghatározását ABI PRISM Model 3100 Version 3.7-es készülékkel végeztük, a termékek identifikálása a BLAST program segítségével történt.

### ***SybrGreen real-time RT-PCR***

A valós-idejű PCR vizsgálatok kivitelezéséhez LightCycler 1.5-ös készüléket használtunk.

#### **a) Kétlépéses real-time RT-PCR:**

A reverz transzkripció az előbbieken leírt módszerrel történt. A PCR reakcióhoz 9 µl master-mixet mértünk össze, melyhez 1 µl cDNS-t mértünk. A PCR ciklusok száma 35 volt a következő hőmérsékletekkel és inkubációs időekkel: elődenaturáció 95°C-on 30mp; a denaturációt (95°C 0mp) az anelláció követte (37°C 20mp) minden ciklusban, majd



extenzióval zárult (72°C 15mp). A minták egyidejűleg történő detektálásához SybrGreen festéket használtunk, az emissziót mindig az extenzió befejeztével mértük. A minták minőségi analízise olvadáspont-görbe alapján történt, a keresett termék olvadáspontja 85,7°C ±0,5°C volt.

#### **b) Egylépéses real-time RT-PCR**

Az egylépéses real-time RT-PCR technika alkalmazásánál a reverz transzkripciót a gyártó által ajánlott paraméterekkel végeztük. A reverz-transzkripciót real-time PCR vizsgálat követte. A reverz transzkripció 43°C-on 60 percig történt, melyet egy 2 perces 94°C-os inkubációs lépés követett. A PCR kondíciók a következők voltak: denaturációs, anellációs és extenziós idők és hőmérsékletek sorrendben: 94°C 12mp, 42°C 20mp, és 68°C 20mp. A PCR ciklusok száma 35 volt. A minták egyidejűleg történő detektálásához SybrGreen festéket használtunk, keresett termék olvadáspontja 85,7°C ±0,5°C volt.

#### **c) Kétlépéses real-time RT-PCR metodika az újonnan tervezett primer párral**

A reverz-transzkripciót a fent említett körülmények között végeztük. A PCR master-mix térfogata 9 µl volt, melyhez 1 µl cDNS-t mértünk. A PCR reakció 35 ciklusból állt, a következő inkubációs időket és hőmérsékleteket tartalmazta: elődenaturáció 94°C-on 30mp; minden ciklusban denaturáció 94°C 0mp, anelláció 42°C 20mp; és extenzió 72°C 15mp. A minták egyidejűleg történő detektálásához SybrGreen festéket használtunk, a keresett termék olvadáspontja 82°C ±0,5°C volt.

#### ***Argene Calici/astrovirus Consensus kit***

Az RNS izolálást és a PCR reakciót a gyártó által megadott körülmények közt végeztük. A kit internális kontrollt is tartalmaz, mellyel az esetleges inhibítorok jelenléte is vizsgálható a mintákban.

#### ***Cepheid Norovirus Primer and Probe Set***

Az RNS izolálást és a PCR reakciót a gyártó által megadott körülmények közt végeztük. A kit internális kontrollt is tartalmaz, mellyel az esetleges inhibítorok jelenléte is vizsgálható a mintákban. A hibridizációs próbáknak köszönhetően a két leggyakoribb genotípus, a GI és GII egymástól elkülöníthető volt.

**IDEIA™ Norovirus ELISA Test**

Az ELISA teszt segítségével a székletmintából kimutatható mind a norovírus GGI mind a GGII felületi antigénje. A vizsgálatokat a gyártó utasításai alapján végeztük el.

**EREDMÉNYEK**

- 1) Az RNS izoláló (Roche), és a V-Gene kitekét hasonlítottuk össze a hagyományos, Trizol-alapú RNS izolálási eljárásokkal. Tapasztalataink szerint a Roche RNS izoláló kit nem távolította el az elvárt hatékonysággal az inhibitorokat a mintákból, és a költségeket tekintve sem volt megfelelő, a V-Gene kittel összehasonlítva. A Trizol-alapú izolálási eljárás olcsó, azonban szakképzett munkaerő és lényegesen több idő szükséges a megfelelő tisztaságú nukleinsav előállításához.
- 2) 30 mintát hasonlítottunk össze hagyományos RT-PCR és a real-time RT-PCR módszerrel. Mindkét metodikával pozitívnak bizonyult 4 (13,3%) minta, negatívnak 3 (10%) minta. A real-time RT-PCR módszerrel pozitívnak bizonyult 20 (66,7%) minta, melyek hagyományos RT-PCR módszerrel negatívnak bizonyult. Mindössze 3 (10%) olyan mintát találtunk, mely pozitívnak bizonyult a hagyományos módszerrel, de negatív lett a real-time technikával.
- 3) A Jiang és mtsai által tervezett primer-párral dolgozva számos aspecifikus terméket kaptunk a PCR reakciók során, így célul tűztük ki egy új primer-pár tervezését, mellyel a norovírus diagnosztika specifikusabbá és szenzitívebbé tehető. Az új primer-párral ismét optimalizáltuk a kétlépéses real-time RT-PCR reakció körülményeit, majd bevezettük az egylépéses real-time RT-PCR módszert is. Összesen 110 mintát hasonlítottunk össze a két különböző primer párral. Mindkét primerrel pozitívnak bizonyult 5 (4,5%) minta, negatív lett 72 (65,5%) minta. Az új primer párral dolgozva 32 (29,1%) minta lett pozitív, melyek a Jiang-féle primerrel dolgozva negatív eredményt adtak. Mindössze egy olyan mintát (0,9%) találtunk, mely a Jiang-féle primer párral pozitív lett, de negatív az újonnan tervezett primerekkel.
- 4) A nagyszámú székletminta egyidejű laboratóriumi vizsgálata PCR módszerrel nem kivitelezhető az időigényessége illetve a költsége miatt, ezért a vírus antigén kimutatására alkalmas ELISA teszt bevezetése mellett döntöttünk (IDEIA™ mivel korábbi

tanulmányokban a teszt megbízhatónak bizonyult). Az ELISA tesztet összehasonlítottuk két, kereskedelmi forgalomban kapható PCR kittel is. Az eredményeink azt mutatták, hogy az ELISA teszt érzékenysége (78,9%) bár alacsonyabb, mint a PCR módszeré, mégis, járványokból és sporadikus esetekből származó minták szűrővizsgálatára nagyfokú specificitása (100%) miatt alkalmas. A két, kereskedelmi forgalomban kapható PCR (Argene Calici/Astrovirus Kit és Cepheid Norovirus Primer and Probe Set) kit közül az Argene cég által gyártott rendszer bizonyult érzékenyebbnek (Argene kit szenzitivitás: 92,8%, specificitás: 100%; Cepheid kit szenzitivitás: 91,2%, specificitás: 100%).

- 5) 2003. január 1.-2011. június 16. között 5.031 székletmintát vizsgáltunk meg norovírus kimutatása céljából. A minták 16,6%-a bizonyult pozitívnak. Habár rotavírus vizsgálatra közel kétszer ennyi minta érkezett ezen időintervallum alatt, a rotavírus pozitívitas mindössze 12,1% volt. A 14 év alatti gyermekektől származó minták döntő többsége fekvőbeteg intézményből, elsősorban a Gyermekkorház Fertőző Osztályáról származott. Közel háromszor annyi norovírus pozitív eredményt regisztráltunk a fekvőbeteg intézményekben, mint a járóbeteg gyermekgyógyász házi orvosok által beküldött mintákban. Esethalmozódást a Szegei Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ fekvőbeteg osztályain az elmúlt 9 évben 10 esetben észleltünk.

## **MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK**

- 1) A PCR módszer nagyon fontos alapköve a mikrobiológiai diagnosztikának. Az eredményes PCR reakció optimalizálás ellenére is negatív marad, megfelelő mennyiségű és minőségű nukleinsav nélkül, melynek elengedhetetlen feltétele a megfelelő nukleinsav izolálás. A hagyományos, Trizol alapú módszerekkel nagyon nagy tisztaságú RNS izolálható biológiai mintákból, azonban rendkívül időigényes, nagyszámú minta egyidejű vizsgálatánál nehezen kivitelezhető. A preparálás során használt vegyszerek egy része erősen mérgező. A kereskedelmi forgalomban kapható kitéket használva a preparálási idő lényegesen lerövidül, azonban nem mindegy, milyen mintához melyik minőségű izoláló kitéket használunk. Több tanulmány foglalkozik a különböző, biológiai eredetű minták inhibitorainak eltávolításával. A székletben számos komponens van, melyek gátolhatják a PCR reakciót (lipidek, vér, stb.), így ezek eltávolítása a mintákból nélkülözhetetlen. Megfigyelték, hogy a felnőttek székletében több inhibitor található, mint a kisgyermekek mintáiban, sőt, 6 hónapos kornál fiatalabbak székletében egyáltalán nem találtak a

molekuláris vizsgálatokat gátló anyagokat. Néhány tanulmány foglalkozik a BSA inhibitor-gátló hatásával. Bár a BSA csökkenti a PCR reakció szenzitivitását, ugyanakkor 100%-ban gátolta az inhibitorokat. Tanulmányunk során megvizsgáltuk a hagyományos nukleinsav izolálási módszereket, illetve kiteket, és azt találtuk, hogy a különböző kitek használatával egyszerre több minta kezelhető, időtakarékosabb, és a megfelelő kiindulási anyaghoz választott kittel dolgozva nagy tisztaságú nukleinsav állítható elő, és közben a környezeti terhelés is minimalizálható.

- 2) A norovírusok szövettenyészetben nem szaporíthatók, így kezdetben a fertőzés igazolása kizárólag IEM segítségével történt. Ez az eljárás azonban költséges, nagy mennyiségű intakt partikulumot igényel, ezért a kutatók a molekuláris módszerek felé fordultak, és így vált a norovírus diagnosztika "gold-standard" metodikája az RT-PCR. Kezdetben hagyományos RT-PCR módszerrel történt a nukleinsav amplifikáció, melyet egy agaróz-gélelektroforézis utáni termékazonosítás követett. Lévén időigényes metodika, a klinikus kollégák részéről felmerült az igény a real-time RT-PCR módszer bevezetésére a norovírus diagnosztikában. Egyszerűsége miatt a SybrGreen alapú real-time RT-PCR módszer bevezetése mellett döntöttünk, számos más laboratóriumhoz hasonlóan. Néhány diagnosztikai laboratóriumban TaqMan próbával történik a specifikus termékek detektálása. Vizsgálataink egyértelműen igazolták, hogy Szeged és vonzáskörzete területén a II-es genocsoport okozta a norovírus infekciók többségét mind sporadikus esetekben, mind az esethalmozódásokban, járványok alkalmával.
- 3) A norovírusok genetikailag magas variabilitással rendelkeznek. Ezért volt nehéz a genomjukban olyan szakaszt találni, mely relatíve konzervatívnak tekinthető. A norovírus diagnosztikában használt primerek döntő többsége az RNS-függő RNS polimeráz egy darabját ismeri fel, azonban vannak primerek, melyeket a kapszidot kódoló régióra terveztek. Újonnan bevezetett és alkalmazott matematikai algoritmust felhasználva generáltunk egy új primer-párt, mellyel az európai régióban cirkuláló törzsek kimutathatóak.
- 4) A norovírusok okozta járványok felhívták a figyelmet a kórokozó etiopatológiai fontosságára, melynek köszönhetően a vizsgálatkérések száma jelentősen megemelkedett. Nagyszámú minta egyidejű vizsgálatára a PCR módszer nem alkalmas, ezért az antigén-

ELISA teszt bevezetése mellett döntöttünk. Az antigén kimutatására szolgáló tesztek közül a szakirodalom az IDEIA<sup>TM</sup> kítet találta a legmegbízhatóbb gyorsdiagnosztikai tesztnek. Az ELISA kítet összehasonlítottuk két magas érzékenységű és specificitású PCR teszttel, és bár az ELISA teszt szenzitivitása alacsonyabb, mint a PCR teszteké, de specificitása 100%-os, így alkalmas járványokból és halmozódásokból származó klinikai minták vizsgálatára, és a betegség akut szakaszában a sporadikus esetek székletmintáiból is nagy valószínűséggel kimutatható a virális antigén.

- 5) Már régóta ismert a szakirodalomban, hogy a gastroenteritises járványok többségéért a norovírusok felelősek. Szakirodalmi adatok alapján, sporadikus esetekből származó mintáknál a norovírusok csak a második helyet foglalják el a rotavírusok mögött. Az elmúlt 9 év vizsgálati anyagát feldolgozva elmondhatjuk, hogy régióinkban a norovírusok által okozott sporadikus gastroenteritisek száma magasabb, mint a sporadikus rotavírus gastroenteritiseké. Kor- vagy nemek szerinti eloszlásban szignifikáns különbség nem volt kimutatható. Az elmúlt 9 évben mindössze 10 esethalmozódást figyeltünk meg a Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ klinikáinak különböző osztályain. Annak köszönhetően, hogy a gyors mikrobiológiai diagnosztikai módszerek segítségével a fertőzött betegek kiszűrhetők, az egészségesektől elkülöníthetők, így a nagyobb járványok megelőzhetővé váltak.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte hálámat Prof. Dr. Deák Juditnak, aki a kezdetektől fogva irányítja a munkámat, hasznos tanácsokkal látott el, végig bátorított a munka során és bevezetett a vírusdiagnosztika rejtelmeibe.

Nagyrabecsülésemet szeretném kifejezni Dr. Somogyvári Ferencnek, aki értékes javaslatokkal, építő jellegű tanácsokkal látott el a real-time PCR technika mikrobiológiai diagnosztikában történő alkalmazásával kapcsolatban.

Szeretném megköszönni Dr. Reuter Gábornak, hogy a calicivírus diagnosztika alapjait megtanította.

Köszönöm Szűcs György Professzor Úrnak, hogy intézetében a calicivírus diagnosztikát elsajátíthattam.

Köszönöm Prof. Dr. Duda Ernőnek a sok hasznos tanácsot, amivel munkám során ellátott.

Különleges köszönettel tartozom mindazoknak a cégeknek, akik anyagi forrás hiányában biztosították laboratóriumunk számára a vegyszereket és a kiteket.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat a Víruslaboratórium egykori és jelenlegi dolgozóinak (Almásiné Lohr Mária, Kispéterné Gál Mónika, Lakóné Tóth Enikő, Nagy Bernadette, Salaki Anikó), türelmükért és rengeteg segítségükért.

Végül köszönöm Családomnak a megértést, a türelmet és a bátorítást.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

1. **Beatrix Kele**, Marianna Papp Abrok and Judit Deak: Sporadic norovirus infections among hospitalized and non-hospitalized 0-3-year-old infants. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2009, **41**: 67-69.

*Impact factor: 1.700*

2. **Beatrix Kele**, György Lengyel, Judit Deak.: Comparison of an ELISA and two RT-PCR methods for norovirus detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 2011, **70**: 475-8.

*Impact factor: 2.451*

3. **Kele Beatrix**, Somogyvári Ferenc, Deák Judit. Sporadikusan előforduló humán calicivírusok kimutatása molekuláris genetikai módszerekkel. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia*. 2005. **12**. 118-123.

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK LISTÁJA

1. **Kele Beatrix**, Deák Judit. Sporadic norovirus cases in Szeged and its catchment area. International PhD Conference, Szeged (2010)
2. **B. Kele**, M. Ábrók Papp, J. Deák: Epidemiological importance of sporadic human caliciviruses. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54 (Suppl.) pp. 1-153 (2007) DOI: 10.1556/Amicr.54.2007.Suppl.1
3. **Kele, B.**, Somogyvári, F., Deák, J.: Comparison of different PCR methods for detection of human caliciviruses. *8th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology*, Geneva, April 27-30, 2005.
4. **Kele B**, F Somogyvári, J Deak. Do human caliciviruses cause epidemics exclusively? *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52:(Suppl) p. 69. (2005).

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

1. **Kele B.:** Csecsemő és kisdedkori légúti és gastrointestinalis vírusfertőzések. „Szegedi Fórum a gyermektüdőgyógyászatról”, 2011.03.19.
2. **Kele B.:** Noro-és Sapovírusok gyakorisága Magyarországon. Klinikai mikrobiológiai és klinikai genetikai OFTEX továbbképzés, Szeged, 2010. 04.21.
3. **Kele B.:** Sporadikusan előforduló *Humán calicivírusok* kimutatása molekuláris genetikai módszerekkel, 2005. június 9. Magyar Infektológiai Társaság

4. **Kele B**, F Somogyvári, J Deák. A humán calicivírusok kizárólag járványokat okoznak? Fiatalok Tudományos Fóruma. 9. Dr. Cserháti István Elékülés, 2005. október 7., Szeged (2005)
5. **Kele B.**: Nukleinsav izolálási eljárások. Molekuláris genetikai mikrobiológiai diagnosztikai OFTEX tanfolyam, Szeged, 2005 (CD-n megjelent)
6. **Kele B.**: HuCV-ok kimutatása hagyományos és RT-PCR-rel. Molekuláris genetikai mikrobiológiai diagnosztikai OFTEX tanfolyam, Szeged, 2005

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

### *Tudományos dolgozatok:*

1. Nadine T. Nehme, S. Liégeois, **Beatrix Kele** et al.: A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. PLOS Pathogens, 2007; 3(11): 1694-1709.
2. Annaházi A, Terhes G, **Kele B**, Deák J, Rosztóczy A, Tizslavicz L, Wittmann T, Róka R. Fulminant Epstein-Barr virus esophagitis in an immunocompetent patient. ENDOSCOPY (2011) (in press).

*Impact factor: 6.096*

### *Proceedings kiadványban megjelent 1 oldalas absztrakt:*

1. Deák J, Z. Kozinszky, T. Sari, **B. Kele** and A. Pal: Determination of *Chlamydia trachomatis* infections in pregnant women by means of TaqMan PCR. *6th meeting of the European society for Chlamydia research*, Aarhus, Denmark, July 1-4, 2008.
2. Deák, J., Tóth, J., Somogyvári, F., **Kele, B.**, Nagy, E., Sipka, R., Szabó, B. A.: Comparison of *Chlamydia pneumoniae*-specific DNA detection methods by PCR and two different RT-PCR methods. *5th meeting of the European Society for Chlamydia Research*, Budapest, September 1-4, 2004.

### *Folyóirat kivonatok:*

1. **Kele B**, Terhes G, Deák J: Congenital and perinatal cytomegalovirus (CMV) infection, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 58 (Suppl.) pp. 49-50. (2011)
2. Deák J, **Kele B**, Szabó K, Bereczki L, Terhes G: Diagnostic results of pandemic influenza infections in 2009 and 2010 at the Department of Clinical Microbiology, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 58 (Suppl.) p. 20. (2011)



3. Terhes G, **Kele B**, Szakál O, Bereczki Cs, Bartyik K, Túri S, Deák J. Epstein Barr virus-associated post-transplant lymphoma. *Clinical Microbiology and Infection* 16:(Suppl 2) p. 706. (2010)
4. Deak J, G Terhes, **B Kele**, E Lanyi, E Kereszty. Involvement of human parvovirus B19 in the sudden death of a young male. *Journal of Clinical Virology*. 46:(Suppl 1) p. 57. (2009)
5. Pappné Ábrók M, Szabó E, **Kele B**, Deák J. Quantitatív hepatitis B PCR vizsgálatok – a monitorozás jelentősége. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia XV*:(1 Suppl) p. 21. (2008)
6. Deák J., Kozinszky Z., Sári T., **Kele B.**, Pál A.: A *Chlamydia trachomatis* fertőzés kimutatása várandós nők non-invazív módszerrel gyűjtött mintáiban. *STD és Genitális Infektológia I. Évfolyam 1. szám*; 2007.1/1:38. (2007)
7. J. Deák, V. Papp, M. Ábrók Papp, **B. Kele**: Detection of EBV in diseases other than infectious mononucleosis, by qualitative and quantitative real-time PCR. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54 (Suppl.) pp. 1-153 DOI: 10.1556/Amicr.54.2007.Suppl.1. (2007)
8. Deák Judith, Papp Vera, Marianna Ábrok-Papp, **Kele Beatrix**. Detection of Epstein - Barr virus in diseases other than infectious mononucleosis, by qualitative and quantitative real-time PCR. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54:(Suppl) p. 23. (2007)
9. Somogyvári F, Deák J, **Kele B**, Nagy E. Herpes simplex vírus 1 és 2 típusának RT PCR módszerrel történő kimutatása. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* 1:(Suppl) p. 15. (2003)

***Tudományos konferencia absztraktok:***

1. **Kele Beatrix**, Lányi Éva, Deák Judit. Dilatative cardiomyopathia. p. 26. XIII *Parvovirus Workshop*, Helsinki, Finland (2010)
2. Judit Deak, **Beatrix Kele**, Gabriella Terhes. Detection of parvovirus B19 antibodies in different respiratory and non-respiratory diseases.p. 236. *4th European Congress for Virology*, Cernobbio, Como, Olaszország (2010)

3. Deák Judit, Terhes Gabriella, **Kele Beatrix**, Bereczki László. A H1N1 influenza járvány diagnosztikai és epidemiológiai értékelése Szegeden. *Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése*, Debrecen (2010)
4. Deák Judit, **Kele Beatrix**, Pappné Ábrok Marianna, Szabó Edina, Dóczi Ilona, Terhes Gabriella. A HSV I-II típusai által okozott fertőzések vírus szerológiai és molekuláris mikrobiológiai diagnosztikája.p. 11. *Magyar STD Társaság XIII. Nagygyűlése*, Budapest. (2008)
5. Deák Judith, **Beatrix Kele**, Mariann Ábrok, Marta Högye, Miklos Csanady. The role of viruses in the development of cardiomyopathy.p. 241. *Third European Congress of Virology*, Nürnberg (2007)
6. Deák J, Pappné Ábrók M, **Kele B**, Domeika M.: Preliminary results of a survey on sexually transmitted disease management in Hungary. *The 23rd IUSTI-EUROPE Conference on sexually transmitted infections and HIV/AIDS*, Cavtat/Dubrovnik, Croatia, October 11-14, (2007)
7. Nehme, T. N., **Kele, B.**, Liegeois, S., Pradel, E., Hoffmann, A. J., Ewbank, J. J., Ferrandon, D.: The gut immune response and phagocytosis by blood cells control intestinal infections in *Drosophila*. *Conferences Jacques-Monod (Insect immunity: the post-genomic era)*, Roscoff (France), June 10-14, (2006)
8. Hajdú, E., Benkő, R., Matuz, M., **Kele, B.**, Zöllei, É., Rudas, L., Nagy, E.: Baktérium és rezisztencia térkép az SZTE, ÁOK, Belgyógyászati Intenzív Osztályán 1999-2002. IX: *Országos Antibiotikum Konferencia*, Hévíz, November 20-22, (2003)