

PERZISZTENS FERTŐZÉST OKOZÓ HEPATITIS VÍRUSOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATAI

Doktori (Ph.D.) értekezés

Malikné Dencs Ágnes

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Iskolavezető: Dr. Erdei Anna

Immunológia doktori program
Programvezető: Dr. Erdei Anna



Témavezető: Dr. Takács Mária

Budapest, 2012.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI HÁTTÉR	6
2.1. PERZISZTENS FERTŐZÉST OKOZÓ KLASSZIKUS HEPATITIS VÍRUSOK	6
2.1.1. <i>A hepatitis B vírus</i>	6
2.1.1.1. A HBV felépítése és fehérjei.....	6
2.1.1.2. Replikáció.....	8
2.1.1.3. Terjedés és megelőzés	9
2.1.1.4. Epidemiológia	10
2.1.1.5. A betegség lefolyása.....	11
2.1.1.6. A HBV ellen kialakuló immunválasz.....	12
2.1.1.7. Mutáns HBV változatok	13
2.1.1.8. Terápia.....	14
2.1.2. <i>A hepatitis C vírus</i>	14
2.1.2.1. A HCV felépítése és fehérjei.....	14
2.1.2.2. Replikáció.....	16
2.1.2.3. Terjedés és megelőzés	17
2.1.2.4. Epidemiológia	18
2.1.2.5. A betegség lefolyása.....	19
2.1.2.6. A HCV ellen kialakuló immunválasz.....	20
2.1.2.7. Terápia.....	21
2.2. NEM KLASSZIKUS HEPATITIS VÍRUSOK.....	22
2.2.1. <i>A hepatitis G vírus / GB vírus C</i>	22
2.2.1.1. A hepatitis G vírus/GB vírus C felfedezése és rendszertana.....	22
2.2.1.2. A hepatitis G vírus/GB vírus C felépítése és fehérjei	23
2.2.1.3. Replikáció.....	24
2.2.1.4. Terjedés és epidemiológia	24
2.2.1.5. A fertőzés lefolyása	25
2.2.1.6. A GBV-C ellen kialakuló immunválasz.....	25
2.2.2. <i>Az Anellovirusok</i>	25
2.2.2.1. Az Anellovirusok felfedezése és rendszertana.....	25
2.2.2.2. Az Anellovirusok felépítése és fehérjei	27
2.2.2.3. Replikáció.....	28
2.2.2.4. Terjedés	28
2.2.2.5. Epidemiológia	28
2.2.2.6. A fertőzés lefolyása.....	29
2.2.2.7. A TTV ellen kialakuló immunválasz	30
2.1.2.8. Sertés TT vírusok	30
2.3. MOLEKULÁRIS JÁRVÁNYÜGYI VIZSGÁLATOK	32
3. CÉLKITŰZÉSEK	34
3.1. NEM KLASSZIKUS HEPATITIS VÍRUSOK PREVALENCIÁJA ÉS GENOTÍPUSAI MAGYARORSZÁGON.....	34
3.2. KLASSZIKUS HEPATITIS VÍRUSOK OKOZTA JÁRVÁNYOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA	35
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	36
4.1. VIZSGÁLATI ANYAGOK	36

4.1.1. HGV/GBV-C vizsgálatok.....	36
4.1.2. Humán TT vírus vizsgálatok.....	36
4.1.3. Sertés TT vírus vizsgálatok.....	37
4.1.4. Hepatitis B vírus vizsgálatok.....	37
4.1.5. Hepatitis C vírus vizsgálatok.....	37
4.2. NUKLEINSAV KIVONÁS.....	38
4.2.1. Sertés szövetminták előkészítése.....	38
4.2.2. Fenol-kloroformos nukleinsav extrakció vérsavóból.....	38
4.2.3. Nukleinsav kivonás szilika oszlopokon vérsavóból.....	38
4.3. REVERZ TRANZSKRIPCIO.....	39
4.3.1. A HGV/GBV-C vizsgálatok.....	39
4.3.2. Hepatitis C vírus vizsgálatok.....	39
4.4. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIO.....	39
4.4.1. HGV/GBV-C vizsgálatok.....	39
4.4.2. TT vírus vizsgálatok.....	41
4.4.3. Sertés TT vírus vizsgálatok.....	41
4.4.4. Hepatitis B vírus vizsgálatok.....	42
4.4.5. Hepatitis C vírus vizsgálatok.....	43
4.5. AGARÓZ GÉLELEKTROFORÉZIS.....	45
4.6. NUKLEOTIDSORREND MEGHATÁROZÁS.....	45
4.6.1. PCR termék klónozása plazmid vektorba.....	45
4.6.2. Nukleotidsorrend-meghatározás A.L.F. szekvenálóval.....	45
4.6.3. Nukleotidsorrend-meghatározás ABI PRISM Genetic Analyzer készüléken.....	46
4.6.4. Nukleotidsorrend-meghatározás MegaBACE 1000 szekvenáló készüléken.....	46
4.7. SZEKVENCIÁK ELEMZÉSE ÉS FILOGENETIKAI ANALÍZIS.....	46
5. EREDMÉNYEK.....	48
5.1. NEM KLASSZIKUS HEPATITIS VÍRUSOK PREVALENCIÁJA ÉS GENOTÍPUSAI MAGYARORSZÁGON.....	48
5.1.1. A HGV/GBV-C előfordulása és genotípusai Magyarországon.....	48
5.1.2. TT vírusok előfordulása és genotípusai egészségügyi dolgozóknál.....	51
5.1.3. Sertés TT vírusok kimutatása és genotipizálása.....	57
5.2. KLASSZIKUS HEPATITIS VÍRUSOK OKOZTA JÁRVÁNYOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA.....	58
5.2.1. Hepatitis B járványok molekuláris vizsgálata.....	58
5.2.2. Nozokomiális hepatitis C járványok molekuláris járványügyi vizsgálata.....	62
6. MEGBESZÉLÉS.....	71
6.1. NEM KLASSZIKUS HEPATITIS VÍRUSOK PREVALENCIÁJA ÉS GENOTÍPUSAI MAGYARORSZÁGON.....	71
6.1.1. A HGV/GBV-C előfordulása és genotípusai Magyarországon.....	71
6.1.2. TT vírusok előfordulása és genotípusai egészségügyi dolgozóknál.....	73
6.1.3. Sertés TT vírusok kimutatása és genotipizálása.....	74
6.2. KLASSZIKUS HEPATITIS VÍRUSOK OKOZTA JÁRVÁNYOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA.....	75
6.2.1. Hepatitis B járványok molekuláris vizsgálata.....	75
6.2.2. Nozokomiális hepatitis C járványok molekuláris járványügyi vizsgálata.....	77
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	82
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	85
9. SUMMARY.....	87
A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	102

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

anti-HBc	hepatitis B vírus c antigénje elleni ellenanyag
anti-HBe	hepatitis B vírus e antigénje elleni ellenanyag
anti-HBs	hepatitis B vírus S antigénje elleni ellenanyag
anti-HCV	hepatitis C vírus elleni ellenanyag
anti-HIV 1/2	HIV 1/2 elleni ellenanyag
ALT	alanin-aminotranszferáz enzim
ÁNTSz	Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat
cccDNS	kovalensen zárt cirkuláris DNS
CD	cluster of differentiation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	Dezoxiribonukleotid trifoszfát
E	envelope - burokfehérje
HBcAg	hepatitis B vírus c antigénje
HBeAg	hepatitis B vírus e antigénje
HBsAg	hepatitis B vírus S antigénje
HBV	hepatitis B vírus
HBxAg	hepatitis B vírus X antigénje
HCC	hepatocelluláris carcinoma
HCV	hepatitis C vírus
HDV	hepatitis D vírus
HIV	Humán immundeficiencia vírus
HVR	hipervariabilis régió
GBV-C/HGV	GB vírus - C/hepatitis G vírus
IFN	interferon
kD	kilodalton
NA	nukleoz(t)id analóg
NK	natural killer – természetes ölősejt
NS	nem strukturális
ORF	nyitott leolvasási keret („open reading frame”)
PCR	polimeráz láncreakció
PKR	protein kináz R
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripció és az azt követő polimeráz láncreakció
SENV	SEN vírus
TLMV/TTMV	Torque Teno minivírus
TLR	Toll-like receptor
TTMDV	Torque Teno midivírus
TTSuV/sTTV	sertés Torque Teno vírus
TTV	Torque Teno vírus
UTR	untranslated region – nem transzlálódó régió
WHO	World Health Organization

1. Bevezetés

A hepatitis a máj gyulladással megbetegedését jelenti, amelyet toxikus anyagok, autoimmun betegségek, és számos különböző fertőző ágens: vírus, baktérium, vagy parazita is okozhat. A virális hepatitisek olyan fertőző megbetegedések, ahol a kórokozó egy vírus, amely vagy elsősorban a májban szaporodik (hepatotróp) és azt betegíti meg, vagy pedig szisztémás fertőzést hoz létre, amelynek csak egyik tünete a máj gyulladása.

Hepatitis vírusoknak azokat a vírusokat nevezzük, amelyek elsősorban hepatotrópok. Ezek valójában taxonómiaiilag egymástól távol álló, felépítésükben és legtöbb tulajdonságukban jelentősen eltérő vírusok, amelyeknek azonban közös jellemzője, hogy szaporodásuk elsődleges helye a máj, a májsejtek. Jelenleg a klasszikus hepatitis vírusok közé a hepatitis A-E vírusokat soroljuk. Közülük perzisztens fertőzést a hepatitis B és C vírusok, valamint a delta ágens (HDV) okozhat. A hepatitis A vírussal kapcsolatban nem írtak le tartós vírushordozást, a hepatitis E vírus pedig a mai álláspontra szerinte csak ritkán, immunhiányos és immunszuppresszált betegekben okozhat perzisztáló fertőzést.

Nem hepatotrópok, de májgyulladást okozhatnak egyes herpeszvírusok (Epstein-Barr vírus, cytomegalovírus, herpes simplex vírus, varicella zoster vírus, humán herpesz vírus 6), entero-, és adenovírusok, a kullancsencephalitis, a kanyaró és a rubeola vírusa.

Számos olyan vírusos májgyulladással megbetegedés fordul elő még ma is, amelyek esetében a kórokozó nem ismert. A diagnosztikai módszerek, és különösen a molekuláris technikák fejlődésével az elmúlt másfél évtizedben több, korábban ismeretlen vírust sikerült felfedezni, amelyek az ismeretlen eredetű májgyulladások egy részének háttérében állhatnak. Ezekről az újonnan felfedezett vírusokról még viszonylag kevés információval rendelkezünk, tehát fontos minél többet megtudnunk szaporodásukról, terjedésükéről, a gazdaszervezettel való kölcsönhatásukról, esetleges kórokozó képességükről.

Vizsgálataim során a klasszikus hepatitis vírusok közül a hepatitis B-vel és C-vel, valamint az újonnan felfedezett, feltehetően szintén májgyulladást okozó Anellovírusokkal, és a hepatitis G vírussal (GB vírus C) foglalkoztam.

2. Irodalmi háttér

2.1. Perzisztens fertőzést okozó klasszikus hepatitis vírusok

A klasszikus hepatitis vírusok közül a hepatitis B (HBV), és a hepatitis C vírusok (HCV) képesek önállóan krónikus fertőzést okozni. Rendkívül sikeres kórokozók, globális népegészségügyi problémát jelentenek. A HBV infekció az egyik legerjedtebb fertőző betegség a világon. Annak ellenére, hogy ma már biztonságos és hatékony oltás áll rendelkezésre ellene, a WHO becslése szerint világszerte 2 milliárd ember fertőződött meg a vírussal, és mindegy 400 millió ma is krónikusan hordozza. A hepatitis C vírus (HCV) a fertőzöttek 70-85%-ában perzisztenciát alakít ki. A Föld lakosságának körülbelül 3%-a hordozza ezt a vírust, és a fertőzöttek száma az utóbbi 10 évben világszerte növekedőben van. A világon előforduló hepatocelluláris carcinomás (HCC) esetek 80 százalékáért krónikus hepatitis B vagy C vírusfertőzés felelős. Ez a negyedik leggyakoribb daganatos betegség a világon, prognózisa rendkívül rossz, és incidenciája évről évre nő.

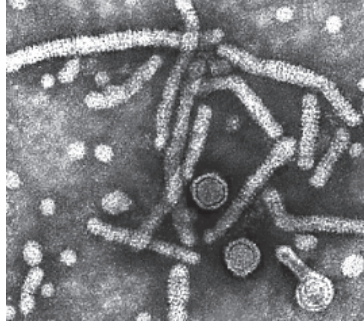
2.1.1. A hepatitis B vírus

A hepatitis B vírus felfedezésének története a 1965-re nyúlik vissza, amikor Blumberg és munkatársai először leírták a vírus felszíni antigénjét, amelyet eleinte Ausztrália antigénnek neveztek. Olyan betegek vérében találták, akik szérum hepatitisben betegedtek meg: így nevezték akkoriban a hosszú lappangási idővel járó májgyulladást. A vírusrészecskéket elektronmikroszkópban 1970-ben Dane figyelte meg először. A hepatitis B vírust jelenleg a *Hepadnaviridae* család *Ortohepadnavirus* nemzetségébe sorolják több emlőállat rokon vírusával együtt. Az *Avihepadnavirus* nemzetségbe madarakat fertőző hepatitis B vírusok tartoznak.

2.1.1.1. A HBV felépítése és fehérvíri

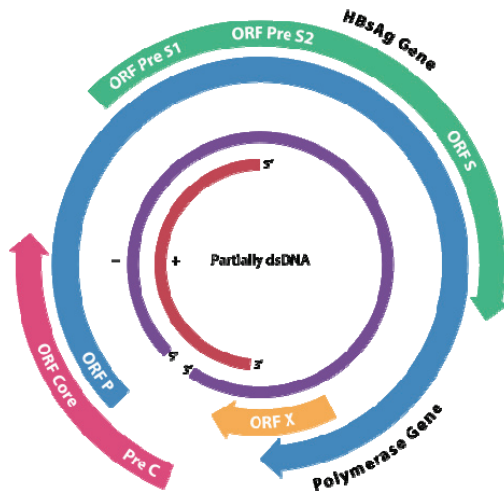
A fertőzött szövet elektronmikroszkópos képén háromféle vírusrészecske figyelhető meg. Kettő közülük csak a HBV felszíni antigénjéből (HBV surface antigén - HBsAg) és gazdasejt eredetű lipidekből áll, nem tartalmaz virális genomot, így nem fertőzőképes. Az egyik részecske 18-22 nm átmérőjű és gömbszerű, a másik változó hosszúságú, filamentózus, szélessége 22 nm körüli. A harmadik változat az úgynevezett Dane-partikulum, a

fertőzőképes komplett virion, ami szintén gömbszerű, de átmérője 42 nm. A komplett virionok lipid burokkal rendelkeznek (1. ábra).



1. ábra. A HBs antigén megjelenési formái elektronmikroszkóppal. (Fotó: Linda M. Stannard)

A kapszidban található a vírus genomjában kódolt polimeráz, valamint a vírus genomja, ami cirkuláris, részlegesen kettős szálú DNS, hossza körülbelül 3,2 kilobázis (2. ábra). A polimeráz a negatív szál 5' végéhez kapcsolódik kovalens kötessel. A genom négy átfedő nyitott leolvasási keretet (open reading frame – ORF) tartalmaz: az S a felszíni antigéneket, a C a kapszidproteint, a P a polimerázt, az X az X proteint kódolja.



2. ábra. A hepatitis B vírus genomszerkezete.

Forrás: Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_B)

Az S leolvasási keret szerkezetileg és funkcionálisan pre-S1, pre-S2 és S régióra osztható. Ezekről eltérő transláció iniciációs helyektől indulva (de azonos keretben) keletkezik a felszíni antigén három eltérő hosszúságú változata: a 39 kD-os „large” (L), 31 kD-os „middle” (M), valamint egy 24 kD-os „small” (S) protein. Ezek a májsejtek citoplazmájában nagy feleslegben termelődnek, és a beteg vérébe és számos testváladékába is beelkerülnek.

A C ORF precore és core szakaszokra osztható, róla szintén kétféle fehérje készülhet. A core protein esetében az átírás a core régiótól, a hepatitis B e („early”) antigénnél (HBeAg) viszont a precore régiótól indul. A precore régió egy szignál peptidet kódol, ami a terméket az endoplazmatikus retikulumba irányítja. Itt a HBeAg végleges mérete poszttranszlációs hasítások után alakul ki, végül a sejt a terméket szekretálja. A HBeAg pontos funkciója nem ismert, de mivel tolerogén hatású, a perzisztencia kialakításában lehet szerepe.

A P ORF-ről íródo polimeráz egy körülbelül 800 aminosavból álló fehérje, amely 3 doménből épül fel. A terminális domén az enkapszidációban és a negatív szál szintézisének elindításában játszik szerepet. A reverz transzkriptáz domén az új genomok szintézisét végzi. A harmadik domén ribonukleáz H aktivitással rendelkezik, lebontja a pregenomi RNS-t és elősegíti a replikációt.

Az X ORF-en kódolt fehérje (HbxAg) 16,5 kD-os multifunkciós protein. Részt vesz jelátvitelben, a DNS javításban, fehérjebontó folyamatokat gátol, de transzkripció aktivátorként is működik. Feltételezik, hogy szerepet játszik a HBV által kiváltott karcinogenezisben [Seeger és mtsai, 2007].

2.1.1.2. Replikáció

A hepadnavírusok jellemzője, hogy bár genomjuk kétszálú DNS, replikációjuk során RNS intermedier keletkezik.

A HBV célsejtjei a hepatocyták, amelyekhez a vírus felszíni antigénjének pre-S doménjén keresztül kapcsolódik. A folyamatban részt vevő receptorokat és a kapszid kiszabadulásának folyamatát még nem ismerjük. A virionokban található részlegesen kétszálú genomok (RC-DNA - relaxed circular DNA) negatív szála komplett, a pozitív szál változó hosszúságú lehet. Az RC-DNS a sejtmagban kiegészül plazmidokhoz hasonló kovalensen zárt DNS-sé (cccDNA – covalently closed circular DNA), amihez a vírus főleg a sejt enzimekhasználatát használja. Egy intracelluláris amplifikációs folyamat következtében egy májsejt akár 50 kópia cccDNS-t is tartalmazhat. A több kópia és a stabil, hosszú felezési idejű forma teszi lehetővé, hogy a genom ne vesszen el a sejtosztódás során, és hozzájárul a vírus hosszú

perzisztálásához. A cccDNS-ről a sejt RNS polimeráz II enzimje RNS másolatokat (pgRNA - pregenomic RNA, pregenomi RNS) készít. Emellett keletkeznek rövidebb, ún. precore RNS-ek is. Az érett pgRNS 5' végén cap található, 3' vége poliadenilált, így egyrészt mRNS-ként működik, másrészt a virális polimerázzal együtt az újonnan keletkezett kapszidokba csomagolódik. Az enzim az intakt kapszid szűk terén belül készíti el a RC-DNS genomot. Először a negatív szálat hozza létre, amelynek első nukleotidja kovalensen kapcsolódik az enzimhez. Az RC-DNS ezután keletkező pozitív szálanak 5' vége valójában egy RNS oligonukleotid, ami a pgRNS-ből marad hátra, és eredetileg a pozitív DNS-szál szintéziséhez szolgált primerként. A reverz transzkripció még azelőtt lezárul, hogy a virion elhagyná a sejtet. A pozitív DNS-szál változó hosszúságát az okozza, hogy az egyes kapszidokba eltérő mennyiségű dNTP kerül. A kapszidok az endoplazmatikus retikulumon át bimbózással kapják meg a lipidburkot, ami ekkor már tartalmazza a háromféle (S, M, L) felszíni antigént. A komplett virionok végül szekréció útján hagyják el a májsejtet [Seeger és mtsai, 2007, Beck & Nassal, 2007].

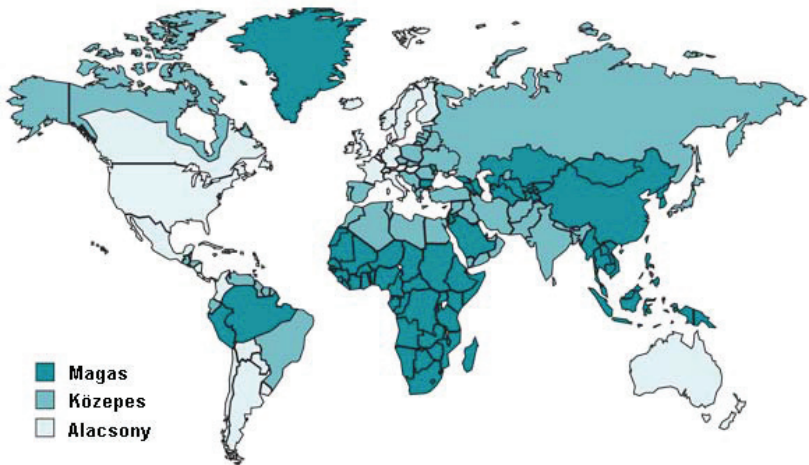
2.1.1.3. Terjedés és megelőzés

A hepatitis B vírus vérrrel, vérkészítményekkel, valamint nemi úton terjed. A vérben és a különböző testváladékokban is nagyon nagy mennyiségben jelen lehet. A vírus igen ellenálló hő-, és fertőtlenítő kezelésekkel szemben, szobahőmérsékleten beszáradva 1 hétig is fertőzőképes marad [Bond és mtsai, 1981]. A donorok szűrésének bevezetése óta a vérrrel történő átvitel nagyon ritka, a fő rizikócsoportot ma az intravénás droghasználók, az egészségügyi dolgozók, és a krónikus dializáltak, valamint HBV hordozó személyek partnerei, illetve családtagjaik jelentik, veszélyeztetettek továbbá a HBV hordozó anyák újszülöttjei.

A hepatitis B vírus ellen rendkívül biztonságos és hatékony vakcina áll rendelkezésre, amely rekombináns úton előállított HBsAg-t tartalmaz. Az aktív vakcináción kívül passzív immunizálásra is van lehetőség hiperimmun gamma-globulinnal. A rekombináns HBV vakcinákkal történő oltás számos országban, így 1998 óta Magyarországon is része a kötelező gyermekkori védőoltási sémának. Serdülőknek, általában 7. osztályos korban adják a nemi úton történő fertőződés kivédésére. Egészségügyi dolgozók, rendőrök, tűzoltók számára is ajánlott, sok munkahelyen kötelező az oltás. HBsAg hordozó anyák újszülöttjeit a születés után 12 órán belül aktívan és passzívan is immunizálják.

2.1.1.4. Epidemiológia

A hepatitis B vírus világon becslések szerint körülbelül 400 millió ember hordozza. Évente félmillióan halnak meg krónikus hepatitis B fertőzés okozta májsugorban (cirrhosis) és májrákban (hepatocelluláris carcinoma, HCC), további 40 ezren pedig akut HBV fertőzés következtében [Belongia és mtsai, 2009]. A vírushordozók gyakorisága területenként eltérő (3. ábra). Hepatitis B vírus hordozás szempontjából endémiás Délkelet-Ázsia és a csendes-óceáni területek (kivéve Japán, Ausztrália és Új-Zéland), valamint Afrika Szaharától délre eső része. Ezeken a területeken a lakosság 8-20%-a fertőzött krónikusan a vírussal. Endémiásnak számítanak továbbá egyes közép-ázsiai államok, valamint a Közel-Kelet, és Kelet-Európa egyes részei. Itt a vírus hordozók aránya 2-8% [WHO, 2008]. Magyarországon a HBV hordozók prevalenciája alacsony, 0,5% alatt van [Rantala és mtsai, 2008].



3. ábra. A krónikus HBV hordozás földrajzi eloszlása (CDC, 2011)

A teljes genom szekvencia minimum 8%-os, vagy a felületi fehérjét kódoló régió minimum 4%-os eltérése alapján 9 HBV genotípust írtak le (jelölésük: A–I), amelyeken belül eddig már több mint 20 szubgenotípust különítettek el [Okamoto és mtsai, 1988, Norder és mtsai, 1994]. A genotípusok jellegzetes földrajzi eloszlást mutatnak. Az A genotípus világszerte előfordul, de Észak-, és Közép-Európában, Észak-Amerikában és Afrikának a Szaharától délre eső területein a leggyakoribb. A B és C genotípusok a Távol-Keleten elterjedtek. A D szintén a világ számos táján előfordul, de elsősorban a Mediterrán régióban,

Észak-Afrikában, és a Közel-Keleten. Az E típus Nyugat-, és Dél-Afrikában jellemző. Az F és H genotípusok főleg Dél-, és Közép-Amerikában mutathatók ki. A ritka G genotípust eddig az Egyesült Államokban és Franciaországban találták meg, az I genotípust pedig 2007-ben írták le Laoszban [Jutavijittum és mtsai., 2007]. Magyarországon elsősorban az „A” és „D” genotípusok fordulnak elő [Szomor és mtsai, 2007]. A genotípusok klinikai szempontból is jelentőséggel bírnak, mivel az általuk okozott megbetegedések lefolyása eltérő lehet.

2.1.1.5. A betegség lefolyása

A HBV nem citopatogén, a máj károsodását a specifikus citotoxikus T-sejtek okozzák, amelyek elpusztítják a fertőzött májsejteket.

Felnőttekben a hepatitis B vírus 90-95%-ban tranziens fertőzést okoz, míg a perinatálisan fertőződtek 90%-a krónikus vírushordozóvá válik. A tranziens fertőzés lefolyása 1-6 hónap. A 30-140 napos inkubációs idő alatt jelentős vírusreplikáció zajlik, amely során akár a máj teljes hepatocytá populációja megfertőződhet. A kialakuló immunválasz azonban a vérből és a májból is képes eliminálni a vírust néhány hét alatt. A fertőzés többnyire tünetmentesen zajlik. A többi esetben a betegség többnyire gyengeséggel, hányingerrel, lázzal és ízületi fájdalmakkal jár, de kialakulhat sárgaság (icterus), és ritkán akut májelégtelenség. Az icterusos betegek 1%-ánál fulmináns hepatitis alakulhat ki, ami rendkívül gyors lefolyású és gyakran halálos kimenetelű. A tranziens fertőzés során a gyógyulás felé mutató kedvező esemény a HBeAg eltűnése, és anti-HBe ellenanyagok megjelenése a vérben. Ezzel egyidőben a vírus DNS mennyisége leesik a szérumban, vagy teljesen el is tűnhet, a vér alanin aminotranszferáz (ALT) szintje normalizálódik, a májban zajló gyulladási folyamatok enyhülnek. Ezt követheti a HBsAg/anti-HBs szerokonverzió, ami a teljes gyógyulás jele. A felszíni antigén elleni neutralizáló ellenanyagok élethosszig tartó immunitást biztosítanak a vírussal szemben.

A krónikus hepatitis B fertőzés akkor áll fenn, ha a vérből 6 hónapon túl is kimutatható a HBsAg. A HBV fertőzés akkor válik krónikussá, ha a kialakuló immunválasz gyenge, ezért főleg az 1 éves kor alatt megfertőződött gyermekek válnak vírushordozóvá. A felnőttek 5-10%-ában szintén krónikussá válhat a fertőzés, ezeknek a betegeknek a 10-25%-a hepatocelluláris carcinómában vagy cirrhosisban hal meg. A korán fertőződött HBV hordozókban a legmagasabb a vírustiter (10^9 - 10^{10} /ml), és a leggyengébb a vírus elleni immunválasz. Immunrendszerük toleranciát mutat a vírussal szemben, így az immunválasz okozta májbetegség bennük a legkevésbé aktív, viszont az interferonnal végzett antivirális sikeres kezelés esélyei is rosszabbak. Évtizedek alatt ebben a betegcsoportban is kialakulhat

hepatocelluláris carcinoma. Amennyiben a vírustiter alacsony, a betegség általában kevés tünettel jár, közben azonban a máj folyamatosan károsodik. A közepesen magas (10^7 - 10^8 /ml) titerű betegek körében a legsúlyosabb a megbetegedés lefolyása. A HBeAg/anti-HBe szerokonverzió krónikus fertőzés esetén is megtörténhet, és javítja a prognózist. A HBeAg eltűnése a vérből azonban az antigén termelésére képtelen mutáns vírus megjelenését is jelezheti. A HBsAg is eltűnhet a krónikus hordozó vérből, de ilyen esetben a virális DNS továbbra is kimutatható lehet, ugyanis a cccDNS képes integrálódni a májsejtek genomjába.

2.1.1.6. A HBV ellen kialakuló immunválasz

A hepatitis B vírussal történt fertőzés után néhány hétig a vírus kópiaszáma alacsony, majd exponenciálisan nő: akár 10^{10} /ml is lehet, és szinte minden egyes májsejt fertőzötté válhat [Ciupe és mtsai, 2007]. Régóta ismert, hogy a vírus eliminációjához erős és tartós adaptív immunválasz szükséges, a természetes immunitás szerepe azonban még kérdéses. Újabban azt feltételezik, hogy a természetes immunrendszer elemei is képesek érzékelni a vírus jelenlétét, és hozzájárulni a későbbi adaptív immunválasz kialakításához. A kezdeti nagymértékű vírusreplikáció feltételezhetően a nagyszámú aktivált NK és NK-T sejt, illetve az általuk termelt INF- γ hatására jelentősen csökken, a HBV specifikus CD8+ T-sejtek pedig csak néhány héttel később jelennek meg [Bertoletti és mtsai, 2006, Durantel és mtsai, 2009, Webster és mtsai, 2004]. A vírus teljes eliminációjához mind a citotoxikus, mind a humorális immunválaszra szükség van. Spontán gyógyuló fertőzések esetén erős, multispecifikus Th1 és CD8+ T-sejt választ figyeltek meg, amely során a CD8+ T-sejtek egyrészt citolitikus mechanizmusokkal elpusztítják a fertőzött májsejteket, másrészt citokinek termelésével gátolják a vírus replikációját. Krónikussá váló fertőzés során ez a reakció gyenge, vagy ki sem mutatható. Szintén összefügg a gyógyulással a vírus burokfehérjéi ellen nagy mennyiségben termelődő neutralizáló ellenanyag.

A HBV-vel csecsemőkorban fertőződtek nagy része és a felnőttek körülbelül 5%-a is krónikus hordozóvá válik, ami részben a vírus különböző fehérjéi által kiváltott immunmodulációs hatások következménye. HBV genomot tartalmazó transzgenikus egerekben kimutatták, hogy a HBeAg, a HBsAg, illetve a tisztított virionok is képesek gátolni az intracelluláris antivirális folyamatokat azáltal, hogy csökkentik a Toll-like receptor (TLR) 3 és 4 termelését májsejtekben [Wu és mtsai, 2009]. Krónikus vírushordozókban más TLR-ok expressziója is alacsonyabb szintet mutat, ami csökkent interferon- α termelést okoz például plazmacitoid dendritikus sejtekben [Liu és mtsai, 2008, Woltman és mtsai, 2011]. A HBV-vel fertőzött sejtek nagy feleslegben termelnek HBeAg-t és HBsAg-t. A nagy

menyiségű antigén folyamatos jelenléte gátolja a citotoxikus immunválaszt, ahogy ezt más vírusok esetén is megfigyelték már [Wherry és mtsai, 2003]. A HBeAg jelentősen hozzájárul a krónikus hordozás kialakításához és fenntartásához azáltal is, hogy hatására csökken a HBV-specifikus B-sejtek száma [Barnaba és mtsai, 1990].

2.1.1.7. Mutáns HBV változatok

A hepatitis B vírus replikációja során köztes termékként pregenomi RNS keletkezik. A genom ebből egy reverz transzkripció lépés során jön létre, amely miatt a vírus mutációs rátája más DNS vírusokénál jelentősen magasabb. A vírust érő evolúciós nyomás hatására (vakcina, antivirális kezelés, a gazda immunválasza) számos vírusvariáns jött létre és terjedt el. Ezek olyan mutációkat hordoznak, amelyek a vírus antigén szerkezetét, vagy egyes virális fehérjék működését módosítják, és ezáltal biztosítják a vírus túlélését. Az egy adott pontban történt báziscsere a leolvasási keretek átfedése miatt több fehérje aminosavsorrendjét is érintheti.

Precore/core promoter mutánsok: a precore mutánsok a HBeAg/anti-HBe szerokonverzió során jönnek létre. Egy báziscsere hatására egy stop kodon keletkezik a precore régióban, ami miatt a HBeAg termelődése megszűnik. A core promoterben történő aminosavcserek csökkent HBeAg termelést okoznak, miközben a replikáció és a patogenitás fokozódik [Kao, 2007].

Polimeráz variánsok: a HBV fertőzés esetén alkalmazott nukleotid, illetve nukleozid analógok gátolják a replikációt a készülő DNS-lánc terminációja, vagy az enzim gátlása által. A hosszan tartó terápia során különféle rezisztens variánsok megjelenését figyelték meg. Egy mutáns több szerre is rezisztens lehet (keresztrezisztencia).

Pre-S/S gén mutánsok: az S antigén 124. és 147. aminosav pozíciója közötti szakaszt „a” determinánsnak nevezik. Ez a régió a neutralizáló ellenanyagok kötődési helye, így megváltozása a preventív vakcináció hatékonyságának csökkenését okozza. A megváltozott fehérje kimutatására nem mindegyik szerológiai teszt alkalmas, így ezek álnegatív eredményt adhatnak [Carman, 1997]. Megváltozott felszíni antigént hordozó, ún. „vakcinaszökevény” (*vaccine-escape*) vírusok megjelenésére a tömeges immunizáció megkezdését követő 1-2 évtizedben számítani lehet.

X gén mutánsok: a HBx génről átiródó, 154 aminosav hosszú fehérje esetében aminosav szubsztitúciókat és inzerciót is leírtak már, és ezeket hepatocelluláris carcinoma kialakulásával hozták összefüggésbe [Choi és mtsai, 2009].

2.1.1.8. Terápia

Hepatitis B vírus elleni terápia elsődleges célja a vírus kópiaszámának jelentős csökkentése, ami nagymértékben csökkenti a májbetegség progressziójának kockázatát, és a gyógyszerrezisztencia kialakulásának veszélyét. Ez idővel HBeAg/anti-HBe szerokonverzióhoz, majd ritkábban HBsAg/anti-HBs szerokonverzióhoz is vezethet [Tillmann, 2007].

A HBV fertőzés kezelésére legtöbb esetben pegilált interferont (IFN) használnak, de többféle nukleozid, illetve nukleotid analóg (NA) gyógyszer is rendelkezésre áll. Annak eldöntéséhez, hogy melyik módszer alkalmazása indokolt, a HBV fertőzést jellemző szerológiai markerek (HBsAg, anti-HBc antitest, és a HBeAg vagy az anti-HBe antitest) mellett többek között a vírus kópiaszámát, az esetleges hepatitis D vírus koinfekciót, a páciens korát, más betegségeit, és a máj állapotát is figyelembe kell venni. Az interferon terápia hossza általában 1 év, amely alatt a 12. és a 24. hét végén meghatározzák a vírus kópiaszámát. Amennyiben a vírusszám nem csökken legalább egy nagyságrenddel a terápia előtt mért kiindulási értékhez képest, vagy a kezdeti csökkenés után újból megemelkedik, a terápia sikertelen, és a NA-k valamelyikével folytatják a kezelést. Jelenleg Magyarországon négyféle NA engedélyezett a HBV fertőzés kezelésére. Ezek akár a beteg élete végéig adhatók önmagukban, vagy kombinációban. A lamivudinnal vagy az adefovir dipivoxillal végzett hosszú távú kezelés során gyakran figyelték meg gyógyszerrezisztens vírusmutások kialakulását. Ilyenkor az addig alacsony vírusszám hirtelen megemelkedik, és gyógyszerváltás szükséges. Az entecavir és a tenofovir esetében a rezisztencia megjelenése ritka, ezért hatékonyabbnak tartják őket. Így az európai szakmai protokoll ezeket ajánlja elsőként választandó szernek [OEP, 2010].

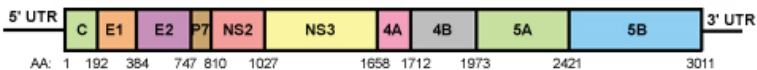
2.1.2. A hepatitis C vírus

A hepatitis C vírust 1989-ben azonosították, mint az addig nonA-nonB hepatitisként ismert megbetegedések fő okozóját. A *Flaviviridae* víruscsalád *Hepacivirus* nemzetségébe sorolják.

2.1.2.1. A HCV felépítése és fehérvéje

A hepatitis C vírus virionjai gömbszerűek, átmérőjük 55-65 nm. A nukleokapszid körül gazdasejt eredetű lipidmembrán található, amelybe beleépülnek a vírus genomja által kódolt glikoproteinek.

A HCV genomja egyszálú, pozitív irányultságú RNS, hossza körülbelül 9,6 kilobázis (4. ábra). Jelenleg 6 genotípusát és számos szubtypusát különítik el. A genotípusok nukleotid szinten 30-35%-ban térnek el egymástól, a szubtypusok közötti különbség 20-25%. A genom két végén nem transzlálódó régiók (UTR – untranslated region) találhatóak, közöttük pedig egy hosszú leolvasási keret. Az 5' UTR nukleotidsorrendje erősen konzervált, jellegzetes másodlagos szerkezetű doménjei belső riboszómakötőhelyet alkotnak. A 3' UTR szintén konzervatív szekvenciákat tartalmaz, amelyeknek mind a transzlációban, mind pedig a replikációban szerepet játszanak. A leolvasási keret körülbelül 3000 aminosav hosszúságú polipeptidet kódol, amelyből celluláris és virális enzimek ko-, és posztranszlációs hasításokkal hozzák létre a különböző, működőképes termékeket.



4. ábra. A hepatitis C vírus genomszerkezete.

Forrás: <http://www.microbiologybytes.com>

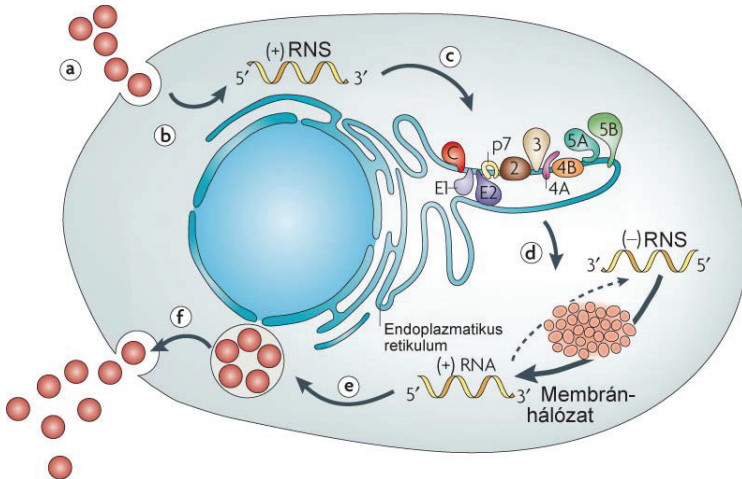
A leolvasási keret 5' végén a strukturális fehérjéket kódoló szakaszok találhatóak. Az 5' UTR-hez legközelebb a core (C) helyezkedik el. A core protein egy RNS-kötő fehérje, amely a kapszidot építi fel. A core hidrófil N-terminális doménje (D1) az RNS-kötésben, illetve a fehérje oligomerizációjában vesz részt, míg a hidrófób C-terminális (D2) segítségével lipidsepppek felszínéhez kötődik. Ez a kapcsolat fontos lehet a vírus replikációja és a virionok összeépülése során is. Jelentősen gátolja a humorális immunitás hatékonyságát azáltal, hogy a keringésben a vírus sejtmembránokhoz kötődve található. A core-tól 3' irányban az E1 és E2 régió található. Ez utóbbi a vírus burkába beépülő, rendkívül változékony glikoproteineket kódolja. Az E2 glikoproteinben több hipervariabilis régiót (hypervariable region – HVR) azonosítottak. A 27 aminosav hosszú HVR1 egy ektodomén része, amelyre erős immunszelekció hat, ez okozza rendkívüli változékonyágát. Az E2 régiótól downstream található szakaszról íródik át a kisméretű, hidrófób p7 membránprotein, amely ioncsatornákat kialakításában játszik szerepet.

A leolvasási keret további részén a nem-strukturális fehérjéket kódoló régiókat találjuk. Ezek közül az NS2 egy cisztein proteáz (vagy autoproteáz), amely a polipeptint az NS2 és az NS3 határán hasítja el. Az NS3 N-terminális szerin proteáz, C-terminális RNS helikáz aktivitást mutat. Az NS4A az NS3 szerin proteáz kofaktora. Az NS4B valószínűleg a HCV replikációs komplex támasztékaul szolgáló membránhálózat kialakításában játszik szerepet.

Az NS5A a replikáció során az RNS megkötésére szolgál, és lehetséges, hogy ez a fehérje felelős a vírusok egy részében az interferon-rezisztenciáért is. Az NS5B régió a vírus RNS-függő RNS-polimerázát kódolja. Az enzim a genomi RNS szárlól komplementer szálakat, majd azokról újabb pozitív polaritású másolatokat készít hibajavító mechanizmus nélkül. A core régióról egy frameshift következtében egy másik, körülbelül 160 aminosav hosszú protein is keletkezhet (ARFP - alternative reading frame protein), amelynek funkciója ma még nem ismert [Dubuisson, 2007].

2.1.2.2. Replikáció

A HCV a vérben szabadon, LDL-hez (low density lipoprotein), VLDL-hez (very low density lipoprotein), vagy immunglobulinokhoz kötve kering. Célsejtjei elsősorban a hepatociták, de megfertőzhet limfocitákat, makrofágokat, dendritikus sejteket és néhány más sejtípust is. Több receptora ismert: többek között a glükózaminoglikánok, az LDL-receptor, a CD81 (tetraspanin), a scavenger receptor B1 (SR-B1), a claudin-1, az occludin (tight junction komponensek) valamint a DC-SIGN és az L-SIGN nevű lektinek is. A vírusrészecskék clathrin-mediált endocitózissal jutnak be a célsejtbe. Az endoszómában a pH lecsökken, aminek következtében az endoszóma membránja fuzionál a vírus lipidburokával, és a kapszid a citoplazmába kerül (5. ábra).



5. ábra. A hepatitis C vírus életciklusa. Lépései: a) A vírus kapcsolódása a célsejthez és a bejutás a sejtbe. b) Bejutás a citoplazmába és a dekapzsidáció. c) IRES-mediált transláció és a poliprotein processzálása. d) RNS replikáció. e) Virionok összeállítása. f) Virionok érése és kijutása a sejtől [Moradpour és mtsai, 2007].

A dekapszidáció mechanizmusa nem ismert. A transláció belső riboszóma-kötőhely (IRES) segítségével történik. A képződő poliproteinből a szerkezeti fehérjéket a sejt az endoplazmatikus retikulum szignál peptidáza és a szignálpeptid peptidáz szabadítja fel, a nem szerkezeti fehérjéket pedig az NS2 és NS3-NS4A peptidázok. A HCV replikációja egy membránkötött replikációs komplexben („membranous web”) zajlik, amit virális fehérjék, a replikáló RNS és módosult, gazdasejt eredetű membránok alkotnak. Hasonló szerkezet kialakulását figyelték meg más, pozitív szálú RNS genommal rendelkező vírusok esetében is. A szivacszerű membránhálózat feltehetően fizikai támasztékként szolgál, kompartmentalizál, valamint megköti a replikációban résztvevő komponenseket, és helyileg megnöveli koncentrációjukat. Ezen kívül védi a virális RNS-t és a kétszálú replikációs intermediert a gazdasejt védelmi mechanizmusaitól és az RNS interferenciától.

A vírus életciklusának késői lépései kevésbé ismertek. A kész virionok a membránjukat az endoplazmatikus retikulum lumenébe történő bimbózással kapják meg, majd a sejtből szekréció útján távoznak [Moradpour és mtsai, 2007].

2.1.2.3. Terjedés és megelőzés

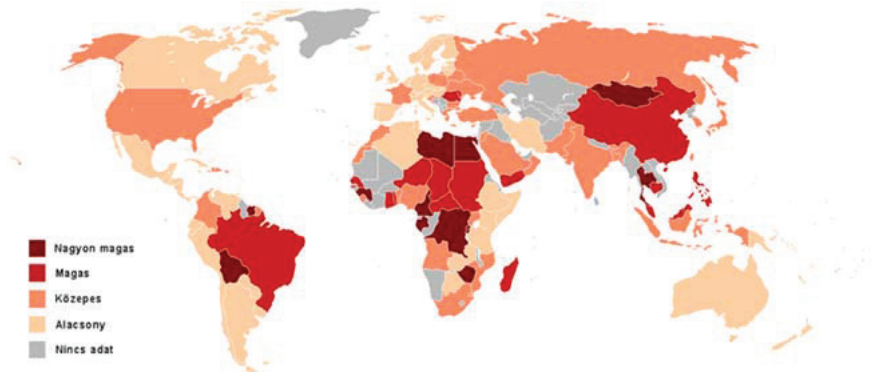
A többi *Flaviviridae* családba tartozó vírustól eltérően a HCV rezervoárja az ember, nincs bizonyíték vektor-közvetítette átvitelre. A hepatitis C vírus alapvetően vérrel, és vérkészítményekkel terjed (vérátömlesztés, szervátültetés, intravénás kábítószerhasználat, invazív orvosi beavatkozások stb.). Kis mennyiségben kimutatható a vírus a fertőzött emberek nyálában, spermájában, vizeletében, és izzadságában is. Előfordul szexuális transzmisszió, de ritkábban, mint a HBV vagy a HIV esetében. Monogám heteroszexuális párkapcsolat esetén ritka a vírusátvitel, és ezen esetek egy része is inkább közös borotva vagy fogkefe-használatra vezethető vissza. A promiszkuitás és a homoszexualitás szintén kockázati tényezők. Vertikális terjedést (anyáról a magzatra), valamint nem megfelelő sterilítású eszközökkel végzett testékszer-beültetéssel (piercinggel) és tetoválással történt vírusátvitel is leírtak már. Az esetek egy részében a fertőzés forrása nem azonosítható [Shepard és mtsai, 2005, Maheshwari és mtsai, 2008, Henderson, 2003].

A vírus változékonysága miatt még nem sikerült aktív védettséget előidéző vakcinát gyártani. További probléma, hogy az alkalmazott peptid alapú, rekombináns glikoproteint tartalmazó, ill. plazmid-DNS-re alapuló vakcinák immunogenitása gyenge. Passzív oltóanyag szintén nem létezik, a humorális immunitás önmagában egyébként sem véd meg a hepatitis C vírusfertőzés ellen. A vírus terjedésének megelőzése elsősorban tehát a véradók szűrésével, a

levett vérek inaktiválásával, valamint az egészségügyi intézményekben a higiénés rendszabályok betartásával lehetséges.

2.1.2.4. Epidemiológia

Jelenleg a világon legalább 170 millió krónikus vírushordozó él, és évente 3-4 millió új fertőzés történik. A HCV hordozás gyakorisága és a hordozók koreloszlása földrajzi eltéréseket mutat (6. ábra). Az Egyesült Államokban, Ausztráliában, Dél-Európában és Japánban a HCV fertőzés prevalenciája hasonló (1,0-1,9%), a koreloszlás azonban eltér. Az USA-ban és Ausztráliában a 30-50 éves korosztályban a legmagasabb a hordozók aránya (akár 4,3% is lehet), és az adatok arra utalnak, hogy a fertőzések többsége fiatal felnőttkorban történt. Ugyanez mondható el Nyugat-, és Észak-Európáról is, ahol azonban a prevalencia alacsonyabb: 0,1-1,2%. Ezzel szemben Dél-Európában, Japánban és Kínában a fertőzöttek többsége 50 évesnél idősebb. A világon a legmagasabb prevalencia értéket Egyiptomban mérték (23,7% szeroprevalencia), ahol a HCV hordozók gyakorisága a korrallal fokozatosan nő, de a prevalencia minden korosztályban magas [Armstrong és mtsai, 2006, Alter, 2007].



6. ábra. A krónikus hepatitis C vírus hordozás földrajzi eloszlása

Forrás: WHO Guide: Hepatitis C, 2002

<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/>

A HCV 6 genotípusa és szubtypusai jellegzetes földrajzi eloszlást mutatnak. A leggyakoribb az 1b szubtypus, amely az egész világon előfordul. Az 1a főleg Észak-Európában és az USA-ban gyakori. A 2-es genotípus a Mediterrán térségben és a Távol-Keleten jellemző. A 3-as elsősorban Indonéziában, illetve intravénás kábítószerélvezőköl

mutatható ki, főleg Európában. A 4-es genotípus a Közel-Keleten, az 5-ös Dél-Afrikában, a 6-os pedig Hong Kongban, Vietnámban és Ausztráliában elterjedt [Simmonds és mtsai, 2005]. A fejlett világban a HCV epidemiológiája az elmúlt 15-20 évben jelentősen megváltozott. A donorok szűrésének bevezetése óta a vérrel, vérkészítményekkel, valamint szervátültetés során történő vírusátvitel száma drasztikusan lecsökkent, így ma a legtöbb új HCV fertőzés intravénás droghasználat következménye. Adatok szerint az új kábítószerhasználók 50-90%-a fertőződik meg 5 éven belül, és sok országban a tűcsereprogramok sem tudtak javítani ezen. A HCV terjedése az intravénás droghasználók körében hatással van a hordozók koreloszlására, mivel egyre több közöttük a fiatal. Eközben a genotípusok elterjedése is módosul, ahogy az intravénás droghasználattal összefüggő genotípusok (1a, 3, 4) fokozatosan felváltják az adott régióban korábban jellemzőeket. Bár egyre szigorúbbá válnak az egészségügyi ellátásban a higiénés rendszabályok, még mindig veszélyeztetettnek számítanak az egészségügyi dolgozók és az olyan krónikus betegek, akik sok invazív beavatkozáson esnek át. A kórházi eredetű fertőzések többnyire éppen a rendszabályok be nem tartása miatt, pl. a kesztyűhasználat és csere hiányosságai, újrahaznált tű/fecskendő és kontaminálódott szerek, felületek, készülékek miatt következnek be. Számos országban egyre nagyobb problémát jelent az endémiás területekről érkező bevándorlók, akik sokszor ritka genotípusokat, szubtipusokat hurcolnak be magukkal [Esteban és mtsai, 2008].

2.1.2.5. A betegség lefolyása

Az akut hepatitis C fertőzés az esetek körülbelül 90%-ában tünetmentesen zajlik. Amennyiben jelentkeznek tünetek, azok leggyakrabban a következők lehetnek: fáradékonyság, izomfájdalom, hőemelkedés, jobb bordaív alatti fájdalom, hányinger és hányás. További jellegzetes tünetek a sárgaság, a széklet világos és a vizelet sötét színe. A tünetek a fertőzés után 2-12 héttel alakulnak ki, és hetekig is tarthatnak. A máj károsodását jelzi, ha a vér ALT szintje megemelkedik. A HCV fertőzöttek 70-85%-a krónikus vírushordozóvá válik, amit a 6 hónap elteltével is kimutatható virémia jelez. A tünetekkel járó akut fertőzés esetén nagyobb az esély a vírus spontán eliminációjára. A kimenetel feltehetően a gazda genetikai hátterétől, és a kialakuló immunválasz jellegétől függ. A HCV fulmináns hepatitiszt csak igen ritkán okoz [Maheshwari és mtsai, 2008].

A hepatitis C vírus nem citopatogén, a fertőzés során a máj károsodásához a kialakuló immunfolyamatok vezetnek. Az immunrendszer bizonyos mértékig kontroll alatt tartja a vírus replikációját, azonban a máj krónikus gyulladása, a májsejtek apoptózis és nekrozis általi folyamatos pusztulása, valamint az ezt kísérő regeneráció és oxidatív stressz az évek során

fibrózishoz, májzsugorhoz, és hepatocelluláris carcinomához vezethet. A krónikus hordozók körülbelül 20%-ában 20-30 év alatt cirrhosis alakul ki, 1-5%-uk pedig idővel májelégtelenség, vagy májrák következtében meghal. A HCC szinte minden esetben cirrhosis talaján alakul ki. HCV nem képes a gazdasejt genomjába integrálódni, tehát elsősorban közvetett módon okoz daganatot, bár egyes kísérleti eredmények arra mutatnak, hogy a HCV egyes fehérjéi, így a core, az NS3 és az NS5A onkogén hatásúak lehetnek [Sakamuro és mtsai, 1995]. A core többek között reaktív oxigéngyökök túltermelését okozza, és ezáltal oxidatív stresszt vált ki. Ezt a hatást a krónikus gyulladás tovább fokozza, ami végül DNS-károsodáshoz vezet. Az oxidatív stressznek a steatosis (zsírmáj) kialakulásában is jelentős szerepe van, ami a krónikus HCV fertőzéssel járó igen gyakori kórkép. *In vitro* vizsgálatok azt mutatják, hogy a HCV core proteinje a lipid metabolizmusban részt vevő egyes gének expresszióját fokozza vagy csökkenti, aminek következtében a májsejtekben nagy mennyiségben zsírcseppek halmozódnak fel. A jelenség fontos szerepet játszhat a vírus replikációjában, mivel a lipidcseppek raktárként szolgálnak a core protein számára a vírusrészekké összeépülése során [Koike K. 2007, Del Campo & Romero-Gómez, 2009].

A vírus limfotróp tulajdonsága miatt a krónikus HCV fertőzés számos extrahepatikus kórkép megjelenését is okozhatja. A leggyakoribb ezek közül a kevert cryoglobulinémia (MC), amelyből esetenként rosszindulatú B-sejtes lymphoma alakulhat ki. Krónikus HCV-fertőzöttekben kialakulhatnak továbbá különböző neurológiai elváltozások, 2-es típusú diabetes mellitus és pajzsmirigy működési zavarok is [Zignego és mtsai, 2007].

2.1.2.6. A HCV ellen kialakuló immunválasz

A hepatitis C vírus nagyon sikeres kórokozó, még az egészséges immunrendszerű fertőzöttek igen nagy részében is perzisztens fertőzést okoz. Ez részben annak köszönhető, hogy rendkívül változékony, részben pedig annak, hogy bár a genomja kicsi és kevés fehérjét kódol, proteinjai segítségével számos ponton képes beavatkozni az ellene irányuló immunválaszba.

A HCV fertőzés I-es típusú interferonok termelődését váltja ki, és a vírus érzékeny is rájuk. A replikáció során keletkező kétszálú RNS-t felismerik a patogén mintázatfelismerő receptorok (Toll-like receptor 3, 4, RIG-1), és a jelátvitel eredményeképpen interferon α és β termelődik. Ezek autokrin és parakrin hatásúak, és különböző effektor molekulák (például protein kináz R - PKR) keletkezését váltják ki. A HCV NS3-NS4A proteáza és core fehérjeje azonban specifikusan gátolni képes a patogén mintázatfelismerő receptorok (TLR-3, 4, RIG-1) által kiváltott jelátviteli folyamatok különböző lépéseit, és így csökkentik az IFN-termelést,

és a keletkezett IFN-ok által kifejtett antivirális hatást. Az E2 és az NS5A fehérjék *in vitro* gátolják a PKR működését. A HCV E2 glikoproteinje ezen kívül képes keresztkötni a természetes ölösejtek felszínén található CD81 molekulákat, ezáltal gátolva az NK-sejtek dendritikus sejteket aktiváló képességét [Tai & Chung, 2009].

A hepatitis C vírus elleni ellenanyagok szinte minden immunkompetens fertőzött személyben kialakulnak, de csak későn, általában 7-8 héttel (esetenként akár 6 hónappal) a fertőzés után jelennek meg, szerepük az esetleges gyógyulásban pedig kérdéses, mivel spontán víruseliminációt ellenanyagválasz hiányában is leírtak már [Post és mtsai, 2004]. Az ellenanyagok fő célpontja az E2 hipervariabilis régiója (HVR1), ahol azonban a szerokonverzióval egyidőben számos mutáció bekövetkeztét figyelték meg. A HCV mutációs rátája rendkívül magas (10^{-3} /nukleotid/generáció), és replikációja igen gyors (10^{12} virion/nap). Ennek következtében nagyszámú, kissé eltérő bázissorrendű „immunszökevény” variáns alakul ki, amelyek a krónikus hordozókban az ellenanyagok által kiváltott evolúciós nyomás hatására folyamatosan változnak. A HCV fertőzés kimenetelét a kutatások szerint leginkább a celluláris immunválasz hatékonysága befolyásolja. A vírus eliminálásához erős, fenntartott, multispecifikus CD4+ és CD8+ T-sejt válasz szükséges, és különösen fontos ennek során az IFN- γ termelő CD8+ T-sejtek szerepe. Számos T-sejt epitópot írtak le, többségük a nem-szerkezeti fehérjéken található. Ezek a B-sejt epitópokhoz hasonlóan mutációk által megváltozhatnak, azonban a változás korlátozottabb, mivel az itt bekövetkező mutációk gyakrabban járnak együtt a virális enzimek működésének sérülésével.

A korábban lezajlott HCV fertőzés után megmaradt immunológiai memória még évtizedekig kimutatható. Egy esetleges újrafertőződéssel szemben sajnos nem nyújt védelmet, a krónikussá válás valószínűségét azonban jelentősen csökkenti. A kialakult ellenanyagok mennyisége idővel csökken, 10–20 évvel később teljesen el is tűnhetnek a szérumból [Boonstra és mtsai, 2008, Lemon és mtsai, 2007].

2.1.2.7. Terápia

A legjobb eredmények krónikus C hepatitis kezelésében kombinált pegilált interferon α + ribavirin terápiával érhetők el, amely a HCV 1-es és 4-es genotípusa esetén körülbelül 40-53%-ban, más genotípusoknál 80-87%-ban sikeres. Magyarországon a krónikus hordozók több mint 90%-a 1-es genotípussal fertőződött. A kezelés a hordozott genotípustól és a kiindulási vírusszámtól függően 16-48 hétig tarthat, de 72 hétre is meghosszabbítható. A 3. és 6. hónap letelte után végzett kontroll vizsgálatokkal követik a vírus kópiaszámának változását, és a kezelést csak abban az esetben folytatják, ha a beteg jól reagált. A terápia igen toxikus,

számos mellékhatását írták le Ezek közül leggyakoribb a fáradékonyság, fejfájás, izom-, és ízületi fájdalmak. Esetenként azonban kialakulhatnak olyan súlyos mellékhatások is, amelyek miatt a kezelést le kell állítani (pl. súlyos depresszió, kognitív zavarok, vörösvérsejtszám csökkenés, szívritmuszavar stb.). A kezelés befejeztével gyakran történik relapszus.

2.2. Nem klasszikus hepatitis vírusok

2.2.1. A hepatitis G vírus / GB vírus C

2.2.1.1. A hepatitis G vírus/GB vírus C felfedezése és rendszertana

A GBV-C – genomstruktúrája alapján – a *Flaviviridae* család tagja, ám az ide tartozó három nemzetség (*Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus*) egyikébe sem sorolják be.

A vírust egymástól függetlenül fedezte fel két kutatócsoport 1995-ben. Deinhardt és munkatársai 1967-ben majmokat oltottak be egy akut hepatitisben szenvedő sebész vérszérumával. Az így beoltott tamarinok mindegyike hepatitises lett. A kórokozót GB-ágensnek nevezték el a sebész monogramja alapján. A chicagói Abbott Laboratories 1995-ben kezdte újra vizsgálni a GB-ágenseket ismeretlen eredetű májgyulladások háttérében levő esetleges kórokozókat keresve. A tamarinok szérumát vizsgálva kimutatták, hogy abban két különböző RNS genom található, amelyek egymással, valamint a hepatitis C-vel is hasonlóságot mutattak. A két felfedezett RNS-vírus a GB vírus A, illetve B nevet kapta. Következő lépésként primereket terveztek a hepatitis C, a GBV-A és GBV-B homolog szakaszára. Az így kapott termék a várt nagyságú volt, de a bázisrendje nem egyezett az egyik ismert víruséval sem. Az új vírus a GBV-C nevet kapta. A GBV-A és GBV-B vírusokról később bebizonyosodott, hogy nem emberi, hanem tamarin vírusok [Simons és mtsai, 1995].

Az Abbott Laboratories vizsgálataival egy időben egy másik kutatócsoport, a Genlabs Technologies, is felfedezett egy új vírust. Ők krónikus hepatitis C-ben szenvedő betegtől mutattak ki olyan RNS-szakaszt, ami sem a GB vírusok, sem a HCV genomjával nem egyezett meg. Az új vírust hepatitis G-nek nevezték el [Linnen és mtsai, 1996].

A két új víusról bebizonyosodott, hogy valójában ugyanannak a vírusnak két variánsa, a köztük lévő hasonlóság a nukleotid szinten 85%, az aminosav szinten pedig 95%. Ma már a GB vírus C elnevezés használatos, mivel időközben bizonyítást nyert, hogy a vírus nem hepatotróp, májgyulladást nem okoz.

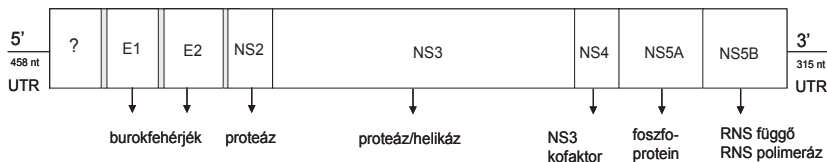
Jelenleg hat genotípust, a 2-es genotípuson belül pedig további két alcsoportot különböztetnek meg (jelölésük: 1-6, az alcsoportoké 2a és 2b). A csoportok többnyire jól jellemezhetőek földrajzi előfordulásukkal: az 1-es genotípus Nyugat-, és Közép-Afrikára jellemző, a 2-es Európában és Észak Amerikában, a 3-as Ázsia északi részén és Japánban, a 4-es genotípus Délkelet Ázsiában, az 5-ös Dél-Afrikában, a 6-os pedig Indonéziában és Iránban fordul elő [Tucker & Smuts, 2000, Muerhoff és mtsai, 2006].

2010-ben Bangladeshbén, gyümölcssevő denevérekéből teljesen új, a GB vírusokhoz aminosav szinten 50%-os hasonlóságot mutató vírusgenomokat mutattak ki. A szekvenciaelemzések alapján az új vírus, amelyet GBV-D-nek neveztek el, a GB vírusok egy ősi ágát képviselheti [Epstein és mtsai, 2010].

A filogenetikai vizsgálatok alapján a GBV-B-t a hepatitis C vírus mellé, a *Flaviviridae* család *Hepacivirus* genusába sorolták 2005-ben [Theil, 2005]. A GBV-A, C és D egyelőre a víruscsaládon belül besorolatlan, de egy a nemzetközi vírustaxonómiai bizottsághoz (ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses) benyújtott új javaslat alapján lehetséges, hogy a későbbiekben számukra egy új nemzetséget fognak létrehozni a *Flaviviridae*-n belül *Pegivirus* néven [Stapleton és mtsai, 2011]

2.2.1.2. A hepatitis G vírus/GB vírus C felépítése és fehérjéi

A GBV-C/HGV vírus – hasonlóan a víruscsalád többi tagjához – pozitív egyszálú RNS-t tartalmaz. Genomstruktúrája nagymértékben hasonlít a HCV-éhez (7. ábra). A genom ~9400 nukleotid hosszúságú, 5' és 3'végein nem kódoló (UTR) régióval. A genomról egy ~2900 aminosavból álló polipeptin keletkezik. A vírus strukturális fehérjéi (E1 és E2 burokfehérjék) a genom 5' végén, míg a replikációhoz szükséges nem-strukturális a 3' végén kódoltak. A két burokfehérje (E1 és E2) tartalmaz egy szignálszekvenciát, ami elősegíti a gazdasejt membránjába való belépést. Ebből arra lehet következtetni, hogy a gazdasejt szignál peptidáz enzimeje szabadítja fel őket a polipeptidláncból.



7. ábra. A HGV/GBV-C genomszerkezete.

Az E1 régió előtt van egy izolátumként eltérő hosszúságú genomszakasz, aminek hossza nem éri el a HCV vagy a GBV-B vírusok által kódolt core-gén hosszát, de lehetséges, hogy a core-gén egy darabját kódolja. Ez a bázikus fehérje a vírus genomjának becsomagolását segíti.

A nem szerkezeti fehérjéket kódoló régióban található NS2 gén egy proteázt, az NS3 proteáz/helikáz enzimet, az NS4 az NS3 által kódolt enzim kofaktorát, az NS5b pedig az RNS-függő-RNS-polimeráz enzimet kódolja.

2.2.1.3. Replikáció

A GBV-C/HGV szaporodásakor, más pozitív szálú RNS genomot tartalmazó vírusokhoz hasonlóan, egyszerű, negatív polaritású köztitermék keletkezik.

Kezetben feltételezték, hogy a GBV-C hepatotróp, mivel májgyulladásban szenvedő betegből mutatták ki először. Később azonban kiderült, hogy a vírus alapvetően limfotróp, az első eredmények pedig, amelyek arra utaltak, hogy májsejtekben is szaporodik, műtermékek lehettek. A májmintákban detektált replikációs intermedierek feltételezhetően a máj ereiből származó fehérvérsejtekből eredtek [Tucker és mtsai, 2000].

2.2.1.4. Terjedés és epidemiológia

A GBV-C a hepatitis C vírushoz hasonlóan elsősorban parenterális úton terjed, de szexuális, és perinatális átvitelt is leírtak [Scallan és mtsai, 1998, Seifried és mtsai, 2004].

A GBV-C-vel történt fertőzés az egészséges populációban sem ritka. Az Egyesült Államokban önkéntes véradók vizsgálatok a vírus hordozók arányát 1-5%-nak találták, míg ez az arány, a fejlődő országokban elérheti a 10-20%-ot is [Mphahlele, 1998].

A fertőzésnek fokozottan kitett rizikócsoportok a politranszfundáltak, hemodializáltak, hemofiliások, intravénás droghasználók, promiszkuatív szexuális életmódot folytatók. Egy vizsgálat során hemodializált betegek között Németországban 19,6%-os prevalenciát mértek. A vírus E2 burokfehérjéje ellen termelt ellenanyagot a betegek 17,5%-ából sikerült kimutatni [Hinrichsen és mtsai, 2002]. Egy Japánban, homoszexuálisok között végzett felmérés során az előfordulást 12,5%-nak találták [Hattori, 2003]. Különösen magas a vírus prevalenciája intravénás drogfogyasztók között. Az Egyesült Királyságban 29%-ot [Kennedy és mtsai, 1998], Görögországban 32,1%-ot [Anastassopoulou és mtsai, 1998], Horvátországban 38,2%-ot mértek [Trisler és mtsai, 1999].

2.2.1.5. A fertőzés lefolyása

A kutatások során a GBV-A illetve B vírusokról bebizonyosodott, hogy majomvírusok, és a GBV-B májgyulladást is okoz: A GBV-C-nek azonban nem bizonyított a májbetegségekkel való kapcsolata. Ma elterjedtebb az a vélemény, hogy ez a vírus nem okoz hepatitist, nem hepatotróp, elsősorban B és T-sejtekben szaporodik. A fertőzés valószínűleg tünetmentesen zajlik. A vírus a gazdaszervezetből többnyire 2 éven belül eliminálódik, de esetenként évtizedeken át is perzisztálhat.

A GBV-C-fertőzés gyakori HIV pozitív betegekben, és több tanulmány során is arra az eredményre jutottak, hogy a GBV-C koinfekció kedvező hatással van a betegek túlélésére [Lefrère és mtsai, 1999]. Más tanulmányok azonban nem erősítették meg ezt az összefüggést, ezért a kérdés a mai napig nyitott. A GBV-C gyakran eltűnik a HIV pozitív betegek szervezetéből, és ez a betegség hirtelen felgyorsuló progressziójával jár együtt. *In vitro* kísérletek is alátámasztják a két vírus közötti interferencia meglétét. A GBV-C-vel fertőzött PBMC-kben (peripheral blood mononuclear cells – perifériális vér mononukleáris sejtek) csökkent HIV replikáció volt megfigyelhető [Nattermann és mtsai, 2003]. Ennek hátterében a CXCR4 és CCR5 kemokin receptorok csökkent expressziója áll, amiben a GBV-C NS5A nem strukturális fehérjéjének egy 30-80 aminosav hosszúságú szakasza játszik szerepet [Chang és mtsai, 2007].

2.2.2.6. A GBV-C ellen kialakuló immunválasz

A GBV-C ellen kialakuló immunválaszról keveset tudunk. Az E2 burokfehérjével szemben neutralizáló ellenanyagok termelődnek, amelyek megjelenésével egyidőben a vírus többnyire eltűnik a vérből. Az anti-E2 IgG ellenanyagok jelenléte a vérben tehát többnyire korábban lezajlott fertőzésre utal. Az E2 ellen termelődött antitestek keresztreakálnak a vírus különböző genotípusaival [Lazdina és mtsai, 2000]. A perzisztáló ellenanyagok megvédik a szervezetet egy esetleges újabb fertőződéstől.

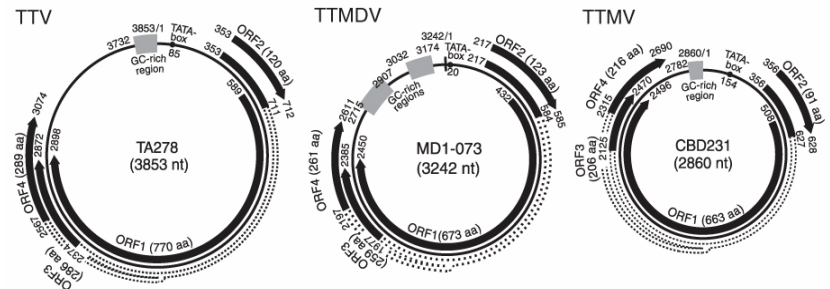
2.2.2. Az Anellovírusok

2.2.2.1. Az Anellovírusok felfedezése és rendszertana

Az első Anellovírust 1997-ben Japánban fedezték fel egy poszttranszfúziós hepatitisben szenvedő beteg vérében [Nishizawa és mtsai, 1997]. Azóta kiderült, hogy egy rendkívüli diverzitást mutató víruscsoport első ismert képviselőjéről van szó. Az *Anelloviridae* családba a Torque Teno vírusok (TTV) népes nemzetségeit sorolják. Mindkét elnevezés az egyszálú,

negatív polaritású cirkuláris DNS-genomjukra utal (latinul az anello gyűrűt, a torque teno vékony nyakláncot jelent), amelyhez hasonlókat korábban csak állati vírusok között ismertek. A családba kilenc nemzetség tartozik, amelyek közül az első háromba (*Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus*, *Gammatorquevirus*) emberi vírusok, a további genusokba (*Deltatorquevirus*, *Epsilontorquevirus*, *Etatorquevirus*, *Iotatorquevirus*, *Thetatorquevirus*, *Zetatorquevirus*) állati vírusok kerültek.

Az 1997-ben felfedezett TT vírusoknak azóta már közel 40 genotípusát írták le, amelyek az *Alphatorquevirus* nemzetséget alkotják. Genomjuk azonos szerkezetű, körülbelül 3,8 kilobázis hosszú. A genotípusokat 5 genocsoportba sorolják. A genotípusok között több mint 30%, a genocsoportok között legalább 50% a szekvenciabeli eltérés. Az elsőként leírt TA278 jelzésű prototípus variáns az 1. genocsoport tagja. Nagy-Britanniában 2000-ben azonosítottak egy nagyon eltérő genotípust, amelyet PMV-nek neveztek el, és ami a TT vírusok 2. genocsoportjának első ismert képviselője lett. A 2000-ben felfedezett SEN vírusok, amelyeket sokáig külön víruscsoportként tartottak számon, ma már a TT vírusok 3. genocsoportját alkotják további TTV variánsokkal együtt, mint a SANBAN (japánul az jelenti: harmadik), vagy a TUS01 [Hijikata és mtsai, 1999]. Szintén 2000-ben írták le a YONBAN (japánul a jelentése: negyedik) genotípust, ami a 4. genocsoport prototípusa. Az 5. genocsoportba tartozó vírusokat először 2002-ben találták meg csecsemők vérében, szintén Japánban [Peng és mtsai, 2002].



8 ábra. A TTV, a TTMDV és a TTMV prototípusának genomszerkezete. A körök átmérője a genomok egymáshoz viszonyított méretét jelzi [Okamoto, 2009].

2000-ben egy nagyjából 1 kilobázissal rövidebb, de azonos szerkezetű genommal rendelkező, és szekvencia-homológiát mutató vírus-változatot is találtak. Ez a TTV-szerű minivírus nevet kapta (TLMV, újabban TTMV – Torque Teno minivírus). Eddig leírt genotípusai alkotják a *Betatorquevirus* nemzetséget. 2007-ben egy további rokon vírus teljes

szekvenciáját sikerült meghatározni, aminek a genomja 3,2 kilobázis körüli volt, ezért Torque Teno midivírusnak (TTMDV) nevezték el [Ninomiya és mtsai, 2007]. Két genotípusát a *Gammatorquevirus* nemzetségbe sorolják (8. ábra).

Számos állatfajban is azonosítottak Anellovírusokat, többek között csimpánzokban és törpe csimpánzokban, nem emberszabású majmokban, mókuscickányokban (tupaia), és háziállatokban (kutya, macska, sertés). Ezek a vírusok az Anellovírusok jellegzetes genom-szerkezetét mutatják, genomjuk mérete és bázissorrendje azonban jelentősen eltér mindhárom emberi TTV speciesétől.

Az Anellovírusokkal a legnagyobb mértékű hasonlóságot a *Circoviridae* víruscsalád mutatja, ahová olyan állati kórokozók tartoznak, mint a csirke anémia vírus (CAV), és a sertés circovírusok (PCV1-2).

2.2.2.2. Az Anellovírusok felépítése és fehérjei

A legtöbb kísérleti eredmény az *Alphatorquevirus* nemzetséggel (a továbbiakban: TTV) kapcsolatos, a többi csoportról még viszonylag kevés információ áll rendelkezésre. Az Anellovírusok virionjai burok nélküliek, kapszidjuk ikozahedrális. A TTV virionok átmérője 30-32 nm, a Torque Teno minivíruséi valamivel kisebbek. A TT vírusok genomja 3,8 kb hosszú, ebből 2,4 kb nagyon változékony kódoló, 1,2 kb pedig viszonylag konzervatív nem kódoló régió (UTR – untranslated region). A nem kódoló régió egy GC-gazdag szakaszt, promotert és transzkripció enhancer elemeket tartalmaz. A kódoló szakaszon több egymással átfedő nyitott leolvasási keretet (ORF – open reading frame) azonosítottak. Közülük az ORF1 teszi ki a genom jelentős részét. A rövid ORF2 részleges átfedésben van az ORF1-gyel, de más leolvasási keretben működik. A többi ORF a genomban egymástól távolabb eső szakaszokból áll, a róluk készülő mRNS hosszú átiratokból alternatív splicing során keletkezik. A TTMV és TTMDV genomja is hasonló szerkezetet mutat, csak az egyes régiók, különösen az UTR hossza tér el.

Az Anellovírusok genomjáról három mRNS átíródását bizonyították. A transzkripció egy közös promotertől indul, és egy közös poliadenilációs szignálnál ér véget, eltérő méretűk alternatív splicing következtében alakul ki. A háromféle mRNS-ről különböző transláció iniciációs helyek felhasználásával legalább hatféle fehérje készül [Qiu és mtsai, 2005]. A fehérjék pontos funkciója még nem ismert, mivel nem áll rendelkezésre sem megfelelő szövetkultúra, sem állati modell az ilyen célú vizsgálatokhoz. Az ORF1 által kódolt fehérje a különböző Anellovírus változatokban 628-783 aminosav hosszú lehet, és feltehetően a vírus kapszidfehérjéjét kódolja. Az ORF2 egy 101-202 aminosavból álló fehérjét kódol, és

valószínűleg foszfatáz aktivitással rendelkeznek. Az ORF3 és ORF4 által kódolt proteinek kizárólag a sejtmagból mutathatók ki, tehát valószínűleg a vírusreplikációban és a virális fehérjék expressziójában játszanak szerepet.

2.2.2.3. Replikáció

A TT vírusok sejtotropizmusuk széles körű. A TT vírusok kétszálú replikációs intermediert és mRNS-eit számos szervben és szövetben sikerült már kimutatni, így a tüdőben, a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben (PBMC – peripheral blood mononuclear cells), a csontvelőben, a májban, nyirokcsomókban, a lépben és a hasnyálmirigyben. Nagy mennyiségű TTV DNS mutatható ki a nyálból is. Nagy diverzitásuk miatt feltételezik, hogy a különböző genotípusok tropizmusuk eltérő lehet, de fő replikációs helyei feltehetően a limfoid sejtek, valamint a májsejtek. Ahogy a kis DNS vírusok általában, a TT vírusok replikációjukhoz a gazdasejt enzimeit használják, a szekvencia-elemzések alapján genomjuk polimeráz enzimét nem kódol. Replikációjuk módja még nem ismert, de feltételezik, hogy a Cirovírusokhoz hasonlóan „gördülő kör” (rolling circle) mechanizmussal szaporodnak [Kakkola és mtsai, 2009].

2.2.2.4. Terjedés

A gazdaszervezetben az Anellovírusok általában perzisztens fertőzést okoznak, amely éveken, sőt egész életen át tartó virémiával jár, a fertőzés ezért könnyen átvihető vérrrel, vérkészítményekkel. Széles körű elterjedtségük miatt valószínű azonban, hogy a legtöbb esetben a fertőzés enterális úton történik. A vírus a májból az epébe ürül, ez lehet a forrása a székletből kimutatható vírusrészecskének. A TTV DNS-ét megtalálták a száj-, és orrüreg epitheliális sejtjeinek citoplazmájában, sőt, a vírus kópiaszáma itt magasabbnak bizonyult, mint a szérumban. Ez alapján lehetséges, hogy a szájüreg a TTV fertőzés elsődleges helye.

A perinatális transzmissziót is sikerült bizonyítani, a transzplacentális átvitelre vonatkozó eredmények viszont ellentmondóak. Szexuális úton történő fertőződés is lehetséges, de jelentősége kicsi.

Az akutan vagy krónikusan fertőzött egyének széklettel és testfolyadékokkal történő nagymértékű vírusürítése miatt az Anellovírusokkal való fertőződés és felülfertőződés valószínűleg igen gyakori. A fertőzések egy része feltehetően tranzienst.

2.2.2.5. Epidemiológia

A diagnosztikai módszerek fejlődésével fokozatosan derült fény az Anellovírusok rendkívüli elterjedtségére. Ma már elfogadott, hogy prevalenciájuk 90% körüli nem csak a különböző vizsgált betegcsoportokban, hanem az egészséges lakosságban is. A pozitívítás

újszülöttekben nagyon korán, már néhány napos korban megjelenik, és egy éves korra eléri a felnőtt lakosságra jellemző átfertőzöttség értékét. Megfigyelések szerint igen gyakoriak a kétszeres és háromszoros koinfekciók a TTV-vel, a mini-, és midivírussal, valamint ezek különböző genotípusai is jelen lehetnek egyszerre egy fertőzött személyben. A TTV genocsoportok közül az 1-es és a 3-as a leggyakoribb, a 2-es pedig viszonylag ritka [Maggi és mtsai, 2006].

2.2.2.6. *A fertőzés lefolyása*

Az Anellovírusok kórokozó képessége jelenleg vitatott. A legtöbb fertőzés biztosan tünetmentesen zajlik, amit a vírusok nagyon magas prevalenciája is alátámaszt. Elterjedtségük és nagy változatosságuk megnehezíti az esetleges összefüggések bizonyítását bármilyen betegség kialakításával. A genotípusok közötti nagy genetikai eltérés miatt az is lehetséges, hogy egyes változatok képesek betegséget okozni, míg mások nem. Elképzelhető, hogy a betegség kialakításához magas vírustiter szükséges, amit normális körülmények között a vírus nem ér el [Tokita és mtsai, 2002]. Mivel TT vírust először egy poszttranszfúziós hepatitisben szenvedő betegből mutattak ki, és mivel a vírus hepatotróp is, az első vizsgálatok a TTV fertőzés és a májgyulladás lehetséges összefüggéseire vonatkoztak. Ismeretlen eredetű májbetegségben szenvedő gyerekek vizsgálatai például azt mutatták, hogy a TTV 1-es genotípusa magasabb patogenitású lehet a többi variánsnál [Sugiyama és mtsai, 2000]. A SENV-D és H néven leírt 12-es és 16-os genotípusokat poszttranszfúziós hepatitiszrel hozták összefüggésbe. Számos olyan tanulmány is megjelent azonban, amely ezeket az eredményeket nem támasztja alá: ezek során nem találtak összefüggést a májgyulladás semmilyen formája, vagy májfunkciós eltérések és a TT vírus hordozás között [Umemura és mtsai, 2001].

Mivel a TTV a tüdőszövetben is szaporodik, légúti megbetegedések kialakulásában is lehet szerepe. Egy vizsgálatban a TT vírus kópiaszáma jelentősen magasabb volt bronchopneumoniás gyerekekben, mint más, enyhébb lefolyású akut légúti betegségben (ARD- acute respiratory disease) szenvedő társaikban [Okamura és mtsai, 2000].

Számos tanulmány foglalkozik a TT vírusok esetleges onkogenitásával. Arra jelenleg nincs bizonyíték, hogy közvetlen daganatkeltő hatásuk lenne, több eredmény azonban arra utal, hogy közvetett módon hozzájárulhatnak rosszindulatú elváltozások kialakulásához. Ennek módja immunszuppresszió lehet, mivel több betegcsoportban is fordított arányosságot figyeltek meg a TTV titer és helper T-sejtek száma között. Egy magyar tanulmányban kimutatták, hogy humán papillomavírussal és a TTV 1-es genocsoportjával történt koinfekció esetén szignifikánsan rosszabb a gége laphámsejtes karcinómájában szenvedő betegek

progressziómentes túlélése, mint ahogyha csak az egyik vírus volt jelen [Szládek és mtsai, 2005].

2.2.2.7. A TTV ellen kialakuló immunválasz

A genom nagy részét lefedő ORF1 feltehetően a kapszidfehérjét kódolja, az ellene termelt ellenanyagokat több kísérletben is sikerült kimutatni. A fehérje hidrofíli szakaszokat tartalmaz, amelyek antigén tulajdonságúak lehetnek. Az ORF1 középső szakaszán három hipervariabilis régiót azonosítottak, amelyek alkalmasak lehetnek az immunválasz kijátszására. Az ellenanyag-termelés kinetikáját vérvétetéssel fertőzött személyek, és kísérletesen fertőzött csimpánzok esetén vizsgálták. Az ellenanyagok viszonylag későn alakultak ki. Az IgM a fertőzés után 10-21 héttel jelent meg, és 5-11 hétig volt kimutatható. Az IgG osztályú ellenanyagok az IgM után több héttel jelentek meg, és a vizsgálat teljes ideje alatt, akár több évig is perzisztáltak. Az ORF2 terméke elleni ellenanyagok szintén kimutathatók [Tsuda és mtsai, 2001].

A detektált ellenanyagok neutralizáló képességéről még nincs információ. A többszörös koinfekciók gyakorisága arra utalhat, hogy az egyik Anellovírus ellen termelt ellenanyagok jelenléte nem véd a más variánssal történő felülfertőződéstől. Genetikailag közelebb álló változatok esetén azonban nem zárható ki a keresztvédettség.

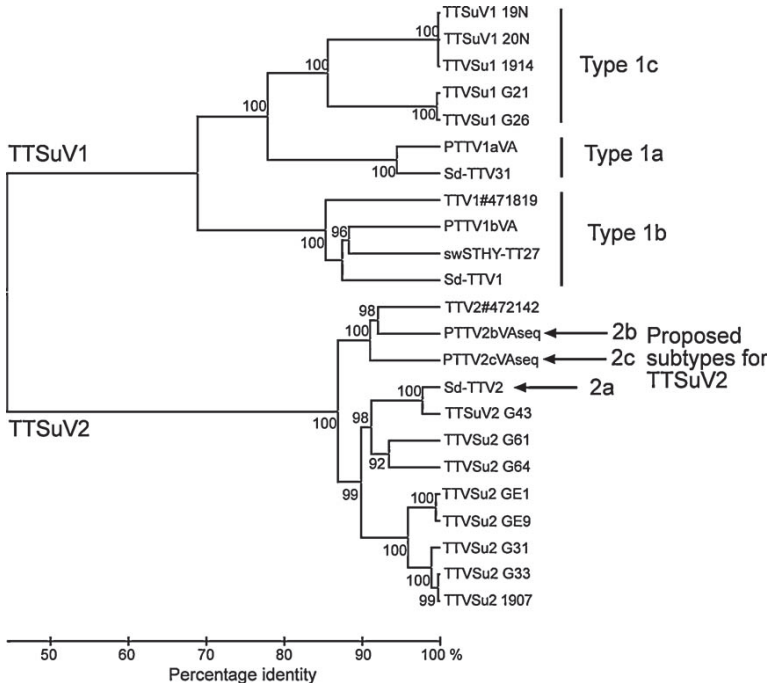
2.1.2.8. Sertés TT vírusok

Az első sertés TT vírust 2002-ben fedezték fel Japánban [Okamoto és mtsai, 2002]. Genomja 2,9 kb hosszú, és nem tartalmaz ORF4-et. A genom nukleotidszekvenciája több mint 50%-ban eltér az emberi és a többi állati TT vírusétól, szerkezetében és a feltételezett mRNS átiratok hosszában mégis közelebb áll az Anellovírusokhoz, mint az állati Circovírusokhoz.

A sertés TT vírusok világszerte előfordulnak sertésekben. Prevalenciájuk a földrajzi helytől függően 24 – 100% is lehet [McKeown és mtsai, 2004]. Eddig nem bizonyultak patogénnek, azonban más vírusokkal koinfekcióban nem zárható ki a szerepük olyan soktényezős betegségek előidézésében, mint például a választott malacok Circovírus okozta sorvadása (PWMS - Post - weaning multisystemic wasting syndrome) [Kerakeinen és mtsai, 2006]. Ennek a biológiai jelentősége még nem egyértelmű, azonban a sertés TT vírusok magas prevalenciája további kockázatot jelenthet xenotranszplantáció esetében az immunszuppresszált betegek számára.

Az első szekvenciaadatok alapján a sertés TT vírusok két genocsoportját különítették el (sTTV1 és sTTV2) [Okamoto és mtsai, 2002, Niel és mtsai, 2005]. A közöttük tapasztalt nagy

genetikai távolság miatt ma már két külön speciesnek tekintik a két csoportot (TTSuV1 és TTSuV2), amelyek körülbelül mindössze 55%-os homológiát mutatnak [Huang és mtsai, 2010]. Jelenleg 23 teljes genom szekvencia áll rendelkezésre. Elemzésük alapján a TTSuV1-en belül 3 genotípust írtak le (1a-c). A csoport rendkívül nagy genetikai variabilitást mutat (~30%). A TTSuV2-n belüli variabilitás alacsonyabb (~15%), a genotípusok pontos száma azonban még nem egyértelmű (9. ábra) [Cortey és mtsai, 2011].



9. ábra. Az eddig ismert sertés TTV változatok filogenetikai kapcsolatai [Cortey és mtsai, 2011]

Előfordulásuk vizsgálatát az indokolja, hogy feltételezések szerint a sertésekben előforduló vírusok – az állatok húsát elfogyasztva, vagy egyéb, egészségügyi felhasználást (pl. xenotranszplantáció) követően – veszélyt jelenthetnek az emberre.

2.3. Molekuláris járványügyi vizsgálatok

A parenterális úton terjedő vírusok ma is világszerte okoznak kórházi járványokat. Egészségügyi beavatkozásokkal összefüggésben történt fertőződéseket sokféle járó-, és fekvőbeteg osztályon leírtak már [CDC, 2003]. Leggyakrabban azonban krónikus betegek érintettek, akik kezelésük során számos invazív beavatkozáson esnek át. A leginkább veszélyeztetett betegcsoportok a krónikus dializáltak és az onkológiai betegek [Silini és mtsai, 2002, Dumpis és mtsai, 2003, Bracho és mtsai, 2005, Carneiro és mtsai, 2007, Mailliard és mtsai, 2009]. A járványok során a fertőzés többnyire betegről betegre terjed, egészségügyi dolgozók ritkán érintettek akár donorként, akár recipiensként, de erre is van példa. Esteban és munkatársai 1996-ban bizonyították, hogy egy HCV hordozó szívsebész 6 év alatt 222 betegéből hatot fertőzött meg a vírussal szívbillentyű-csere műtétek során [Esteban és mtsai, 1996]. Sepkowitz onkológiai osztályokon zajlott HCV járványok vizsgálatának tapasztalatait foglalja össze. Az eredmények azt mutatják, hogy a HCV megtalálható a hordozók nyálában, könnyében és más váladékaiban, és a vírus ezekkel a váladékokkal való érintkezés útján is terjedhet. A járványok többségében vizsgálták azt is, hogy lehetett-e a vírusforrás az egészségügyi dolgozók egyike, de ez minden esetben kizárható volt [Sepkowitz, 2004].

A fertőzések sokszor arra vezethetők vissza, hogy az egészségügyi dolgozók megszegik az alapvető higiénés rendszabályokat, például újrahasználják az egyszerhasználatos tűket, fecskendőket, vagy nem váltanak elég gyakran kesztyűt. Egy Belgiumban zajlott retrospektív vizsgálat során 36 akut HBV fertőzés tüneteit mutató beteg esetében kiderült, hogy egyazon háziorvoshoz jártak, aki mindannyiuknak injekciót adott be legalább 3 hónappal a májgyulladás tüneteinek jelentkezése előtt [Pourkarim és mtsai, 2009]. Más esetekben az intézményben uralkodó viszonyok, a túlszűfolttság vagy az infekciókontroll hiányosságai vezetnek a járvány kitöréséhez. Egy Dániában zajlott HBV járvány vizsgálata során arra következtettek a szakemberek, hogy a fertőzéseket a nem megfelelő kórházi gyakorlat és a körülmények okozták. A zsúfolt onkológiai osztályon ugyanis a steril és nem steril műveleteket (mintavétel és preparálás, transfúziós szerelések összeállítása) egyazon helyiségben végeztek, így például a használt eszközök, és a többadagos kiszerezésű gyógyszeres üvegcscék gyakran egymás mellé kerültek az asztalon. A tiszta eszközök vagy készítmények kontaminációja ezáltal könnyen bekövetkezhetett [Fisker és mtsai, 2006].

A nozokomiális járványok felderítése során egyre gyakrabban alkalmaznak molekuláris szintű analízist. A vírusgenomok filogenetikai vizsgálata molekuláris bizonyítékot szolgáltat a fertőzések közös eredetére, segíthet azonosítani (vagy éppen kizárni) a

lehetséges fertőző forrást, és felderíteni az intézményben zajlott eseményeket, amelyek végül a járvány kitöréséhez vezettek.

Az ilyen vizsgálat során a kimutatott vírusgenomok egy megfelelően változékonyságú szakaszának nukleotidsorrendjét polimeráz láncreakcióval történt felszaporítás után meghatározzák. A kapott szekvenciákat egymással, valamint megfelelő helyi és nemzetközi kontroll-szekvenciákkal hasonlítják össze, és filogenetikai fát készítenek. Az eddig a témában megjelent tanulmányok a hepatitis B vírus járvány esetén a vírusgenom legváltozékonyságú részét, vagyis a felszíni („S”) antigént kódoló régió egy szakaszát, vagy pedig a teljes genom szekvenciáját vizsgálták [Echevarría és mtsai, 2005, Lin és mtsai, 2005, Pourkarim és mtsai, 2009]. Hepatitis C vírussal történt fertőzések molekuláris járványügyi vizsgálata során általában vagy a gyorsan evolválódó első hipervariabilis régió (HVR1), vagy a burokfehérjéket kódoló E1 és E2 régió teljes vagy részleges nukleotidsorrendjét elemezték (amely szintén tartalmazta a HVR1-et) [Izopet és mtsai, 1999; Silini és mtsai, 2002]. Az adatok szerint a lassabban változó NS5B régió genotipizálásra és szubtipizálásra a legalkalmasabb, de a vírusszekvenciák rokonságának bizonyításához is elegendő információval szolgált [Laperche és mtsai, 2005, Carneiro és mtsai, 2007]. Az E2 HVR1-et is magában foglaló szakasza azonban pontosabb eredményt adott például abban az esetben, amikor a fertőződés és a mintavétel között csak rövid idő telt el [Bracho és mtsai, 2005]. Az eredmények jobb statisztikai alátámaszthatósága érdekében mindkét régió esetében javasolták minél hosszabb szakasz nukleotidsorrendjét figyelembe venni [Casino és mtsai, 1999].

3. Célkitűzések

A vírusos májgyulladás jelenleg a leggyakoribb májbetegség a világon. A hepatitis B és C vírusok okozta krónikus fertőzések a májcirrhisosok közel 60%-áért, a hepatocelluláris carcinomák majdnem 80%-áért felelősek. Világszerte minden 40. haláleset hátterében végstádiumú májbetegség áll, amelyek többsége szintén vírusos eredetű [Perz és mtsai, 2006].

3.1. Nem klasszikus hepatitis vírusok prevalenciája és genotípusai Magyarországon

A hepatitis A és B vírussal történt fertőzések kimutatására szolgáló diagnosztikumok az 1970-es években váltak széles körben elérhetővé. Elterjedésükkel világossá vált, hogy mind az enterálisan, mind pedig a parenterálisan átvitt vírusos májgyulladások között számos olyan eset akad, amelyért nem ez a két kórokozó felelős. Ezekre a megbetegedésekre a non A-B hepatitis elnevezést használták. Húsz évvel később, a molekuláris technikák fejlődése tette lehetővé az enterálisan terjedő hepatitis E vírus, illetve a parenterális májgyulladások jelentős részét okozó hepatitis C vírus azonosítását. Idővel azonban kiderült, hogy továbbra is előfordulnak olyan megbetegedések, amelyek nem magyarázhatók a négy vírus bármelyikével történt fertőzéssel (non A-E hepatitis), az esetek súlyossága ráadásul nagyon eltérő volt. Az évek során az ilyen megbetegedések egy része esetében a diagnosztikai módszerek fejlődése tisztázta a kórokozót, így kimutathatóvá váltak a hepatitis B különböző S-antigén mutánsai, és a hepatitis C vírus sokféle genotípusa és szubtípusa. A vírusgenomok molekuláris módszerrel végzett kimutatása is egyre érzékenyebbé vált.

Mindezek ellenére még mindig maradtak ismeretlen etiológiájú májgyulladásos esetek, amelyek hátterének vizsgálata során az 1990-es években több új lehetséges kórokozó vírust azonosítottak. 1995-ben fedezték fel a hepatitis G vírust, más néven GB vírus C-t, 1997-ben a TT vírust, 2000-ben pedig az azóta a TTV-k közé sorolt SEN vírust. Ezen vírusok diagnosztikáját Magyarországon az Országos Epidemiológiai Központ Virologiai Főosztálya vezette be elsőként Dr. Takács Mária vezetésével.

Munkánk során a célunk az volt, hogy felmérjük GBV-C előfordulását egy egészséges magyar populációban, és egy többszörösen hátrányos helyzetű személyekből álló rizikócsoportban. A TT vírusok 3-as genocsoportjának prevalenciáját egészségügyi dolgozók

körében, a sertés TT vírusokét pedig egy magyarországi sertéstelep malacaiban vizsgáltuk. Mindegyik esetben a kimutatott vírusok genotípusait is meghatároztuk.

3.2. Klasszikus hepatitis vírusok okozta járványok molekuláris vizsgálata

A hepatitis B és C vírusok epidemiológiája a fejlett világban az elmúlt évtizedekben sokat változott. A vérrel, vérkészítményekkel és szilárd szervekkel történő vírusátvitel a donorok szűrésének bevezetése óta nagyon ritkává vált. A hepatitis B elleni hatékony és biztonságos vakcina kifejlesztése és az oltási kampányok még jobban visszaszorították az akut esetek számát. Más vírusátviteli utak kerültek előtérbe, így az intravénás kábítószer-használat, és a HBV esetében a szexuális, és az intrafamiális transzmisszió. Világszerte előfordulnak továbbá kórházi hepatitis B és C járványok, így hazánkban is. Ezek vizsgálata korábban csak járványügyi módszerekkel történt.

Célkitűzésünk az volt, hogy e két, elsősorban vérrel terjedő vírus esetében olyan, molekuláris szintű vizsgálati módszereket dolgozzunk ki és vezessünk be, amelyek kórházi vagy intrafamiális járványok gyanúja esetén molekuláris bizonyítékot szolgáltathatnak a fertőzések közös eredetére, vagy éppen kizárhatják azt. A molekuláris járványügyi vizsgálatok továbbá nagyban segíthetik az epidemiológiai vizsgálatot végző szakembereket az események utólagos rekonstruálásában. Az eredmények segíthetnek az infékcióntróll területén új, bizonyíték-alapú protokollok felállításában, amelyek segítségével megelőzhető esetleges további járványok kialakulása.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Vizsgálati anyagok

A vizsgálatok megkezdéséig minden mintát -20°C-on tároltunk.

4.1.1. HGV/GBV-C vizsgálatok

Az egészségesek HGV/GBV-C szűrővizsgálatához 124, hepatitis tüneteit nem mutató budapesti lakos vérsavó mintáit használtuk fel. A minták levétele 1999-es év folyamán zajlott. A vizsgált személyek közül 75 nő, 49 férfi volt. Életkoruk 0 és 65 év között változott.

A vizsgált többszörösen hátrányos helyzetű csoport a Budapest IX. kerületében, az Illatos út és a Gubacsi út sarkán található lakótelep („Dzsumbuj”) lakói közül származott. Többségük roma származású, munkanélküli és drogfogyasztó. A prostitúció is gyakori a körükben. A megvizsgált 75 vérmintát 2005. október 5-6-án vették egy szűrés alkalmával.

4.1.2. Humán TT vírus vizsgálatok

A 3-as genotípus-csoportba tartozó TT vírusok prevalenciáját és genotípusait egy budapesti kórház 185 egészségügyi dolgozójának savómintáiban vizsgáltuk. A vizsgált személyek többsége nő volt (170/185), átlagéletkoruk 40,5 (22-70) év volt. Kontrollként 40 olyan egészséges személyt választottunk ki, akiknek a savómintája az Országos Epidemiológiai Központ Virologiai Főosztályára szűrővizsgálat céljából érkezett. Közülük 24 nő, 24 férfi volt. Átlagéletkoruk 36,2 (22-56) év volt. Minden vizsgált személy negatív volt anti-HIV 1/2 és anti-HCV ellenanyagokra. Egy egészségügyi dolgozó volt HBsAg pozitív.

Egy hepatitis tüneteket nem mutató egészségügyi dolgozó 15 év során 1-3 évente vett, összesen 9 mintájában vizsgáltuk a 3-as genocsoportba tartozó TT vírusok jelenlétét. A mintákat 1992-ben, 1993-ban, 1996-ban, 1998-ban, 2000-ben, 2001-ben, 2002-ben, 2005-ben, és 2006-ban vették az anti- HBs titer és az anti-HCV státusz rutin monitorozása céljából. Ez alatt az időszak alatt a vizsgált személy végig anti-HBs pozitív és anti-HCV negatív maradt, májgyulladás tüneteit nem mutatta.

4.1.3. Sertés TT vírus vizsgálatok

Egy magyarországi sertésneveldeből származó 44 malac különböző szerveiben (szérum, máj és bél) vizsgáltuk sertés TT vírusok jelenlétét. A minták levétele két csoportban (jelölésük: BLC II és BLC VII–VIII) történt, 12 hónap eltéréssel.

4.1.4. Hepatitis B vírus vizsgálatok

A családi halmozódás vizsgálatát két gyermek, valamint nevelőanyjuk savómintájából végeztük el. Mindhármán HBsAg pozitívak voltak.

Egy magyarországi kórház onkohematológiai osztályáról 7 gyermek, valamint egyikük testvérének korábban már HBsAg pozitívnak bizonyult savómintáját kaptuk meg molekuláris epidemiológiai vizsgálat céljából.

4.1.5. Hepatitis C vírus vizsgálatok

Egy hemodialízis központ 21 anti-HCV IgG pozitív betegének savómintájából is molekuláris epidemiológiai vizsgálatot végeztünk. A vizsgált 21 beteg közül 4 évek óta vírushordozó volt, a többi beteg feltételezhetően újonnan fertőződött. A filogenetikai vizsgálathoz kontrollként 15 olyan HCV hordozó beteg mintáját használtuk, akik Magyarország különböző területeiről származtak.

Egy kórház onkológiai osztályáról 21 anti-HCV ellenanyagokra pozitív beteg vérsavó mintáját kaptuk meg egy feltételezett nozokomiális járvány molekuláris kivizsgálása céljából. Közülük egy beteg az adatok szerint legalább 1998 óta vírushordozó volt, a többiek anamnézisében nem szerepelt HCV fertőzés. A minták levétele 2008 márciusa és novembere között történt. Minden beteg nő volt, átlagéletkoruk 57,7 (27-76) év volt a mintavétel idején. Kontrollként 40 olyan HCV hordozó beteg savómintáját választottuk ki, akik az ország eltérő területeiről származtak, és fertőződésük tudomásunk szerint független volt az onkológiai osztályon zajlott járványtól.

4.2. Nukleinsav kivonás

4.2.1. Sertés szövetminták előkészítése

A malacokból származó bél-, és májmintákat steril homokkal eldörzsöltük, 1,5 ml hideg PBS (phosphate buffered saline) oldatban (pH 7,2) homogenizáltuk, majd lecentrifugáltuk. A felülúszóból azonnal elvégeztük a fenol-kloroformos nukleinsav kivonást.

4.2.2. Fenol-kloroformos nukleinsav extrakció vérsavóból

Valamennyi HGV/GBV-C és TTV vizsgálat, valamint a családi HBV halmozódás vizsgálata során a mintákból a nukleinsavakat fenol-kloroformos extrakcióval vontuk ki. Ehhez a savó, vagy az előkészített szövetminta 160 µl-jét 395 µl lízis pufferben (25 mM EDTA; 0,2 M Tris-HCl; pH: 7,5; 0,3 M NaCl; 2 % SDS), 4 µl 20 mg/ml-es proteináz-K jelenlétében inkubáltuk 37°C-on egy órán át. Ezután fenolos (395 µl) - kloroformos (160 µl) extrahálással eltávolítottuk a hidrofób összetevőket. A fázisokat centrifugálással (15 min. 4°C) különítettük el. A vizes fázisban oldott nukleinsavat izopropanolos (480 µl, -20 °C) precipitációval csaptuk ki az oldatból (inkubáció: -20°C-on, min. 12 órán át), centrifugáltuk (10 min. 4°C), majd 70 %-os etanolos mosás következett, mosás után eltávolítottuk az alkoholt, és a cső alján pelletként található nukleinsavat szobahőmérsékleten szárítottuk. A visszaoldás 8 µl RNáz-, DNáz-mentes nagy tisztaságú vízben történt. Az így kivont nukleinsav 2 µl-jét használtuk fel a reverz transzkripció vagy a polimeráz láncreakció lépéséhez.

4.2.3. Nukleinsav kivonás szilika oszlopokon vérsavóból

A szilika oszlopokon történő nukleinsav-kivonáshoz két gyártó reagenskészleteit alkalmaztuk: a HBV járvány vizsgálatokor a Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kitjét, a HCV járványok elemzése során pedig a Qiagen QIAamp MinElute Virus Spin Kitjét használtuk a gyártó utasításai szerint. A virális nukleinsavakat a vizsgálati anyagok (savóminták, illetve a szövetminták homogenizálása és a centrifugálása után nyert felülúszók) 200 µl-éből vontuk ki. A kapott nukleinsav oldatból 8-10 µl-t használtuk fel a reverz transzkripcióhoz vagy a polimeráz láncreakciókhoz.

4.3. Reverz transzkripció

4.3.1. A HGV/GBV-C vizsgálatok

A hepatitis G vírus/GB vírus C genomok detektálásakor a reverz transzkripcióhoz a kivont RNS 2 µl-ét használtuk fel. A reakciót 20 µl végtérfogatban az Applied Biosystems reagenseivel a következőképpen állítottuk össze: 2 µl 10 x PCR puffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 3 µl RNáz, DNáz mentes víz, 8 µl 10 mM dNTP, 1 µl murine leukemia vírus reverz transzkriptáz (50 U/µl), 1 µl RNáz inhibitor (20 U/µl), 1 µl 0.5 µM-os random hexamer, 2 µl of 25 mM MgCl₂. A reakciót 42°C-on végeztük 15 percig, majd az enzimet 99°C-on 5 perc alatt inaktiváltuk.

4.3.2. Hepatitis C vírus vizsgálatok

A hepatitis C vírus vizsgálatok során a reverz transzkripciót a Promega ImProm II reagenskészletével végeztük. A kivont RNS 7 µl-ét 1 µl 0,5 µg/µl random primerrel 5 percen át 70°C-on inkubáltuk, majd azonnal jégre tettük. Az RNS-t ezután 12 µl térfogatú reakcióelegyhez (4 µl 5 x reakciópuffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl 40 U/µl ribonukleáz inhibitor, 1 µl reverz transzkriptáz, 2,5 µl DNáz, RNáz mentes víz) kevertük, és az elegyet 5 percig 25°C-on tartottuk. A cDNS szintézisét 42°C-on végeztük 1 órán át, majd az enzimet 70°C-on 15 perc alatt inaktiváltuk.

4.4. Polimeráz láncreakció

4.4.1. HGV/GBV-C vizsgálatok

A GBV-C genomok kimutatására korábban közölt, a vírusgenom NS5 régiójára specifikus nested PCR-t használtunk [Khudyakov és mtsai, 1997]. A primerek szekvenciáját és a reakciók körülményeit az 1.a és 1.b táblázat mutatja:

1.a táblázat. A HGV/GBV-C PCR reakció során használt primerek

<i>Lépés</i>	<i>Primer jelölése</i>	<i>Irány</i>	<i>Primer nukleotidsorrendje</i>
1. PCR	HGYK877	Sense	5'- ACC GAC ACC TTA GAT CCC CAG CCC-3'
	HGYK874	Antisense	5'- CTG ATG TTG CTA GCC TGT GTG AGA-3'
2. PCR	HGYK876	Sense	5'- biotin - CCT TAC AGT CCT TAT TGC TTC CTC-3'
	HGYK1183	Antisense	5'- GTA AAA CGA CGG CCA CAG AAC CAT ACA GCC TAT TGT GC-3'

1.b táblázat. A HGV/GBV-C PCR reakció körülményei

<i>Lépések</i>	<i>1. PCR</i>			<i>2. PCR</i>		
	<i>Hőmérséklet (°C)</i>	<i>Idő (min:sec)</i>	<i>Ciklusok száma</i>	<i>Hőmérséklet (°C)</i>	<i>Idő (min:sec)</i>	<i>Ciklusok száma</i>
Kezdeti denaturáció	94	3:00	1x	94	3:00	1x
Denaturáció	94	0:30	35x	94	0:30	30x
Primer kapcsolódás	57	0:30		56	0:30	
Lánchosszabbítás	72	1:00		72	1:00	
Végző lánchosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x

A HGV/GBV-C genotipizálással egybekötött, PCR-en alapuló detektálását japán kutatók dolgozták ki [Naito & Abe, 2001]. Az 1-4 genotípusokat kimutató rendszerhez típus-specifikus primereket terveztek az 5' UTR konzervatív régiójára. A HG1, a HG1R és a HG2R univerzális primerek. Az első kettő alkotja az első PCR reakcióhoz szükséges külső primerpárt, a HG2R pedig a második PCR-kor használt belső primerpár antisense tagja. Ehhez a primerhez terveztek négy genotípus-specifikus primert. Ezek olyan szakaszokhoz készültek, melyek egy adott genotípuson belül rendkívül konzervatívak, de más genotípusokkal viszonylag kis homológiát mutatnak, az univerzális primerek pedig olyanokhoz, melyek minden genotípusban nagyon hasonlóak és konzervatívak. A második PCR reakcióhoz kétféle keveréket készítettünk. Az egyik a HG2R mellett a G38 (az 1. genotípushoz) és a G41 (a 3. genotípushoz) jelzésű primereket tartalmazta, a másik pedig a G35-öt (a 2. genotípushoz) és a G40-et (a 4. genotípushoz). A primerek ilyen elosztása a genotípus-specifikus primereknek a HG2R-től való eltérő távolságán alapul. Az eltérő távolságok eltérő méretű termékekhez vezetnek, amelyek aztán a gélelektroforézis során szemmel is elkülöníthetők. A primerek szekvenciáját és a reakciók körülményeit a 2.a és 2.b táblázat mutatja:

2.a táblázat. A HGV/GBV-C genotipizáló PCR reakciók során használt primerek

Lépcs	Primer jelölése	Irány	Kimutatott genotípusok	Primer nukleotidsorrendje
1. PCR	HG1	Sense	Összes	5'-GGT CGT AAA TCC CGG TCA CC-3'
	HG1R	Antisense	Összes	5'-CCC ACT GGT CCT TGT CAA CT-3'
2. PCR	G38	Sense	1	5'-TGT AAT AAG GAC CCG GCG MT-3'
	G35	Sense	2	5'-GGG TCT TAA GAG AAG GTT AAG A-3'
	G41	Sense	3	5'-TGG TCA AGG TCC CTC TG-3'
	G40	Sense	4	5'-GGG TYA AGG CAC CTC TTA-3'
	HG2R	Antisense	Összes	5'-GGT CCA CGT CGC CCT TCA AT-3'

2.b táblázat. A HGV/GBV-C genotipizáló PCR reakció körülményei

Lépések	1. PCR			2. PCR		
	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	94	3:00	1x	94	3:00	1x
Denaturáció	94	0:20	40x	94	0:20	20x
Primer kapcsolódás	55	0:20		58	0:20	
Lánchosszabbítás	72	0:30		72	0:30	
Denaturáció				94	0:20	20x
Primer kapcsolódás				60	0:20	
Lánchosszabbítás				72	0:30	
Végző lánchosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x

4.4.2. TT vírus vizsgálatok

A 3-as genocsoportba tartozó TT vírusok kimutatása során háromféle nested polimeráz láncreakciót alkalmaztunk. Az 1. PCR során korábban közölt primereket használtuk (AI-1F és AI-1R), amelyek minden ismert, a vizsgált TTV 3. genotípus-csoportjába sorolt vírus kimutatására voltak alkalmasak. A 2. PCR során háromféle primerpárt használtunk. Két korábban közölt primerpárt kissé módosítottunk. Ezek a 3-as genocsoportba sorolt SEN vírusok D és H genotípusának detektálására szolgáltak (D-1127F és D-1341R, valamint H-1017F és H-1134R). Egy harmadik primerpárt (AI-2F és AI-2IR) a teljes genotípus-csoport kimutatására terveztünk. A primerek szekvenciáját és a reakciók körülményeit a 3.a és 3.b táblázat mutatja:

4.4.3. Sertés TT vírus vizsgálatok

A sertésekben előforduló TT vírusok kimutatásához személyes közlésből származó primereket használtunk [Bigarré és mtsai, 2006]. A primerek szekvenciáját és a reakciók körülményeit a 4.a és 4.b táblázat mutatja.

3.a táblázat. A humán TTV PCR reakciók során használt primerek

Lépés	Primer jelölése	Irány	Kimutatott genotípusok	Primer nukleotidsorrendje
1. PCR	AI-1F	Sense	Összes	5'-TWC.YCM AAC.GAC.CAG.CTA.GAC.CT-3'
	AI-1R	Antisense	Összes	5'-GTT.TGT.GGT.GAG.CAG.AAC.GGA-3'
2. PCR	D-1127F	Sense	SENV-D	5'-CCA.CCC.ATG.AAA.AAC.ACA.GAA.C-3'
	D-1341R	Antisense	SENV-D	5'-GCA.GTT.GAC.CGC.AAA.GTT.ACA.AGA.G-3'
	H-1017F	Sense	SENV-H	5'-TAC.TTT.GGC.TGC.ACC.TTC.TG-3'
	H-1134R	Antisense	SENV-H	5'-GTA.GTA.GRA.ATG.ATG.GGT.GAG.TGT-3'
	AI-2F	Sense	Összes	5'-AGC.TAG.ACC.TGG.YBA.GAT.ACA-3'
	AI-2R	Antisense	Összes	5'-TGW.GDG.TAC.CAC.TKR.TCT.TCA.AA-3'

3.b táblázat. A humán TTV PCR reakciók körülményei

Lépések	1. PCR			2. PCR		
	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	95	3:00	1x	95	3:00	1x
Denaturáció	95	0:30	40x	95	0:30	35x
Primer kapcsolódás	56	0:45		55/54/53*	0:45	
Lánchosszabbítás	72	0:45	1x	72	0:45	1x
Végző lánchosszabbítás	72	7:00		72	7:00	

*A primerkapcsolódási hőmérsékletek sorrendje: D-1127F/D-1341R, H-1017F/H-1134R, és AI-2F/AI-2R

4.a táblázat. A sertés TTV PCR reakció során használt primerek

Primer jelölése	Irány	Kimutatott genotípusok	Primer nukleotidsorrendje
oGVB4034	Sense	Összes	5'-GGA.GTC.AAG.GGG.CCT.ATC.GG-3'
oGVB403	Antisense	Összes	5'-CCG.GCG.WAT.TTG.GGG.TGT.GT-3'

4.b táblázat. A sertés TTV PCR reakció körülményei

Lépések	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	95	3:00	1x
Denaturáció	95	0:30	40x
Primer kapcsolódás	56	0:45	
Lánchosszabbítás	72	0:45	1x
Végző lánchosszabbítás	72	7:00	

4.4.4. Hepatitis B vírus vizsgálatok

A hepatitis B vírusok kimutatásához, majd a szekvenáláshoz és a filogenetikai vizsgálathoz nested PCR-t alkalmaztunk. A primerek a genom pre-S1/pre-S2/S régió egy-egy szakaszát szaporították fel [Carman és mtsai, 1990, Naito és mtsai, 2001]. A kétféle reakció során az első körben használt primerek azonosak voltak. A primerek szekvenciáját az 5.a, a

detektálási reakció körülményeit az 5.b, a genotipizáláshoz szükséges PCR körülményeit pedig az 5.c táblázat mutatja:

5.a táblázat. A HBV PCR reakciók során használt primerek

<i>Lépés</i>		<i>Primer jelölése</i>	<i>Irány</i>	<i>Primer nukleotidsorrendje</i>
1. PCR		Outer1	Sense	5'- TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'
		Outer2	Antisense	5'- CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC 3'
2. PCR (pozíció)	Detektálás (459-668)	Inner1	Sense	5'- GTA TGT TGC CCG TTT GTC CTC-3'
		Inner2	Antisense	5'- GGC ACT AGT AAA CTG AGC CA-3'
	Genotipizálás (2935-459)	Inner1	Sense	5'- AAT CCA GAT TGG GAC TTC AAC C-3'
		Inner2	Antisense	5'- GAG GAC AAA CCG GCA ACA TAC-3'

5.b táblázat. A HBV detektálási PCR reakció körülményei

<i>Lépések</i>	1. PCR			2. PCR		
	<i>Hőmérséklet (°C)</i>	<i>Idő (min:sec)</i>	<i>Ciklusok száma</i>	<i>Hőmérséklet (°C)</i>	<i>Idő (min:sec)</i>	<i>Ciklusok száma</i>
Kezdeti denaturáció	94	3:00	1x	94	3:00	1x
Denaturáció	94	0:30	40x	94	0:30	30x
Primer kapcsolódás	55	0:30		54	0:30	
Lánchosszabbítás	72	0:30		72	0:30	
Végző lánchosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x

5.c táblázat. A HBV genotipizálási PCR reakció körülményei

<i>Lépések</i>	1. PCR			2. PCR		
	<i>Hőmérséklet (°C)</i>	<i>Idő (min:sec)</i>	<i>Ciklusok száma</i>	<i>Hőmérséklet (°C)</i>	<i>Idő (min:sec)</i>	<i>Ciklusok száma</i>
Kezdeti denaturáció	94	3:00	1x	94	3:00	1x
Denaturáció	94	0:30	40x	94	0:30	35x
Primer kapcsolódás	55	0:30		57	0:30	
Lánchosszabbítás	72	0:30		72	0:30	
Végző lánchosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x

4.4.5. Hepatitis C vírus vizsgálatok

A hemodialízis központban és az onkológiai osztályon zajlott járványok során vizsgált betegek savómintáiból és a kontrollmintákból nested polimeráz láncreakcióval mutattuk ki a vírusgenomokat. A vírust a legnagyobb érzékenységgel a genom konzervatív 5'UTR régiójára specifikus primerekkel lehetett detektálni [Khan és mtsai, 2004]. Filogenetikai vizsgálat céljából a változékonyabb NS5B régióra terveztünk primereket. Az onkológiai osztályon zajlott járvány esetében az eredmények megerősítése érdekében a burok glikoproteineket kódoló, rendkívül variábilis E1/E2 régió egy 1026 bázis hosszú szakaszát is felszaporítottuk,

korábban közölt primerek segítségével [Ray és mtsai, 2000]. A primerek tulajdonságait és nukleotidsorrendjét a 6.a táblázatban, a reakciók körülményeit pedig a 6.b, 6.c, és 6.d táblázatokban tüntettük fel.

6.a táblázat. A HCV PCR reakciók során használt primerek

Régió	Lépés	Irány	Pozíció	Primer nukleotidsorrendje
5'UTR	1. PCR	Sense	43-68	5'-CCC TGT GAG GAA CTA CTG TCT TCA CG-3'
		Antisense	348-322	5'-TGC TCA TGG TGC ACG GTC TAC GAG ACC-3'
	2. PCR	Sense	78-103	5'-TCT AGC CAT GGC GTT AGT ATG AGT GT-3'
		Antisense	313-288	5'-CAC TCG CAA GCA CCC TAT CAG GCA GT-3'
NSSB	1. PCR	Sense	8312-8332	5'-GGA GKC AAT YTA CCA ATG YTG TGA C-3'
		Antisense	9220-9203	5'-GCC GSD ATT GGA GTG AGT TTR AG-3'
	2. PCR	Sense	8622-8636	5'-ACG GAK GCT ATG ACY AGG-3'
		Antisense	9187-9171	5'-ACY GCC CAR TTR AAG AGG TA-3'
E1/E2	1. PCR	Sense	834-859	5'-GCA ACA GGG AAC CT TCCT GGT TGC TC-3'
		Antisense	2086-2064	5'-GGG CAG DBC ARR GTG TTG TTG CC-3'
	2. PCR	Sense	843-868	5'-AAC CTT CCT GGT TGC TCT TTC TCT AT-3'
		Antisense	1868-1848	5'-GAA GCA ATA YAC YGG RCC ACA-3'

6.b táblázat. A HCV UTR PCR reakció körülményei

Lépések	1. PCR			2. PCR		
	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	95	3:00	1x	95	3:00	1x
Denaturáció	95	0:45	35x	95	0:45	30x
Primer kapcsolódás	60	0:45		59	0:45	
Lánchosszabbítás	72	0:45		72	0:45	
Végző lánchosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x

6.c táblázat. A HCV NSSB PCR reakció körülményei

Lépések	1. PCR			2. PCR		
	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	95	3:00	1x	95	3:00	1x
Denaturáció	95	0:40	40x	95	0:40	35x
Primer kapcsolódás	58	0:40		57	0:40	
Lánchosszabbítás	72	1:00		72	1:00	
Végző lánchosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x

6.d táblázat. HCV E1/E2 PCR reakció körülményei

Lépések	1. PCR			2. PCR		
	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma	Hőmérséklet (°C)	Idő (min:sec)	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	95	3:00	1x	95	3:00	1x
Denaturáció	95	0:30	35x	95	0:30	30x
Primer kapcsolódás	58	0:45		59	0:45	
Lánchosszabbítás	72	1:00		72	1:00	
Végző lánchosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x

4.5. Agaróz gélelektroforézis

A polimeráz láncreakció során felszaporított termékek méretének ellenőrzését agaróz-gélelektroforézissel végeztük. A keletkezett termékhez a 2%-os agaróz-gélbe való bemérés előtt 10 mg/ml-es etídium-bromid oldatot adtunk, a termék méretének megállapításához ismert méretű DNS-fragmentumokat tartalmazó ún. „létra” 5 µl-jét használtuk (100bp DNA ladder, Promega, Madison, WI, USA).

4.6. Nukleotidsorrend meghatározás

A polimeráz láncreakciók termékeit a genotípus-meghatározások során vagy plazmid vektorba történő klónozás után, vagy pedig közvetlenül szekvenáltuk.

4.6.1. PCR termék klónozása plazmid vektorba

A GBV-C esetében a genotipizáló primerekkel végzett PCR termékeit, az egészségügyi dolgozókból kimutatott TT vírusok esetében az AI-2F és AI-2R primerekkel végzett reakció termékeit, valamint a sertés TT vírusokból kapott PCR termékeket plazmid vektorba történő klónozás után szekvenáltuk. Ehhez az Invitrogen Corporation TOPO TA Cloning[®] kitjét (Invitrogen, San Diego, CA) használtuk a gyártó leírása szerint, kivéve azt, hogy a sertés TTV PCR termékek klónozása során az agaróz gélből kivágott termék ligálását 5 perc helyett egy éjszakán át végeztük a termék nagy mérete miatt.

A plazmid preparálást a HGV/GBV-C vizsgálatok esetében még fenol-kloroformos eljárással végeztük, később ezt felváltotta az egyszerűbb és gyorsabb, szilika oszlopokon történő DNS extrakció, amelyhez a Viogene Mini-M kitjét (Viogene, New Taipei City, Taiwan) használtuk a gyártó utasításai alapján.

4.6.2. Nukleotidsorrend-meghatározás A.L.F. szekvenálóval

A PCR termékek közvetlen szekvenálásához a termékeket a biotinilált forward primernél fogva streptavidines mágneses gyöngyökhöz kötve tisztítottuk, majd fluoreszcenciával jelölt *M13 Universal primer* segítségével, az AutoRead Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) használatával szekvenáltuk. A szekvenáló primer a reverz primer végén található

komplementeréhez kötődött az anelláció során. A nukleotidsorrendet egy A.L.F. DNA Sequencer berendezés segítségével olvastuk le. A HGV/GBV-C genomok detektálására szolgáló PCR termékeit szekvenáltuk így.

Plazmidba klónozott PCR termékek esetén a szekvenálási reakcióhoz primerként *M13 Universal primert* használtunk. Ezzel a módszerrel a HGV/GBV-C genotipizáló primerekkel felszaporított, változékonyabb genomszakaszának szekvenálását végeztük el.

4.6.3. Nukleotidsorrend-meghatározás ABI PRISM Genetic Analyzer készüléken

A PCR termékeket a Viogene PCR-M kitjével (Viogene, New Taipei City, Taiwan) tisztítottuk. A ciklikus szekvenálási reakció ABI PRISM 3.1 BigDye Terminator kittel (Perkin Elmer Foster. City, CA, USA), az elektroforézis pedig egy ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer berendezésén történt. Egy családban történt hepatitis B vírus halmozódás elemzése során alkalmaztuk ezt a készüléket és eljárást.

4.6.4. Nukleotidsorrend-meghatározás MegaBACE 1000 szekvenáló készüléken

A PCR termékeket a Viogene PCR-M kitjével tisztítottuk. A ciklikus szekvenálási reakciót a DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kittel (Amersham Biosciences Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) végeztük, majd termékeket etanolos precipitációs módszerrel tisztítottuk a gyártó leírása szerint. A reakciótermékeket egy MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) kapilláris szekvenáló berendezésén elektroforetizáltuk. Ezt az eljárást a következő vizsgálatok során alkalmaztuk: HGV/GBV-C kimutatása egy hátrányos helyzetű populációban, humán és sertés TT vírus vizsgálatok, hepatitis B és C kórházi járványok vizsgálata.

4.7. Szekvenciák elemzése és filogenetikai analízis

A filogenetikai vizsgálatok során a nukleotidsorrend-vizsgálattal kapott, majd manuálisan ellenőrzött és azonos hosszúságúra levágott szekvenciákat többszörös szekvencia-illesztő programmal egymáshoz illesztettük. Erre az ingyenesen hozzáférhető MultAlin és ClustalW programokat használtuk [Corpet, 1988, Thompson és mtasai, 1994].

HGV/GBV-C vizsgálatok: az egészséges magyar lakosságban történt vizsgálat esetében a Phylip programcsomaggal, a többszörösen hátrányos helyzetű személyek körében zajlott felmérés során pedig a MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) szoftver 2.1-es verziójával készítettünk filogenetikai fát [Kumar és mtsai, 2001]. Mindkét fa a neighbor-joining módszerrel, és Kimura 2-paraméteres nukleotid-szubsztitúciós modelljének alkalmazásával készült [Felsenstein, 1989].

Humán TT vírus vizsgálatok: a nukleotid-szekvenciákat aminosavsorrendre fordítottuk, és így illesztettük össze a MultAlin szoftver segítségével. Ezután a MEGA 4.0 verziójával gyökértelen filogenetikai fát készítettünk neighbor-joining módszerrel, a p-distance evolúciós modellel [Tamura és mtsai, 2007]. A fa megbízhatóságát 1000 ismétléses bootstrap analízissel ellenőriztük.

Sertés TT vírus vizsgálatok: A MEGA 3.1-es verziójával gyökértelen filogenetikai fát készítettünk a neighbor-joining módszerrel, a Kimura 2-paraméteres nukleotid-szubsztitúciós modell használatával [Kumar és mtsai, 2004]. A kapott csoportosítás helyességét 1000 ismétléses bootstrap analízis segítségével ellenőriztük.

Hepatitis B vírus vizsgálatok: a MEGA szoftver aktuális legfrissebb verziója segítségével készítettünk gyökeres filogenetikai fát a neighbor-joining módszerrel [Kumar és mtsai, 2004, Tamura és mtsai, 2007]. Nukleotid szubsztitúciós modellnek Kimura 2-paraméteres modelljét választottuk. A fa topológiájának megbízhatóságát 1000 ismétléses bootstrap analízis segítségével ellenőriztük.

Hepatitis C vírus vizsgálatok: a hemodialízis központban zajlott járvány elemzése során a MEGA 4.0-s verziójával gyökértelen filogenetikai fát készítettünk neighbor-joining módszerrel, a Kimura 2-paraméteres modellel. Az onkológiai osztályon zajlott járvány vizsgálatok a szekvenciaadatokat legjobban megközelítő nukleotid szubsztitúciós modellt a ModelTest és a PAUP* programok segítségével választotta ki a FindModel program [Posada and Crandall, 1998, Swofford, 2002]. A filogenetikai fákat a maximum likelihood módszerrel a PhyML 3.0 programmal készítettük [Guindon and Gascuel, 2003]. Az NS5B régió vizsgálata során az AY651061 számú, 1c szubtypusú HCV izolátum, az E2 régió elemzések pedig az AF046866 számú, 3a szubtypusú szekvencia szolgált kulcsoportként. A filogenetikai fák topológiájának megbízhatóságát 1000 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk. Az evolúciós távolságokat a Kimura 2-paraméteres szubsztitúciós modell alkalmazásával a MEGA 4.0 szoftver segítségével számítottuk ki [Tamura és mtsai, 2007].

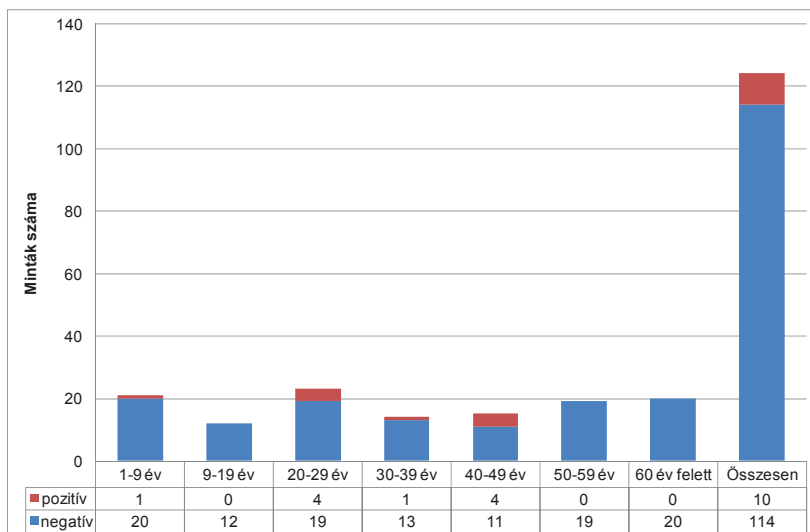
5. Eredmények

5.1. Nem klasszikus hepatitis vírusok prevalenciája és genotípusai Magyarországon

5.1.1. A HGV/GBV-C előfordulása és genotípusai Magyarországon

A GBV-C/HGV prevalenciáját először az egészséges magyar lakosság körében mértük fel. A szűrővizsgálathoz 124 egészséges (hepatitises tüneteket nem mutató) budapesti lakos vérsavó mintáit használtuk fel, amelyek levétele az 1999-es év folyamán történt. A mintákat a felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A vizsgált 124 savóból 10 (8,1%) bizonyult GBV-C/HGV RNS pozitívnak. A GBV-C/HGV RNS-t tartalmazó minták korcsoportonkénti számát a 10. ábra mutatja.



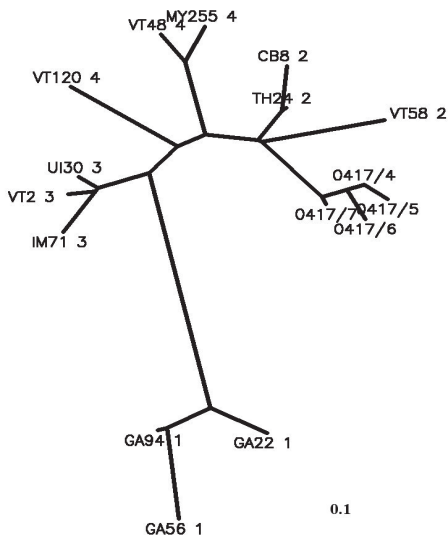
10. ábra. A GBV-C/HGV RNS pozitív és negatív minták megoszlása az egészséges magyar lakosság különböző korcsoportjaiban

Gyermekek között a GBV-C/HGV fertőzöttség alacsony: 19 éves kor alatt csak egyetlen pozitív mintát találtunk. A legmagasabb prevalenciát 40-49 éves kor között kaptuk (4/15). Az 50 év feletti lakosok mintái mind negatívak voltak. A vírus prevalenciája férfiakban és nőkben hasonló volt: 4/49 és 6/75 (8,2% és 8,0%).

A 10 pozitív mintából nyert terméket ezután tisztítottuk, és közvetlen módon szekvenáltuk. A FASTA program segítségével összehasonlítottuk őket más, korábban publikált szekvenciákkal, és megállapítottuk, hogy a kapott termék mindegyik esetben valóban a GBV-C/HGV genom NS5 régiójának várt hosszúságú szakasza volt.

A Naito és Abe által kidolgozott, genotipizálással egybekötött RT-PCR módszert 10, korábban a másik módszerrel már GBV-C-re pozitívnak bizonyult mintával próbáltuk ki. Közülük 7 mintából a Mix B-vel kaptunk pozitív eredményt. A termék mérete a 2-es genotípusnak felel meg. A másik 3 minta esetében nem volt lehetséges a genotipizálás ezzel a módszerrel, egyik primerkombinációval sem kaptunk pozitív eredményt.

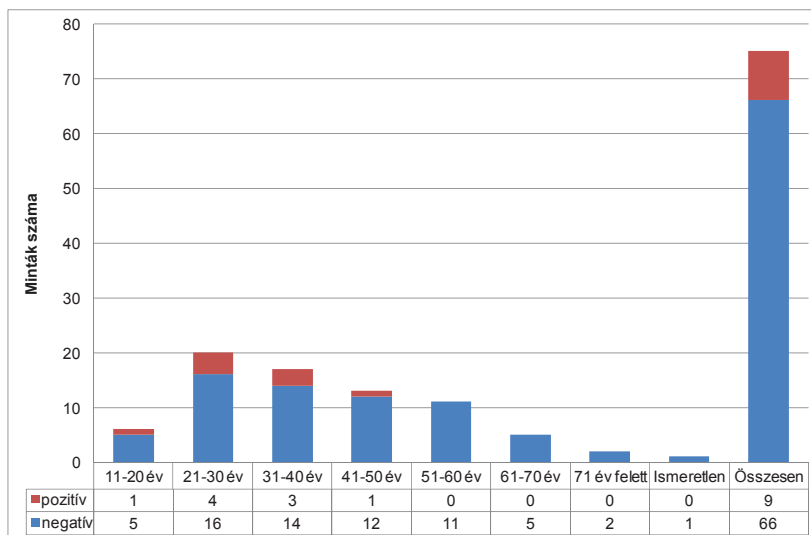
Az egyik, 2-es genotípusúként azonosított terméket plazmidba klónoztuk, és négy klón nukleotidsorrendjét meghatároztuk. A 4 klónt a nemzetközi GenBankból választott, ismert genotípusú referencia-szekvenciákkal illesztettük össze.



11. ábra. A Phylip programmal készített gyökértelen filogenetikai fa. Az izolátumok azonosítói után a genotípusok számát tüntettük fel. A 0417/4, 0417/5, 0417/6 és 0417/7 jelű szekvenciák pedig a 2-es genotípusra pozitívítást mutató mintából kapott klónok.

Ezek hozzáférési számai: 1-es genotípus: AB004509 (GA22), AB004511 (GA56), AB004515 (GA94); 2-es genotípus: AB013203 (VT58), AB013231 (TH24), AB013229 (CB8); 3-as genotípus: AB013192 (UI30), AB013193 (VT2), AB008342 (IM71); 4-es genotípus: AB030438 (VT120), AB018667 (VT48), AB030435 (MY255). Gyökértelen filogenetikai fát készítettünk neighbor-joining módszerrel (11. ábra). A fáról leolvasható volt, hogy az általunk kapott szekvenciák valóban a 2-es genotípushoz álltak a legközelebb.

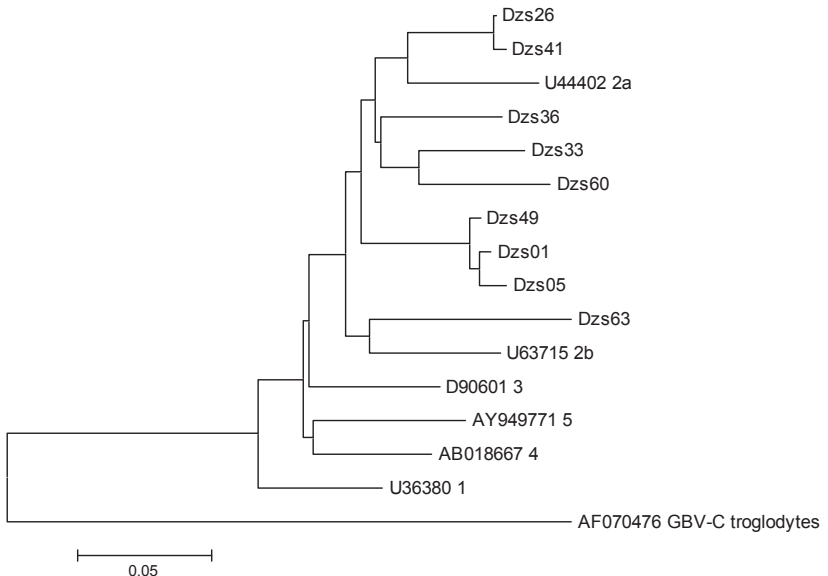
Egy többszörösen hátrányos helyzetű populációban, a „Dzsumbuj” nevű lakótelep lakosságának körében is felmértük a HGV/GBV-C prevalenciáját. A vizsgálat során 75 személy vérmintáját vizsgáltuk, közülük 9 (12%) bizonyult pozitívnak. A legtöbb pozitív minta 21-40 éves kor között fordul elő (12. ábra). A férfiak és nők között mért prevalencia szinte azonos volt annak ellenére, hogy a vizsgált személyek jelentős része nő volt (59/75).



12. ábra. A GBV-C/HGV RNS pozitív és negatív minták megoszlása hátrányos helyzetű rizikócsoport különböző korcsoportjaiban

A vizsgálat során kapott 9 PCR termék nukleotidsorrendjét meghatároztuk, majd az eredményt manuálisan ellenőriztük. Ezután filogenetikai vizsgálatot végeztünk a kimutatott vírusok genotípusainak és szubtypusainak meghatározására. Ehhez referenciának a nemzetközi GenBankból ismert genotípusú szekvenciákat választottuk: 1-es genotípus: U36380; 2a szubtypus: U44402; 2b szubtypus: U63715; 3-as genotípus: D90601; 4-es genotípus:

AB018667. A készítendő gyökeres fához külsőportként a csimpánz GBV-C vírusát (AF070476) használtuk (13. ábra).



13. ábra. A hátrányos helyzetű rizikócsoportból kimutatott HGV/GBV-C szekvenciák filogenetikai vizsgálata. A vizsgált csoportban detektált vírusgenomok jelölése „Dzs” és egy szám, a referenciaként használt szekvenciákat pedig hozzáférési azonosítóikkal tüntettük fel.

Látható, hogy minden általunk kimutatott vírus 2-es genotípusú volt. Közülük 8 a 2a, egy pedig a 2b szubtypussal mutatta a legközelebbi rokonságot.

5.1.2. TT vírusok előfordulása és genotípusai egészségügyi dolgozóknál

A 3-as genocsoportba tartozó TT vírusok előfordulását 185 egészségügyi dolgozó vérsavómintájában vizsgáltuk. A szintén ebbe a genocsoportba tartozó SENV-D és SENV-H prevalenciáját genotípus-specifikus PCR segítségével külön is meghatároztuk.

A 3-as genocsoportra specifikus primerekkel 130 (70,3%) savó esetén kaptunk pozitív eredményt. A SENV-D és a SENV-H prevalenciája egymáshoz hasonló volt (22,7% és 25,9%), 17 esetben kettős pozitívitást tapasztaltunk. A kontroll csoportban is az egészségügyi dolgozóknál mérhetően magas prevalenciát találtunk a teljes genocsoportot (31/40,

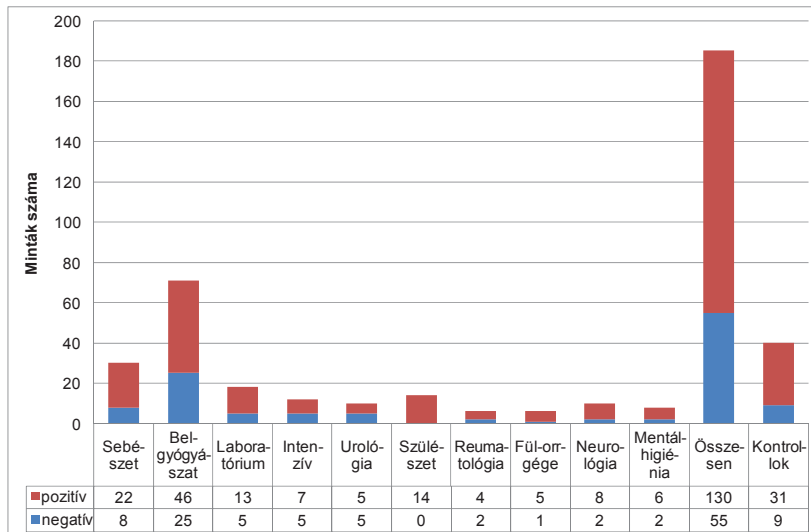
77,5%) és a SENV-H variánst (14/40, 35%) vizsgálva. A SENV-D genotípus pozitivitás azonban jelentősen ritkábban fordult elő a kontrollok között (3/40, 7,5%). Ez az eltérés Fisher's exact teszttel szignifikánsnak is bizonyult ($P=0,030$).

A prevalencia a korrall emelkedett, de már a legfiatalabb korcsoportban is magas volt (7. táblázat).

7. táblázat. A TT vírus pozitív minták száma korcsoportonként

Kor	Minták száma	3-as genocsoport pozitív (%)	SENV-D pozitív (%)	SENV-H pozitív (%)
20-29	39	24 (61,5)	4 (10,3)	10 (25,6)
30-39	50	32 (64)	9 (18)	16 (32)
40-49	47	34 (72,3)	12 (25,5)	10 (21,3)
50-59	41	32 (78)	13 (31,7)	9 (22)
60+	6	6 (100)	3 (50)	3 (50)
Ismeretlen	2	2 (100)	1 (50)	0 (0)
Összesen	185	130 (70,3)	42 (22,7)	48 (25,9)

Minden vizsgált kórházi osztályon gyakori volt a pozitivitás egy osztályon pedig (szülészet) minden vizsgált dolgozó vérében ki lehetett mutatni a vírust (14. ábra).



14. ábra. A TTV 3-as genocsoportjára pozitív és negatív egészségügyi dolgozók száma kórházi osztályonként

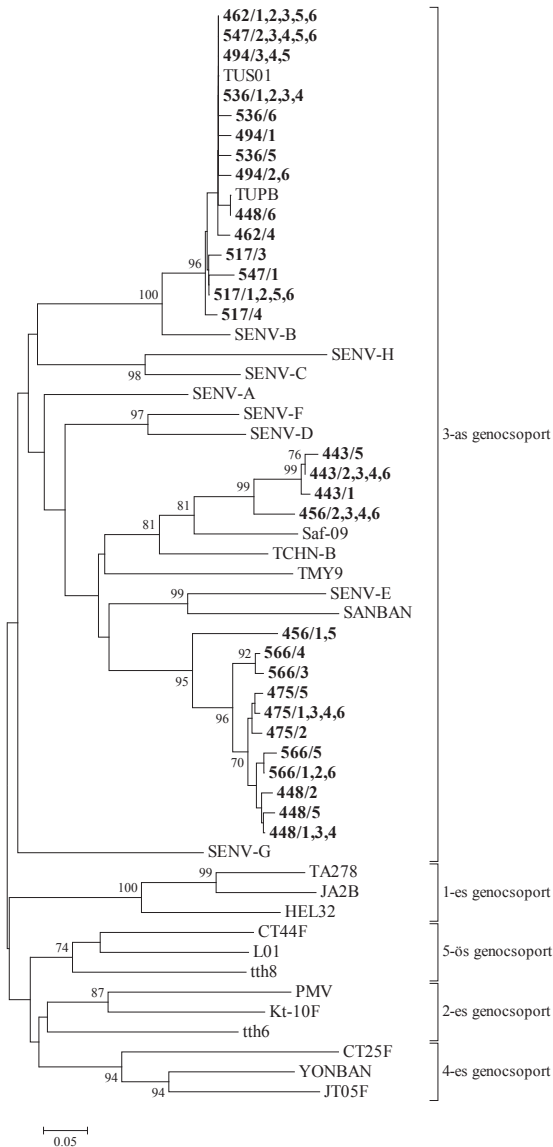
Nem találtunk összefüggést a TTV pozitivitás és az egészségügyben eltöltött idő vagy a végzettség között.

Azért, hogy megállapítsuk, a SENV-D-n és H-n kívül milyen, a 3-as genocsoportba tartozó vírusok fordulnak elő a vizsgált egészségügyi dolgozóknak, kiválasztottunk 10 mintát, amelyek az AI-2F és AI-2R jelű primerekkel pozitív eredményt adtak, a két genotípus-specifikus primerpárral azonban nem. A 256 bp hosszúságú termékeket plazmid vektorba klónoztunk, és mintánként 6 klón nukleotidsorrendjét meghatároztuk. A klónok nukleotid szekvenciáit a GenBankban is elhelyeztük, az FM881907-FM881966 hozzáférési számok alatt érhetőek el. A szekvenálás során bebizonyosodott, hogy mind a 10 minta a Torque Teno víruscsaládhoz tartozó vírusokat tartalmazott. A vírus genomok kissé eltérő szekvenciájú változatok, quasispeciesek formájában voltak jelen. A nukleotid-sorrendbeli eltérések egy része aminosavak szintjén is megjelent.

A kapott aminosav szekvenciákat referencia-szekvenciákkal illesztettük össze. Az elemzéshez a nemzetközi GenBankból minden ismert humán TTV genotípuscsoportból válogattunk izolátumokat: 1-es genotípuscsoport: AB017610 (TA278), AF122918 (JA2B) és AY666122 (HEL32); 2-es genotípuscsoport: AF261761 (PMV), AB054648 (Kt-10F) és AJ620212 (tth6); 3-as genotípuscsoport: AX025667 (SENV-A), AX025677 (SENV-B), AX025718 (SENV-C), AX025730 (SENV-D), AX025761 (SENV-E), AX025822 (SENV-F), AX025830 (SENV-G), AX025838 (SENV-H), AF247137 (TUPB), AB017613 (TUS01), AB025946 (SANBAN), AF348409 (TCHN-B), AB050448 (TYM9), AB060597 (SAa-01) és AB060596 (Saf-09); 4-es genotípuscsoport: AB064598 (CT25F), AB038621 (yon-KC009) és AB064600 (JT05F); 5-ös genotípuscsoport: AB064605 (CT44F), AJ620231 (tth8) és AY026465 (L01). A szekvenciák illesztése után gyökértelen filogenetikai fát készítettünk (15. ábra). A kapott fán látható, hogy minden kimutatott vírusgenom valóban a TTV-k 3-as genocsoportjába tartozott, tehát primereink specifitása megfelelő volt. Két minta (448 és 456) két különböző genotípust is tartalmazott. A klónok több mint fele a TUS01 és TUPB izolátumokhoz áll a legközelebb genetikailag, amelyek a jelenlegi besorolás alapján a Torque Teno vírus 16-os genotípusának (TTV-16) felelnek meg. Négy különböző mintából nyert 19 klón a SANBAN (TTV-19) és a SENV-E szekvenciákkal állt legközelebbi rokonságban, azonban távolságuk arra utalt, hogy nem azonos genotípusba tartoznak. A szekvenciákat a BLAST program segítségével összehasonlítottuk a GenBankban található szekvenciákkal, és nem találtuk 74%-osnál nagyobb hasonlóságot.

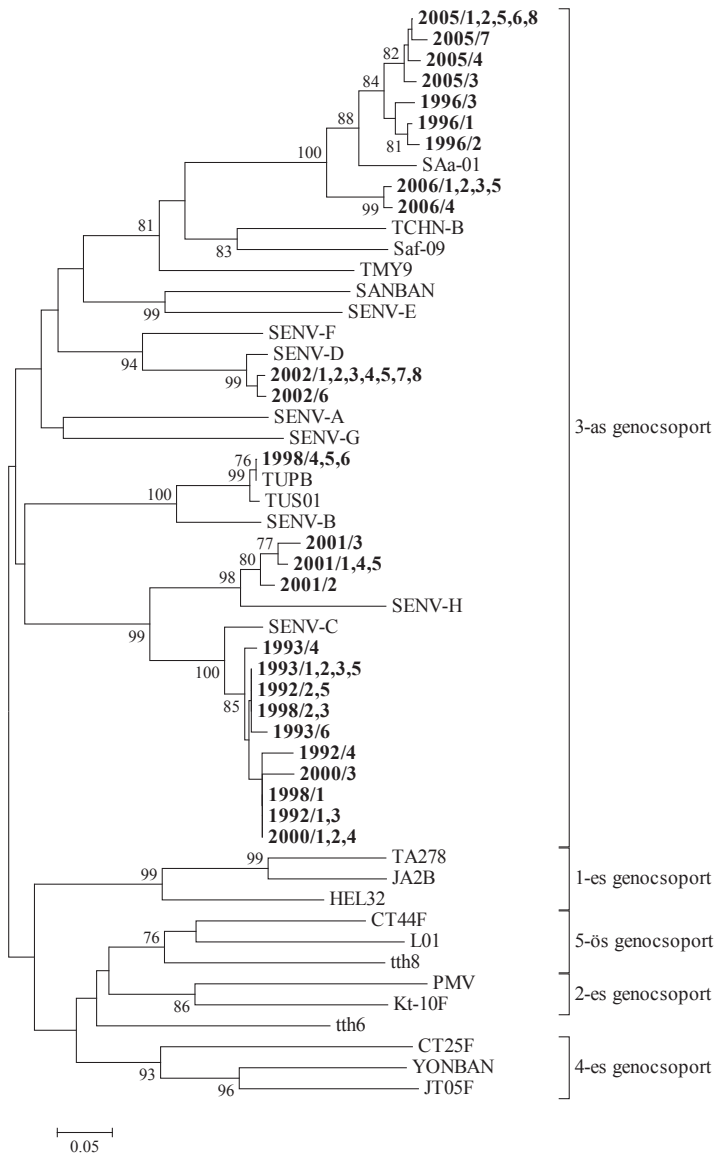
Egy egészségügyi dolgozó 1992 és 2006 között vett 9 mintájában vizsgáltuk a 3-as genocsoportba sorolható TT vírusok jelenlétét. A teljes genocsoport detektálására alkalmas

AI-2F és AI-2R primerekkel mind a 9 minta pozitív eredményt adott. A termékeket plazmid vektorba klónoztuk, és mintánként 3-8 (összesen 50) klón nukleotidsorrendjét meghatároztuk. A szekvenciákat a nemzetközi GenBankba is elhelyeztük az FM881967-FM882016 hozzáférési számok alatt. Elvégeztük az 50 klón filogenetikai vizsgálatát az 5 genocsoportból választott reprezentatív szekvenciák segítségével (16. ábra). Az évek során legalább 6 különböző vírustörzs volt kimutatható, bár az 1998-ban vett mintát kivéve minden évben egyazon vírustörzshöz tartoztak a kimutatott szekvenciák. Egy SENV-C törzs 1992-től 2000-ig perzisztált. Egy másik, amely az SAA-01 jelű izolátummal (TTV-24) mutatta a legközelebbi rokonságot, 1996-tól 2005-ig volt kimutatható.



15. ábra. A TTV hordozó egészségügyi dolgozók mintáiból nyert, 3-as genocsoportba tartozó TTV szekvenciák filogenetikai elemzése. A kapott szekvenciákat a következőképpen jelöltük: mintaszám/klón száma.

Az azonos aminosav-sorrendű klónokat vesszővel elválasztva tüntettük fel.



16. ábra. A TTV hordozó egészségügyi dolgozó különböző időpontokban levett mintáiból nyert, 3-as genocsoportba tartozó TTV szekvenciák filogenetikai elemzése. A kapott szekvenciákat a következőképpen jelöltük: mintavétel éve/klón száma. Az azonos aminosav-sorrendű klónokat vesszővel elválasztva tüntettük fel.

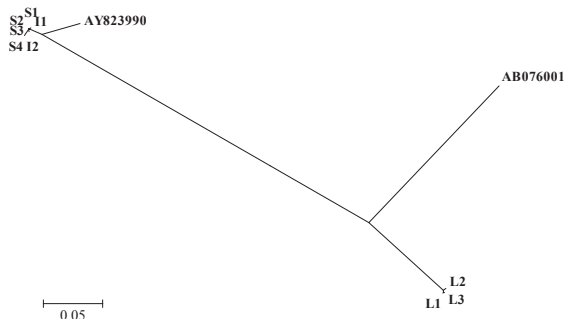
5.1.3. Sertés TT vírusok kimutatása és genotípezálása

A vizsgált 44 malac közül 32 (72,7%) savójában sikerült kimutatni sertés TT vírusok jelenlétét. A malacok közül 15-től májmintát, 22-től pedig bélmintát is vizsgáltunk. A májminták közül 5, a bélminták közül pedig 4 tartalmazott vírust. Két malac esetében mind a máj, mind a bél pozitív eredményt adott, kettő esetében csak a máj volt pozitív, 8 esetben pedig csak a savó, a vizsgált többi szerv nem. Egyetlen olyan malacot találtunk, amelynek mindhárom mintájából kimutatható volt a sertés TTV (8. táblázat). Az ebből a három mintából nyert PCR termékeket plazmidba klónoztuk, és több klón nukleotidsorrendjét meghatároztuk. A szekvenciákat a nemzetközi GenBankban is elhelyeztük az FM200045-52 hozzáférési számok alatt. Ezekkel a szekvenciákkal és két, a GenBankból kiválasztott referencia izolátummal, amelyek a sertés TT vírusok 1-es genotípuscsoportjához tartoztak (hozzáférési számok: AB076001, AY823990), gyökértelen filogenetikai fát készítettünk (17. ábra). A malac savójából és bélszövetéből nyert szekvenciák genetikailag közel álltak egymáshoz, valamint az AY823990 jelű izolátumhoz.

8. táblázat. Huszonkét malac szerveiből kapott PCR eredmények.

<i>Malac jelölése</i>	<i>Szérum</i>	<i>Máj</i>	<i>Bél</i>
BLC II/1	pozitív	n/a	negatív
BLC II/3	pozitív	n/a	negatív
BLC II/4	pozitív	n/a	pozitív
BLC II/5	pozitív	n/a	negatív
BLC II/7	pozitív	n/a	negatív
BLC II/9	pozitív	n/a	negatív
BLC II/10	pozitív	n/a	negatív
BLC II/11	pozitív	negatív	negatív
BLC VII/1	negatív	negatív	negatív
BLC VII/2	negatív	negatív	negatív
BLC VII/3	negatív	pozitív	negatív
BLC VII/4	negatív	pozitív	pozitív
BLC VII/5	negatív	pozitív	pozitív
BLC VII/6	negatív	negatív	negatív
BLC VII/7	negatív	negatív	negatív
BLC VII/8	negatív	negatív	negatív
BLC VII/9	negatív	negatív	negatív
BLC VII/10	negatív	negatív	negatív
BLC VIII/1	negatív	pozitív	negatív
BLC VIII/2	pozitív	negatív	negatív
BLC VIII/3	pozitív	pozitív	pozitív
BLC VIII/4	negatív	negatív	negatív

N/a: nincs adat.



17. ábra. A BLC VIII/3 jelű malac három különböző szervéből nyert sertés TTV szekvenciák filogenetikai vizsgálata. A szekvenciák jelölése: egy betű (S = serum/szérum, L = liver/máj, I = intestine/bél) és a klón száma.

A malac májmintájából nyert TTV klónok azonban nem mutattak közeli rokonságot a másik két szervből kimutatott vírusokkal, és az AB076001 jelű izolátummal is csak 80%-os homológiát mutattak.

5.2. Klasszikus hepatitis vírusok okozta járványok molekuláris vizsgálata

5.2.1. Hepatitis B járványok molekuláris vizsgálata

Egy intrafamiális hepatitis B vírus halmozódás, és egy kórház onko-hematológiai osztályán zajlott HBV fertőzések molekuláris epidemiológiai vizsgálatát végeztük el.

A családi halmozódásban érintett nevelőanya és a gyermekek is PCR pozitívnak bizonyultak hepatitis B vírusra. A három vizsgált betegből nyert HBV szekvenciák teljesen azonosak voltak a vizsgált 650 bázis hosszú szakaszon. Ezután filogenetikai analízist végeztünk, amelyhez a GenBankból a HBV A-H genotípusait képviselő szekvenciákat választottunk. Ezek a következők voltak: A1 szubgenotípus: U87742, AY344111, M57663; A2 szubgenotípus: Z35717, X70185, V00866; A3 szubgenotípus: AB194952; B genotípus: AB033555; C genotípus: AB033553; D1 szubgenotípus: AF121242; D2 szubgenotípus: AY090453, X72702; D3 szubgenotípus: AJ344117, AY233296; D4 szubgenotípus: AB033558; E genotípus: X75664; F genotípus: AB036917; G genotípus: AF405706; H genotípus: AY090460.



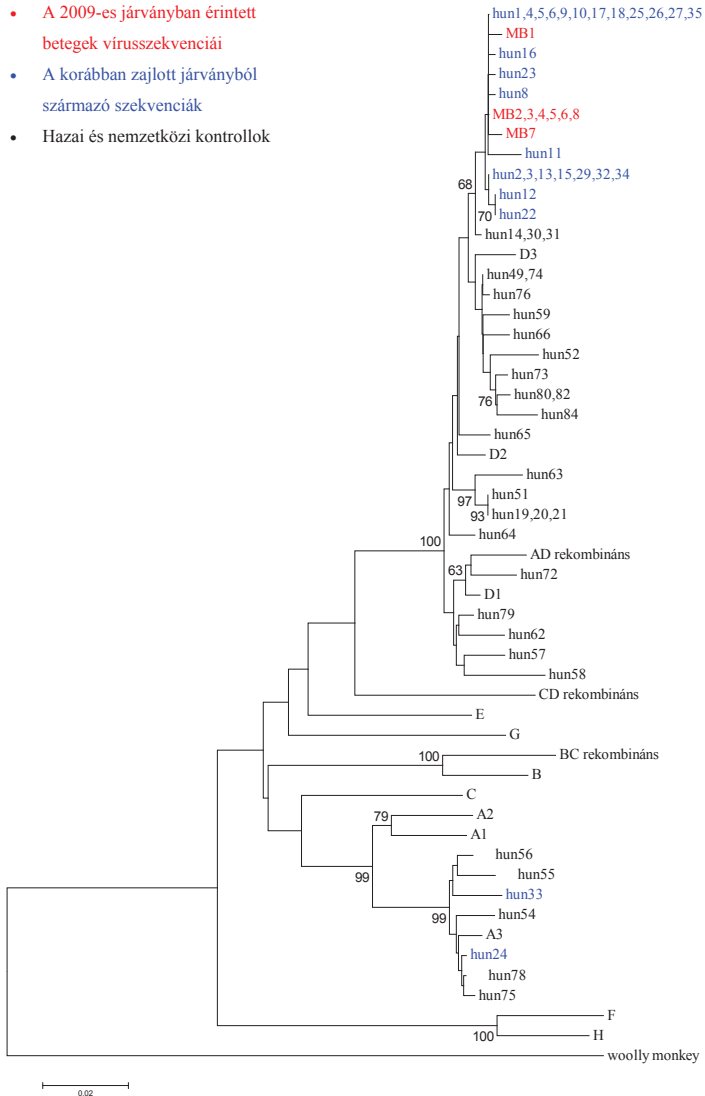
18. ábra. A HBV családi halmazódás filogenetikai vizsgálata. A családi halmazódásból nyert HBV szekvenciákat (jelölésük: hun 19-21) piros kerettel emeltük ki. A bootstrap értékek közül csak a 30%-nál magasabbakat tüntettük fel. A fán szürke háttérrel egy magyarországi kórházban korábban zajlott HBV járvány során kapott szekvenciák szerepelnek.

Külsoportként a gyapjas majmocska (woolly monkey) hepatitis B vírusának szekvenciáját használtuk (hozzáférési szám: AF046996) (18. ábra). Mindhárom általunk kimutatott vírus a HBV D1 szubgenotípusába volt sorolható. A szekvenciák a GenBankban az AM040693 hozzáférési szám alatt szerepelnek.

A kórházi járvány vizsgálata során egy hazai kórház onko-hematológiai osztályán kezelt 7 gyermek, valamint egyikük testvérének savómintájából végeztük el a víruskimutatást és a filogenetikai vizsgálatot. A vírusgenomokat a preS1/preS2/S régióra specifikus primerekkel mutattuk ki. Mind a 8 mintában kimutatható volt a hepatitis B vírus. A további vizsgálatokhoz meghatároztuk a PCR termékek nukleotidszortrendjét, és a kapott szekvenciákat a GenBankban a következő azonosító számok alatt helyeztük el: FR750340-42. A termékek 576 bp hosszú szakaszát használtuk fel a filogenetikai analízis során, amelyhez a nemzetközi GenBankból ismert genotípusú izolátumokat választottunk. Ezek a következők voltak: A1 szubgenotípus: U87742, AY344111, M57663; A2 szubgenotípus: Z35717, X70185, V00866; A3 szubgenotípus: AY344106; B genotípus: AB033555; C genotípus: AB033553; D1 szubgenotípus: AF121242; D2 szubgenotípus: AY090453, X72702; D3 szubgenotípus: AJ344117, AY233296; D4 szubgenotípus: AB033558; E genotípus: X75664; F genotípus: AB036917; G genotípus: AF405706; H genotípus: AY090460; AD rekombináns genotípus: AY230127; CD rekombináns genotípus: EU678603; BC rekombináns genotípus: GQ924672, a korábbi járványból származó szekvenciák: AM040674–AM040705. Magyarországi különböző területeiről származó 30 – a vizsgált járványtól függetlenül fertőződött – vírushordozó kontrollbeteg, valamint egy korábban (2002-2003 során) lezajlott másik nozokomiális járványból 27 beteg mintáját vontuk be a vizsgálatba. Ezen szekvenciák hozzáférési számai a GenBankban: AM040674–AM040705. A gyökeres fához külsoportként a gyapjas majmocska (woolly monkey) hepatitis B vírusát (AF046996) használtuk (19. ábra). A szekvenciák összeillesztése után gyökeres filogenetikai fát készítettünk neighbor-joining módszerrel. Ezen látható, hogy a vizsgált betegek vírusai mind a D genotípusba tartoztak. A gyermekek véréből kimutatott vírusok szekvenciái a vizsgált szakaszon nagyon hasonlóak voltak. Közülük 6 teljesen azonos volt, de a másik két szekvencia is csak 1, illetve 2 pozícióban tért el tőlük.

A 8 szekvencia nemcsak egymással, hanem egy korábban, 2002-2003-ban zajlott másik HBV járványból nyert 25 szekvenciával is közeli rokonságot mutatott. A szekvenciák a fán egy csoportot alkottak, amely egy közös ággal kapcsolódott a fa többi részéhez. Bármely két szekvencia között nem találtunk hat nukleotidnál több eltérést. A két járványból nyert nukleotidszortrendek között átlagosan mindössze 3 bázis eltérés volt.

- A 2009-es járványban érintett betegek vírusszekvenciái
- A korábban zajlott járványból származó szekvenciák
- Hazai és nemzetközi kontrollok



19. ábra. Az onkohematológiai osztályon zajlott hepatitis B járványból nyert HBV szekvenciák filogenetikai vizsgálata. A 2009-ben zajlott járványból származó mintákat pirossal (MB1-8), a korábbi járványból kapottakat kékkel jelöltük. A hun24 és hun33 jelű betegek vírusai a korábbi vizsgálat során az akkor zajlott járványtól már függetlennek bizonyultak.

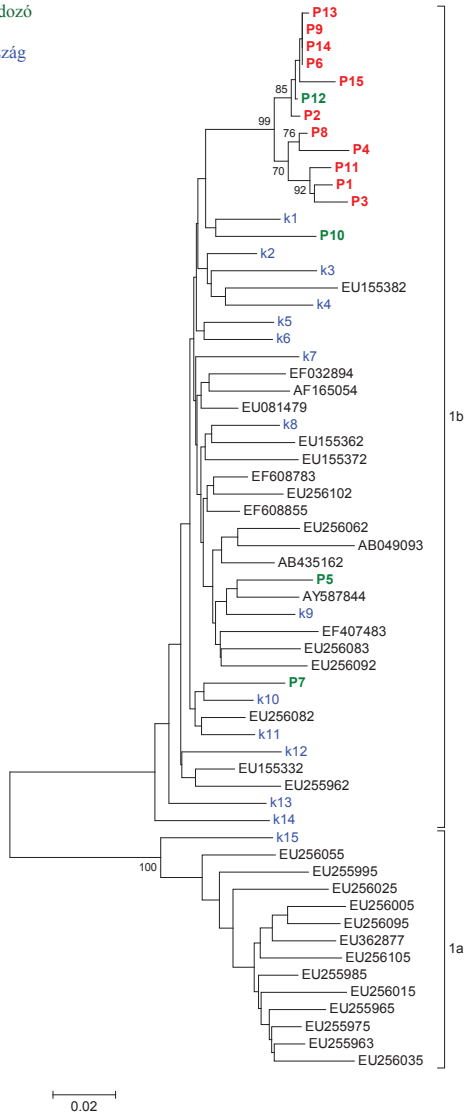
5.2.2. Nozokomiális hepatitis C járványok molekuláris járványügyi vizsgálata

Két hepatitis C vírus halmozódás vizsgálatát végeztük el, hogy megállapítsuk, a fertőzések az egészségügyi ellátással összefüggésben történtek-e.

A dialízis központ 21 anti-HCV IgG ellenanyagokra pozitív betegéből kíséreltük meg a hepatitis C vírus genomok kimutatását. A páciensek közül 4 évek óta ismerten vírushordozó volt. A 21 beteg savómintájából szilikaoszlopos módszerrel kivontuk a nukleinsavakat, majd reverz transzkripció után nested polimeráz láncreakciót végeztünk az 5'UTR régióra specifikus primerekkel. A minták közül 15 bizonyult pozitívnak ezekkel a primerekkel, köztük a 4 évek óta vírushordozó páciens mintája is. Így a filogenetikai vizsgálatot a 11 feltételezhetően újonnan fertőződött és a 4 ismert vírushordozó beteg vírusaival végeztük el. Célunk az volt, hogy kiderítsük, közös volt-e a fertőzések eredete, és hogy a HCV-t évek óta hordozó betegek egyike lehetett-e a közös fertőző forrás. Mivel az 5'UTR régió molekuláris járványügyi vizsgálatra nem alkalmas (túl konzervatív), az elemzés során a vírusgenom nagyobb változékonyságot mutató NS5B régióját vizsgáltuk. Polimeráz láncreakciót végeztünk az NS5B régióra specifikus primerekkel, majd meghatároztuk a termékek nukleotidszortrendjét. Az elemzéshez kontrollként 15 magyarországi HCV hordozó beteg mintáját használtuk. Ezek hozzáférési számai a GenBankban: FN666642, FN666644, FN666646-FN666649, FN666654, FN666656, FN666659-FN666662, FN666667-FN666669. A nemzetközi GenBankból 32 további referencia izolátumot is bevontunk a vizsgálatba. Ezek hozzáférési számai az adatbázisban: 1a szubttípus: EU256055, EU255995, EU256025, EU256005, EU256095, EU362877, EU256105, EU255985, EU256015, EU255965, EU255975, EU255963, EU256035; 1b szubttípus: EU155382, EF032894, AF165054, EU081479, EU155362, EU155372, EF608783, EU256102, EF608855, EU256062, AB049093, AB435162, AY587844, EF407483, EU256083, EU256092, EU256082, EU155332, EU255962. Az 500 bázis hosszúságú szakaszok összeillesztése után gyökértelen filogenetikai fát készítettünk (20. ábra).

Az NS5B régióra specifikus PCR-rel pozitívnak bizonyult 15 betegből és a 15 magyarországi kontrollbetegből nyert szekvenciák mellett a nemzetközi GenBankból 32 ismert (1a és 1b) szubttípusú hepatitis C vírus izolátumot használtunk a molekuláris járványügyi vizsgálatához.

- A dialízis központ újonnan fertőződött betegeinek mintái
- A központ ismert vírushordozó betegeinek mintái
- Kontrollminták Magyarország különböző régióiból
- A GenBankból származó vírusszekvenciák



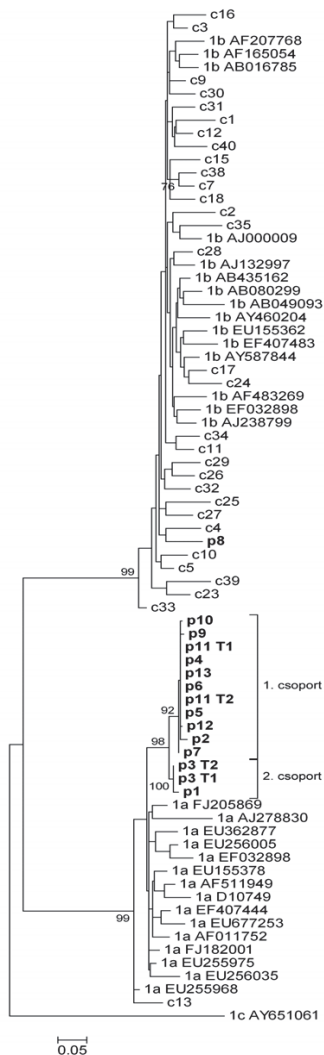
20. ábra. A dialízis központban zajlott járványból nyert hepatitis C vírus szekvenciák filogenetikai vizsgálata. A dializált betegek mintáit P betűvel és egy számmal jelöltük (P1-15). A feltehetően újonnan fertőződött betegek mintáit pirossal, az ismert vírushordozó páciensekét zölddel, a hazai kontrollbetegeket kékkel tüntettük fel (k1-15).

Mind a 15 dializált beteg vírusa 1b szubtypusának bizonyult. A feltételezhetően újonnan fertőződött betegek vírusai genetikailag közel álltak egymáshoz, egy statisztikailag is jól alátámasztott (bootstrap érték: 99) csoportot alkottak a fán, amely közös ággal kapcsolódott a fa többi részéhez. Ez az eredmény közös eredetet valószínűsíti. A négy ismert vírushordozó mintájából nyert szekvenciák közül három (P5, P7 és P10) nem mutatott genetikai rokonságot, a fa más ágain helyezkedtek el, a járványtól független kontrollszekvenciákhoz hasonló távolságban. A P12 jelű vírushordozó betegből kapott nukleotidsorrend azonban az újonnan fertőződött betegek vírusaival közös ágra került. A fán így kialakult csoporton belül a 12 szekvencia átlagos genetikai távolsága mindössze 2% volt.

Az onkológiai osztályról 21 anti-HCV pozitív beteg savómintájában vizsgáltuk a HCV RNS-ének jelenlétét a genom konzervatív 5'UTR régiójára specifikus nested PCR-rel. A feltételezhetően frissen fertőződött betegek mintái közül 12-ből sikerült kimutatni a virális RNS-t. Az évek óta ismert HCV pozitív páciens (p8 jelű) is RNS pozitív volt, ezért lehetséges fertőző forrásnak volt tekinthető. A 13 RNS pozitív beteg adatai a 9. táblázatban láthatók.

9. táblázat. A HCV RNS pozitív onkológiai betegek adatai

<i>Beteg azonosító</i>	<i>Kor</i>	<i>Alapbetegség</i>	<i>Első ALT szint emelkedés</i>	<i>Első anti-HCV pozitívítás</i>	<i>HCV genotípus</i>	<i>További információk</i>
P1	57	Emlórák	2007. október	2007. november	1a	
P2	53	Emlórák	2008. április	2008. május	1a	
P3	70	Emlórák	2007. június	2008. január	1a	
P4	70	Emlórák	2008. február	2008. augusztus	1a	
P5	58	Emlórák	2007. december	2008. június	1a	
P6	67	Emlórák	2007. október	2008. május	1a	
P7	56	Emlórák	2008. augusztus	2008. június	1a	
P8	76	Hodgkin lymphoma	1998. október	1998. októbere előtt	1b	Legalább 1998 óta vírushordozó
P9	65	Petefészekrák	2007. október	2007. december	1a	Emelkedett ALT szint 2003-ban, de anti-HCV negatív. A májfunkció hirtelen romlása 2007-ben
P10	55	Emlórák	2008. január	2008. január	1a	Krónikus eosinophil leukaemia alakult ki a terápia 8. hetében
P11	51	Vastagbél adenocarcinoma	2007. november	2007. december	1a	
P12	57	Húgyhólyagrák	2008. január	2008. június	1a	
P13	49	Emlórák	2005.	2008. augusztus	1a	



21. ábra. Az onkológiai osztály betegeiből kimutatott hepatitis C vírusok NS5B régióiból nyert nukleotid szekvenciák filogenetikai vizsgálata. A maximum likelihood fán GenBankból 30 db 1a és 1b szubtipusú HCV izolátum, és 31 db független eredetű magyarországi virusszekvencia szerepel a vizsgált betegcsoport vírusai mellett. Az onkológián kezelt betegekből kapott szekvenciákat vastag betűvel tüntettük fel (p1–13). A hazai kontrollok jelölése „c” és egy sorszám. Két beteg (p3 és p11) esetében a vizsgált genomszakasz nukleotisosrendjét két időpontban is meghatároztuk (T1 és T2).

Az RNS pozitív betegekből kimutatott vírusok genomjának NS5B régiójából genotipizálás és filogenetikai vizsgálat céljából egy 500 bázis hosszú szakasz bázissorrendjét határoztuk meg. A filogenetikai elemzéshez a 13 RNS pozitív beteg vírusa mellett 31 magyarországi kontrollt, és a GenBankból származó 1a, illetve 1b szubtípusú HCV szekvenciákat használtunk fel. Az onkológiai betegek vírusszekvenciáit a GenBankban az FN666627–FN666641, a magyarországi kontrollokét az FN666642–FN666672 hozzáférési számok alatt helyeztük el. A GenBankból kiválasztott izolátumok hozzáférési számai a következők voltak: 1a izolátumok: EU677253, AJ278830, EF032898, EU155378, FJ205869, EU255968, FJ182001, EU256005, EU256035, EU362877, AF511948, AF511949, D10749, EU255975, EF407444. 1b izolátumok: AY587844, AB435162, EF407483, AF165054, AB049093, EF032894, EU155362, AJ132997, AF483269, AJ000009, AY460204, AF207768, AB080299, AB016785, AJ238799. A gyökeres fát a GTR (general time reversible) nukleotid szubsztitúciós modell alapján készítettük (gamma shape paraméter: 0,397, invariáns helyek aránya: 0,265), mivel a ModelTest program szerint ez a modell írta le legpontosabban a bevitt szekvenciaadatokat. Kulcsoportként az AY651061 számú, 1c szubtípusú HCV izolátum szolgált (21. ábra). A fáról leolvasható, hogy a 12 újonnan fertőződött beteg vírusa 1a szubtípusú volt, az ismert hordozóé azonban 1b, tehát nem lehetett a fertőzések forrása. A 12 új beteg vírusai két csoportot alkottak a fán. Az egyik csoportba 10 szekvencia került (1. csoport), amelyek közül csak egy tért el a többitől több mint 3 nukleotid pozícióban, 5 pedig teljesen azonos volt (10. táblázat). A másik két új beteg vírusa egy külön ágra került (2. csoport), 3 nukleotid pozícióban tértek el egymástól, és mindhárom aminosav cserét is okozott. A két csoport közötti átlagos evolúciós távolság értéke 0,021 volt. Az 1. és 2. csoport egy közös ággal csatlakozott a fa többi részéhez 98%-os statisztikai alátámasztottság mellett, ami a szekvenciák valószínű rokonságára utalt.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a genom egy gyorsabban evolválódó szakaszának elemzése is megerősíti-e ezt a csoportosítást, a jóval variábilisabb E1/E2 régióra specifikus primerekkel is PCR-t végeztünk. A felszaporított szakasz az első hipervariábilis régiót is magában foglalta. Ez a PCR csak 12 beteg esetében adott pozitív eredményt, az 1. számú beteg mintájából nem kaptunk terméket. A kapott termékek nukleotidsorrendjét meghatároztuk és a Genbankban az FN667677–FN667690 hozzáférési számok alatt helyeztük el.

10. táblázat. Szekvenca-eltérések az NS5B régió vizsgált szakaszán

Összehasonlított szekvenciák	Nukleotidok szintje			Aminosavak szintje		
	Variábilis pozíciók száma	Eltérő pozíciók átlagos száma (SEM)	Átlagos genetikai távolság (SEM)	Variábilis pozíciók száma	Eltérő pozíciók átlagos száma (SEM)	p-distance (SEM)
1. csoporton belül	9	1,636 (0,535)	0,003 (0,001)	4	0,727 (0,354)	0,004 (0,002)
2. csoporton belül	3	3,000 (1,717)	0,006 (0,003)	3	3,000 (1,687)	0,018 (0,010)
1. és 2. csoportok között	19	10,455 (2,913)	0,021 (0,006)	7	1,864 (0,870)	0,011 (0,005)
Azonos szubtipusú kontrollok között (1a/1b)	96 / 189	23,792 (2,518) / 31,245 (2,489)	0,050 (0,006) / 0,067 (0,006)	18 / 53	3,392 (0,872) / 5,029 (0,857)	0,021 (0,005) / 0,031 (0,005)
1a szubtipusú kontrollok és az 1-2. csoportok között	112	28,670 (3,632)	0,061 (0,008)	23	5,643 (1,867)	0,034 (0,011)

11. táblázat. Szekvenca-eltérések az E1/E2 régió vizsgált szakaszán

Összehasonlított szekvenciák	Nukleotidok szintje			Aminosavak szintje		
	Variábilis pozíciók száma	Eltérő pozíciók átlagos száma (SEM)	Átlagos genetikai távolság (SEM)	Variábilis pozíciók száma	Eltérő pozíciók átlagos száma (SEM)	p-distance (SEM)
1. csoporton belül	13	2,836 (0,805)	0,003 (0,001)	8	1,600 (0,569)	0,005 (0,002)
Az 1. csoport és a 3-as számú beteg között	53	43,591 (6,529)	0,049 (0,007)	25	21,000 (3,977)	0,070 (0,014)
Azonos szubtipusú kontrollok között (1a/1b)	326 / 471	97,419 (4,815) / 118,640 (5,465)	0,115 (0,006) / 0,147 (0,008)	92 / 162	34,267 (3,439) / 43,480 (3,764)	0,111 (0,011) / 0,161 (0,014)
1a szubtipusú kontrollok és az 1-2. csoportok között	349	103,359 (6,426)	0,123 (0,009)	104	41,979 (4,737)	0,137 (0,015)



23. ábra. Az onkológiai osztály betegeiből kimutatott hepatitis C vírusok E1/E2 régióiból nyert nukleotid szekvenciák filogenetikai vizsgálata. A fán a GenBankból 30 db 1a és 1b szubtypusú HCV izolátum, és 18 db független eredetű magyarországi virusszekvencia szerepel a vizsgált betegcsoport vírusai mellett. Az onkológián kezelt betegekből kapott szekvenciákat vastag betűvel tüntettük fel (p2–13). A hazai kontrollok jelölése „c” és egy sorszám. Két beteg (p3 és p11) esetében a vizsgált genomszakasz nukleotisosrendjét két időpontban is meghatároztuk (T1 és T2).

A 8. számú beteg szekvenciája ismét az 1b szubtypusú vírusok közé sorolódott. Az onkológiai osztály betegeiből kimutatott 1a szubtypusú vírusok is a korábbival azonos csoportosításban jelentek meg a fán. A bootstrap analízis is alátámasztotta a csoportok létezését. Az E1/E2 régióra vonatkozó evolúciós távolságokat a 11. táblázatban tüntettük fel.

Az 1. csoportba sorolt szekvenciák genetikailag igen közel álltak egymáshoz, átlagos távolságuk mindössze 0,003 volt. Tizenhárom nukleotid pozícióban jelentkezett variabilitás, közülük 5 a HVR1-en belül. A báziscserék az E1 proteinben 3 (3/192, 1,56%), a HVR1-ben 4 (4/27, 14,81%), a rövid E2 szakaszon belül pedig további 1 (1/80, 1,25%) aminosav szubsztitúciót okoztak. Az átlagos evolúciós távolság az 1. és a 2. csoport között 0,049 volt nukleotid szinten, jóval alacsonyabb, mint az egymástól független, de azonos szubtypusú szekvenciák átlagos távolsága (1a szubtypus esetén: 0,115).

A 3. és 11. számú betegektől 3 hónap elteltével újabb mintát kaptunk és megismételtük a víruskimutatást és a szekvenálást mindkét genomrégióban. A fákban az eltérő időpontokból származó minták T1 és T2 jelöléssel szerepelnek. Az NS5B régióban 3 hónap alatt nem történt változás, a burokképlete kódoló szakaszon viszont 2, illetve 3 báziscsere volt megfigyelhető. Ezek 1-1 aminosav-cseréhez vezettek a két betegből kimutatott vírusokban.

Vizsgálatainkhoz független kontrollként 40 magyarországi HCV hordozó betegből nyert vírusszekvencia szolgált. Egyúttal ezek a minták a Magyarországon előforduló HCV genotípusok eloszlásáról is információval szolgáltak. A 40 kimutatott vírusból 38 (95%) az 1-es genotípusba tartozott. Közülük csak egy volt 1a szubtypusú, a többi az 1b szubtypusba sorolódott. Két hordozó esetében a vírus csak az 5'UTR-re specifikus PCR-rel volt kimutatható, ezért genotípusukat ennek a terméknek a bázisrendje alapján határoztuk meg. Ez a szakasz szubtipizálásra nem alkalmas, így annyit lehetett megállapítani, hogy a két vírus 3-as, illetve 4-es genotípusú volt. A 6 helyi kontroll, amelyek az ország dél-keleti részéből, a kórház 150 km-es körzetéből származtak mind 1b szubtypusúak voltak.

6. Megbeszélés

6.1. Nem klasszikus hepatitis vírusok prevalenciája és genotípusai Magyarországon

6.1.1. A HGV/GBV-C előfordulása és genotípusai Magyarországon

Vizsgálataink célja a néhány éve felfedezett GB vírus C/hepatitis G vírus prevalenciájának felmérése volt Magyarország egészséges lakosainak és egy többszörösen hátrányos helyzetű csoportnak a körében.

A vizsgált 124 különböző korú, egészséges budapesti lakos vérsavó mintából 10-et találtuk pozitívnak GBV-C/HGV RNS-re. Az így kapott 8,1%-os prevalencia viszonylag magasnak számít más európai országok hasonló adataihoz képest, de nem kiugró érték. Az adatok összehasonlítása azonban nem könnyű, mert az egy országban kapott eredmények jelentős eltéréseket mutatnak vizsgálatonként, valószínűleg azért, mert a kutatók eltérő primer szettekkel alkalmaztak, és ezek érzékenysége különbözhet.

A GBV-C/HGV RNS-re pozitív minták számát korcsoportonként vizsgálva megfigyelhető volt, hogy a gyerekek között a GBV-C/HGV fertőzöttség alacsony: 19 éves kor alatt csak egyetlen pozitív mintát találtunk. A legmagasabb prevalenciát 40-49 éves kor között kaptuk (4/15). Az 50 év feletti lakosok mintái mind negatívak voltak. Ez egyrészt annak lehet köszönhető, hogy a minták száma viszonylag alacsony volt ebben a korcsoportban. A másik lehetséges magyarázat szerint a prevalencia értékek eltérése a vírus szexuális úton történő terjedésére vezethető vissza. A pozitív minták száma a szexuálisan legaktívabb csoportokban volt a legmagasabb, idősebbekben viszont alacsony, mivel a friss fertőzés náluk már ritka, a korábban bekerült vírus pedig feltehetően már eliminálódott a szervezetükből. Eredményeink egybeesnek más kutatócsoportoknak az irodalomban korábban megjelent megfigyeléseivel, amelyek szintén a szexuális transzmisszió jelentőségére mutattak rá [Lampe és mtsai, 1998]. Gyermekekben a GBV-C/HGV előfordulását alacsonynak találtuk. A GBV-C/HGV prevalenciájában férfiak és nők között jelentős különbséget nem tapasztaltunk, ami szintén megfelel az irodalomban korábban közölteknek.

A GBV-C/HGV prevalenciája hepatitiszes betegekben jóval magasabb, mint az egészséges lakosokban. A Magyarországon, hepatitisben szenvedő betegek között végzett szűrővizsgálat

17,5%-os prevalenciát mutatott ki, ami több mint kétszerese az általunk, egészségesek között mértnek [Takács és mtsai, 2002]. Általában ehhez hasonló, vagy ennél is nagyobb különbségekről számolnak be a témában eddig megjelent publikációk. Abe és munkatársai akut, valamint krónikus hepatitisben, továbbá cirrrosisban és hepatocelluláris carcinómában szenvedő betegekben vizsgálták a HGV/GBV-C jelenlétét, és a betegek 6,8%-ából mutatták ki a vírust. Különösen gyakorinak találták a koinfekciót HBV-vel (8,9%) és HCV-vel (66,7%). Az egészséges kontrollcsoportban a HGV hordozók aránya mindössze 1,4% volt [Abe és mtsai, 1997]. Nakatsuji és kollégái nem találtak szignifikáns eltérést a HGV prevalenciájában akut, illetve krónikus non-A-non-E hepatitises betegek és véradók csoportjai között. A koinfekciót HBV-vel és a HCV azonban ők is gyakorinak találták (5-15, illetve 10-15%) [Nakatsuji és mtsai, 1996]. Ezek az eredmények látszólag a GBV-C és a májgyulladás közötti összefüggésre utalnak, mivel azonban azóta kiderült, hogy a vírus replikációs helye nem a máj, valószínűbbnek látszik, hogy a vírusos májgyulladással megfigyelt kapcsolat valójában csak a klasszikus hepatitis vírusokkal, a HBV-vel és a HCV-vel közös parenterális terjedési mód következménye.

A „Dzsumbuj” lakosaitól vett 75 savómintából 9 (12%) bizonyult pozitívnak a HGV/GBV-C RNS-ére, ami másfélszerese az egészséges lakosságban mértnek. Az intravénás droghasználók körében zajlott külföldi vizsgálatok ennél magasabb értékeket mutattak [Kennedy és mtsai, 1998, Anastassopoulou és mtsai, 1998, Trisler és mtsai, 1999]. Az összehasonlítás azonban nem egészen helytálló, mivel az általunk vizsgált csoportnak csak egy része volt intravénás droghasználó (28%). A GBV-C prevalenciájában itt sem találtunk eltérést a nemek között, és a pozitív minták korcsoportonkénti eloszlása is az egészségesek között tapasztaltnak volt hasonló.

A vizsgálataink során kimutatott HGV/GBV-C vírusok genotípusát genotipizáló primerek, valamint nukleotidsorrend-meghatározás segítségével állapítottuk meg. Minden vizsgált vírus 2-es genotípusának bizonyult. Ez megfelel az irodalmi adatoknak, ugyanis az eddig megjelent tanulmányok szerint szinte kizárólag ez a típus fordul elő Európában. Három minta esetében a genotipizáló primerekkel negatív eredményt kaptunk. Lehetséges, hogy ezek a genomok olyan pontmutációkat tartalmaztak, melyek miatt egyik primerrel sem mutathatók ki, de lehetséges, hogy a primerek kisebb érzékenysége okozta a téves negatív eredményeket. A minták többszöri felolvasztása során a vírus érzékeny RNS-e jelentős részben töredezhett, vagy lebomolhatott. Bár a primerek az azóta azonosított 5-ös és 6-os genotípus kimutatására nem alkalmasak, nem valószínű, hogy ezek okozták volna a téves negatív eredményeket,

mivel ezek az eddigi adatok alapján Afrikában és Délkelet Ázsiában fordulnak elő [Tucker & Smuts, 2000, Muerhoff és mtsai, 2006].

A „Dzsumbuj” lakosságából kimutatott HGV/GBV-C szekvenciák filogenetikai elemzése alapján az izolátumaink némelyike genetikailag igen közel állt egymáshoz (a Dzs26 és Dzs41, valamint a Dzs01, Dzs05 és Dzs49 jelű izolátumok) ami alapján lehetségesnek tűnik, hogy a fertőzések eredete közös. A vírusátvitel módja lehet szexuális, vertikális, vagy akár az intravénás drogfogyasztás során történt közös tűhasználat, azonban ezt a megfelelő adatok hiányában nem tudtuk bizonyítani.

6.1.2. TT vírusok előfordulása és genotípusai egészségügyi dolgozóknál

Munkánk során egy magyarországi kórház 185 egészségügyi dolgozójának vérében vizsgáltuk a 3-as genocsoportba tartozó TT vírusok jelenlétét. Külön is megvizsgáltuk két genotípussal, a SENV-D-vel és a SENV-H-val történt fertőzések gyakoriságát, mivel a szakirodalom szerint ezek összefüggésbe hozhatók ismeretlen eredetű májgyulladásos megbetegedésekkel. Kontrollként 40 egészséges személy savómintáját választottuk ki.

Vizsgálatunk azt mutatta, hogy a TT vírusok e genocsoportja rendkívül gyakori mind az egészséges lakosságban, mind a rizikócsoportnak számító egészségügyi dolgozóknál. A prevalencia korrallal emelkedett, és ez a tendencia a SENV-D esetében volt a legfelfűtűbb. A fertőzések gyakorisága nem mutatott szignifikáns összefüggést a dolgozók munkakörével. Nem volt jelentős eltérés a prevalenciában a kórházi osztályok között sem, annak ellenére, hogy az egyes részlegeken eltért a fertőzés kockázata, illetve a lehetséges vírusátviteli mód.

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a TT vírusok 3-as genotípusával történt fertőződés természetes és gyakori jelenség a magyar lakosságban, és az esetek nagy részében feltételezhetően nem függ össze az egészségügyben végzett munkával. Egy korábbi vizsgálat sem találta jelentős kockázati tényezőnek az egészségügyben végzett munkát a TTV fertőzés szempontjából [Nagano és mtsai, 1999]

A PCR termékek nukleotidsorrendjének meghatározásával és filogenetikai vizsgálattal sikerült besorolnunk a genotipizáló primerekkel nem azonosítható vírusgenomokat: minden vizsgált vírus a 3-as genotípus csoportba sorolódott. Ezáltal primereink specifikásáról is meggyőződünk. A vizsgált minták közül 4-ből olyan szekvenciákat mutattunk ki, amelyek nem mutattak közeli rokonságot egyetlen, a nemzetközi GenBankban közölt izolátummal sem. Genetikailag a legközelebb a SANBAN, illetve a SENV-E genotípusokhoz álltak,

távolságuk azonban arra utalt, hogy másik, eddig le nem írt genotípust képviselnek. Pontos azonosításukhoz azonban hosszabb genomszakasz vizsgálatára lenne szükség.

Egy hepatitis tüneteit nem mutató, de TT vírust hordozó egészségügyi dolgozóban vizsgáltuk a vírusgenomok nukleotidsorrendjének változásait. A 9 savóminta levétele 1992 és 2006 között történt. Mindegyik minta pozitívnak bizonyult a TTV 3-as genocsoportjára specifikus primerekkel. A filogenetikai elemzésből kiderült, hogy az évek során legalább 6 különböző, de a keresett genocsoportba tartozó vírustörzs volt kimutatható a vizsgált személyben. Ezek egyike 1992-től legalább 2000-ig perzisztált, egy másik pedig az 1996-ban és a 2005-ben vett mintában is jelen volt. A két variáns azonban nem volt kimutatható az első és az utolsó detektálás vett összes mintában, feltehetően a vizsgált klónok kis száma vagy a vírustörzsek titerének ingadozása miatt. A vírustiter ingadozása más vírustörzsekkel történő felülfertőződés következménye lehet, ami feltehetően gyakori jelenség, és többnyire tranzienst. A más genotípusokkal bekövetkező felülfertőződés az irodalmi adatok alapján az addig hordozott vírustörzsek titerének és arányának hirtelen megváltozását okozhatja [Maggi és mtsai, 2005]. A 3-as genocsoportba tartozó törzsekkel történő szuperinfekciók átmeneti jellege miatt lehetségesnek tűnik, hogy az egészséges szervezetben perzisztáló törzsek ellen termelődött ellenanyagok kereszt-védelmet biztosítanak az azonos csoportba tartozó variánsokkal szemben. Ennek bizonyítására sajnos jelenleg még nem állnak rendelkezésre a szükséges reagensek. A perifériás vér mononukleáris sejtjei rezervoárként szolgálhatnak a vírus számára, így ha egyes variánsok időlegesen el is tűnnek a szérumból, később újra megjelenhetnek, amikor a specifikus ellenanyagok titeré csökken [Okamoto és mtsai, 2000]. Megfelelő specificitással rendelkező szerológiai tesztek segítségével elkülöníthetők lennének a friss és a krónikus fertőzések, ezen kívül kimutathatóvá válnának a korábban lezajlott infekciók is. Ilyen reagenskészletek azonban ma még nincsenek kereskedelmi forgalomban.

6.1.3. Sertés TT vírusok kimutatása és genotípezálása

A sertés TT vírusok kimutatását 44 malacból kíséreltük meg. A vizsgálatokhoz savó-, máj-, valamint bélmintákat használtunk. A vizsgált malacokban gyakori volt sertés TTV virémia. A vírus a malacok egy részének májában és belében is kimutatható volt, de a fertőzéshez köthető klinikai tüneteket egyik állat sem mutatott. Egy malac (jelölése BLC VIII/3) esetében mindhárom szervben detektálható volt a sertés TTV. A kapott PCR termékekből nukleotidsorrend-vizsgálatot és filogenetikai elemzést végeztünk. A szérumból és a bélből nyert vírusszekvenciák nagyon hasonlóak voltak. A májból kimutatott vírusgenom

azonban jelentősen eltért ezektől, a malacban tehát legalább két vírustörzs perzisztált egyszerűen. Emberben is leírtak már olyan kevert fertőzéseket, ahol a különböző szervezetben eltérő TTV genotípus dominált [Okamoto és mtsai, 2001]. Ennek hátterében az állhat, hogy az egyes genotípusok evolúciójuk során más és más szövettípushoz adaptálódtak. Vizsgálataink idején még csak 3 sertés TTV genom teljes szekvenciája volt elérhető, ezek közül kettő a sTTV1-es genocsoportjába tartozott (AY82990 és AB076001), bár jelentős szekvenciabeli eltérés volt közöttük. A harmadik a sTTV2-es genocsoportot képviselte és genetikailag olyan távol állt az általunk kapott, illetve a fent említett két másik izolátumtól, hogy nem vontuk bele a filogenetikai vizsgálatba.

A filogenetikai fáról leolvasható volt, hogy a malac szérumából és beléből kapott vírusszekvenciák az AY82990 jelű izolátummal álltak közeli rokonságban, a májból nyert szekvenciák azonban jelentősen eltértek mindkét referencia-izolátumtól. Feltételeztük tehát, hogy egy új genocsoportról lehet szó. Ennek megerősítése azonban további vizsgálatokat igényelt volna. Az azóta publikálásra került szekvenciaadatok és a Corey és mtsai által javasolt taxonómia alapján az összes általunk kimutatott nukleotidsorrend a TTSuV1-es speciesbe tartozik [Cortey és mtsai, 2011]. Ma már azt is tudjuk, hogy a malac véréből és beleiből kimutatott vírusok az AY82990 izolátummal együtt az 1b genotípusba, a májból detektált variáns pedig a szerzők által újonnan felállított 1c genotípusba sorolható be, amelyet azóta már Kínában is megtaláltak sertésekben. A fán szintén szereplő AB076001 izolátum az 1a genotípust képviseli.

6.2. Klasszikus hepatitis vírusok okozta járványok molekuláris vizsgálata

6.2.1. Hepatitis B járványok molekuláris vizsgálata

Munkánk során két hepatitis B vírus halmozódást vizsgáltunk molekuláris technikákkal. Az egyik esetben intrafamiális halmozódásról volt szó: két gyermek és örökbefogadójuk mintáját kaptuk meg vizsgálatra. A másik esetben a fertőzések egy kórház gyermek onkohematológiai osztályán történtek.

Két gyermek és nevelőanyjuk savómintájában vizsgáltuk a hepatitis B vírus jelenlétét, majd azt vizsgáltuk, hogy a kimutatott vírusok genetikailag közeli rokonságban állnak-e. A vizsgálat szükségessége akkor merült fel, amikor néhány hónappal a gyermekek

örökbefogadását követően a nevelőanyánál akut vírusos májgyulladás tünetei jelentkeztek. A szerológiai vizsgálat megerősítette, hogy friss fertőzésről van szó. A filogenetikai vizsgálat során azt találtuk, hogy mindhárom kimutatott vírusgenom a HBV D1 szubgenotípusába tartozott. A vizsgált szakaszon a vírusok genomjának nukleotidsorrendje teljesen azonos volt, ami alapján igen valószínű a közös eredet. A járványügyi vizsgálat során kiderült, hogy a két gyermek vér szerinti édesanyja tünetmentes vírushordozó volt. Születésük után a gyermekek a hazai protokollnak megfelelően aktív és passzív immunizálásban részesültek, azonban ennek ellenére vírushordozókká váltak, majd az adoptálás után a fertőzés sajnos a nevelőanyára is továbbterjedt.

Egy magyarországi kórház gyermek onko-hematológiai osztályán 2009-ben kezdtek nozokomiális HBV járványra gyanakodni, miután az egyik kezelt gyermek négy családtagjánál akut hepatitis B vírus fertőzést diagnosztizáltak. Az osztály betegei közül egy sem mutatta akut hepatitis tüneteit, 7 beteg esetében azonban emelkedett májenzim szinteket és HBsAg pozitivitást találtak. A fertőzések feltehetően 2008 júniusa és 2009 novembere között történtek. A HBsAg pozitív 7 beteg többsége akut limfoid leukémia miatt került az osztályra, egyiküknél agydaganat volt az elsődleges diagnózis. Mindegyikük többször kapott vért és vérkészítményeket, és számos más invazív beavatkozáson is átesetek a kezeléseik során. A regionális tisztifőorvos kezdeményezte a filogenetikai vizsgálatot, amelybe a HBsAg pozitív betegeket és egyikük testvérét vontuk be.

Az onko-hematológiai osztályon kezelt 7 betegből, és egyikük testvéréből kimutatott hepatitis B vírusok szoros genetikai rokonságot mutattak a filogenetikai analízis során, így feltételezhető, hogy eredetük közös, valóban nozokomiális járvány zajlott az osztályon. Meglepő módon a kapott szekvenciák hasonló mértékű rokonságot mutattak egy korábbi, 2002-2003 során, egy másik kórház hasonló osztályán zajlott HBV járvány mintáival is. Ennek a járványnak is laboratóriumunkban zajlott a molekuláris vizsgálata, és eredményeit egy korábbi publikációban közzé is tettük [Szomor és mtsai, 2007]. A járványügyi vizsgálat kiderítette, hogy a két kórház onko-hematológiai osztályai évek óta kooperáltak és a csontvelő-átültetésre váró betegek gyakran mindkét kórházban megfordultak. Így tehát előfordulhatott, hogy a második járvány során vizsgált HBsAg pozitív gyermekek egyike valójában a korábbi járvány során fertőződött meg, de az eset akkor nem került felismerésre.

A regionális ÁNTSZ és az Országos Epidemiológiai Központ Kórházi Járványügyi Osztályának vizsgálata hiányosságokat tárt fel a kórházban az infekciókontroll területén, és feltételezhető, hogy ezek együttese idézte elő a járvány kialakulását. Az osztályra kerülő betegeket nem szűrték rendszeresen HBsAg-re, és ha mégis megtörtént a vizsgálat, az

eredményt az azt kiadó laboratórium nem mindig interpretálta helyesen. A kórházban nem állt rendelkezésre bizonyíték-alapú szakmai protokoll sem a betegek HBV elleni immunizálása, sem pedig szűrésük tekintetében. Ezen kívül, a vírussal fertőzött és nem fertőzött gyermekek részére egy közös játszóhelyiség volt kialakítva, közös játékokkal, amelyek könnyen kontaminálódhattak a környezeti hatásokkal szemben nagyon ellenálló vírussal. A vírusátvitel kockázatát jelentősen növelte két tényező. Egyrészt a beteg gyermekek egy részének szájában a terápia mellékhatásaként fekélyek alakultak ki (stomatitis aphthosa), másrészt mivel a betegek immunuszupprimált állapotban voltak, a szervezetükbe jutott vírus titere a vérükben rendkívül magas értéket ért el.

Az onkológiai osztályon lezajlott HBV halmozódást első alkalommal a 70-es években, az Egyesült Államokban írtak le. A járvány 8 egészségügyi dolgozót érintett. A fertőzések forrása a feltételezések szerint az egyik beteg lehetett [Wands és mtsai, 1974]. Dumpis és munkatársai szintén egy gyermek onkológiai osztályon zajlott járványt vizsgáltak molekuláris technikával. Az osztályon 1996 és 2000 között számos beteg fertőződött meg hepatitis B és/vagy hepatitis C vírussal. A filogenetikai vizsgálat a fertőzések többségében bizonyította a közös eredetet, a járványügyi vizsgálat azonban nem tudott egyértelműen rámutatni a vírusátvitel pontos módjára. Azt azonban valószínűsítették a szerzők, hogy a járvány háttérben az állt, hogy osztály dolgozóinak egy része nem tartotta be a kézhigiéne gyakorlatának alapvető szabályait [Dumpis és mtsai, 2003].

6.2.2. Nozokomiális hepatitis C járványok molekuláris járványügyi vizsgálata

Két, Magyarországon zajlott nozokomiális hepatitis C vírus halmozódás molekuláris járványügyi vizsgálatát végeztük el. Az egyik halmozódás egy dializisközpont, a másik egy kórház onkológiai osztályának betegeit érintette.

Egy magyarországi hemodialízis központban 2008 januárjában két beteg havonta esedékes májfunkciós vizsgálata emelkedett értékeket mutatott, ezért elvégezték a betegek HBV és HCV szűrését. Mindkét beteg pozitívnak bizonyult anti-HCV ellenanyagokra. Július közepéig összesen 17 dializált beteg esetében tapasztaltak szerokonverziót. Közülük 14 beteg korábban mind HBV, mind HCV markerekre negatív, három pedig ismert HBV hordozó volt.

A 17 beteg közül 14-et rendszeresen ebben a dialízis centrumban kezeltek, hármat azonban egy kisebb, szatellita állomáson. Ezen a szatellita állomáson 2007. november 15-én vízellátási gondok adódtak, ezért 6 beteget a centrumba vittek át kezelésre, és dialízisüket ott

végezték el. Két különböző helyiségben 3-3 beteg kezelése történt meg, és az egyik helyiségben kezelt 3 beteg megfertőződött, a másik 3 nem. Így a járványügyi szakemberek a fertőzések pontos helyét és idejét is megállapíthatták.

A 17, feltételezhetően újonnan fertőződött beteg savómintájából megkíséreltük a HCV RNS kimutatását, és 11 esetben pozitív eredményt kaptunk. Rajtuk kívül három olyan, szintén a centrumban kezelt betegből is kimutattuk a vírust, akik ismert HCV hordozók voltak (P5, P7, és P10). Feltételeztük, hogy egyikük vírusa lehetett a fertőzések forrása. A szekvenálás és a filogenetikai vizsgálat azt mutatta, hogy a 11 újonnan fertőződött beteg vírusa genetikailag nagyon közel áll egymáshoz, tehát valóban közös lehetett az eredetük. A három ismert hordozóból kimutatott HCV genomok nem mutattak közeli rokonságot a halmozódásból származó szekvenciákkal. Az analízisbe bevont, különböző eredetű kontrollok és a GenBankból származó szekvenciák között hasonló távolságok voltak megfigyelhetők, ez alapján a három beteg fertőződése egymástól és a halmozódástól is függetlennek tűnt.

A járványügyi szakemberek ezután egy további beteget azonosítottak, aki a kérdéses napon kezelésben részesült a központban és ismertén HCV hordozó volt: Ez a páciens azonban még a járvány felismerése előtt elhunyt. Mivel sikerült tőle korábban vett savómintát találni egy laboratóriumban, megkísérelhettük a víruskimutatást és a filogenetikai vizsgálatot (P12). A mintából sikerült vírust kimutatnunk, és a szekvenációelemzést is elvégeztük. A P12 jelű beteg mintájából nyert vírusszekvencia az elemzés során az újonnan fertőződött páciensek vírusaival közös csoportba sorolódott. Ez alapján valószínűsíthető, hogy ez a beteg volt a járvány kiindulópontja.

A másik járvány egy magyarországi kórház onkológiai osztályán zajlott. Itt 2008 első hónapjaiban az osztály több betege is emelkedett májenzimszint mellett anti-HCV ellenanyagokra pozitívnak bizonyult, ezért felmerült, hogy a fertőzések nozokomiális eredetűek lehetnek. Az esetleges kórházi járvány felderítésére molekuláris epidemiológiai vizsgálatot végeztünk. Az onkológiai osztályon évente igen nagyszámú beteg fordult meg. Szűrésük hepatitis B és C vírus markerekre nem volt rutinszerű, azonban a betegek rendszeresen átestek vérérvizsgálatokon (többek között májfunkciós vizsgálaton is) a citosztatikus terápia mellékhatásainak kontrollálása céljából. Magas májfunkciós érték esetén további teszteket végeztek. 2008 első hónapjaiban jelentősen megnőtt azon betegek száma, akik emelkedett ALT szintet mutattak. A jelenség háttérének vizsgálata során többek között a betegek HCV és HBV szűrését is elvégezték. Októberig összesen 45 beteg anti-HCV vizsgálata történt meg, közülük 21 bizonyult pozitívnak. Húsz beteg anamnézisében nem szerepelt hepatitis C vírus fertőzés, egy beteg azonban évek óta ismert a vírus hordozó volt.

A 21 anti-HCV pozitív beteg savómintájából kíséreltük meg a virális RNS kimutatását, a genotipizálást és a filogenetikai analízist. Tizenhárom minta bizonyult HCV RNS pozitívnak, köztük az évek óta ismerten vírushordozó beteg (p8). A genotipizálás azt mutatta, hogy a frissen fertőződött betegek vírusai 1a szubtipusúak voltak, míg a p8 jelű betegé 1b. Ez által kizárható, hogy ez a beteg lett volna a közös fertőző forrás. Az NS5B régió elemzése során kiderült, hogy 10 beteg vírusa nagyon közeli rokonságban áll egymással (1. csoport), és nagyon valószínű, hogy eredetük közös. A két másik újonnan fertőződött beteg vírusa szintén nagyon közel állt egymáshoz (2. csoport), de elkülönült a másik 10 szekvenciától. Ez a távolság azonban kisebb volt az egymástól független eredetű szekvenciák között átlagosan megfigyelhetőnél. A 12 szekvencia egy monofiletikus csoportot alkotott a filogenetikai fán, amit a statisztikai analízis is megerősített. Ez arra utalt, hogy közöttük kapcsolat lehet. A GenBankból származó kontrollok azt is megmutatták, hogy az NS5B régióban egymástól független izolátumok között is előfordulhat viszonylag kis genetikai távolság, azonban ezek a szekvenciák nem alkotnak monofiletikus csoportot (pl. az FJ182001 és az EU255975 jelű izolátumok). Mivel az NS5B evolúciója viszonylag lassú, a vizsgálatot a burokfehérjéket kódoló, és a HVR1-et is tartalmazó változékony szakasz alapján megisméltük. Ezzel a PCR-rel az egyik újonnan fertőződött beteg mintája negatív eredményt adott, aminek az oka a primerkötő szakaszokon bekövetkezett mutáció, vagy a módszer alacsonyabb érzékenysége lehetett. Az eredmények azonban hasonlóak voltak az NS5B régió analízisével kapottakhoz és megerősítették egy távolabbi közös őst létezését. A rövid és gyorsan változó HVR1 bázisrendje alátámasztotta az 1. csoport létezését, de a 2. csoportba tartozó szekvenciák már nem mutattak nagyobb hasonlóságot az 1. csoporthoz, mint a kontrollszekvenciákhoz.

Megfigyeléseink egyik lehetséges magyarázata, hogy a közös fertőző forrás egy, a vírus hosszú ideje hordozó beteg, akinek a vére egy rendkívül diverz víruspopulációt tartalmazott. A recipiensek szervezetébe jutott kis mennyiségű inokulum a variánsoknak valószínűleg csak egy kis részét tartalmazta. A megfertőződött betegekben más és más variáns vált dominánssá, majd a fertőzéstől a mintavételig eltelt hónapokban tovább evolválódott. Ez a folyamat a HCV quasispeciesek szelektív transzmissziójának példája, amit először csimpánzokban figyeltek meg. A kísérlet során három csimpánzt fertőztek meg egyazon HCV tartalmú plazmából származó inokulumokkal. Két állapotban a plazmában jelen levő quasispeciesek közül a leggyakoribb variáns vált dominánssá, a harmadik állapotban azonban egy ritka változat [Hijikata és mtsai, 1995; Sugitani & Shikata, 1998]. A HCV variánsok szelektív átvitelét emberben is leírták már. Egy tüszúrásos baleset után a donorban ritkának számító variáns mutatta a legnagyobb genetikai hasonlóságot a recipiensből kimutatott vírusokhoz [Saito és

mtsai, 2004]. Egy hemodialízis központban lezajlott járvány során két újonnan fertőződött beteg vírusának szekvenciája a vírusdonorból kimutatható vírusvariánsok egy kis csoportjához állt a legközelebb [Bracho és mtsai, 2005]. Egy hepatitis C vírus hordozó szivsebész több páciensét is megfertőzte a beavatkozások során. A recipiensekből nyert vírusszekvenciák a sebészből kimutatható különböző variánsok egyikével vagy másikával álltak közelebbi rokonságban [Esteban és mtsai, 1996]. Perinatális fertőzés során is egy vagy néhány quasispecies jut át a csecsemőbe [Manzin és mtsai, 2000].

Az onkológiai osztályon történt fertőzések közös forrása egy HCV hordozó páciens (esetleg egészségügyi dolgozó) lehetett, akit a helyszíni járványügyi vizsgálat során nem sikerült azonosítani, így a filogenetikai analízisben sem szerepel. Ez a beteg a szerológiai HCV szűrésben sem vett részt vagy azért, mert májenzim szintje normális volt, vagy időközben meggyógyult, esetleg elhalálozott. Hasonló okok miatt több más, szintén a kórházban fertőződött beteg is kimaradhatott a filogenetikai vizsgálatból. Sajnos nem áll rendelkezésre elegendő járványügyi adat ahhoz, hogy felderítsük a fertőzések sorrendjét.

Egy másik lehetséges magyarázat is létezik arra, hogy miért tűnik távolabbinak a kapcsolat az 1. és a 2. csoport vírusai között. A közöttük kimutatható homológia hátterében az is lehet, hogy egyazon populációból származnak, és egy távolabbi közös őstől származnak. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára 40 olyan magyarországi HCV hordozó vírusának genotipizálását is elvégeztük, akik fertőződése nem állt összefüggésben a vizsgált kórházi járvánnyal. A 40 vírushordozóból 6 a kórház 150 km-es körzetén belül lakott, így helyi kontrollnak tekinthető. A genotipizálás azt mutatta, hogy Magyarországon az 1b szubtípus domináns (92,5%), ehhez hasonló eredményeket közöltek korábban Gervain és munkatársai [Gervain és mtsai, 2003] is. Mindössze egyetlen 1a szubtípusú vírust találtunk, ez azonban az ország nyugati feléről származott és nukleotidsorrendje sem mutatott rokonságot az onkológiai betegek vírusaival. Ezek az eredmények nem erősítik meg azt az eshetőséget, hogy az onkológiai osztályon párhuzamosan két 1a szubtípusú HCV változat okozott volna nozokomiális fertőzéseket.

Molekuláris módszerekkel mindkét halmozódás esetében bizonyítékot találtunk arra, hogy a fertőzések az egészségügyi ellátással összefüggésben következhetnek be. A krónikus betegek kezelése során mindkét intézményben gyakoriak voltak az invazív beavatkozások, amelyek növelték a vérrel terjedő fertőzések kockázatát. Az infekciók feltehetően közös eredetűek voltak, a közös forrást azonban csak a dialízis központ betegei között sikerült azonosítanunk. A vírusátvitel pontos módjának felderítése viszont egyik esetben sem történt meg. A dializált betegek esetében a közös terjesztő tényező az antikoaguláns (heparin) és a

hígításhoz használt fiziológiás sóoldat lehetett, mivel azonos palackokat használtak azokban a helyiségekben, ahol a fertőzések bekövetkeztek. Amennyiben a műszak végén még maradt a megbontott oldatokból, hűtve tárolták, és másnap felhasználták. Az onkológiai osztályon lehetséges, hogy a járvány kialakulása többadagos kiszerezésű készítmények vagy infúziós szerelékek befertőződésére volt visszavezethető. A fertőzések felismerése után szigorú infekciókontroll intézkedések kerültek bevezetésre, amelyek betartását rendszeresen ellenőrizték is. Ezek után egyik intézményben sem derült fény újabb fertőzésekre.

Az elmúlt években több hasonló molekuláris járványügyi vizsgálat zajlott világszerte. Francia kutatók egy dialízisközpontban történt HCV járványt elemeztek, amely során 9 hónap alatt 22 beteg fertőződött meg. A járvány kitöréséhez feltételezhetően a kesztyűcsere és a kézfertőtlenítés hiányosságai, valamint az eszközök nem megfelelő sterilizálása vezethetett [Savey és mtsai, 2005]. Silini és munkatársai egy hematológiai osztály 13 újonnan bekerült betegének anti-HCV szerokonverzióját tanulmányozták. Kizárták egy esetleges HCV hordozó egészségügyi dolgozó és a vérkészítmények szerepét a járvány kialakulásában. A fertőzés betegről betegre terjedt, és a fertőzések háttérében többadagos kiszerezésű gyógyszeres ampullák kontaminációja állhatott [Silini és mtsai, 2002]. Mailliard egy sok beteget érintő járványt elemzett, amely szintén egy onkológiai osztályon zajlott. Itt egy 3a szubtypusú vírus terjedt. Azt találta, hogy a fertőzések egy közös forrástól indultak, és a vírus betegről betegre terjedt [Mailliard és mtsai, 2009].

A molekuláris módszerek elterjedtek a hepatitis C vírus járványok vizsgálatában. Mindkét járvány vizsgálata során az NSSB régió nukleotidsorrendjének analízise a betegekből kimutatott vírusszekvenciák helyes csoportosításához vezetett, amit a bootstrap analízis is alátámasztott. Az onkológiai betegek esetében a csoportok létezését a burokféhérvéket kódoló régió egy hosszabb szakaszának vizsgálata is megerősítette. Ez alapján úgy tűnik, hogy az NSSB régióból származó megfelelő hosszúságú szekvenciák (legalább 500 bázis) meghatározása elegendő, hogy bebizonyítsuk, vagy kizárjuk vírusizolátumok rokonságát, ahogy ezt egy korábbi tanulmányunk során is tapasztaltuk [Dencs és mtsai, 2009b]. A módszer további előnye, hogy a téves negatív eredmények esélye kisebb, mint a variábilisabb E1/E2 régió esetén, mivel ritkábban történnek pontmutációk a primerkötő szakaszokon. A filogenetikai elemzések során gyakran vizsgált rövid HVR1 szintén alkalmas lehet abban az esetben, ha a fertőzések óta csak rövid idő telt el. Jelen esetben azonban ennek a régióknak a vizsgálata nem adott megfelelő eredményt.

7. Új tudományos eredmények

A virológiában a molekuláris eljárások elterjedése és gyors fejlődése számos új vírus felfedezését, és új típusú vizsgálatok elvégzését tette lehetővé. Munkánk során perzisztens fertőzést okozó klasszikus és nem klasszikus hepatitis vírusokat vizsgáltunk molekuláris módszerekkel.

A nem klasszikus („újnonnan felfedezett”), és májgyulladásal összefüggésbe hozott vírusok esetében a vírusok detektálása, hazai prevalenciájának felmérése volt az elsődleges célunk, valamint a kimutatott variánsok azonosítása, genotipizálása. A klasszikus hepatitis vírusok közé sorolt hepatitis B-vel és C-vel kapcsolatos munkánk során egészségügyi ellátással kapcsolatos járványok, valamint egy családon belül lezajlott halmazódás kapcsán olyan, hazánkban korábban nem alkalmazott molekuláris járványügyi módszereket kíséreltünk meg kidolgozni, amelyek segítségével molekuláris adatokkal bizonyíthatjuk a fertőzések összefüggését, illetve felderíthetjük forrásukat.

A munka során elért új eredmények:

- 1. Meghatároztuk a HGV/GBV-C hordozás gyakoriságát és előforduló genotípusát Magyarországon:** Vizsgálataink során egészséges budapesti lakosok, és a „Dzsumbuj” lakótelepen élő, többszörösen hátrányos helyzetű személyek savómintájában vizsgáltuk meg a HGV/GBV-C jelenlétét. Az egészséges lakosságban a vírus prevalenciája 8,1%-nak bizonyult, a rizikócsoportban ennek másfélszeresét kaptuk. Eredményeink hasonlóak a más európai országokban mért értékekhez. Mindkét csoportban megfigyelhető volt, hogy a vírus hordozás a szexuálisan legaktívabb korcsoportokban volt a gyakoribb. A kimutatott vírusok 2-es genotípusúak voltak, ami domináns genotípusnak számít Európában. [Takács és mtsai, 2002, Dencs & Sebestyén, 2007].
- 2. Megállapítottuk a humán TT vírusok prevalenciáját és azonosítottuk genotípusait egészségügyi dolgozóknál:** Egy hazai kórház dolgozóinak, kontrollként pedig egészséges személyeknek a vérmintáiban mértük fel a TT vírusok 3-as genocsoportjának gyakoriságát. Mindkét csoportban rendkívül gyakori volt a vírus hordozók aránya. A prevalencia a korral emelkedett, de már a legfiatalabb korcsoportban is magas volt. A kimutatott vírusok egy részének a genotípusát is meghatároztuk, és több, már ismert variáns mellett egy olyat is találtunk, amely valószínűleg egy eddig ismeretlen genotípust képvisel. Egy TTV hordozó egészségügyi dolgozó több év alatt levett mintáiból többféle, a 3-as genocsoportba

tartozó variánst sikerült kimutatni. Egyes vírusgenomok több év elteltével is kimutathatók voltak. Gyakorinak tűntek az átmeneti felülfertőzések a vizsgált genocsoportba tartozó különböző genotípusokkal [Dencs és mtsai, 2009a].

- 3. Sertés TT vírusokat mutattunk ki egy hazai sertéstelepen tartott malacok szerveiből és genotipizálást végeztünk:** A vizsgált malacok többsége egy vagy több szervében is hordozta a sertés TT vírust. Egy malac esetében mindhárom mintában sikerült vírust detektálni. A malac májából TTSuV 1c genotípusú vírust mutattunk ki, míg a véréből és a beléből TTSuV 1b-t [Takács és mtsai, 2008].

A nem klasszikus hepatitis vírusokkal és a humán TT vírusokkal rokon sertés TTV-vel végzett vizsgálataink során hazánkban elsőként felmértük prevalenciájukat különböző populációkban, és információt nyertünk az előforduló genotípusokról is.

- 4. Elvégeztük két hepatitis B halmozódás molekuláris járványügyi vizsgálatát:** Egy családi halmozódás során megállapítottuk a két gyermek és nevelőanyjuk savómintáiból kimutatható hepatitis B vírusok genetikai rokonságát [Szomor és mtsai, 2002].

Molekuláris bizonyítékot találtunk egy magyarországi kórház onko-hematológiai osztályán kezelt gyermekek és egyikük testvérének vérmintáiból detektálható hepatitis B vírusok közös eredetére. A kimutatott vírusok azonban nem csak egymással, hanem egy évvel korábban, egy másik kórházban zajlott nozokomiális járványból származó vírusokkal is közeli rokonságot mutattak, ezáltal sikerült fényt derítenünk a két halmozódás közötti összefüggésre is [Dencs és mtsai, 2011b].

- 5. Molekuláris járványügyi eljárást dolgoztunk ki alkalmaztunk két nozokomiális hepatitis C járvány esetében:** Egy hemodialízis központ betegei között merült fel a HCV járvány gyanúja, és a szerológiai vizsgálatok alapján érintett betegek közül 11-ből sikerült is kimutatnunk a vírus genomját. A filogenetikai elemzés segítségével kimutattuk, hogy a fertőzések valóban közös eredetűek voltak. Azt is sikerült megállapítanunk, hogy a központ ismert HCV hordozó betegeinek vírusai közül melyik lehetett a fertőzések forrása (közlés alatt).

Egy hazai kórház onkológiai osztályán kezelt 21 anti-HCV pozitív betege közül 13-ból mutattunk ki hepatitis C vírust. Húsz beteg anamnézisében nem szerepelt korábbi HCV fertőzés, egy azonban évek óta ismert vírus-hordozó volt. A vírusgenomok filogenetikai vizsgálata mind az NS5B, mind pedig az E1/E2 régióban a 12 újonnan fertőződött beteg vírusainak genetikai rokonságát mutatta. A betegek vírusai az 1a

szubtípusba sorolódtak. Az ismert HCV hordozó vírusa azonban az 1b szubtípusba tartozott, ami alapján kizárható, hogy ez a beteg lett volna a fertőzések kiindulópontja. A közös fertőző forrást tehát ennek a járványnak az esetében nem sikerült azonosítani. A filogenetikai vizsgálatok során kontrollként alkalmazott vírushordozó betegek vírusainak genotipizálása alapján a HCV genotípusainak egymáshoz viszonyított gyakoriságáról is képet kaptunk Magyarországon. A leggyakoribb az 1-es genotípus volt (95%). Csak egyetlen 1a szubtípusú vírust azonosítottunk, a többi 1b-nek bizonyult. Két további beteg 3-as, illetve 4-es genotípusú vírussal fertőződött [Dencs és mtsai, 2011a].

A hepatitis B és C vírusokkal végzett vizsgálatainkat összegezve elmondható, hogy nozokomiális járványok gyanúja esetén sikerrel alkalmaztunk molekuláris járványügyi módszereket a fertőzések közös eredetének bizonyítására vagy kizárására. Megtáltuk azokat a megfelelő változatosságú és hosszúságú genomszakaszokat, amelyeket saját tervezésű vagy korábban közölt PCR primerek segítségével amplifikálva, majd megszekvenálva nemcsak genotipizálhatjuk, vagy szubtipizálhatjuk a kimutatott vírusokat, hanem a megfelelő kontrollok és referencia szekvenciák segítségével genetikai rokonsági fokokról is képet kaphatunk. Amennyiben a későbbiekben újabb járvány következik be, rövid időn belül eredményekkel szolgálhat a vizsgálat, ami hozzájárulhat akár további fertőzések megelőzéséhez is.

8. Összefoglalás

Munkám során perzisztens fertőzést okozó klasszikus és nem klasszikus hepatitis vírusokat vizsgáltam molekuláris módszerekkel. A hepatitis vírusoknak rendszertanilag eltérő vírusokat nevezünk, amelyek közös jellemzője, hogy hepatotropok.

A nem klasszikus, de perzisztens fertőzést okozni képes vírusok közül a HGV/GBV-C-vel és a TT vírusok két csoportjával, a humán TT vírusok 3-as genocsoportjával, valamint a sertéseket fertőző TTSuV vírusokkal foglalkoztunk. Célunk hazai prevalenciájuk felmérése, és a hazánkban elterjedt genotípusaik azonosítása volt. A HGV/GBV-C fertőzés gyakoriságát az egészséges lakosságban, valamint egy többszörösen hátrányos helyzetű rizikócsoportban vizsgáltuk. Az egészséges lakosokban mért érték kissé magasabb, de hasonló volt más európai országokban kapott eredményekhez. A rizikócsoportban ennél másfélszer magasabb értéket kaptunk. A kimutatott HGV/GBV-C genotipizása azt mutatta, hogy Magyarországon az egész Európában dominánsnak számító 2-es genotípus fordul elő jellemzően [Takács és mtsai, 2002, Dencs & Sebestyén, 2007]. A humán TT vírusok 3-as genocsoportjának előfordulását egészségügyi dolgozóknál vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy az ezen vírusokkal történt fertőződés gyakori, de valószínűleg nem függ össze az egészségügyben végzett munkával. Egy tünetmentes TTV hordozó 15 év során levett vérmintáit vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a 3-as genocsoportba tartozó vírusok évekig perzisztálhatnak, és gyakori jelenség lehet az újabb és újabb genotípusokkal való átmeneti felülfertőződés [Dencs és mtsai, 2009a]. A sertés TT vírusokat egy hazai sertéstelepen tartott malacok szerveiben kíséreltük meg kimutatni. A malacok többsége TTV hordozónak bizonyult. Az egyik malac három szervében detektált vírusokat genotipizáltuk is, és azt találtuk, hogy a májból kimutatott vírus a vérben és a bélben találttól eltérő genotípusú volt [Takács és mtsai, 2008].

A klasszikus hepatitis vírusok közé a hepatitis A-E vírusokat sorolják, közülük a hepatitis B és C vírusokkal foglalkoztunk. E két vírus egészségügyi jelentősége világszerte rendkívül nagy. A vérről és vérkészítményekkel történő akut fertőzések a fejlett világban már igen ritkák, és olyan terjedési módok kerültek előtérbe, mint az intravénás droghasználat és az egészségügyi ellátással összefüggő vírusátvitel. A hepatitis B és C vírusokkal végzett munkám során egy családon belül lezajlott, illetve három nozokomiális járványt vizsgáltunk molekuláris módszerekkel, hogy bizonyítsuk vagy kizárjuk a fertőzések közös eredetét, és ha lehetséges, azonosítsuk forrásukat. Az intrafamiliáris halmozódás esetén sikerült megállapítani, hogy a nevelőanya HBV fertőzésének forrása a születésük óta vírushordozó

gyerekek egyike lehetett [Szomor és mtsai, 2007]. Kimutattuk egy gyermek onkohematológiai osztályon történt HBV fertőzések közös eredetét, és összefüggésüket egy évvel korábban, egy másik kórházban zajlott hasonló járvánnyal [Dencs és mtsai, 2011b]. Egy hemodialízis központ hepatitis C vírussal újonnan fertőződött betegek esetében molekuláris bizonyítékot találtunk a fertőzések eredetére. A központ évek óta HCV hordozó betegek között azonosítottuk a járvány forrását is. Egy onkológiai osztály betegeinek HCV fertőzése is közös eredetűnek bizonyult, de a fertőző forrást nem sikerült azonosítani [Dencs és mtsai, 2011a].

9. Summary

In the course of my work I used molecular methods to study classic and newly discovered hepatitis viruses that cause persistent infections. Hepatitis viruses are a diverse group of infectious agents, which are primarily hepatotropic.

During this work we studied three groups of recently discovered viruses that have been suspected to cause hepatitis: HGV/GBV-C virus, human TT viruses, and TTSuV viruses, which infect pigs. Our aim was to determine the incidence of these viruses and to identify their dominant genotypes in different groups of the Hungarian population. The prevalence of HGV/GBV-C infections was measured in the healthy Hungarian population and in a multirisk group. The prevalence in the healthy subjects was similar, though slightly higher than in other European countries. Infection with HGV/GBV-C was 50% more frequent in the multirisk group. Genotype 2 was found to be the most common variant in Hungary, similarly to other countries in Europe [Takács et al., 2002, Dencs & Sebestyén, 2007]. Prevalence of viruses belonging to genogroup 3 of human TT viruses was measured in serum samples of health care workers. Infection with these viruses was very common in the study group, but the observed prevalence was probably independent of profession. Group 3 TT viruses were also detected in serum samples collected over a period of 15 years from a symptomless health care worker. Some strains were found to persist for years. Transient superinfections with other genotypes seemed to occur frequently [Dencs et al., 2009a]. Molecular methods were used to detect swine TTV genomes in different organs of weaned pigs. Most of the pigs were shown to carry TTSuV in one or more of their organs. Genotyping of the viruses detected in three organs of one pig showed that the virus detected in the liver belonged to a different genotype than the ones found in the blood and intestinal samples [Takács et al., 2008].

Hepatitis A to E viruses are sometimes called classic hepatitis viruses, of which we studied hepatitis B and C viruses. Infections with these viruses have great public health significance worldwide. The number of new infections from blood and blood products have become rare in the developed world. Other transmission routes, such as intravenous drug use and health care associated transmission have become the leading causes of viral spread. During our work with hepatitis B and C we investigated an intrafamilial outbreak and three outbreaks associated with health care. Our aims were to provide molecular evidence for the common origin of the infections and also tried to identify their source, if possible. In case of the intrafamilial HBV outbreak it was shown that the source of the foster mother's infection

was one of the adopted children, both of whom had been infected perinatally by their natural mother [Szomor et al., 2007]. Phylogenetic analysis showed that nosocomial transmission of HBV occurred at the pediatric onco-haematology unit. An additional link was found between this outbreak and another one that occurred several years earlier at another hospital [Dencs et al., 2011b]. Using molecular methods it was confirmed that the HCV infections of the patients of a haemodialysis unit were from a common origin. The source patient could also be identified among the long term HCV carriers treated at the unit [Dencs et al., 2009b]. The HCV infections of the patients of an oncology ward were also shown to be nosocomial, but the common source of these infections was not found [Dencs et al., 2011a].

10. Irodalomjegyzék

Abe K, Moriyama M, Hayashi S, Nakai K, Miyauchi I, Edamoto Y, Saito T, Fukushima S, Shimizu T, Matsumura H, Arakawa Y. 1997. Prevalence of hepatitis G virus infection among patients with liver diseases in Japan. *Int. Hepatol. Commun.* 6:239–248.

Alter MJ. 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 13(17):2436-41.

Anastassopoulou CG, Paraskevis D, Sypsa V, Psychogiou M, Katsoulidou A, Tassopoulos N, Skoutelis A, Malliori M, Hatzakis A. 1998. Prevalence patterns and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among imprisoned intravenous drug users. *J. Med. Virol.* 56: 246-252.

Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. 2006. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann. Intern. Med.* 144(10):705-14.

Barnaba V, Franco A, Alberti A, Benvenuto R, Balsano F. 1990. Selective killing of hepatitis B envelope antigen-specific B cells by class I-restricted, exogenous antigen-specific T lymphocytes. *Nature* 345: 258–260.

Beck J, Nassal M. 2007. Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* 13(1):48-64.

Belongia EA, Costa J, Gareen IF, Grem JL, Inadomi JM, Kern ER, McHugh JA, Petersen GM, Rein MF, Sorrell MF, Strader DB, Trotter HT. 2009. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis B. *Ann. Intern. Med.* 150:104-10.

Bertoletti A, Gehring AJ. 2006. The immune response during hepatitis B virus infection. *J. Gen. Virol.* 87:1439-144.

Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Gravelle CR, Ebert JW, Maynard JE. 1981. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. *Lancet* 1:550-551.

Boonstra A, Woltman AM, Janssen HL. 2008. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 22(6):1049-61.

Bracho MA, Gosalbes MJ, Blasco D, Moya A, González-Candelas F. 2005. Molecular

epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a hemodialysis unit. *J. Clin. Microbiol.* 43:2750–2755.

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336: 325–329.

Carman WF. 1997. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J. Viral Hepat.* 4. Suppl. 1:11-20.

Carneiro MA, Teles SA, Lampe E, Espirito-Santo MP, Gouveia-Oliveira R, Reis NR, Yoshida CF, Martins RM. 2007. Molecular and epidemiological study on nosocomial transmission of HCV in hemodialysis patients in Brazil. *J. Med. Virol.* 79:1325–1333.

Casino C, McAllister J, Davidson F, Power J, Lawlor E, Yap PL, Simmonds P, Smith DB. 1999. Variation of hepatitis C virus following serial transmission: Multiple mechanisms of diversification of the hypervariable region and evidence for convergent genome evolution. *J. Gen. Virol.* 80:717–725.

Centers for Disease Control and Prevention. 2003. Transmission of hepatitis B and C viruses in outpatient settings—New York, Oklahoma, and Nebraska. 2000–2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 52:901–906.

Chang Q, McLinden JH, Stapleton JT, Sathar MA, Xiang J. 2007. Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4+ T-lymphocyte cell line. *J. Gen. Virol.* 88:3341-6.

Choi CS, Cho EY, Park R, Kim SJ, Cho JH, Kim HC. 2009. X gene mutations in hepatitis B patients with cirrhosis, with and without hepatocellular carcinoma. *J. Med. Virol.* 1(10):1721-5.

Ciupe SM, Ribeiro RM, Nelson PW, Dusheiko G, Perelson AS. 2007. The role of cells refractory to productive infection in acute hepatitis B viral dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(12):5050-5.

Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids. Res.* 16:10881-10890.

Cortey M, Macera L, Segales J, Kekarainen T. 2011. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Vet. Microbiol.* 148(2-4):125-131.

Del Campo JA, Romero-Gómez M. 2009. Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: a way out for the virus? *World J. Gastroenterol.* 15(40):5014-9.

Dencs Á, Sebestyén Á. 2007. Prevalence and genotypes of hepatitis G virus/GB virus C in a multirisk group in Hungary. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 54(3):305-16.

Dencs Á, Hettmann A, Szomor KN, Kis Z, Takács M. 2009a. Prevalence and genotyping of group 3 torque teno viruses detected in health care workers in Hungary. *Virus Genes.* 39(1):39-45.

Dencs Á, Hettmann A, Szűcs M, Rusvai E, Takács M. 2009b. Phylogenetic analysis of a hepatitis C virus outbreak in a haemodialysis unit. 51st Annual meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, Tihany, June 13–16, *Z. Gastroenterol* 47:463.

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

Dencs Á, Farkas Á, Gyugos M, Kurcz A, Puskás E, Tresó B, Rusvai E, Barcsay E, Takács M. 2011b. Phylogenetic analysis of a nosocomial transmission of hepatitis B virus at a paediatric haematology ward. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 58(1):23-9.

Dubuisson J. 2007. Hepatitis C virus proteins. *World J. Gastroenterol.* 13(17):2406-15.

Dumpis U, Kovalova Z, Jansons J, Cupane L, Sominskaya I, Michailova M, Karayiannis P, Gardovska D, Viazov S, Ross S, Roggendorf M, Pumpens P. 2003. An outbreak of HBV and HCV infection in a paediatric oncology ward: Epidemiological investigations and prevention of further spread. *J. Med. Virol.* 69:331–338.

Durantel D, Zoulim F. 2009. Innate response to hepatitis B virus infection: observations challenging the concept of a stealth virus. *Hepatology.* 50(6):1692-5.

Echevarría JM, Avellón A, Magnius LO 2005. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J. Med. Virol.* 76: 176–185.

Epstein JH, Quan PL, Briese T, Street C, Jabado O, Conlan S, Ali KS, Verdugo D, Hossain MJ, Hutchison SK, Egholm M, Luby SP, Daszak P, Lipkin WI. 2010. Identification of GBV-D, a novel GB-like flavivirus from old world frugivorous bats (*Pteropus giganteus*) in Bangladesh. *PLoS Pathog.* 6:e1000972.

Esteban JI, Gómez J, Martell M, Cabot B, Quer J, Camps J, González A, Otero T, Moya A, Esteban R, Guardia J. 1996. Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N. Engl. J. Med.* 334:555–560.

Esteban JI, Sauleda S, Quer J. 2008. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J. Hepatol.* 48(1):148-62.

Felsenstein J. 1989. PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5:164-166.

Fisker N, Carlsen NL, Kolmos HJ, Tønning-Sørensen L, Høst A, Christensen PB. 2006. Identifying a hepatitis B outbreak by molecular surveillance: A case study. *BMJ* 332:343–345.

Gervain J, Simon G Jr, Simon J. 2003. Genotype distribution of hepatitis C virus in the Hungarian population with chronic viral hepatitis C. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 4:449–450.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology.* 52:696-704.

Hattori J, Ibe S, Nagai H, Wada K, Morishita T, Sato K, Utsumi M, Kaneda T. 2003. Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among homosexual men. *Microbiol. Immunol.* 47: 759-763.

Henderson, DK. 2003. Managing Occupational Risks for Hepatitis C Transmission in the Health Care Setting. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:546–568.

Hijikata M, Mizuno K, Rikihisa T, Shimizu YK, Iwamoto A, Nakajima N, Yoshikura H. 1995. Selective transmission of hepatitis C virus in vivo and in vitro. *Arch. Virol.* 140:1623–1628.

Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. 1999. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 260:17–22.

Hinrichsen H, Leimenstoll G, Stegen G, Schrader H, Fölsch UR, Schmidt WE. 2002. Prevalence of and risk factors for hepatitis G virus (HGV) infection in haemodialysis patients: a multicentre study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 7: 271-275.

Huang YW, Ni YY, Dryman BA, Meng XJ, 2010. Multiple infection of porcine Torque

teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. *Virology* 396:289–297.

Izopet J, Pasquier C, Sandres K, Puel J, Rostaing L. 1999. Molecular evidence for nosocomial transmission of hepatitis C virus in a French hemodialysis unit. *J. Med. Virol.* 58:139–144.

Jutavijittum P, Olinger CM, Hübschen J, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, Toriyama K, Muller CP. 2007. Molecular phylogeny of hepatitis B virus in Laos reveals multiple subtypes of endemic genotypes, numerous unclassifiable strains and a growing prevalence of recombinations within sub- and genotypes and a potential new genotype. In: *Proceedings of the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Rome, Italy.*

Kakkola L, Hedman K, Qiu J, Pintel D, Söderlund-Venermo M. 2009. Replication of and protein synthesis by TT viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 331, 53-64.

Kao JH. 2007. Role of viral factors in the natural course and therapy of chronic hepatitis B. *Hepatology*. 44(4):415-30.

Kekarainen T, Sibila M, Segales J. 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J. Gen. Virol.* 87:833–837.

Kennedy N, Tong CY, Beeching NJ, Lamden K, Williams H, Mutton KJ, Hart CA. 1998. Hepatitis G virus infection in drug users in Liverpool. *J. Infection* 37:106-107.

Kennedy N, Tong CY, Beeching NJ, Lamden K, Williams H, Mutton KJ, Hart CA. 1998. Hepatitis G virus infection in drug users in Liverpool. *J. Infection* 37: 106-107.

Khan N, Aswad S, Shidban H, Aghajani M, Mendez R, Comanor L. 2004. Improved detection of HCV Infection in hemodialysis patients using a new HCV RNA qualitative assay: experience of a transplant center. *J. Clin. Virol.* 30:175-182.

Khudyakov YE, Cong ME, Bonafonte MT, Abdulmalek S, Nichols BL, Lambert S, Alter MJ, Fields HA. 1997. Sequence variation within a nonstructural region of the hepatitis G virus genome. *J. Virol.* 71, 6875-6880.

Koike K. 2007. Pathogenesis of HCV-associated HCC: Dual-pass carcinogenesis through activation of oxidative stress and intracellular signaling. *Hepatology Research*. 37(2): S115–S120.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*. 17:1244-1245.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform*. 5:150-163.

Lampe E, Saback FL, Viazov S, Roggendorf M, Niel C. 1998. Age-specific prevalence and genetic diversity of GBV-C/hepatitis G virus in Brazil. *J. Med. Virol*. 56(1):39-43.

Laperche S, Lunel F, Izopet J, Alain S, Dény P, Duverlie G, Gaudy C, Pawlotsky JM, Plantier JC, Pozzetto B, Thibault V, Tosetti F, Lefrère JJ. 2005. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J. Clin. Microbiol*. 43:733-739.

Lazdina U, Hultgren C, Chen M, Fischler B, Weiland O, Mushahwar IK, Sällberg M. 2000. Humoral and cellular immune responses to the GB virus C/hepatitis G virus envelope 2 protein. *J. Med. Virol*. 62(3):334-44.

Lefrère J-J, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, Mariotti M. 1999. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J. Infect. Dis*. 179:783-9.

Lemon SM, Walker CM, Alter MJ, Yi M. 2007. *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Hepatitis C virus. 1253-1304.

Lin CH, Kao JH, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. 2005. Application of hepatitis B virus genotyping and phylogenetic analysis in intrafamilial transmission of hepatitis B virus. *Clin. Infect. Dis*. 41:1576-1581.

Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayannis P, Fyng K, Nakatsuji Y, Shih JW, Young L, Piatak M, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fong SK, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP. 1996. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 271, 505-508.

Liu B, Woltman AM, Janssen HL, Boonstra A. 2008. Modulation of dendritic cell function by persistent viruses. *J. Leukoc. Biol*. 85(2):205-14.

Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Fornai C, Vatteroni M, Pistello M, Presciuttini S,

Bendinelli M. 2005. Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4807–4810.

Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Meschi S, Rocchi J, Fornai C, Vatteroni ML, Pistello M, Bendinelli M. 2006. Rapid increase in total torquetenovirus (TTV) plasma viremia load reveals an apparently transient superinfection by a TTV of a novel group 2 genotype. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2571–2574.

Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. 2008. *Lancet.* 372(9635):321-32.

Mailliard ME, Capadano ME, Hrnicek MJ, Gilroy RK, Gulizia JM. 2009. Outcomes of a patient-to-patient outbreak of genotype 3a hepatitis C. *Hepatology* 50:361–368.

Manzin A, Solfrosi L, Debiaggi M, Zara F, Tanzi E, Romanó L, Zanetti AR, Clementi M. 2000. Dominant role of host selective pressure in driving hepatitis C virus evolution in perinatal infection. *Virology* 74:4327–4334.

McKeown NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. 2004. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet. Microbiol.* 104:113–117.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. 2007. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(6):453-63.

Mphahlele MJ, Lau GK, Carman WF. 1998. HGV: the identification, biology and prevalence of an orphan virus. *Liver* 18:143-55.

Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM 2006. A previously unrecognized sixth genotype of GB virus C revealed by analysis of 5'-untranslated region sequences. *J. Med. Virol.* 78:105-11.

Nagano K, Fukuda Y, Yokozaki S, Okada K, Tanaka K, Funahashi K, Hayakawa T. 1999. Low risk of TT virus (TTV) infection in medical workers. *J. Hosp. Infect.* 42, 243–246.

Naito H, Abe K. 2001. Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 to type 4 by the polymerase chain reaction using type-specific primers and geographical distribution of viral genotypes. *J. Virol. Methods* 91:3-9.

Naito H, Hayashi S, Abe K. 2001. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J. Clin.*

Microbiol. 39: 362–364.

Nakatsuji Y, Shih JW, Tanaka E, Kiyosawa K, Wages J Jr, Kim JP, Alter HJ. 1996. Prevalence and disease association of hepatitis G virus infection in Japan. *J. Viral. Hepat.* 3(6):307-16.

Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. 2003. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS* 17:1457-62.

Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S. 2005. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J. Gen. Virol.* 88:1343–1347.

Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, Lorenzo FR, Shimosegawa T, Okamoto H. 2007. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J. Gen. Virol.* 88:1939–1944.

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241:92–97.

Norder H, Courouce AM, Magnius LO. 1994. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198: 489-503.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosewinjo RI, Imal M, Miyakawa Y, Mayumi M. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.* 69:2575-2583.

Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. 2000. Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 74:10236–10239.

Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F, Yoshikawa A. 2001. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* 30, 358–368.

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, Naito Y, Yoshikawa A. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. *J. Gen. Virol.*

83:1291–1297.

Okamoto H. 2009. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 331:1-20.

Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X, Hayashi A, Ishiko H, Kobayashi K. 2000. Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J. Med. Virol.*, 62:104-8.

Országos Egészségbiztosítási Pénztár Elemzési, Orvossalakértői és Szakmai Ellenőrzési Főosztály A hepatitis B vírus okozta krónikus májgyulladás diagnosztikája és terápiája. 2010. február 15.

Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. 2002. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch. Virol.* 147:21–41.

Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol.* 45: 529–538.

Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.

Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P, Haber PS, Marinos G, Levy MH, Kaldor JM, Dolan KA, French RA, Lloyd AR, Rawlinson WD. 2004. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. Hepatitis C Incidence and Transmission in Prisons Study (HITS) Group. *J. Infect. Dis.* 189(10):1846-55.

Pourkarim MR, Verbeeck J, Rahman M, Amini-Bavil-Olyae S, Forier AM, Lemey P, Maes P, Van Ranst M. 2009. Phylogenetic analysis of hepatitis B virus full-length genomes reveals evidence for a large nosocomial outbreak in Belgium. *J. Clin. Virol.* 46(1): 61–68.

Qiu J, Kakkola L, Cheng F, Ye C, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Pintel DJ. 2005. Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone. *J. Virol.* 79:6505–6510.

Rantala M, van de Laar MJ. 2008. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. *Euro Surveill.* 22:13(21).

Ray SC, Mao Q, Lanford RE, Bassett S, Laeyendecker O, Wang YM, Thomas DL. 2000. Hypervariable region 1 sequence stability during hepatitis C virus replication in chimpanzees. *J. Virol.* 74:3058-66.

Saito T, Watanabe H, Shao L, Okumoto K, Hattori E, Sanjo M, Misawa K, Suzuki A, Takeda T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Kawata S. 2004. Transmission of hepatitis C virus quasispecies between human adults. *Hepatol. Res.* 30:57-62.

Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. 1995. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 69(6):3893-6.

Savey A, Simon F, Izopet J, Lepoutre A, Fabry J, Desenclos JC. 2005. A large nosocomial outbreak of hepatitis C virus infections at a hemodialysis center. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26(9):752-60.

Scallan MF, Clutterbuck D, Jarvis LM, Scott GR, Simmonds P. 1998. Sexual transmission of GB virus C/hepatitis G virus. *J. Med. Virol.* 55: 203-208.

Seeger C, Zoulim F, Mason WS. 2007. Hepadnaviruses, p. 2977-3030. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Seifried C, Weber M, Bialleck H, Seifried E, Schrezenmeier H, Roth WK. 2004. High prevalence of GBV-C/HGV among relatives of GBV-C/HGV-positive blood donors in blood recipients and in patients with aplastic anemia. *Transfusion* 44: 268-74.

Sepkowitz KA. 2004. Risk to cancer patients from nosocomial hepatitis C virus. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 25:599-602.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* 5(9):558-67.

Silini E, Locasciulli A, Santoleri L, Gargantini L, Pinzello G, Montillo M, Foti L, Lisa A, Orfeo N, Magliano E, Nosari A, Morra E. 2002. Hepatitis C virus infection in a hematology ward: Evidence for nosocomial transmission and impact on hematologic disease outcome. *Haematologica* 87:1200-1208.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 42(4):962-73.

Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushawar IK. 1995. Isolation of novel virus-like sequences with human hepatitis. *Nature Medicine* 1:564-569.

Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. 2011. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 92:233-46.

Sugitani M, Shikata T. 1998. Comparison of amino acid sequences in hypervariable region-I of hepatitis C virus clones between human inocula and the infected chimpanzee sera. *Virus Res.* 56:177-182.

Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Kawabe Y. 2000. Prevalence of TTV DNA among children with a history of transfusion or liver disease. *J. Med. Virol.* 60:172-176.

Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Szládek G, Juhász A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, Tar I, Márton I, Kónya J, Gergely L, Szarka K. 2005. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 58:402-405.

Szomor KN, Dencs A, Tóth G, Kovács GM, Saleh Ali Y, Berencsi G, Takács M. 2007. Variability of the PreS1/PreS2/S regions of hepatitis B virus in Hungary. *Arch. Virol.* 152(4):697-704.

Tai AW, Chung RT. 2009. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J. Hepatol.* 50(2):412-20.

Takács M, Szomor KN, Szendroi A, Dencs A, Brojnás J, Rusvai E, Berencsi G. 2002. Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus in Hungary. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34(4):283-7.

Takács M, Dencs A, Csiszár C, Hettmann A, Rusvai E, Szomor KN, Pálfi V, Nagy B. 2008. First description of swine Torque teno virus (TTV) and detection of a new genogroup in Hungary: short communication. *Acta Vet. Hung.* 56(4):547-53.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Theil HJ 2005. Family Flaviviridae. In: Claude M Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2 ed. San Diego: Academic Press. pp 979–996.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.

Tillmann HL. 2007. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 13(1):125-40.

Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H. 2002. High TT virus load as an independence factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J. Med. Virol.* 67:501-509.

Trisler Z, Seme K, Poljak M, Celan-Lucu B, Sakoman S. 1999. Prevalence of hepatitis C and G virus infections among intravenous drug users in Slovenia and Croatia. *Scand. J. Infect. Dis.* 31: 33-35.

Trisler Z, Seme K, Poljak M, Celan-Lucu B, Sakoman S. 1999. Prevalence of hepatitis C and G virus infections among intravenous drug users in Slovenia and Croatia. *Scand. J. Infect. Dis.* 31: 33-35.

Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Akahane Y, Konishi K, Yoshizawa H, Okamoto H. 2001. IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection. *Hepatol. Res.* 19:1–11.

Tucker TJ, Smuts HE, Eedes C, Knobel GD, Eickhaus P, Robson SC, Kirsch RE. 2000. Evidence that the GBV-C/hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J. Med. Virol.* 61: 52-58.

Tucker TJ, Smuts HE. 2000. GBV-C/HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1-5. *J. Med. Virol.* 62(1):82-3.

Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY, Shih JW, Donahue P, Primi D, Alter HJ. 2001. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology* 33, 1303–1311.

Wands JR, Walker JA, Davis TT, Waterbury LA, Owens AH, Carpenter CC. 1974. Hepatitis B in an oncology unit. *N. Engl. J. Med.* 291(26):1371–1375.

Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, Williams R, Dusheiko G, Bertoletti A. 2004. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J. Virol.* 78:5707–5719.

Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. 2003. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 77:4911–4927.

Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, Shi CC, Janssen HL. 2011. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One.* 6(1):e15324.

World Health Organization. Hepatitis B. 2008
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>

Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Sowa JP, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. 2009. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 49(4):1132-40.

Zignego AL, Giannini C, Ferri C. 2007. Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders: an overview. *World J. Gastroenterol.* 13(17):2467-78.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

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

Dencs Á, Farkas Á, Gyugos M, Kurcz A, Puskás E, Tresó B, Rusvai E, Barcsay E, Takács M. 2011b. Phylogenetic analysis of a nosocomial transmission of hepatitis B virus at a paediatric haematology ward. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 58(1):23-9.

Dencs Á, Hettmann A, Szomor KN, Kis Z, Takács M. 2009a. Prevalence and genotyping of group 3 torque teno viruses detected in health care workers in Hungary. *Virus Genes.* 39(1):39-45.

Takács M, Dencs Á, Csiszár C, Hettmann A, Rusvai E, Szomor KN, Pálfi V, Nagy B. 2008. First description of swine Torque teno virus (TTV) and detection of a new genogroup in Hungary: short communication. *Acta Vet. Hung.* 56(4):547-53.

Dencs Á, Sebestyén Á. 2007. Prevalence and genotypes of hepatitis G virus/GB virus C in a multirisk group in Hungary. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 54(3):305-16.

Szomor KN, Dencs Á, Tóth G, Kovács GM, Saleh Ali Y, Berencsi G, Takács M. 2007. Variability of the PreS1/PreS2/S regions of hepatitis B virus in Hungary. *Arch. Virol.* 152(4):697-704.

Takács M, Szomor KN, Szendrői A, Dencs Á, Brojnás J, Rusvai E, Berencsi G. 2002. Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus in Hungary. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34(4):283-7.

Kongresszusi összefoglaló

Dencs Á, Hettmann A, Szűcs M, Rusvai E, Takács M. 2009b. Phylogenetic analysis of a hepatitis C virus outbreak in a haemodialysis unit. 51st Annual meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, Tihany, June 13–16, *Z. Gastroenterol* 47:463.

A dolgozat témájában megjelent egyéb saját közlemények

Tresó B, Baresay E, Tarján A, Horváth G, Dencs Á, Hettmann A, Csépai MM, Győri Z, Rusvai E, Takács M. Prevalence and Correlates of HCV, HVB, and HIV Infection among Prison Inmates and Staff, Hungary. *J Urban Health*. 2011 Dec 6. [Epub ahead of print]

Szomor KN, Dencs Á, Garai E, Rusvai E, Berencsi G, Takács M. 2008. Mutation spectra of the surface-protein-coding region of the HBV genome in HBV-vaccinated and non-vaccinated individuals in Hungary. *Arch. Virol*. 153(10):1885-92.

Takács M, Lengyel A, Dencs Á, Berencsi G. 2003. Újjonnan felfedezett hepatitis vírusok: de okoznak-e májgyulladást? *Orv. Hetil*. 144(32):1569-74.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani Dr. Takács Máriának, aki nemcsak a doktori, hanem a diplomamunkám során is témavezetőm volt. Felkarolt, amikor mindjárt a munkám legelején „elárvultam”. Nemcsak rengeteg elméleti tudást adott nekem, hanem a labormunka alapjait is tőle tanultam. Főökként pedig nagy erőfeszítések árán lehetővé teszi, hogy a Főosztályon mindig folyjon kutatómunka.

Köszönöm Dr. Berencsi Györgynek, hogy érdekes és jó hangulatú előadásaival megszerettette velem a virológiát, és hogy az évek során bármikor bármilyen szakmai kérdéssel bátran fordulhattam hozzá.

Köszönöm Dr. Erdei Annának, hogy lehetővé tette, hogy részt vegyek az Immunológia doktori programban.

Hálás vagyok Dr. Szomor Katalinnak a rengeteg közös munkáért, az értékes tanácsokért és még értékesebb barátságáért, ami a legnehezebb időkben különösen sokat jelentett. Szeretném megköszönni Dr. Kis Zoltánnak a sokszor sietős ebédek és kávék mellett folytatott szakmai konzultációkat, és hogy megtanított bánni a LightCyclerrel.

Köszönöm Kerégyártóné Zalka Ceciliának, Kulcsár Katalinnak, Kunosné Végh Máriának és Dubszki Zsoltné Erzsinek, hogy mindig precízen és lelkiismeretesen végeztek el minden munkát a rutin feladatokon túl is, akár PCR-ről, akár klónozásról, akár szekvenálásról volt szó. Köszönettel tartozom Dr. Barcsay Erzsébetnek és Dr. Rusvai Erzsébetnek, amiért tanácsaikkal sokat segítettek a munkámban. Köszönöm Tresó Bálintnak és Hettmann Andreának, hogy a munka az irodában gördülékenyen és jó hangulatban folyhatott. Andinak külön köszönöm a segítséget a kísérletek elvégzésében.

Végül családomnak szeretnék köszönetet mondani. Köszönöm szüleim szeretetét és támogatását, és hogy mellettem álltak és segítettek mindig mindenben, amiben csak tudtak. Köszönöm férjemnek, Péternek a türelmét, amikor a dolgozatírás sokszor az éjszakába nyúlt, és figyelmességét, hogy annyiszor felajánlotta, hogy vigyáz Emmára, hogy nyugodtan írhattak, vagy éppen egy kicsit kikapcsolódjak. Szeretném megköszönni Emmáskának is, ha ő még nem is érti, csak azt, hogy itt van, és annyi örömet és felejthetetlen élményt nyújt nap mint nap.