

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Hepatitiszt okozó vírusok molekuláris vizsgálata

N. Szomor Katalin

Budapest, 2009.

A doktori iskola

megnevezése: Budapesti Corvinus Egyetem, Budai Campus

tudományága: Élettudományok Területi Doktori Tanács, Élelmiszertudományi Doktori Iskola

vezetője: Dr. Fodor Péter
Tudományos rektorhelyettes, tanszékvezető egyetemi tanár, kutatócsoport-vezető, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Matematika és Informatika Tanszék

Témavezető: Dr. Takács Mária PhD
főosztályvezető, címzetes egyetemi docens,
Országos Epidemiológiai Központ, Virologiai főosztály

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2009. október 6-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Deák Tibor

Tagjai

Beczner Lászlóné
Mohácsiné Farkas Csilla
Minárovits János
Rusvai Miklós

Opponensek

Harrach Balázs
Kónya József

Titkár

Mohácsiné Farkas Csilla

TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2.	BEVEZETÉS, CÉLKITÚZÉSEK	7
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1.	<i>A májgyulladás (hepatitisz)</i>	9
3.1.1.	Történet	9
3.1.2.	Tünetek, klinikai jellemzők	10
3.1.3.	A májgyulladás laboratóriumi diagnosztikája	11
3.1.4.	A megelőzés lehetőségei	12
3.1.4.1.	Specifikus védelem	12
3.1.4.2.	Nem specifikus védelem	13
3.2.	<i>A májgyulladást okozó vírusok rövid áttekintése</i>	14
3.2.1.	Enterálisan terjedő hepatitisz vírusok	15
3.2.2.	Parenterálisan terjedő hepatitisz vírusok	16
3.3.	<i>A hepatitisz B vírus (HBV)</i>	18
3.3.1.	Epidemiológiai adatok	18
3.3.2.	A kórokozó	19
3.3.3.	HBV: genotípusok – szerotípusok	22
3.3.4.	Replikációs mechanizmus	23
3.3.5.	A HBV klinikai jelentősége, laboratóriumi diagnosztika	23
3.3.6.	Immunizálási lehetőségek HBV fertőzés kivédésére	25
3.3.7.	A kezelés lehetőségei	26
3.3.8.	HBV vírusvariánsok / mutáns vírusok	27
3.3.8.1.	Pre-core/core gén mutáns	27
3.3.8.2.	HBV polimeráz variánsok	28
3.3.8.3.	PreS/S gén mutáns vírusok	28
3.3.8.4.	X gén mutánsok	30
3.4.	<i>Torque Teno vírus (TTV)</i>	30
3.4.1.	Epidemiológiai adatok	30
3.4.2.	A kórokozó	31
3.4.3.	TTV genotípusok	32
3.4.4.	A TTV klinikai jelentősége, laboratóriumi diagnosztika	32
3.5.	<i>GBV-C/hepatitisz G vírus (GBV-C/HGV)</i>	33
3.5.1.	Epidemiológiai adatok	33
3.5.2.	A kórokozó	34
3.5.3.	GBV-C/HGV genotípusok	34
3.5.4.	A GBV-C/HGV klinikai jelentősége, laboratóriumi diagnosztika	34
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	36
4.1.	<i>VIZSGÁLATI ANYAGOK</i>	36
4.1.1.	Hepatitisz B vírus magyarországi genotípus-eloszlásának meghatározása	36
4.1.2.	Nozokomiális járvány molekuláris epidemiológiai vizsgálása	36
4.1.3.	„Vakcinaszökevény” vírusmutánsok keresése Magyarországon	37
4.1.4.	Torque Teno vírus előfordulása rizikócsoportokban; TTV molekuláris vizsgálatok	37
4.1.5.	Torque Teno vírus előfordulása hazai sertésállományban tartott sertésállományban	38
4.1.6.	GBV-C/HGV vírus előfordulása különböző rizikócsoportokban; molekuláris vizsgálatok	38
4.2.	<i>MÓDSZEREK</i>	39
4.2.1.	Szerológiai markerek	39
4.2.2.	Nukleinsav kivonás	39
4.2.3.	Reverz transzkripció	39
4.2.4.	Polimeráz láncreakció (PCR)	40
4.2.4.1.	PCR – humán TTV kimutatására	40
4.2.4.2.	PCR – sertés TTV kimutatására	40
4.2.4.3.	PCR – HBV molekuláris vizsgálatokhoz	41
4.2.4.4.	PCR – GBV-C/HGV kimutatására	42

4.2.5.	Agaróz gél-elektroforézis	42
4.2.6.	Klónozás	42
4.2.7.	DNS – szekvenálás	43
4.2.8.	Szekvencia azonosítás	43
4.2.9.	Nukleotid szekvencia illesztés	43
4.2.10.	Fehérje fordítás, aminosav szekvencia illesztés	44
4.2.11.	Filogenetikai analízis	44
4.2.12.	HBV Hibridizációs próba	44
5.	EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	45
5.1.	<i>Hepatitisz B molekuláris vizsgálatok</i>	45
5.1.1.	Genotipizálási eredmények	45
5.1.2.	Nozokomiális járvány molekuláris epidemiológiai vizsgálatának eredménye	48
5.1.3.	Misszensz mutációk a magyarországi A2 szubgenotípusú HBV izolátumok felületi fehérjét kódoló génszakaszán	50
5.1.4.	HBV: mutációk feltérképezése a felületi-antigént kódoló génszakaszon, „vakcinaszökevény” vírusvariánsok keresése	53
5.2.	<i>TTV vizsgálatok eredményei</i>	61
5.2.1.	A TTV előfordulása rizikócsoportokban	61
5.2.2.	A TTV előfordulása hazai sertésállományban	66
5.3.	<i>GBV-C/HGV vizsgálatok eredményei</i>	67
5.3.1.	GBV-C/HGV előfordulása rizikócsoportokban	67
5.3.2.	GBV-C/HGV anti-E2 ellenanyagvizsgálatok eredményei	68
5.3.3.	GBV-C/HGV molekuláris vizsgálatok eredményei	68
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	71
7.	MELLÉKLETEK	76
	<i>MI. IRODALOMJEGYZÉK</i>	76
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	90

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

(+)	pozitív polaritású
(-)	negatív polaritású
aa	aminosav („amino acid”)
aHBc/anti-HBc	hepatitisz B vírus „c” („core” – köpeny) antigénje elleni ellenanyag
aHBe/anti-HBe	hepatitisz B vírus „e” („early” – korai) antigénje elleni ellenanyag
aHBs/anti-HBsAg	hepatitisz B vírus „S” („surface” – felszíni) antigénje elleni ellenanyag
aHCV/anti-HCV	hepatitisz C vírus elleni ellenanyag
ALL	akut limfoid leukémia
ALAT/ALT	aszpartát transzamináz (régebbi elnevezése: SGOT – szérumban glutamát-oxálacetát aminotranszferáz)
ASAT/AST	alanin transzamináz (régebbi elnevezése: SGPT – szérumban glutamát-piruvát aminotranszferáz)
ÁNTSZ	Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat
ds	duplaszálú („double stranded”)
DNS	deoxiribonukleinsav
E	enterális terjedési mód
EB	etídium-bromid
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay” - szerológiai módszeren alapuló teszt
γ-GT/GGT	gamma glutamil transzpeptidáz
HAV	hepatitisz A vírus
HBcAg	hepatitisz B vírus „c” („core” – köpeny) antigénje
HBeAg	hepatitisz B vírus „e” („early” – korai) antigénje
HBIG	hiper-immun gamma globulin
HBsAg	hepatitisz B vírus „S” („surface” – felszíni) antigénje
HBV	hepatitisz B vírus
HCC	májsejtes rák (hepatocelluláris karcinóma)
HCV	hepatitisz C vírus
HDV	hepatitisz D vírus
HEV	hepatitisz E vírus
GBV-C/HGV	GB vírus - C/hepatitisz G vírus
IFN	interferon
IgG	G alosztályú immunglobulin ellenanyag
IgM	M alosztályú immunglobulin ellenanyag
kb	kilobázis-pár
nt	nukleotid
OEK	Országos Epidemiológiai Központ
ORF	nyitott leolvasási keret („open reading frame”)
OVSZ	Országos Vérellátó Szolgálat
PCR	polimeráz láncreakció
PE	parenterális terjedési mód
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripció és az azt követő polimeráz láncreakció
SENV	SEN vírus
SGOT	ld. ALAT/ALT
SGPT	ld. ASAT/AST
SM	szklerózis multiplex
SLE	szisztémás lupusz eritematózus - idült, gyulladáshoz vezető kötőszöveti betegség
ss	egyszálú („single stranded”)
TTV	Torque Teno vírus

2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A világ legjelentősebb népegészségügyi problémái közé tartoznak a vírusok által okozott májgyulladások (hepatitisz). Az Egészségügyi Világszervezet, a WHO szerint csak a B típusú hepatitisz vírussal fertőzöttek száma milliárdos nagyságrendűre tehető, és évi közel 3-400 millió azoknak a friss fertőzötteknek száma, akik a betegség heveny szakasza után idült májgyulladásban szenvednek életük végéig.

A hepatitisz kórképpel összefüggésbe hozott, májsejtekben szaporodó (hepatotróp) vírusok csoportja minden bizonnyal még nem teljes, hiszen felfedezésük, azonosításuk folyamatos. Még alig több, mint 20 évvel ezelőttig is nonA–nonC hepatitiszként említették az ismeretlen eredetű májgyulladásokat. Az elsődlegesen a májat megtámadó, hepatotróp vírusokon túl egyéb vírusfertőzések is okozhatnak májgyulladást, itt azonban a máj érintettsége csak kísérőjelenség. Ilyen kórokozók az egyes herpeszvírusok (pl. Epstein-Barr vírus – HHV-4, cytomegalovírus – HHV-5, humán herpeszvírus-6, 7), sárgaságot és vérzéses lázat okozó (icterohaemorrhagiás) vírusok, az adenovírusok, enterovírusok egyes képviselői, a rózsahimlő vagy a kanyaró vírusa. A 90-es években azonosították az eleinte hepatotrópnek gondolt, mára azonban már lymphotróp (fehérvérsejtekben szaporodó) vírusként számon tartott GBV-C vírust, amelyet hepatitisz G vírusként is nevezünk (GBV-C/HGV), valamint a Torque Teno vírust (TTV).

A májgyulladást okozó vírusok sem struktúrájukban, sem genetikailag, sem terjedési módjukban nem egységes víruscsoport, az általuk okozott kórképek súlyosságában is alapvető különbségek tapasztalhatók. Ismereteink ebben a témában szinte napi szinten bővülnek, ennek ellenére, még napjainkban is vannak olyan májgyulladásban szenvedő betegek, akiknél a kórokozót nem sikerül azonosítani.

Az országhatárok közel 20 évvel ezelőtti megnyílásával, könnyebb átjárhatóságával nem csak az emberek vándorlása indult meg, hanem általuk a hordozott vírusoké is. A migrációval a mikroorganizmusok eddig ismert földrajzi eloszlása elmosódottabbá válik, újabb és újabb területeken bukkanhatnak fel eddig ott nem jellemző kórokozók. Célul tűztük ki, hogy vizsgálataink során feltérképezzük a Magyarországon előforduló hepatitisz B és TT vírusok genotípusait, amely ismereteknek szerepe lehet a betegek kezelésében.

Ismeretes, hogy a hepatitisz B vírus esetében egyes genetikai variánsok kialakulásának hatása lehet a laboratóriumi diagnózis felállítására („e” antigén-hiányos vírus-típus), a terápia kimenetelére (rezisztencia a vírus ellenes szerekkel szemben, pl. lamivudin rezisztens mutáns) vagy az előzőleg elvégzett immunizáció hatására („vakcinaszökevény” mutáns). További célunk volt, hogy elvégezzük a HB vírusok genotípusokon belüli finomabb vizsgálatát, különös tekintettel a tömeges immunizáció immunszelektív hatása révén kialakuló vírusvariánsokra, és a nemzetközi

szakirodalomban – Carman munkacsoportja által 1990-ben elsőként – leírt „*G145R*” (a 145-ös aminosavpozícióban található aminosavcsere: glicinről – G, argininre – R) mutációra és egyéb, aminosav-szubsztitúciós vírusváltozatok kimutatására, amelyek a vakcináció ellenére is okozhatnak fertőzéseket.

A Magyarországon előforduló hepatitisz B genotípusok és vírusvariánsok ismeretében molekuláris epidemiológiai vizsgálatokat végeztünk egy kórházi járvány betegek (onko-hematológiai osztályon kezelték) között a betegek közös forrásból való fertőződésének igazolására vagy kizárására.

Vizsgáltuk továbbá a GBV-C/HGV, TT vírusok előfordulását ugyanezen rizikócsoporthoz (onko-hematológiai osztályon kezelt betegek, akik alaptermésükből adódóan vért, vérkészítményeket gyakran kaphatnak), összehasonlítva az egészséges populációban mérhető prevalenciával.

Vizsgáltuk a TT vírusok előfordulását hazai sertéstelepeken tartott sertések mintáiban is, az azonban egyelőre nem tisztázott, hogy jelenthetnek-e egyáltalán veszélyt ezek a kórokozók az emberre, pl. enterális terjedési módon, a fertőzött állat húsát elfogyasztva vagy állati eredetű szervek emberbe történő beültetését (xenotranszplantáció) követően, többek között gasztroenterális kórképek – májgyulladás – kiváltásával.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A májgyulladás (hepatitisz)

3.1.1. Történet

A máj gyulladására utaló tüneteket, elsősorban a sárgaságot – még a betegség pontos megnevezése nélkül – már Hippocrates (kb. 460-kb. 370, ókori görög orvos) leírta, de a betegség fertőző voltára utaló feltételezésekről szóló feljegyzések csak a VIII. századból ismertek. A XVII-XIX. századokban zajló háborúk idején mind a hadseregben, mind a civil lakosságban nagy tömegeket érintő járványok zajlottak, melyek feltehetőleg virális eredetűek voltak (hepatitisz A?). Lurman írt le 1883-ban, Németországban, egy – hajógyári rakodómunkások himlő oltását követő – „sárgaság-járványt”, ami feltehetőleg vagy az oltóanyag fertőzöttsége (emberi nyirokcsomóból izolált, gyengített kórokozóból készült oltóanyag), vagy a hiányos oltási higiénia következtében kialakult hepatitisz B, esetleg C járvány lehetett. McDonald már 1908-ban feltételezte, hogy a „fertőző sárgaságot” vírus okozza [McDonald, 1908]. Szintén feltehetőleg HBV vagy HCV által okozott, sárgaláz elleni immunizációt követő járvány alakult ki Angliában, az 1930-as évek végén (az oltóanyagot emberi szérummal stabilizálták). Ezek az esetek irányították a figyelmet a kórokozó vérrel vagy plazmával is előforduló továbbvitelének lehetőségére. Az 1940-es években mind német, mind amerikai kutatók, orvosok jeleztek a II. világháborúban már széleskörűen végzett vérátömlesztéseket követő, járványszerűen kialakuló májgyulladás eseteket. A vérrel átvihető vírust az enterálisan terjedőtől Hans Voegt 1942-ben, kétes etikájú (elmeegógyintézetben kezelteken és koncentrációs táborok foglyain végzett) kísérletekben különítette el [Voegt, 1942]. Így bizonyította, hogy nincs keresztimmunitás a két vírus között [Leyendecker, 1989]. MacCallum javaslatára 1947-ben nevezték el az enterálisan terjedő vírust hepatitisz A-nak vagy fertőző májgyulladás vírusának, míg a vérrel is átvihető vírust hepatitisz B-nek (ahol a B betű a vér útján történő – „blood-borne” – terjedésre utal), vagy szérum hepatitisznek.

Az 1976-ban Nobel-díjjal kitüntetett Baruch Samuel Blumberg (amerikai orvos, genetikus) 1965-ben, új korszakot nyitott a víruskutatás történetében. Ekkor fedezte fel Ausztrál bennszülöttek vérében az „Ausztrália-antigén”-t (amely később a HBV felszíni antigénjének – HBsAg – bizonyult), majd rámutatott arra, hogy leukémiások (politranszfundáltak) és Down-kórosok vérében az „Ausztrália-antigén” nagy koncentrációban található meg [Blumberg, 1967]. Későbbi kutatásai során patológiai összefüggést talált az Ausztrália-antigén előfordulása és az elsődleges májrák között [Blumberg, 1969]. Az Ausztrália-antigént Prince és Okochi mutatta ki (a vérrel átvihető hepatitiszvírus által okozott májgyulladásban szenvedők véréből) 1968-ban [Prince, 1968], [Okochi, 1968], magát a komplett vírust pedig Dane és munkatársai 1970-ben (Ausztrália-antigénnel összefüggő-hepatitiszesek véréből) [Dane, 1970]. Feinstone és munkatársai 1973-ban azonosították

a fertőző májgyulladás (HAV) kórokozóját [Feinstone, 1973], a hepatitisz D vírust pedig Rizzetto munkacsoportja fedezte fel 1977-ben [Rizzetto, 1977]. A hepatitisz E vírust Balayan és munkatársai azonosították 1983-ban [Balayan, 1983], a hepatitisz C vírus felfedezése 1989-ig váratott magára [Choo, 1989]. Ekkor már körvonalazódott az is, hogy a vírusos eredetű, parenterálisan terjedő fertőzések igen nagy hányadéért ez a vírus a felelős. Az ezután eltelt tíz éven belül újabb három vírust azonosítottak: GBV-C [Simons, 1995] vagy más néven hepatitisz G vírus [Linnen, 1996], TTV [Nishizawa, 1997] és SENV [Primi, 2000]. A molekuláris módszerek térhódításával újabb lehetőségek nyíltak a vírusvadászok előtt: napjainkban is újabb és újabb – klasszikus virológiai módszerekkel nem, vagy csak igen költségesen (pl. főemlősök fertőzésével) izolálható – kórokozók léte derül fény (pl. humán bocavírus) [Allander, 2005], és várhatóan egyes ismeretlen eredetű hepatitisz esetében is tisztázódhat a betegséget kiváltó kórokozó.

3.1.2. Tünetek, klinikai jellemzők

A vírusok okozta májgyulladás az észrevétlen, vagy enyhe lefolyású betegségtől a gyors, gyakran súlyos, akár végzetes kimenetelű májelégtelenségig változhat, amely a kiváltó októl éppúgy függ, mint a fertőzött személy korától, és általános egészségi állapotától. A betegség kezdetét jelző általános tünetek a rossz közérzet, fáradtság, hányinger, étvágytalanság, esetleg láz. Ritkán – főleg HBV által előidézett májgyulladás esetén – előfordulhatnak ízületi fájdalmak, csalánkiütéshez hasonlító bőrtünetek is. Az első tünetek megjelenését követő ~3-10 nap múlva jelentkező, májgyulladásra már sokkal inkább jellemző tünetek a jobb bordaív alatti fájdalom, a bőr, és/vagy szemfehérje sárgás színe, a világos széklet, sötétbarna vizelet. Ezzel egyidejűleg a szérumban a máj károsodására utaló – a legnagyobb mennyiségben a májban előforduló – transzamináz enzimek szintjében markáns, a normális élettani értékek többszörösét, akár százszorosát meghaladó emelkedés mutatkozhat.

A fertőzés következményei lehetnek:

- a heveny formában zajló *akut-* vagy tartós, idült gyulladással járó *krónikus májgyulladás*,
- a gyors, rossz prognózisú, gyakran végzetes kimenetelű májgyulladás: *fulmináns hepatitisz*,
- klinikai tünetek nélküli – tünetmentes – *hordozói állapot* (főleg az élet korai szakaszán szerzett fertőzést követően, de kialakulhat klinikai tünetek nélkül - szubklinikus formában - korábban lezajlott fertőzést követően is),
- a folyamatosan fennálló gyulladással járó folyamat következményeként *májzsugor* (cirrózis),
- primer májsejtes rák (*hepatocelluláris carcinoma* – HCC), mely gyakran a májzsugor, és az ezt megelőző krónikus gyulladással járó folyamatok következménye.

A vírusos eredetű májgyulladások nagy része 4-8 hét alatt magától gyógyul, a lábadozás időszaka azonban hónapokig vagy akár egy évig is eltarthat.

3.1.3. A májgyulladás laboratóriumi diagnosztikája

A máj összetett szerv, amelynek anyagcsere-, kiválasztó- és védekező működései kölcsönösen függenek egymástól. Egyetlen egyszerű vizsgálat sem alkalmas a májműködés általános megítélésére, a vizsgálatok specificitása és szenzitivitása korlátozott. Több szűrővizsgálat együttes alkalmazásával azonban a máj működésének zavara már könnyebben felismerhető, illetve az elvégzett vizsgálatok elősegíthetik a klinikai tünetek alapján gyanított betegség meghatározását, valamint súlyosságának megállapítását. A szérum enzimszintjének növekedését a működésükben megzavart májsejtek hipoxiája vagy pusztulása, valamint a fokozott sejtmembrán permeabilitás következtében a sejtekből a vérbe jutó enzimfehérjék eredményezik. A máj működésének zavarára utalhat még a májban termelődő szérumfehérjék (α -, β -globulinok), alvadási faktorok vagy az α -foetoprotein szint változása is. Az automatizáltan végzett vizsgálatok közül a leghasznosabbak a szérum bilirubin szintjének, az alkalikus foszfatáz szintnek és a transzamináz enzimek szintjeinek meghatározása.

A **szérum bilirubin** szintjének emelkedése oka lehet többek között az epe kiválasztás, a máj bilirubin felvételének vagy konjugációjának csökkenése. Az egyik legszembetűnőbb tünetet, a sárgaságot (icterus) a májsejt-károsodás miatti anyagcsere-zavar okozza. Ennek során elmarad a zsírodékony indirekt bilirubinnak vízoldékony (direkt) bilirubinná alakítása (glükuronsavval történő konjugációja), amely így már ürülne az epével, vagy a vizelettel (urobilinogén formájában). E folyamat hiányában azonban az epefesték a bőrben és/vagy a szemben szaporodik fel. A sárgaság a máj regenerációját követően fokozatosan csökken. A szérum **alkalikus foszfatáz** tartalma élettani körülmények között a májból, csontból és terhesség idején a placentából származik. Aktivitása jelentősen nő az epeképződést akadályozó folyamatokkal, illetve kisebb mértékben májsejtkárosodás esetén. A vérben megjelenő **transzamináz enzimeknek** (ASAT/AST, ALAT/ALT és a γ -GT/GGT) a vérben sem szubsztrátjuk, sem funkciójuk nincs, megjelenésük egyértelmű indikátora a májsejt-permeabilitás növekedésének, vagy a májsejt-pusztulás fokozódásának.

Szerológiai markerek meghatározása:

A vírusos eredetű májgyulladások laboratóriumi diagnosztikáját nagymértékben megkönnyíti a kereskedelmi forgalomban kapható, szerológiai módszeren alapuló ELISA (immunfehérjék vagy kórokozó antigének minőségi/mennyiségi mérését lehetővé tevő) diagnosztikus reagenskészletek (kitek) alkalmazása. A klasszikus hepatitisz vírusok esetében lehetőség van a fertőzés tényének igazolására az IgM/IgG alosztályú vírus-ellenes antitestek (anti-HAV, anti-HBs, anti-HBc, anti-

HBe, anti-HCV, anti-HDV, anti-HEV) és a vírus replikációja során keletkező antigének kimutatásával (pl. HBsAg, HBeAg). A markerek jelenléte egyes esetekben utalhat a fertőzés stádiumára is. Előnye, hogy a vizsgálat gyorsan, olcsón, viszonylag egyszerűen (automatizáltan) kivitelezhető, viszont a tünetek megjelenésekor vett vérmintában az ellenanyag kimutatása még nem mindig ad megbízhatóan pontos eredményt, sokszor szükség lehet a rekonvaleszcencia szakában vett vérminta vizsgálatára is.

Molekuláris módszerek:

A vírus genetikai örökítő-anyagának kimutatása polimeráz láncreakcióval (PCR) a beteg vizsgálati mintájából (vérsavó, biopsziás anyag, széklet, stb.) igazolja a vírus jelenlétét. A PCR kivitelezése speciális laboratóriumi környezeti feltételeket követel meg, a módszer viszonylag hamar ad eredményt, ám költségeit tekintve kedvezőtlenebb a szerológiai vizsgálatoknál. A reakció során két rövid, a kórokozó genomjára specifikus, azzal komplementer oligonukleotid („primer”) által határolt genomszakaszt sokszorozunk meg, olyan mértékben, hogy keletkezett termék – pl. a kettős spirálba interkalálódó festék segítségével – könnyen kimutathatóvá, láthatóvá válják. A primerek által határolt génszakasz sikeres megsokszorozása a vírus genomjának jelenlétét, azaz – egyes esetektől eltekintve – a vírus aktuális szaporodását jelzi, a szerológiai eredményekkel történő összehasonlítása segítséget ad a diagnózis felállításában. A megsokszorozott génszakasz bázissorrendjének pontos meghatározásával (DNS-szekvenálás) az egyes mutációk feltérképezhetők, az ezeket hordozó vírusok elterjedtsége nyomon követhető. A kapott vírusszekvenciák összehasonlításával filogenetikai analízis végezhető, amely epidemiológiai adatokkal kiegészítve segítséget nyújthat fertőzések láncolatának felderítésében és esetleg a fertőzőforrás azonosításában is.

3.1.4. A megelőzés lehetőségei

3.1.4.1. Specifikus védelem

(a) Aktív immunizálás: számos vírusfertőzéssel – köztük három hepatitiszt okozó vírussal: HAV-val, HBV-vel, HDV-vel szemben áll rendelkezésre védőoltás, amely a vírus immunogén antigénjét, vagy a teljes, de elölt vírust tartalmazza. (Speciális eset a HDV-elleni immunizáció, mivel a HBV a HDV segítő – „helper” – vírusa, így a HBV oltás egyúttal a HDV fertőzés ellen is hatékony védelmet nyújt.) A védőoltást a vírussal történő feltételezett találkozást megelőzően beadva, vírusneutralizáló hatású ellenanyagok képződését válthatjuk ki az immunizált személyeknél. A megfelelő időpontokban beadott teljes oltási sorozatot követően védettség alakul ki, amely ismételt vagy emlékeztető oltásokkal – optimális esetben – életre szóló.

(b) Passzív immunizálás: a fertőzést természetes úton kiállott emberek vérében magas koncentrációban jelen levő ellenanyagok kinyerése és tisztított formában való alkalmazása – hiperimmun gamma globulin – a fertőzésnek kitett személyeknél hatásos védelem lehet olyan esetekben, amikor az aktív immunizálásra már nincs elég idő. (Pl. HAV járvány idején azoknál az érintett személyeknél, akiknél a betegség tünetei még nem alakultak ki vagy HBV hordozó kismamák újszülöttjeinek passzív immunizálása születéskor.) A passzív immunizálás által szerzett védelem csak egy átmeneti időszakra – amíg az ellenanyagok a vérben keringve le nem bomlanak – elegendő, további fertőzésnek kitett személyeknél az aktív immunizáció a választandó immunizálási lehetőség.

3.1.4.2. Nem specifikus védelem

A hepatitiszt okozó vírusok egy részével szemben nincs hatásos immunizálási lehetőség, így a fertőzésnek kitett személyek esetében nagy hangsúlyt kell fektetni a megelőzésre. A megelőzés nem specifikus módzatai, melyek önállóan kevésbé, kombinálva azonban viszonylag biztos védelmet nyújtanak a fertőzés elkerülésére:

- a kórokozó inaktiválása
- a fertőzési lánc megszakítása.

A megelőzésben egyfelől részt vesznek az egészségügyi hatóságok, oly módon, hogy a fertőzésnek fokozottan kitett betegcsoportok (dializáltak, hemofiliások, transzplantáltak) védelmét biztosítja a betegellátó intézményekben. Ezek lehetnek a kezeléshez használt berendezések rendszeres és hatékony szerekkel végzett fertőtlenítése, a vér és vérkészítmények ellenőrzése, a donorok szűrése. Része a nem specifikus védelemnek a településeken a vízügyi, környezetvédelmi hatóságok által felügyelt, megfelelő csatornázási és szennyvízelvezetési és kezelési rendszer kiépítése, a megfelelő minőségű ivóvíz biztosítása a lakosság számára. Fontos védelmi tevékenység az árvízvédelem, hiszen árvizek idején a szennyvízzel kontaminálódott ivóvíz, vagy akár termőföldek kiindulópontjai lehetnek egy későbbi, enterálisan terjedő járválynak. Az élelmiszerbiztonsági hatóságok az emberi fogyasztásra szánt élelmiszereket előállító/forgalmazó üzemek ellenőrzésével előzhetik meg a nem megfelelő minőségű – akár megbetegedést is okozó – élelmiszerek fogyasztókhöz jutását.

A megelőzés másfelől feladata magának az egyénnek is, hiszen a jelenleg rendelkezésre álló információk alapján számos esetben elkerülhető a fertőzés:

- megfelelően hőkezelt élelmiszer fogyasztásával
- megfelelő személyi higiénia betartásával
- intravénás/nem intravénás drogok használatának kerülésével

- tetoválástól, testékszer viseléstől való tartózkodással, illetve csak a megfelelő higiéniajú helyen (egyszer-használatos eszközökkel, gumikesztyűben dolgozó személyzet által) történő tetováltatással, testékszer behelyezéssel
- szexpartnerek gyakori váltogatásának kerülésével és nem monogám párkapcsolatban a szexuális együttlét során alkalmazott védekezéssel (gumi óvszer).

3.2. A májgyulladást okozó vírusok rövid áttekintése

Az elsődlegesen a májat megtámadó vírusokat „klasszikus” hepatitisz vírusoknak nevezzük, ebbe a csoportba soroljuk a hepatitisz A, B, C, D, E (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV) vírusokat. További, feltételezhetően, vagy bizonyítottan májgyulladást okozó vírusok felfedezésével a hepatitisz vírusok csoportja tovább bővült (Torque Teno vírus/TTV, GBV-C/HGV, TTV-szerű minivírus, SEN vírus) és minden bizonnyal még nem teljes.

A felsorolt vírusok csoportosítása kizárólag az általuk okozott, illetve feltételezetten okozott kórkép, és azok tüneteinek hasonlósága alapján történt, hiszen taxonómiailag különböző vírusszaládókba tartoznak, genetikailag sem egységesek: RNS és DNS tartalmú vírusok is előfordulnak közöttük, és terjedési módjuk is alapvetően eltérő. A fertőződés jellemzően kétféle módon történik:

- emésztőrendszeren át történő (enterális) terjedési mód, amely elsősorban a vírussal (HAV, HEV, TTV) fertőzött vízzel, étellel (pl. szennyvízzel kontaminálódott ivóvíz), szennyvízzel kapcsolatba került ételiszerekkel (pl. elégtelenül hőkezelt tengeri kagyló), de kontakt módon még a fertőzött vízzel megmosott, nem hőkezelt ételiszerekkel is (pl. gyümölcsök) átvihető
- az emésztőrendszert kikerülő (parenterális) terjedési mód, ebben az esetben a vírusok átvitele *horizontálisan* vérrel, vérkészítményekkel (vagy kontakt módon a vérrel szennyeződött közös használati eszközökkel), továbbá szexuális úton; míg *vertikálisan* anyáról magzatra/újszülöttre történhet.

Terjedési módjuk alapján egyes vírusok egyidejűleg többféle átviteli lehetőséggel is jellemezhetőek (pl. TTV, SENV – parenterális/enterális). Fontos megjegyezni, hogy az enterális terjedésű vírusok a fertőzés kezdeti szakában, a virémia időszakában vérrel és testnedvekkel is terjedhetnek.

1. táblázat. A klasszikus, és az újonnan felfedezett, feltehetően hepatitiszt okozó fontosabb vírusok jellemzőinek összefoglalása.

VÍRUS elnevezés	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV	HGV (GBV-C)	TTV/SENV
CSALÁD	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	még nincs családhoz sorolva	még nincs családhoz sorolva	<i>Flaviviridae</i>	javasolt: <i>Anelloviridae</i>
NEMZETSÉG	<i>Hepatitisvirus</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	<i>Hepacivirus</i>	<i>Deltavirus</i>	<i>Hepevirus</i>	még nincs nemzetséghez sorolva	<i>Anellovirus</i>
VIRION							
méret (Ø - nm)	27-32	42	40-60	36	27-34	?	30-50
genomjellemzők	lineáris, nem szegmentált, 7500 nt ss(+)-RNS,	cirkuláris, 3200 nt, részlegesen dsDNS,	lineáris, nem szegmentált, 9600 nt, ss(+)-RNS	cirkuláris, 1700 nt ss(-)-RNS	lineáris, nem szegmentált, 7176 nt ss(+)-RNS	lineáris, nem szegmentált, 9600 nt, ss(+)-RNS	cirkuláris, 3600-3800 nt ss(-)-DNS
burok	nincs	van	van	van	nincs	van	nincs
terjedési mód	E	PE	PE	PE	E	PE	PE/E
KÓRKÉP							
fulmináns hepatitisz	ritka	ritka	igen ritka	gyakori	terhesek	?	?
krónikus hepatitisz	nem	~5 %	~70-85 %	koinfekcióban ~5-10 % szuperinfekcióban ~90 %	nem	?	?
májsejtes karcinóma	nem	igen	igen	igen	nem	?	?
IMMUNIZÁCIÓS LEHETŐSÉGEK							
passzív	van	van	jelenleg nincs	jelenleg nincs	jelenleg nincs	jelenleg nincs	jelenleg nincs
aktív	elölt vírus	rekombináns HBsAg	jelenleg nincs	rekombináns HBsAg	jelenleg nincs	jelenleg nincs	jelenleg nincs

3.2.1. Enterálisan terjedő hepatitisz vírusok

A *Picornaviridae* család *Hepatitisvirus* nemzetségébe tartozó **hepatitisz A vírus (HAV)** 27-32 nm átmérőjű burok nélküli, kubikális szimmetriájú virion, amely lineáris, pozitív polaritású, egyszálú RNS genomot tartalmaz. A HAV-replikáció döntően a májsejtekben zajlik. A HAV fertőzés nem válik krónikussá virológiai értelemben, azaz szemben a hepatitisz B-, C-, D vírusokkal, tartósan fennálló vírusszaporodás és ürítés (perzisztencia) nem marad vissza. Lappangási ideje általában 10-50 nap, de ennél hosszabb is lehet. Az ellene termelődött IgG ellenanyagok többnyire az egész élet folyamán kimutathatók a fertőzést követően, és életreszóló védettséget adnak az újabb fertőzéssel szemben. A vírus világszerte elterjedt, a járványok főleg rossz higiéniai viszonyok között (csatornázás hiánya, zárt rendszerű ivóvíz-ellátás hiánya) alakulnak ki. Sporadikus esetek előfordulhatnak pl. szennyvízzel kontaminálódott tengervízben tenyésztett és nem kellően hőkezelt vagy nyers kagyló fogyasztását követően. A kagylók óránként 5-10 liter tengervíz szűrnek keresztül a testükön, így a vírus koncentrációja a kagyló testében az öt

körülvevő vízének akár 1000-szeresét is elérheti. A HAV-fertőzés elsősorban a gyermekek és fiatal felnőttek betegsége: a Magyarországon 2000-ben végzett seroepidemiológiai adatok alapján a vírussal szemben már csak az idősebb korosztály védett, azok, akik még természetes úton állták ki a fertőzést, az életszínvonal emelkedésével együtt a fiatalabb korosztályok – és ez az életkor egyre emelkedik – többnyire fogékonyak a fertőzésre. A csatornázott és zárt ivóvíz-hálózattal ellátott települések számának emelkedésével a fertőzésveszély ugyan egyre kisebb, ennek ellenére néha nagyobb járványok alakulnak ki pl. Istvándi 2006. [Epinfo, 2006] Nyírmihálydi 2007. [Epinfo, 2007], Csehország 2008. [Cástková, 2009] vagy Lettország 2008. [Perevoscikovs, 2009].

A **hepatitisz E vírus** (HEV) jelenleg taxonómiaiilag családba még nem besorolt (javaslat: Hepeviridae) *Hepevirus* nemzetségbe tartozik. A virion 27-34 nm átmérőjű, burok nélküli, pozitív egyszálú RNS-t tartalmazó vírus. Az emberi szervezetbe enterális úton jut be, elsősorban szennyezett vízzel, de egyre több bizonyíték van a zoonózis útján (állatról emberre) történő terjedési módra, mivel vadon élő és haszonállatok is hordozzák a vírust. A fertőzött állattal történő kontaktus (a fertőzött állat nyúzása, feldolgozása közben történő sérülés), a fertőzött állat húsának elfogyasztása (pl. vaddisznóhúsból készült szalámi) is okozhatnak megbetegedést. [Okamoto, 2007]. Lappangási ideje ~40 nap. A fertőzöttek kb. 50 %-a betegszik meg. A HEV által okozott betegség ugyan enyhe, általában kezelés nélkül, spontán gyógyul, és nem válik krónikussá, viszont terhes nők fertőzésekor a halálozási arány a 20 %-ot is elérheti. A HAV-fertőzéshez hasonlóan krónikus vírus-hordozás nem marad fenn, és feltehetően az immunitás is tartós. A HEV-fertőzés elsősorban Délkelet- és Közép-Ázsiában, Közép-Amerikában, valamint Észak-Afrikában tekinthető endémiásnak.

3.2.2. Parenterálisan terjedő hepatitisz vírusok

A **hepatitisz B vírus** (HBV) a *Hepadnaviridae* család *Orthohepadnavirus* nemzetségébe tartozik, különböző emlősállatok hepatitisz B vírusával együtt. A vírus igen ellenálló: beszáradva, szobahőmérsékleten minimálisan 1 hétig fertőzőképes marad. A HBV által okozott májgyulladás világszerte jelentős egészségügyi probléma [WHO, 2008]. A fertőzés elsődleges következményei (tünetmentes hordozó, akut-, krónikus-, fulmináns hepatitisz, primer HCC, májzsugor) évente milliós nagyságrendben okozzák a HBV-vel fertőződött emberek halálát. A vírus elsődlegesen vérrel, vércélesztékkel, anyáról gyermekre és szexuális úton terjed. A veszélyeztetettek közé tartoznak az invazív beavatkozást végző egészségügyi egységek dolgozói (szülészet, sebészet, fogászat, stb.), intravénás kábítószer-használók, a gyakran vérátömlesztést kapók (politranszfundáltak), művese kezelték (dializáltak), HBV pozitív anyák gyermekei.

A *Flaviviridae* család *Hepacivirus* nemzetségébe tartozó **hepatitisz C vírus** (HCV) ~40-60 nm átmérőjű, pozitív polaritású, egyszálú RNS-genomot tartalmaz. Lappangási ideje feltűnően hosszú,

elérheti a 60-120 napot is. A májsejtekben való szaporodás következménye az akut hepatitisz, amely klinikailag lehet hasonló a HAV és HBV okozta kórképhez, sok esetben (~90-95 %-ban) azonban a primer fertőzés teljesen tünet nélkül, szubklinikus formában zajlik. Hónapokkal, évekkel az elsődleges fertőzést követően alakul ki a rossz prognózisú, krónikus, perzisztens fertőzés, melyek a HBV fertőzéshez hasonló következményekkel járhat (májzsugor, májrák). A vírus a tumoros májsejtekből rendszerint kimutatható. A HCC betegek 13-76 %-ának anti-HCV ellenanyaga van. A vírus elsődlegesen vérrel, vércsízítményekkel, ritkán szexuális úton terjed. A veszélyeztetettek közé tartoznak az invazív beavatkozást végző egészségügyi egységek dolgozói (szülészet, sebészet, fogászat, stb.), intravénás kábítószer-használók, politranszfundáltak, dializáltak, HCV pozitív anyák gyermekei. Védőoltás nincsen ellene, a donorok és a vér illetve vércsízítmények szűrésével jelentősen csökkenthető a transfúzió útján bekövetkező fertőzés veszélye. Terápiaként alkalmazott interferon-, és antivirális kezelés sikeressége a vírus kezdeti koncentrációján és genotípusán múlhat. A kezelés csak az esetek 50-60 %-ában hatásos, és sajnos ez sem jelenti minden esetben a teljes vírus-eliminációt, csak a kópiaszám átmeneti csökkenését.

A **hepatitisz D vírus** (HDV, Delta ágens) a besorolatlan *Deltavirus* nemzetség egyetlen tagja. A vírus csak az olyan májsejtekben képes szaporodni, amelyek egyidejűleg HBsAg-t expresszálnak. Inkubációs ideje 2-12 hét. A kórlefordulás szempontjából lényeges különbséget jelent, hogy egy már fennálló HBV fertőzés talaján következik-e be a HDV-fertőzés (szuperinfekció), vagy egyszerre fertőz a két vírus (koinfekció). Az utóbbi általában jobb prognózisú. A szuperinfekció akut lefordulása esetén gyakori a fulmináns hepatitisz. A vírus világszerte elterjedt, de leggyakoribb a mediterrán térségben és egyes trópusi országokban.

A *Flaviviridae* család még egyik nemzetségéhez sem sorolt **GB vírus C** vagy **hepatitisz G vírus** (GBV-C/HGV) pozitív egyszálú RNS-vírus. Felfedezése – egymástól függetlenül – két kutatócsoport által történt 1995-ben [Linnen, 1996; Simons, 1995]. Az elnevezések különbözősége abból ered, hogy az egyik kutatócsoport annak betegnek monogramjával jelölte a kórokozót (GB), akinek mintájából a vírust kimutatták, míg a másik csoport hepatitisz G-nek nevezte el a vírust, mivel egy vérátömlesztést követően kialakult (poszttranszfúziós) májgyulladásban szenvedő beteg mintájában találták meg. Ma is használják mindkét elnevezést, bár újabb kutatások bizonyították, hogy a vírus – bár ott is kimutatható – elsődlegesen nem a májban szaporodik. A vírus előfordulása – vérrel, vércsízítménnyel, vagy szexuális úton történő átviteli módja miatt – magas az intravénás drogosok, promiszkuatív szexuális életmódúak (homoszexuálisok), vagy alapbetegségük révén gyakran vérátömlesztést, vércsízítményt kapók, dializáltak között. Az utóbbi időben egyre több eredmény támasztja alá, hogy a GBV-C/HGV koinfekció kedvezően befolyásolja a HIV pozitív betegek állapotát [Hattori, 2007; Stapleton, 2004; Xiang 2008].

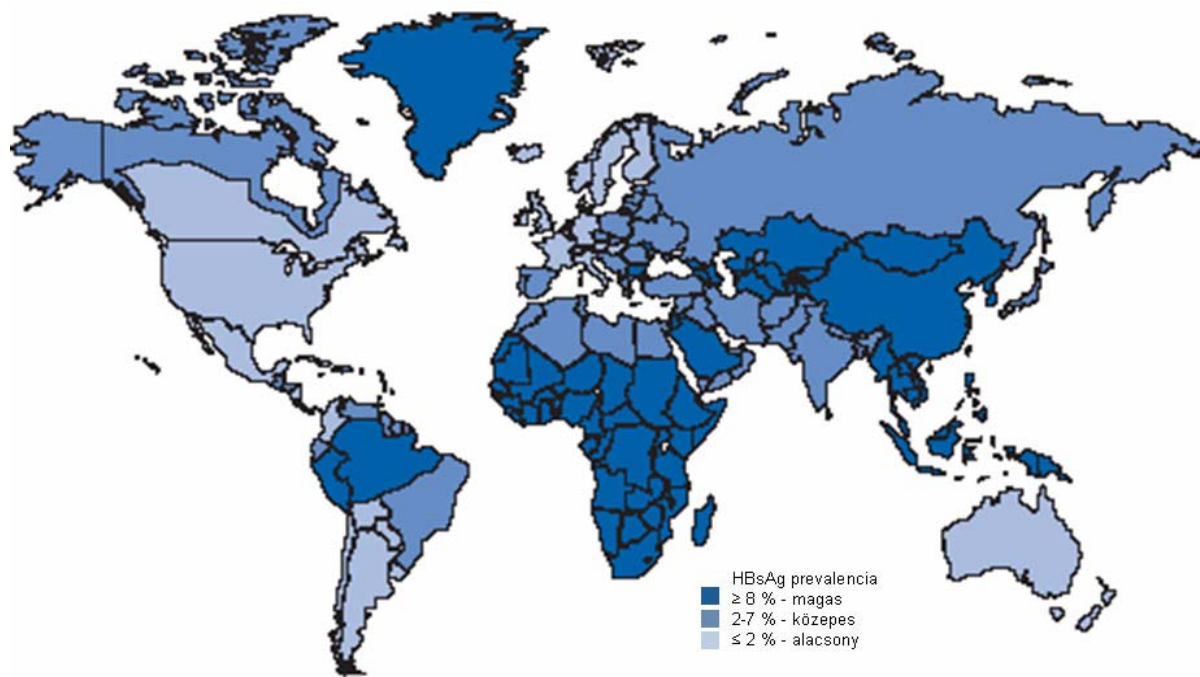
A **TT vírus** 1997-ben mutatták ki, szintén ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő beteg véréből, elnevezése (TT) eleinte a beteg nevének kezdőbetűiből eredt. A vírust először a parvovírusok közé, jelenleg pedig az egyenlőre még csak javasolt Anelloviridae család *Anellovirus* nemzetségébe sorolnák be. A TTV változékony, számos genotípust különítettek el, melyeket genocsoportokba soroltak [Peng, 2002]. Terjedéséről bebizonyosodott, hogy nem csak parenterálisan, hanem enterálisan is terjed [Okamoto, 1998]. A TTV fertőzés egyedülálló a vírusok okozta enterális fertőzések között abból a szempontból, hogy évekig is fennállhat. Bár ismeretlen eredetű hepatitiszes betegekben gyakrabban kimutatható a TT vírus, mint más egyénekben, mégis bebizonyosodott, hogy a legtöbb esetben nem a TT vírus az oka a májgyulladásnak [Sugiyama, 2000]. Az 1-es genotípusról viszont feltételezik, hogy több esetben poszttranszfúziós hepatitiszt okozott. Egyes esetekben a szervezet eliminálta a vírust, más esetekben hosszú éveken át ki lehetett mutatni a vírus DNS-ét a beteg szervezetében [Okamoto, 1999].

A 2000-ben felfedezett *TTV szerű minivírus* (TTMV) és *SEN vírusok* (SENV-D és H) szekvencia homológiája a TTV-vel a legnagyobb, de nem egyértelmű, hogy új vírusról, vagy a TT vírus egyes genotípusairól van-e szó. Patogenitásuk máig nem tisztázott.

3.3. A hepatitisz B vírus (HBV)

3.3.1. Epidemiológiai adatok

A vírus világszerte elterjedt, két milliárdra tehető azok száma, akik fertőződtek a vírussal, és 350 millió körülire becsülik a krónikus fertőzöttek (tünetes vagy tünetmentes vírushordozók) számát. Mintegy 3,5 milliárd ember él HBV tekintetében endémiás területeken (1. ábra), főként a fejlődő országokban. Ezen országokban évente mintegy 120 millió újszülött van kitéve annak, hogy HBV hordozóvá válják. Hepatitisz B vírusfertőzés következtében világszerte évente körülbelül 1-1,5 millió ember hal meg. A krónikus vírushordozók mintegy 25-30 %-a gyermekkorban fertőződik, minden ötödik májkárosodásban, minden huszadik pedig májrák következtében hal meg. Az összes HCC esetek több, mint felében a HBV szerepet játszhat a kiváltó okok között. Ez az ismert, rákot potenciálisan kiváltó tényezők között a – dohányzást követően – a második vezető halálok.



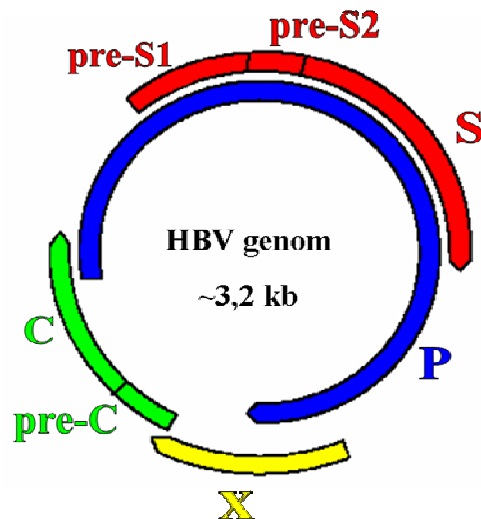
1. ábra. A népesség HBsAg pozitívitasának földrajzi megoszlása. [CDC, 2006]

Hazánkban a HBV hordozás az átlagpopulációban 2 % alatti [Takács, 2009]. Rizikócsoportok az intravénás droghasználók, egészségügyi dolgozók, fertőzöttek rokonai (hordozó anyák újszülöttjei, hordozó egyén házastársa), promiskuitív életmódot folytatók, dializáltak, politranszfundáltak, nem kellő higiéniaival tetováltak, testékszert (body-piercing) viselők. A terjesztésben kizárólagos a vér, illetve a testnedvek (vizelet, hüvelyváladék, sperma) szerepe. Ezekben a vírus koncentrációja rendkívül magas lehet, így az átvitel már ezek minimális mennyiségével is lehetséges. A vérátömlesztéssel és a vérkészítményekkel történő infekció veszélye a fejlett országokban a donorok szűrővizsgálatainak bevezetésével minimálisra csökkent. A vírus egyéb módon történő továbbvitelének megakadályozása leghatékonyabban a fiatalok szexuálisan aktív életszakaszának elérése előtt elvégzett immunizálással oldható meg. A fejlődő országokban a vírus horizontálisan máig is elsősorban szexuális módon, vertikálisan pedig fertőzött anyáról gyermekére terjed. Nem ismeretlenek a szakirodalomban a nozokomiális járványok sem: számos invazív beavatkozást követően (vese-dialízis) [Kondili, 2006], (szívizom biopszia) [Rosenheim, 2006] vagy kórházi osztályon történő fekvőbeteg kezelés után (pl. gyermek-onkológia) [Dumpis, 2003] kialakuló járványról tudunk.

3.3.2. A kórokozó

A vírus a *Hepadnaviridae* családon belül az *Orthohepadnavirus* nemzetségbe tartozik, különböző emlősállatok és madarak (mormota, mókusfélék, kacs, gém, stb.) hepatitisz B vírusával együtt. A HBV 42 nm átmérőjű, kubikális szimmetriájú képlet. A komplett viriont Dane-partikulának is nevezik. A vírus rendelkezik reverz transzkriptáz (RNS-függő DNS polimeráz)

enzimmel. A virion felszínét az ún. felületi („surface”) antigén (HBsAg), míg a vírus kapszidját a fehérjetermészetű „core” antigén (HBcAg) alkotja. A kapszid belsejében található a cirkuláris, részlegesen duplaszálú, ~3200 bázispárt tartalmazó DNS-genom. Ennek jellegzetessége, hogy egy teljes negatív szálát és egy rövidebb pozitív szálát tartalmaz. A genomon négy, részben egymást átfedő leolvasási keret („open reading frame” vagy ORF) különíthető el, melyek hét proteint kódolnak (preS1/preS2/S antigének, „C”, „e”, „X” antigén, „P” reverz transzkriptáz aktivitással bíró polimeráz enzim).



2. ábra. A hepatitisz B vírus genomjának leolvasási keretei.

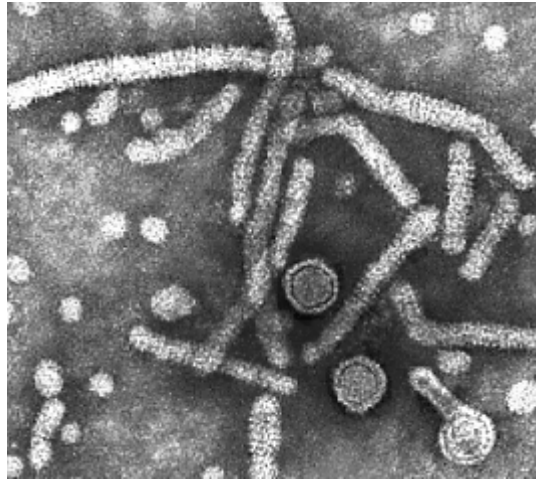
Vírusantigének:

HBs (felületi, „surface”) antigén:

E fehérjéknek elsősorban a fertőzés első lépésében, a májsejt felszíni receptora és a virion közötti kötődésben van fontos szerepük. Az akut HBV infekció első, szerológiai módszerekkel kimutatható fehérjéje, mely a fertőzés 6. hetétől 3 hónapig mutatható ki. Az akut hepatitiszek 95 %-ában jelen van. A fertőzéstől számított 6 hónapon túli jelenléte (perzisztálása) krónikus HBV infekció kialakulását jelenti. A HBsAg szerokonverziója – mely alatt az antigén eltűnését és az anti-HBs ellenanyag megjelenését értjük – a vírusszaporodás megszűnésének és a betegség gyógyulásának a jele. Az anti-HBs ellenanyag életfogytig kimutatható szerológiai mutatója az átvészelt fertőzésnek. Sikeres immunizálást követően is kimutatható – ez esetben azonban más fehérjék nem mutathatók ki.

A „preS1-preS2-S” gén kolineárisan kódol egy 226 aminosavból álló „large” (L), egy 108 aminosav hosszúságú „middle” (M) és egy 55 aminosav hosszúságú „small” (S) proteint. Ezek önmagunkban nem fertőző komponensek. A májsejtek citoplazmájában nagy feleslegben termelődnek, innen kerülnek a beteg vérébe. Kimutatható vérben, nyirokban, anyatejben,

spermában, hüvelyváladékban, de nyálban, könnyben is. Elektronmikroszkóppal háromféle formában mutatható ki (3. ábra): a komplett virion burokfehérjéjeként valamint két kisebb, 18-22 nm átmérőjű gömb és tubuláris részecskeként.



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

HBc (kapszid, „core”) antigén:

Csak a májsejtekben mutatható ki. A fertőzött sejt felületére kerülve celluláris immunválaszt indukál annak elpusztítására. A vele szemben megjelenő anti-HBc IgM ellenanyag biztos jele a fertőzésnek (akut fertőzés), ám hiánya nem jelenti vírusreplikáció megszűnését (krónikus fertőzés). Az anti-HBc IgM akut hepatitiszben a HBsAg után megjelenő első ellenanyag. Az anti-HBc IgG ellenanyag – mind gyógyult májgyulladás után, mind pedig idült betegségben – életfogytig kimutatható.

HBe antigén:

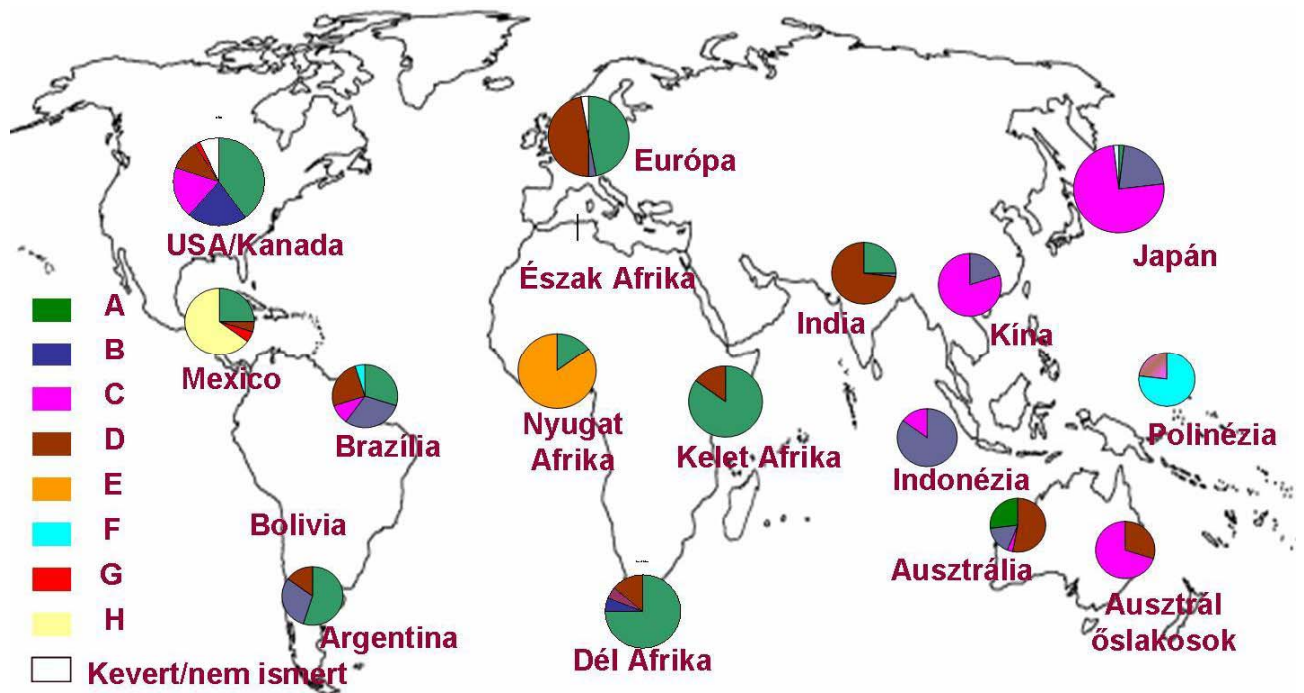
A „precore” és a „core” gén transzlációjával egy polipeptid keletkezik, melyből proteolitikus hasítás útján egy oldékony antigénvariáns, a HBeAg protein keletkezik. Extracellulárisan cirkulál és ezért a szerológiai diagnosztikában a HBsAg mellett szintén könnyen mérhető marker. Kimutathatósága akut és krónikus hepatitiszben egyaránt fertőzőképességet és vírusreplikációt jelent. A HBsAg hordozókban a HBeAg negativitás/anti-HBe pozitivitás jó prognosztikai jel. Ez alól kivétel, ha „pre-core mutáns” vírusa van a betegnek, ebben az esetben ugyanis a fehérjét kódoló génen előforduló pontmutáció következtében ez a fehérje nem jelenik meg.

HBx antigén:

Az X-génről átíródó HBxAg protein egy potenciális transzaktivátor, melynek feltételezhetően a karcinogenezisben lehet szerepe. A hepatocelluláris karcinoma sejtjeiben az X-gént integrálódva megtalálták a gazdasejt kromoszómájában [Anzola, 2004]. A gazdasejt szabályozásának megváltoztatásában protein-protein kapcsolat játszik szerepet [M. Brojnás, 2005].

3.3.3. HBV: genotípusok – szerotípusok

Genotípusok: a HBV genotípusok (jelölésük: A–I) jellegzetes földrajzi eloszlást mutatnak [Kramvis, 2005] (4. ábra). A genotípusok azonosítása folyamatos, a legutóbb leírt, 9. (I) genotípust 2008-ban közölték [Tran, 2008; Olinger, 2008] A genotípus-csoportokon belül több, mint 20 szubgenotípust különböztetünk meg. A genotípusokat a teljes genomszekvencia minimum 8 %-os, vagy a felületi fehérjét kódoló régió minimum 4 %-os eltérése alapján különítik el.



4. ábra. A genotípusok földrajzi eloszlása. (A legutóbb azonosított I genotípust –amelyet ázsiai vírushordozóknál írtak le- még nem szerepel az ábrán.)

Az egyes genotípusok által okozott megbetegedések között klinikailag eltérések tapasztalhatók [Mayerat, 1999; Kao, 2000; Orito, 2001; Chu, 2002b]: összehasonlítva az egyes genotípusokat, úgy találták, hogy

- a „D” genotípus okozta fertőzés krónikussá válása gyakoribb, mint az „A” esetében [Girlanda, 2004]
- a „D” genotípust kisebb arányban találták HCC-ban szenvedő betegek HBV fertőzésének hátterében, mint a „C” genotípust [Duong, 2004]
- a „C” genotípust krónikusan hordozóknál magasabb ALAT/ALT szint volt mérhető, mint a szintén krónikus, de „A” genotípust hordozóknál [Vivekanandan, 2004]
- a „B” és „C” genotípusokat összehasonlítva a „B” esetében hamarabb alakult ki az „e” antigén elleni szerokonverzió, valamint alacsonyabb az előfordulása a májzsugorban szenvedőkben [Chu, 2002].

Szerotípusok: a szubtípus és a szerotípus szakkifejezéseket egymással felcserélhetően használták a vírus felületi, HBsAg antigénjének immunológiailag különbözőként azonosított formái (determinánsai) leírására. A molekuláris módszerek térhódítása következtében bevezetésre került *genotípus*, *szubgenotípus* elnevezésekkel való összezavarodás elkerülése, illetve az összhang megteremtése végett a terminológiában a HBsAg antigén determinánsai definiálásának szinonimájaként a *szubtípus* kifejezés helyett a „*szerotípus*” vagy „*szerológiai szubtípus*” kifejezéseket ajánlatos használni.

A HBsAg immunológiailag nem egységes antigén. Kezdetben a HBsAg heterogenitására alapozva 4 szerológiai szubtípust azonosítottak: adw, adr, ayw és ayr. A közös antigén-determinánst „a” betűvel, az egymást kölcsönösen kizáró antigén determinánsokat pedig „d”/„y”, illetve „w”/„r” betűkkel jelöljük. Az „a” antigén determinánsnak 2 allélje van, amit a Thr [T] vagy az Ile [I] határoz meg a 126-os aminosavpozícióban. Később megkülönböztettek még egy „q”-val jelölt aldeterminánst is. Jelenleg 9 szerotípust különböztetnek meg: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adwq, adr, adrq-. Az altípus-megoszlást elsősorban egy-egy földrajzi helyre tekintik jellemzőnek, azonban ez nem olyan jellegzetes, mint a genotípusoknál, ezért molekuláris epidemiológiai kutatásokhoz inkább a molekuláris módszereken alapuló genotípus-meghatározás használandó.

3.3.4. Replikációs mechanizmus

Miután a vírus bejutott a májsejtbe, a HBV genetikai örökítőanyaga a sejtmagba kerül, és a részlegesen kettősszalú DNS molekula kiegészül. A DNS-ről a sejt saját polimerázai mRNS-másolatot és RNS-pregenomként funkcionáló mRNS-t készítenek. A sejt citoplazmájában termelődnek meg a vírus nem strukturális (P, X fehérjék) és strukturális (C, felületi L, M, S) fehérjéi. A pregenom, a vírus-eredetű DNS-polimeráz, valamint véletlenszerű mennyiségű nukleotid-trifoszfátok egy újonnan készült kapszidba csomagolódnak. A kapszidba épülés során reverz transzkripcióval egy új, negatív polaritású DNS-szál készül a pregenomról. A pregenom enzimatikusan lebontódik, majd a polimeráz hozzákezd egy új, pozitív polaritású DNS-szál felépítéséhez, amelynek mintájául a negatív szálát használja. Amint elfogynak a felhasználható nukleotidok, a pozitív szál szintézise azonnal leáll, ezért annak hossza viriononként változó. A vírus egy intracelluláris membránon (endoplazmatikus retikulum - ER) történő áthaladással (bimbózás) veszi fel a lipidtartalmú burkát, melybe előzőleg beékelődtek a felületi (L, M, S) fehérjék. Ezt követően a komplett virion elhagyja a májsejtet.

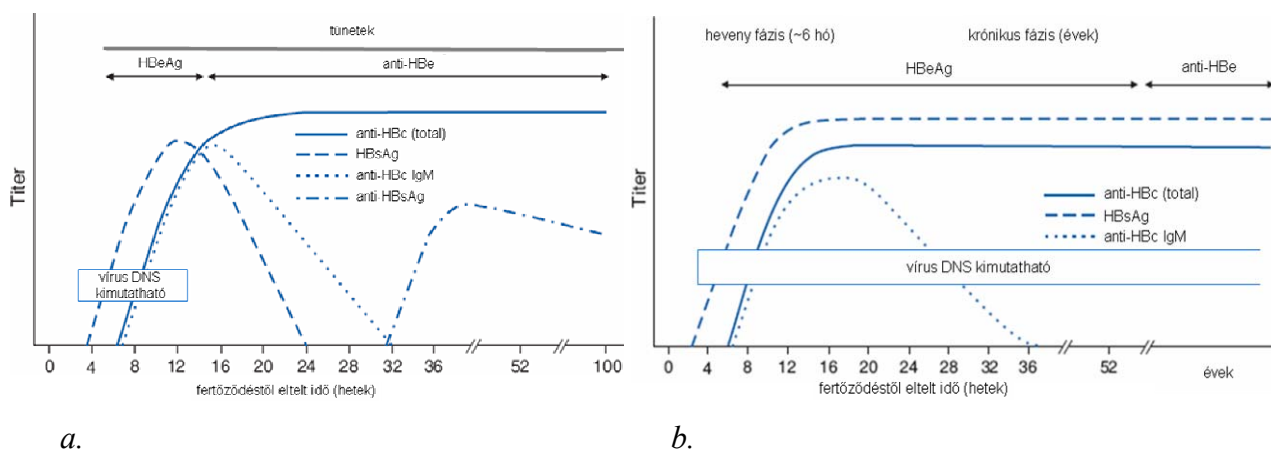
3.3.5. A HBV klinikai jelentősége, laboratóriumi diagnosztika

Az *akut B-hepatitisz* klinikai képe nem különbözik a többi vírushepatitisztől. A lappangási idő átlag 75 nap (30–140 nap). A korai, nem specifikus tünetek: láz, (sok)ízületi gyulladás, immunpatológiai eredetű foltos-göbös bőrkiütés gyakoriak. A sárgaság (icterus) megjelenésével a

rossz közérzet, étvágytalanság inkább rosszabbodik. A sárgaság 2-3 hétig, de néha hónapokig eltarthat. Az étvágy és a közérzet javulása már a lábadozás kezdetét jelenti. Az icterusos szakaszban a fogyás 2–10 kg is lehet. A fáradékonyság a legtovább tartó tünet. A vírus nem citopatogén, emiatt az aktívan folyó vírustermelés ellenére hiányozhatnak, vagy csak igen enyhe formában jelentkeznek a fertőzés jellegzetes klinikai tünetei. Ez az esetek kb. 30 %-ában fordul elő (*szubklinikus forma*), ennek következtében a fertőződött személy sokszor nem is tud a fertőzöttsége tényéről. A májsejtek pusztulása a T-sejtes immunválasz következménye. A vírus – neutralizáló ellenanyag termelődést kiváltó – felületi fehérjéi, MHC-I molekulákkal együtt megjelennek a sejt felszínén, és aktiválják a citotoxikus (Tc) sejteket. Akut megbetegedésnél ez a folyamat a vírus eliminációját (szervezetből történő kiürülését) és az ezzel szinte egyidejűleg meginduló májsejt-tömeg helyreállítását eredményezi [Ganem, 2004].

A felnőttkorban szerzett akut B-hepatitisz mintegy 5–10 %-ban fordul át krónikussá, az újszülöttkori friss fertőzéseknek azonban több mint 90 %-a válik idültté, ám rendszerint nem jár együtt a májgyulladás klinikai tüneteivel (*tünetmentes vírushordozó*). A *krónikus B-hepatitisz* diagnózisa akkor mondható ki, ha a májgyulladásra utaló biokémiai laborértékek és a vírusreplikációt jelző virológiai markerek 6 hónapnál tovább mutathatók ki (5. ábra). A diagnózishoz – a mediterrán területeken, de hazánkban is előforduló HBeAg negativitás miatt – a víruszaporodás igazolására a HBV DNS kimutatása (PCR) is szükségessé válhat. Az évtizedekig fennálló, idült HBV fertőzés során a folyamatosan pusztuló májparenchima helyén hegesedés indul meg, amely a májlebenyekék struktúráját fokozatosan átrendezi, és kialakul a májsugor (cirrózis). A már zsugorodott, cirrotikus májban a májrák kialakulásának gyakorisága 6-10 %. Gyakori (~16 %) a májon kívüli kórfolyamat (*extrahepatikus manifesztáció*) is, amelyet elsősorban a folyamatos antigén-inger (állandó HBsAg termelés) tart fenn, és amely az antigén-antitest komplex kiváltotta immunpatológias folyamatok következménye. Ezek elsősorban vesekárosodás (glomerulonefritisz), ízületi fájdalom/gyulladás (arthralgia, arthritisz), izomfájdalom (myalgia) vagy különféle bőrelváltozások. Ezen folyamatok azonban mind az akut, mind idült májgyulladás esetén megjelenhetnek [Cacoub, 2005].

A gyors lefolyású, rossz prognózisú *fulmináns hepatitisz* kialakulása HBV fertőzésben ritka (~1 %), kezelés nélkül gyakran végzetes kimenetelű, és még komplex intenzív kezelés mellett is ~80 %-os a halálozási arány.



5. ábra. A májgyulladás virológiai diagnosztikájában használt markerek és azok értelmezése.
(a. - heveny, b. - idült májgyulladásra jellemző laboratóriumi eredmények)

3.3.6. Immunizálási lehetőségek HBV fertőzés kivédésére

Aktív immunizálás hepatitisz B ellen: az aktív védőoltásban a vírus felszíni antigénje (HBsAg) kerül beadásra, az ellene termelődő ellenanyagok biztosítják a védettséget. Eleinte (a '80-as években) a protektív ellenanyagot indukáló antigént (HBsAg) tünetmentes hordozók plazmájából – plazmaferezis útján – állították elő. A HBsAg biztonságos előállítását mára géntechnológiai eljárások révén sikerült megoldani: a *S. cerevisiae*-ben – nagyüzemi körülmények között – termeltetett, tisztított vírus-antigén mind fiziko-kémiai, mind immunológiai vizsgálatokban, valamint a korábbi oltóanyaggal történt összehasonlításban is alkalmasnak bizonyult vakcinaként való felhasználásra.

Az aktív immunizálás 3 oltásból áll, ennek rendje általában 0., 1., és 6. hó (gyorsított eljárásban 0., 1., és 2. hó, ez esetben azonban a 12. hónapban újabb, emlékeztető adag szükséges). Jelenlegi ismereteink alapján a vakcinációs védettség időtartamát legalább 10-15 évre lehet számítani, de csak az oltott személyek folyamatos szerológiai monitorozása alapján lehet majd megmondani, hogy szükség lesz-e – és ha igen, mikor – emlékeztető oltásra. A védettség szintjét a 10 IU/l anti-HBs ellenanyag-szintben határozták meg, e szint felett az egyén védettnek tekinthető.

Az oltandók körét több tényező határozza meg, leginkább az adott populációban vagy területre jellemző HBsAg hordozás aránya, valamint az egyén veszélyeztetettségének mérve. A hazai védőoltási rendben a hepatitisz B vakcináció kötelező, illetve ajánlott oltásként szerepel. **Kötelező** a HBsAg hordozó anyák újszülöttjeinek vakcinálása, akiket 12 órán belül – a szülés körüli sérülések, illetve azok útján történő fertőződés ellen – hiperimmun gamma-globulin (HBIG) adásával passzív védelemben is kell részesíteni. Aktív immunizálást kell kezdeni az esetben is, ha az anya HBV fertőzöttsége nem tisztázott. A védettséget az 1 és 6 hónapos korban beadott 2. és 3. oltás teszi teljessé. 1998-ban lett kötelező – az aktív szexuális élet megkezdése előtt, a szexuális úton történő

fertőződés kivédésére – a serdülők (általában az általános iskolák 8. osztályos tanulóinak) oltása [Budai, 1999; Csohán, 2008]. A jelenlegi tapasztalatok alapján szükségessé vált ennek az oltásnak az időpontját még korábbi életkorra áthelyezni. Oltani kell a közép- és felsőfokú, egészségügyi iskolák első éves hallgatóit is. **Ajánlott** és ingyenes az oltás a foglalkozásuknál fogva különösen veszélyeztetettek (egészségügyiek, mentők, rendőrök, tűzoltók) számára. Veszélyeztetettek az epidemiológiai körülményeik miatt veszélyben lévők is: vírushordozókkal szoros együttélésben élő kontaktok, dializált betegek, politranszfundáltak, vérkészítményt gyakran kapók, pl. hemofiliások, stb. Ajánlott az oltás továbbá a magas fertőzöttségű (endémiás) területre, fejlődő országokba utazók, és ott huzamosabb időt eltöltők számára, valamint azoknak is, életvezetésük miatt különösen veszélyeztetettek.

Passzív immunizálás HBV fertőzés ellen: a passzív immunizálásra szolgáló HBIG készítményt magas ellenanyagtartalmú savókból (pl. aktív immunizálásban részesült személyek szérumból) állítják elő. A passzív védelem igénye akkor merül fel, ha immunitással nem rendelkező egyén vérrrel szennyezett eszközzel sérül [Mihály, 1995]. Egy tanulmány alapján, a sérülések következtében – amennyiben a kontaktszemély szerológiai státusza HBsAg és HBeAg pozitív volt a baleset időpontjában – 22-31 %-ban klinikailag igazolható májgyulladás, 37-62 %-ban csak szerológiailag igazolható fertőzés lépett fel. Ugyanez az arány 1-6 % és 23-37 % volt, ha a kontaktszemély HBsAg pozitív, de HBeAg negatív volt [CDC - MMWR, 2001].

3.3.7. A kezelés lehetőségei

A vírusos májgyulladás – így a B vírus által okozott hepatitisz – terápiája antivirális és interferon kezeléssel alapul. Az érvényes kezelési útmutatót és előírásokat a Gasztroenterológiai és Infektológiai Szakmai Kollégiumok által megbízott szakmai bizottság állítja össze. A kezelésben meghatározó tényezők a beteg/tünetmentes hordozó klinikai laboratóriumi és virológiai eredményei, amelyeket a kezelés során folyamatosan monitoroznak, és a kezelést e változások tükrében folytatják [Szakmai kollégiumi ajánlás, 2008]

Interferon alfa (IFN-a): A krónikus B-hepatitisz kezelésében ma az alfa-interferonoké (pegilált/standard) a vezető szerep. A hatékony kezelés során a vírusmentesség a fertőzött májsejtek pusztulása árán következik be, ezért májzsugor esetén, amikor a működőképes májsejttömeg egyébként is kicsi, súlyos májelégtelenség léphet fel. A kezelés hatásosságát nagymértékben befolyásolja a terápiát megelőző szérumból a vírus titer mértéke.

Nukleozidanalógok (pl. Lamivudin, Adefovir dipivoxil, Entecavir): A terápia célja a HBV szaporodás gátlása, a vírus nukleinsav mennyiség alacsony szinten tartása. A DNS szintézisét leállítják, oly módon, hogy a sejtbe történő bejutás és foszforilálódás után, beépülnek és terminálják a keletkező új DNS-láncot. Májátültetés esetén kivédheti az új szerv újrafertőződését, és a gyors

májzsugor kialakulását. A hosszú ideig tartó lamivudin kezelés során lamivudin rezisztencia (YMDD mutáns) alakulhat ki, ami a betegség további progressziójához vezethet.

Kombinált terápiában (nukleozid analógok + interferon), szemben a monoterápiával, hatásosabb eredmény érhető el.

3.3.8. HBV vírusvariánsok / mutáns vírusok

Más vírusokhoz hasonlóan külső (antivirális terápia, immunizáció) és belső (gazdaszervezet immunválasza) szelekciós nyomásra a HBV DNS-ében is történhet(nek) mutáció(k) [Locarnini, 2003]. A mutáció, típusától és helyétől függően lehet a gén funkciójában változást nem okozó, ún. néma („silent”) pontmutáció, de jelentkezhet a keletkező fehérje szekvenciájában, eredetitől eltérő aminosav beépülését, ezáltal egy lehetségesen megváltozott/hibás funkciójú fehérjét eredményező változásként (misszensz mutáció), vagy „stop” kodont kódoló tripletként a fehérje kifejeződését megakadályozó (nonszensz) mutációként. A mutációk komoly következményekkel járhatnak: az aminosav csere következtében megváltozhat az expresszálandó „új fehérje” antigénszerkezete, amelynek hatása lehet a laboratóriumi diagnosztikára, terápiára vagy az immunizálás hatására. Ha az új triplet „stop”-kodonnak felel meg, az csonka, gyakran funkcióképtelen fehérje képződéséhez – és így a terápiára adott válasz és a betegség kimenetelének megváltozásához – vezethet.

Kijelenthető, hogy a kutatások alapján a vírusmutánsok előfordulási gyakorisága minden bizonnyal magasabb, mint ahogyan azt eddig feltételezték. Szakértők egy csoportja szükségesnek látná egy központi adatbázis létrehozását, és egy olyan „nemzetközi vagy központi referencia laboratórium” üzemeltetését, amely az egyes vérmintákat egyidejűleg több kereskedelmi forgalomban levő szerológiai kittel párhuzamosan vizsgálja, és ezzel nagyobb valószínűséggel szűri ki a diagnosztikai kitek hiányosságaiából adódó, eredmények közötti eltéréseket [Gerlich, 2004].

A HBV genomja viszonylag stabilnak mondható, ám, speciális – RNS közbeeső lépést tartalmazó – replikációs ciklusa miatt, magasabb mutációs ráta jellemzi ($\sim 10^{-4} - 10^{-5}$ /nt/év), mint általában a DNS vírusokat ($\sim 10^{-6}$ /nt/év). A vírus átfedő és kolineárisan kódolt leolvasási keretei miatt egyetlen pontmutáció is több gén megváltozását, és a róla készülő fehérje funkciójának károsodását eredményezheti.

3.3.8.1. Pre-core/core gén mutáns

A „core” promóter vagy a „pre-core” régióban megjelenő mutációk a HBeAg mennyiségének csökkenését vagy teljes eltűnését okozzák. Leggyakrabban a „pre-core” régió 1896-os nukleotidpozíciójában előforduló guanin-adenozin szubsztitúció (a triptofánt kódoló TGG kodonból keletkező TAG - „stop” szignál) blokkolja a HBeAg szintézist. Ez a mutáció a világon mindenütt előfordul, de gyakorisága különböző. Legnagyobb számban, 40-80 %-os előfordulással a D genotípusú vírust hordozókban, tehát elsősorban a mediterrán, dél-európai területeken található

meg. Az „e” antigén hiányának egyik következménye lehet a szervezet immunválaszának megváltozása [Brunetto, 1991]. Mivel ezt a vírusvariánst hordozó betegek a vírusreplikáció idején is HBeAg negatívak, náluk a betegség lefolyását csak a vírus DNS és vírusszerológiai markerek (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc IgM) monitorozásával lehet nyomonkövetni [Barbera, 1994].

3.3.8.2. HBV polimeráz variánsok

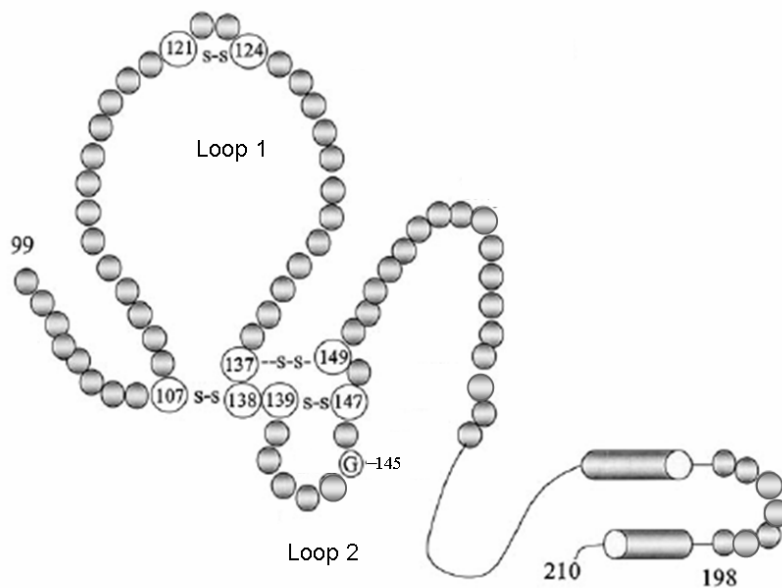
A reverz transzkriptáz aktivitású HBV DNS polimeráz a vírus szaporodásának egyik kulcsfontosságú enzime. Az enzimet kódoló régió a krónikus B hepatitisz terápiájában elsőként alkalmazott nukleozid analóg, a *Lamivudin* támadáspontja. Az YMDD (tirozin–metionin–aszparaginsav–aszparaginsav) aminosav-mintázatot kódoló génszakasz a vírusellenes kezelés következtében változik meg (rövid jelöléssel: M204V/I). A Lamivudin mellett további antivirális szerek alkalmazását követően is megfigyeltek rezisztencia kialakulását: pl. *Adefovir dipivoxil* (N236T vagy A181V/T), *Entecavir* (S202G/I, T184G vagy M250V). A vírusellenes kezelés nem közvetlenül váltja ki a mutációt, hanem mint szelektációs nyomás hat: csak az ezt túlélő vírusok (megváltozott genetikai állományú vírusvariánsok) képesek – a kezelés ellenére is – a további replikációra [Nijhuis, 2009].

Mivel a polimerázt kódoló gén részben átfed a felületi fehérjét kódoló génszakasszal, az itt előforduló aminosav-sorrendet befolyásoló mutációk kihatással lehetnek a felületi fehérje antigén-szerkezetére is [Oon, 1999; Lok, 2000; Torresi, 2002].

3.3.8.3. PreS/S gén mutáns vírusok

A HBsAg „a” determinánsát kódoló génen belüli (vagy az ezzel átfedő polimeráz génen található) mutáció(k) a vírus felületi fehérjéjének, azaz a neutralizáló ellenanyagok kötődési helyének megváltozásához, ezzel a preventív vakcináció biztonságosságának és hatékonyságának, csökkenéséhez vezethet. Oka, hogy az oltóanyagban található HBsAg ellen termelődött ellenanyag nem ismeri fel a mutáció következtében eltérő szerkezetű HBsAg fehérjét. Ezeket a vírusvariánsokat „vakcinaszökevény” (vaccine-escape) mutánsoknak nevezzük. Amennyiben oltott személy ilyen vírussal „találkozik”, az oltás következtében kialakult védettsége ellenére fertőződhet hepatitisz B vírussal. Félő, hogy az „vakcinaszökevény” vírusvariánsok egyre nagyobb teret hódítanak és előbb-utóbb domináns törzsekké válhatnak. Erre, matematikai modellszámítások alapján, a populáció tömeges immunizációjának megkezdését követő 1-2 évtizeden belül számítani lehet [Wilson, 2000].

A HBsAg epitópok nagy mértékű, térszerkezeti változását leggyakrabban az „a” determináns 100-200. aminosav-pozíciói közé eső fehérjeszekvencián fordul elő. A legjelentősebb változásokat a fehérje 137-145. aminosav-pozíciók közötti, 2. huroknak („loop 2”) nevezett ciszteinben gazdag területére eső aminosav-szubsztitúció(k) okozzák (6. ábra).



6. ábra. A hepatitisz B felületi fehérjéjének szerkezete.

A fehérje alapvetően két hurokból áll („loop1” és „loop 2”), melyeket a 107-138-as, 121-124-es, 137-149-es, 139-147-es aminosav pozíciókban található ciszteinek között kialakuló diszulfid-hidak stabilizálnak. A fehérje C-terminális végén két alfa-hélix található. A jelölt 145-ös aminosav-pozíció az elsőként leírt, felületi fehérje szerkezetét döntően befolyásoló aminosav-szubsztitúció helye.

Ilyen hatású mutációt legelsőként egy olasz kutatócsoport írt le: a beteg mintájában található vírus felületi fehérjéjét kódoló régiójában egy nukleotid szubsztitúciót fedezték fel, amelynek eredményeképpen a 145-ös aminosav-pozícióban glicint kódoló triplet (GGA) arginint kódoló (CGA vagy AGA) tripletre változott (G145R). A mutációra HBsAg hordozó édesanyák gyermekeinek születés kori rutin (aktív és passzív) sikeres immunizációja ellenére kialakuló HBsAg pozitivitása, és akut B-vírus hepatitiszének kivizsgálásakor derült fény [Zanetti, 1988; Carman, 1990].

A HBV fertőzés tényének megállapítására irányuló rutinszerűen végzett szerológiai tesztek a felületi antigén jelenlétének kimutatásán alapulnak (HBsAg ELISA kit). A mutáns vírusok módosult fehérjéinek kimutatására azonban nem mindegyik teszt elég érzékeny [Mizuochi, 2005; La'ulu, 2006]. Álnegatív szerológiai eredmény kiadásához vezethet, ha egy teszt nem képes kimutatni a vérben keringő HBsAg felszíni fehérjét. Ez megnehezítheti a betegség felismerését, valamint, komoly következményekkel járhat, pl. ha véradókat szűrnek vele [Weber, 2005; Coleman, 2006]. Huy és munkacsoportja szerint a „surface”-mutánsok gyakrabban fordulnak elő a B (25 %) és a C (24,5 %) genotípusú vírushordozók között [Huy, 2003], és szintén meglepően magas (28 %) volt az előfordulási arány korábban immunizált, HBsAg és DNS pozitív taiwani gyermekek között [Hsu, 1999].

3.3.8.4. X gén mutánsok

A HBx génről átíródó, 154 aminosavat tartalmazó transzaktivátor fehérje a HBV fertőzés patogenezisében játszik szerepet. Számos leírt mutáció található a kódoló génszakaszon, melyek némelyike (szubsztitúciók a 118, 127, 135, 260, 264, 240, 257, 261, 279, 353, 357 aminosav-pozíciókban, illetve 6 aminosav inzerciója a 204-es aminosav-pozíciónál) nagy százalékban (> 90 %) összefüggésbe hozható(k) a HCC kialakulásával [Chen GG, 2005]. Mindazonáltal meg kell említeni, hogy HCC-s betegek májbiopsziás mintáiból „surface”-antigén mutáns vírusok is kimutathatók voltak, amelyek előfordulása szintén összefüggésbe hozható a HCC kialakulásával [Oon, 1999b].

3.4. Torque Teno vírus (TTV)

Az 1990-es évek második felében, nem specifikus genom-amplifikációs technikával egy addig ismeretlen vírusgenom eredetű szekvenciát azonosítottak vérátömlesztésen átesett, májgyulladás klinikai képét mutató beteg véréből, akinél az addig ismert, májgyulladást okozó „klasszikus hepatitisz” vírusok (A–E) egyikének kóroki szerepét sem sikerült igazolni. A beteg májgyulladásának kialakulását ezzel az újonnan felismert virális kórokozó jelenlétével magyarázták [Nishizawa, 1997]. A vírust annak a betegnek monogramja alapján (TT) nevezték el, akinek a véréből a kórokozót először kimutatták. Később a rövidítést a „vérátömlesztéssel terjedő” (transzfúzióval transzmittálható/transzmisszálódó) elnevezés alapján használták – mivel az akkori ismeretek szerint a vírus leginkább vérátömlesztés útján terjedhet. Mára igazolódni látszik, hogy nemcsak a parenterális, hanem az enterális, valamint a cseppfertőzés is szerepet játszik a vírus terjedésében. A vírus elnevezése jelenleg Torque Teno vírus (= vékony gyűrű) – amely egyben a vírusgenom biokémiai felépítésére is utal [Hino, 2007].

3.4.1. Epidemiológiai adatok

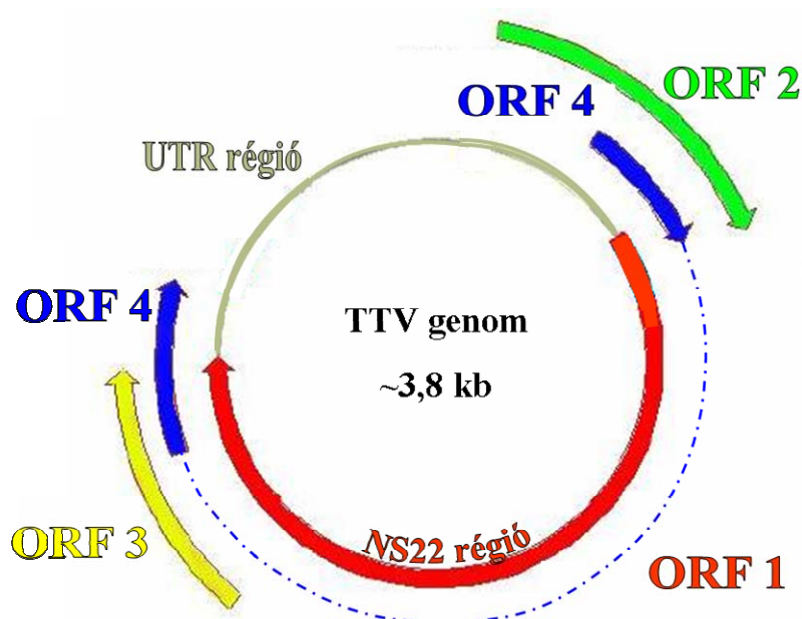
A vírus az egész világon előfordul [Abe, 1999], előfordulása a nemzetközi (20-50 %) [Masia, 2001; Hino, 2007] és hazai (18,5 %) [Takács, 2003] adatok szerint meglepően magas az egészséges populációban. Egyes közleményekben ~90 %-os prevalencia értékekről is beszámoltak [Huang, 2001]. Ismeretlen eredetű hepatitiszesek, többszörösen vérátömlesztettek, hemodializáltak között ez az arány magasabb (50-73 %) [Maggi, 1999]. A vírust kimutatták májbiopsziás mintákból [Matsumoto, 1999], székletből [Okamoto, 1998], epéből [Ukita, 1999], torokváladékból [Ishikawa, 1999], nyálból [Naganuma, 2008], könnyből, spermából, anyatejből [Ross, 1999]. A perinatalis terjedési módra is van bizonyíték [Gerner, 2000], bár a csecsemők TTV fertőzöttsége gyakran már a környezetükből ered, mivel a vírus a köldökvérből nem minden esetben volt kimutatható [Ohto, 2002].

Emberen kívül számos gazdaállatban való előfordulásáról tudunk: kimutatták házisertésben [Okamoto, 2002; Bigarré, 2005], vaddisznóban [Martínez, 2006], de csirkében, kutyában, és macskában is [Okamoto, 2002].

3.4.2. A kórokozó

A TT vírus – a jelenleg még csak javaslat formájában létező – Anelloviridae család *Anellovirus* nemzetségének tagja [Biagini, 2005, 2008]. Meghatározott méretű póruson történő ultracentrifugálással végzett kísérletben a virion átmérőjét ~30-50 nm körül határozták meg [Mushahwar, 1999]. A vérátömlesztés általi átvitel lehetőségéből következtethetünk arra, hogy a vírus nem rendelkezik külső lipidburokkal, mivel a vérkészítmények lipidburokkal rendelkező vírusokat inaktiváló szerei a TT vírusra hatástalanok [Chen, 1999].

A TT vírus egyszálú, negatív polarizációjú, cirkuláris DNS genomot tartalmaz, melynek hossza genotípustól függően változó, ~3,6-3,8 kilobázis. A genom kb. 2/3 része négy, részben átfedő nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz [Mushahwar, 1999], amelyről egyes szerzők szerint 6 [Kakkola, 2008] más kutatócsoport eredményei szerint 7 [Mueller, 2008] fehérje íródik át (7. ábra). Az ORF1 (770 aminosav) a kapszidfehérjét kódolja, az ORF2 (120 aminosav) pedig feltételezhetően egy, a vírusreplikációban, valamint a gazdaszervezet immunválaszának befolyásolásában, így a TTV patogenitásában szerepet játszó, nem strukturális fehérjét kódol [Zheng, 2007]. Az ORF3 (286 aminosav) valószínűleg a transzkripcióban résztvevő, nukleinsavkötő proteint kódol [Tanaka, 2001]. A fennmaradó 1/3 rész nem kódoló régió (UTR). A vírus replikációs mechanizmusa – fertőzhető sejtvonal hiányában – nem ismert.



7. ábra A TTV genomjának felépítése.

3.4.3. TTV genotípusok

A TTV mind nukleotid-, mind fehérjeszekvencia szinten igen nagy diverzitást mutat, ez elsősorban az RNS genomú vírusok sajátja, de – eltérően a többi DNS vírustól – a TTV-re is jellemző. Az RNS vírusok heterogenitásának biokémiai oka a RNS-dependens nukleinsav-polimeráz enzimek másolási pontatlansága és/vagy a hibajavítási funkció kiesése. A TTV esetében tapasztalt heterogenitás egyik okaként a másolási pontatlanságot tartják számon, de felmerült egy esetleges RNS intermedier szerepe is [Nishizawa, 1999]. A nagy genomi eltérésekre hivatkozva az izolátumok egy részét néhány szerző a TTV-től eltérő fajként kezeli (YONBAN, SANBAN, SENV vírusok), amit azonban a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (*ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses*) még nem erősített meg. A TT vírusokat, a genomszekvenciájuk legalább 30 %-os eltérése alapján önálló genotípusba, 15 %-os eltérése alapján pedig egy genotípuson belüli altípusba sorolják [Okamoto, 1999]. Jelenleg már több, mint 40 genotípust ismerünk, amelyek 5 genocsoportba sorolhatók. [Peng, 2002; Biagini, 2005, 2008]. Az 1. genocsoportba az 1–6 számozott genotípusok tartoznak, a 2. genocsoportba a 7, 8, 17, 22, 23 genotípusokat, a 3. genocsoportba pedig 9–16, 18–20 genotípusokat sorolták. A 4. és 5. genocsoportba tartozó genotípusokat Peng és munkacsoportja különítette el a többitől.

3.4.4. A TTV klinikai jelentősége, laboratóriumi diagnosztika

A magas prevalencia adatok inkább egy, a „normál vírusflóra” tagjaként jelenlevő vírusra utalnak, melyeknek – mint általában az endoszimbiontákknak – pathogenitási hajlama roppant csekély és nem, vagy csak szélsőséges körülmények között okoznak megbetegedést [Bendinelli, 2001]. Alátámasztja ezt a feltételezést, hogy a mai napig nem sikerült társítani a Torque Teno vírust (kivéve a vírus 1-es genotípusát) egyetlen, jól körülírható klinikai kórformához sem, emiatt gyakran nevezik a vírust „árva vírusnak” („orphan virus”). A TTV 1-es genotípusáról feltételezhető, hogy vérátömlesztést követően májgyulladászt váltott ki [Okamoto, 1999], Biagini és munkacsoportja pedig ornyálkahártya gyulladást írt le egy újszülöttnél TT vírussal összefüggésben [2003].

Vizsgálták a TT vírus előfordulását koinfekcióban hepatitisz C vírusfertőzöttek (betegek és tünetmentes hordozók) között. Krónikus HCV-sek között a TTV 40,25 %-ban fordult elő. Azoknál, akik IFN kezelés hatására meggyógyultak, az előfordulási arány 20 %-ra csökkent. Tünetmentes HCV hordozókban a TTV 75,7 %-ban volt jelen. A TTV előfordulását azok között találták a legalacsonyabbnak, akik IFN kezelést követően tartósan tünetmentesek maradtak. Ezek alapján lehet arra következtetni, hogy a vírus valószínűleg IFN-érzékeny ágens [Pár, 2004]. Kutatások folynak a TTV és egyes autoimmun folyamatok kiváltásának kapcsolatáról [Sospedra, 2005]. Feltételezések szerint a TTV – a molekuláris mimikri „alkalmazásával” – szerepet játszhat olyan

betegségek kiváltásában, mint pl. SM, az SLE vagy egyes bőrbetegségek [Blazsek, 2008]. A folyamat során a vírus fehérjének (ORF1 N terminális régiója) a gazdaszervezet saját molekuláihoz való hasonlatossága miatt az immunrendszer toleranciája megszűnik.

A TTV-hez nagyon hasonló PCV-t („porcine circovirus” - sertés circovírus) állati kórokozóként tartják számon: a sertések PMWS (postweaning multisystemic wasting syndrome – választott malacok sokszervi elégtelensége és sorvadása) betegségét okozza, amelyben súlyvesztés, sorvadás mellett nyirokcsomó érintettség, máj-, vese-, gyomor-, szívizom- és tüdőgyulladás is felléphet [Meehan, 1998; Morozov, 1998].

A TTV fertőzés diagnózisának felállítása napjainkig nehézségekbe ütközik, melynek oka, hogy nem ismerjük a fertőzés célsejtjeit vagy szöveteit – annak ellenére, hogy molekuláris módszerekkel a vírus DNS-ét a szervezet számos szövetéből kimutatták már. A molekuláris módszerekkel történő kimutatás nehézségekbe ütközhet a vírusgenom hipervariabilitása miatt. Kutatások folytak az immunválasz reakcióinak detektálásával a fertőzés igazolására: a fertőzést követően „klasszikus” immunválaszt tapasztaltak, rövid ideig tartó IgM és sokáig kimutatható IgG ellenanyagszinttel [Tsuda, 1999 és 2001]. Kakkola és munkatársai 6 – baktériumban termeltetett – TT vírus proteinnel szemben vizsgálták az immunválaszt, amely mind a hat vírusfehérjével szemben kimutatható volt [Kakkola, 2008].

3.5. GBV-C/hepatitisz G vírus (GBV-C/HGV)

A vírus – genomstruktúrája alapján – a *Flaviviridae* család tagja, ám az ide tartozó három nemzetség (*Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus*) egyikébe sem sorolták még be.

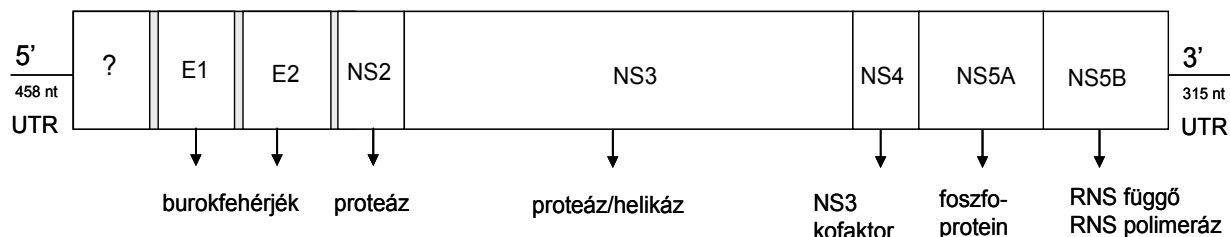
A vírusról felhalmozott ismereteink elenyészőek, annak ellenére, hogy azonosítása már 1995-ben megtörtént. A vírust – klinikailag májgyulladásos betegből történő izolálása miatt – a hepatitisz okozó vírusok közé sorolták [Simons, 1995; Linnen, 1996], mára azonban már bizonyítást nyert, hogy nem hepatotróp ágens [Tucker, 2000].

3.5.1. Epidemiológiai adatok

A vírus parenterálisan, elsősorban vérrel, vérkészítményekkel terjed, de szexuálisan is átvihető. Az Egyesült Államokban önkéntes véradók vizsgálatakor a vírushordozók 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 (többszörösen vérátömlesztettek), hemodializáltak, hemofiliások, intravénás droghasználók, promiszkuatív szexuális életmódot folytatók. Japánban végzett felmérés szerint a homoszexuálisok között az előfordulás 12,5 % [Hattori, 2003], magyarországi rizikócsoportok (intravénás droghasználók és/vagy promiszkuatív életmódúak) között 12 % volt [Dencs, 2007].

3.5.2. A kórokozó

A GBV-C/HGV vírus – hasonlóan a víruscsalád többi tagjához – pozitív egyszálú RNS-t tartalmaz. Genomstruktúrája nagymértékben hasonlít a HCV-éhez. A genom ~9400 nukleotid hosszúságú, 5' és 3' végein nem kódoló (UTR) régióval. A genomról egy ~2900 aminosavból álló poliprotein keletkezik. A vírus strukturális fehérjéi (E1 és E2 burokfehérjék) a genom 5' végén, míg a replikációhoz szükséges nem-strukturális fehérjék (NS2 - proteáz, NS3 - helikáz, NS5B RNS-függő RNS polimeráz) a 3' végén kódoltak (8. ábra).



8. ábra. A GBV-C/HGV genomstruktúrája.

Vírus-tenyésztési kísérletekben 30 nappal az inokuláció után mindkét felhasznált sejtvonalon (MT-2C – transzformált humán T-sejtvonal és PH5GH – humán májsejtvonal) kimutatható volt a víruszaporodás RT-PCR-rel [Ikeda, 1997].

3.5.3. GBV-C/HGV genotípusok

Jelenleg hat genotípust, a 2-es genotípuson belül pedig további két alcsoportot különböztetünk meg (jelölésük: 1-5, az alcsoportoké 2a és 2b) [Smith, 2000; Muerhoff, 2006]. A csoportok többnyire jól jellemezhetőek földrajzi előfordulásukkal: az 1-es genotípus Nyugat és Közép-Afrikára, míg az 5-ös Dél-Afrikára jellemző, a 2-es Európában és Észak-Amerikában, a 3-as Ázsia északi országaiban és Japánban, a 4-es genotípus Délkelet-Ázsiában, a 6-os pedig Indonéziában és Iránban fordul elő [Muerhoff, 1997, 2006].

3.5.4. A GBV-C/HGV klinikai jelentősége, laboratóriumi diagnosztika

A kutatások során a GBV-A illetve B vírusokról bebizonyosodott, hogy májokban okoz májgyulladást, a C típus viszont emberben is [Karayiannis, 1995]. Végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő, dializált betegek között végzett felmérésben (ahol a vírus előfordulási aránya a dialízis időtartamával, esetleges vérátömlesztéssel és vesetranszplantációval egyre magasabb) úgy találták, hogy habár nincs bizonyítható összefüggés a vírus kimutathatósága és a betegség súlyosabbá válása között, a vírus felbukkanása mindenképpen jó marker a vérrel terjedő vírusok monitorozására. Megjelenése a betegellátó egységben jelzi a fokozott óvintézkedések bevezetésének szükségességét [Fabrizi, 1999]. Francia kutatók tettek említést a

vírussal talán összefüggésbe hozható további kórformáról, egy beteg – vérátömlesztést követően kialakuló – mellhártya- és szívburokgyulladás (pleuropericarditis) kapcsán [Blanc, 2008].

Vizsgálták a vírus – HIV és más hepatitisz vírusokkal – koinfekcióban történő előfordulásának hatását a betegség lefolyására. Nem találtak bizonyítékot súlyosabb betegség kialakulására HBV és/vagy HCV hordozó betegek HGV koinfekciójával kapcsolatban, de a koinfekció a fennálló krónikus májbetegség lefolyására kedvezőtlen hatással volt [Yang, 2006]. Érdekes módon a hepatitisz C víruskópiaszámának csökkenését tapasztalták német HCV hordozókban GBV-C/HGV koinfekcióban [Yan, 2000], de magyarországi vizsgálatok ezt az eredményt nem támasztották alá: sem a HGV RNS sem a TTV DNS jelenléte nem volt hatással a krónikus HCV fertőzés lefolyására [Pár, 2004]. Az utóbbi időben azonban egyre több eredmény támasztja alá, hogy kedvező hatással van a vírus előfordulása a HIV pozitív betegek állapotára, a HIV replikációjának gátlásával [Lefrere, 1999; Tillmann, 2001; Williams, 2004; Hattori, 2007; Xiang, 2008].

A vírusfertőzés laboratóriumi diagnosztikája vagy a kórokozó molekuláris módszerekkel történő kimutatásán (RT-PCR), vagy a vírus burokfehérjéje (E2) ellen termelt neutralizáló hatású ellenanyag kimutatásán alapul [Hassoba, 1998]. A vírus RNS kimutathatósága és az ellenanyagok megjelenése közötti fordított arány arra utal, hogy az ellenanyagok megjelenése a vírus szervezetből történő eliminációját eredményezi [Hassoba, 1997].

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. VIZSGÁLATI ANYAGOK

A vizsgálati mintákat (szérum minta) – a beérkezés után szétosztva – a vizsgálatok elvégzéséig - 20°C-on tartottuk.

4.1.1. Hepatitisz B vírus magyarországi genotípus-eloszlásának meghatározása

A HBV Magyarországon előforduló genotípusainak meghatározásához az intézetbe előzőleg diagnosztikus célból beküldött vérminták közül választottunk ki huszonnégyet. A kiválasztás feltételei csak a lakóhely, illetve az előzetes HBsAg pozitív eredmény voltak. A beküldő által feltüntetett diagnózis a kiválasztott minták mindegyikénél a feltételezett akut vagy ismert krónikus hepatitisz volt. A kiválasztott minták származási helyének földrajzi megoszlása a 9. ábrán látható. A mintákat a kiválasztás után a „hun” rövidítéssel és egy számmal jelöltük (hun49, hun51-52, hun54-59, hun62-66, hun72-76, hun78-80, hun82, hun84).



9. ábra. A HBV genotipizálási kísérlethez felhasznált minták származási helye.

4.1.2. Nozokomiális járvány molekuláris epidemiológiai kivizsgálása

Egy feltételezhetően kórházi (gyermek onko-hematológiai) osztályon kialakult járványban érintettek mintáit (összesen 36 fő, akik közül 29 beteg és 1 fő kórházi személyzet mintája került beküldésre) vizsgáltuk. A járvány epidemiológiai kivizsgálását az illetékes ÁNTSz járványügyi szakemberei az OEK Kórházi járványügyi osztályának munkatársaival közösen végezték el. A fertőzések számának emelkedését (HBsAg pozitivitás megjelenése) 2001-ben, az első klinikai tüneteket 2002 februárjában észlelték, az utolsó pozitív szűrővizsgálati eredményre 2003 februárjában derült fény. A mintákat 2001-2003 között gyűjtötték. Három beteg esetében történt két, egymástól egy év különbséggel vett vérminta beküldése: hun5, hun8, hun13 (a HBV

vizsgálatokat az első mintákból végeztük el, csak HGV és TTV vizsgálatokat végeztünk párhuzamosan, mindkét vérmintából). A beküldött minták mindegyike előzőleg HBsAg pozitív szerológiai eredményt adott. A mintákat „hun” rövidítéssel és egy számmal jelöltük (hun1-hun6, hun8-hun18, hun23-hun27, hun29-hun35).

4.1.3. „Vakcinaszökevény” vírusmutánsok keresése Magyarországon

Előzetes irodalmi adatok alapján egyes genotípusú („B” és „C”) HBV vírushordozók között magas (~25 %) a mutáns vírusok előfordulásának aránya [Huy, 2003]. Vizsgálatainkhoz ezért feltételezhetően „B” és/vagy „C” genotípusú hepatitisz B vírust hordozó, Magyarországon élő személyeket kerestünk. Mivel az epidemiológiai adatok alapján a „B” és „C” genotípusok előfordulása nem jellemző az európai populációra, erre a célra az intézet (OEK) régiós feladatoként végzett HBsAg terhesszűrésre érkező, anti-HBc pozitív szerológiai eredményű vérminták közül választottunk ki 40, nem magyar leánykori (születési) nevű kismama mintáját. A kismamák születési helyét (származását) nem vettük figyelembe. A kiválasztás egy további szempontja volt a HBsAg pozitív (19 minta) vagy negatív (21 minta) szerológiai eredmény. A mintákat „P” betűvel (P – „pregnant” – várandós) és egy számmal jelöltük (P1-40). A kiválasztást egy meghatározott időintervallumon belül érkezett minták közül végeztük el (2004-2006).

Szintén irodalmi adatok alapján [Hino, 2001] olyan – születésükkor aktív és passzív – **védőoltásban részesült gyermekek** vérmintáit kerestük, akik (a magyarországi gyakorlat alapján 15 hónapos korukban, a korábbi immunizálás hatásosságának ellenőrzésekor) HBsAg pozitívnak, vagy HBsAg negatívnak, de anti-HBc pozitívnak bizonyultak (és/vagy molekuláris módszerekkel is kimutatható volt az általuk hordozott vírus). Huszonnyolc minta közül 12 bizonyult alkalmasnak további molekuláris vizsgálatok végzésére (9 esetben HBsAg pozitív, 19 esetben pedig HBsAg negatív előzetes eredménnyel). A mintákat „V” betűvel (V – „vaccinated” – oltott) és egy számmal jelöltük (V1-10, V22-26, V30-42). A kiválasztást egy meghatározott időintervallumon belül érkezett minták közül végeztük el (2004-2006).

A vizsgálat során 9 magyar nevű, tünetmentes hordozó vérmintáját használtunk kontrollként, a mintákat „C” betűvel (C – „control” – kontroll) és egy számmal jelöltük (C1-C9).

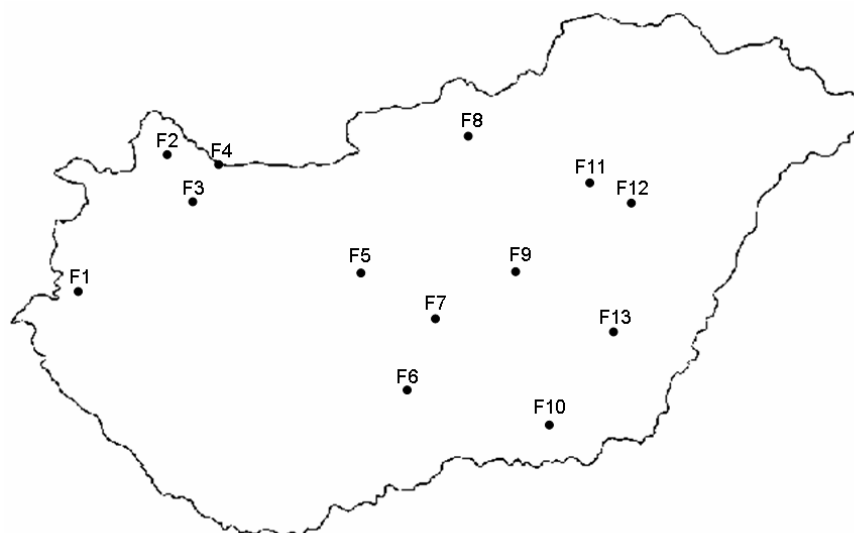
4.1.4. Torque Teno vírus előfordulása rizikócsoportokban; TTV molekuláris vizsgálatok

Az egészséges populációban a TT vírus magyarországi prevalenciája 18,5 % [Takács, 2003]. Különböző betegcsoportokban való előfordulásukhoz 228, ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő beteg vérmintáját, valamint a 30, kórházi járványban érintett onko-hematológiai osztályról érkezett vérmintát vizsgáltuk meg. Meghatároztuk a TTV ismeretlen eredetű hepatitiszesekben előforduló

genotípusait is. Az ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő betegek mintáit 1999-2001 között gyűjtöttük.

4.1.5. Torque Teno vírus előfordulása hazai sertésállományban

Magyarországi sertésneveldekből (farm *F1-13*, 10. ábra) származó 82 sertés szérummintáját vizsgáltuk TTV előfordulására. A mintákat 12 hónapos időintervallumban gyűjtöttük be.



10. ábra TTV előfordulásának vizsgálatára kiválasztott sertésállomány földrajzi megoszlása

(A sertésállományok F betűvel – farm – és egy számmal jelöltek)

4.1.6. GBV-C/HGV vírus előfordulása különböző rizikócsoportokban; molekuláris vizsgálatok

Az egészséges populációban a GBV-C/HGV vírus prevalenciája molekuláris módszerekkel vizsgálva 8 % körüli [Takács, 2002]. Különböző betegcsoportokban való előfordulásukhoz 247, ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő beteg mintáját vizsgáltuk molekuláris módszerrel (PCR). A PCR-rel párhuzamosan 51 betegnél szerológiai módszerrel (ELISA a vírus E2 burkokfehérjéje ellen termelt ellenanyag kimutatására) is vizsgáltuk a mintákat.

Ebből a betegcsoportból (ismeretlen eredetű hepatitiszesek) néhány beteg (9) további molekuláris vizsgálatát is elvégeztük (szekvenálás).

Vizsgáltuk továbbá a 30, kórházi (onko-hematológiai osztályon zajlott) járványban érintett beteg mintáját.

4.2. MÓDSZEREK

4.2.1. Szerológiai markerek

A szérumminták szerológiai markereinek vizsgálatára a következő reagenskészleteket használtuk, a gyártók használati utasítása alapján:

- **HBsAg** Hepanostika HBsAg UniForm II (Biomerieux)
- **Anti HBc IgM** HBc IgM ELISA (DiaPro)
- **Anti HBc Ab** Hepanostika anti-HBc UniForm (Biomerieux)
- **HBe Ag/Ab** HBe Ag/Ab ELISA (DiaPro)
- **Anti-HAV Ab** Bioelisa HAV (Biokit)
- **Anti HDV Ab** HDV Ab ELISA (DiaPro)
- **Anti HCV IgG** Bioelisa HCV (Biokit)
- **GBV-C/HGV E2 Ab** Anti GBV-C Immunoassay (R and D Systems)

4.2.2. Nukleinsav kivonás

A szérummintákból előzetes kezelés nélkül, alapvetően kétféle módon vontunk ki nukleinsavat.

Fenol-kloroformos módszer: A minták 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 (Sigma) jelenlétében inkubáltuk 37°C-on egy órán át. Ezután fenolos (395 µl, Sigma) - kloroformos (160 µl, Merck) extrahálással eltávolítottuk a hidrofób sejtalkotókat. Az oldatrészeket centrifugálással (15 min. 4°C) különítettük el. A vizes fázisban oldott nukleinsavat izopropanolos (480 µl, -20 °C, Molar Chemicals) precipitációval csaptuk ki az oldatból (inkubáció: -20°C-on, min. 12 órán át), centrifugáltuk (10 min. 4°C), majd 70 %-os etanolos (Molar Chemicals) mosás következett, mosás után eltávolítottuk az alkoholt, és a cső alján pelletként található nukleinsavat szobahőn 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 lácreakció lépéséhez [Sambrok, 1989].

Oszlopos nukleinsav-tisztítási módszer: A mintákból a High Pure Viral Nucleic Acid Purification Kit (Roche) kit használatával tisztítottunk nukleinsavat, a gyártó utasítása szerint. Az így kivont nukleinsav 5-10 µl-jét használtuk fel a reverz transzkripció vagy a polimeráz láncreakció lépéséhez.

4.2.3. Reverz transzkripció

A GBV-C/HGV polimeráz láncreakcióval történő kimutatását megelőzően a vírus RNS cDNS-sé való átírása reverz transzkripcióval (42°C, 15 min) történt. A reakcióelegyet (20 µl/reakció) Applied Biosystems reagensek (DNáz-, RNáz-mentes víz, 10x PCR Buffer II, 25 mM MgCl₂,

dNTP készlet, RNáz inhibitor, reverz transzkriptáz enzim) használatával állítottuk össze, primerként „*random hexamert*” használtunk, és az előzőleg fenolos-kloroformos tisztítási módszerrel kivont nukleinsav 2-2 µl-jét adtuk hozzá.

4.2.4. Polimeráz láncreakció (PCR)

A sertés TTV kimutatására végzett PCR során egy szimpla, a HBV, humán TTV, GBV-C/HGV kimutatásához két, egymást követő (ún. fészkes - „*nested*”) polimeráz láncreakcióban szaporítottuk fel a primerek által közrefogott génszakaszt. A reakciók során használt primereket az Integrated DNA Technologies Inc. (USA) szintetizálta.

4.2.4.1. PCR – humán TTV kimutatására

2. táblázat. A humán TTV PCR reakciók során használt primerek és a reakciók körülményei:

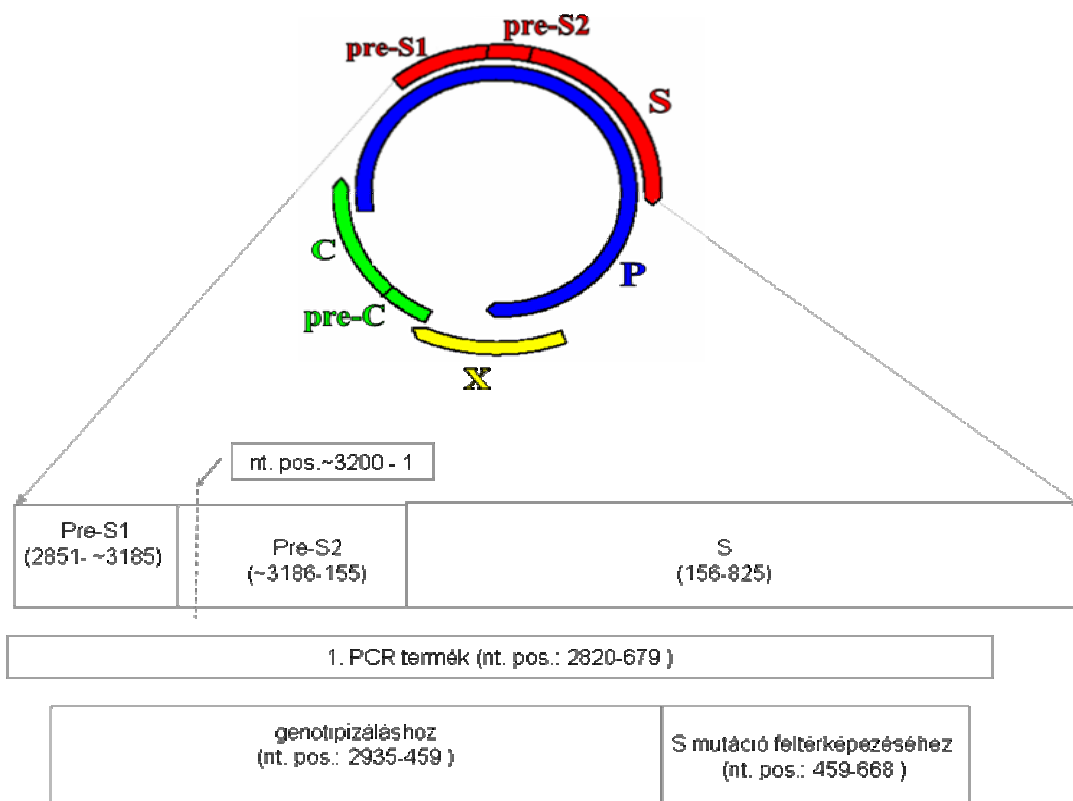
humán – TTV							
primerek (5' - 3')	külső (→)	ACAGACAGAGGAGAAGGCAACATG					
	külső (←)	CTGGCATTTTACCATTTCCTAAAGTT					
	belső (→)	GGCAACATGYTRTGGATAGACTGG					
	belső (←)	CTGGCATTTTACCATTTCCTAAAGTT					
reakció körülményei	lépések	1. PCR			2. PCR		
		°C	min/sec	ismétlés	°C	min/sec	ismétlés
	kezdő denaturáció	94	3:00	1x	94	3:00	1x
	denaturáció	94	0:30	35x	94	0:30	25x
	primer kapcsolódás	55	0:45		58	0:30	
	lánchosszabbítás	72	0:45	1x	72	0:30	1x
végző lánchosszabbítás	72	7:00	72		7:00		

4.2.4.2. PCR – sertés TTV kimutatására

3. táblázat. A sertés TTV PCR reakció során használt primerek és a reakció körülményei:

sertés – TTV				
primerek (5' - 3')	(→)	GGAGTCAAGGGCCTATCGG		
	(←)	CCGGCGWATTTGGGGTGTGT		
reakció körülményei	lépések	1. PCR		
		°C	min/sec	ismétlés
	kezdő denaturáció	94	3:00	1x
	denaturáció	94	0:30	35x
	primer kapcsolódás	55	0:45	
	lánchosszabbítás	72	0:45	1x
végző lánchosszabbítás	72	7:00		

4.2.4.3. PCR – HBV molekuláris vizsgálatokhoz



11. ábra. A HBV molekuláris vizsgálatokhoz használt primerek genomon való helyzete.

4. táblázat. A HBV genotipizálás során használt PCR primerek és a reakciók körülményei:

HBV – genotipizáláshoz							
primerek (5' - 3')	külső (→)	TCACCATATTCTTGGAACAAGA					
	külső (←)	CGAACCACTGAACAAATGGC					
	belső (→)	AATCCAGATTGGGACTTCAACC					
	belső (←)	GAGGACAAACGGGCAACATAC					
reakció körülményei	lépések	1. PCR			2. PCR		
		°C	min/sec	ismétlés	°C	min/sec	ismétlés
	kezdő 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	
	lánc meghosszabbítás	72	0:30		72	0:30	
végző lánc meghosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x	

5. táblázat. A vakcinaszőkevény vírusmutánsok kimutatására használt PCR primerek és a reakciók körülményei:

HBV – S mutációk feltérképezéséhez							
primerek (5' - 3')	külső (→)	TCACCATATTCTTGGGAACAAGA					
	külső (←)	CGAACCACTGAACAAATGGC					
	belső (→)	GTATGTTGCCCGTTTGTCCTC					
	belső (←)	GGCACTAGTAAACTGAGCCA					
reakció körülményei	lépések	1. PCR			2. PCR		
		°C	min/sec	ismétlés	°C	min/sec	ismétlés
	kezdő 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	
	lánc meghosszabbítás	72	0:30		72	0:30	
végző lánc meghosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x	

4.2.4.4. PCR – GBV-C/HGV kimutatására

6. táblázat. A GBV-C/HGV PCR reakciók során használt primerek és a reakciók körülményei:

GBV-C/HGV							
primerek (5' - 3')	külső (→)	ACCGACACCTTAGATCCCCAGCCC					
	külső (←)	CTGATGTTGCTAGCCTGTGTGAGA					
	belső (→)	CCTTACAGTCCTTATTGCTTCCTC					
	belső (←)	CAGAACCATACAGCCTATTGTGAC					
reakció körülményei	lépések	1. PCR			2. PCR		
		°C	min/sec	ismétlés	°C	min/sec	ismétlés
	kezdő 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	
	lánc meghosszabbítás	72	1:00		72	1:00	
végző lánc meghosszabbítás	72	7:00	1x	72	7:00	1x	

4.2.5. Agaróz gél-elektroforézis

A polimeráz láncreakció során felszaporított termékek (amplikonok) méretének (molekulatömegének) ellenőrzését agaróz gél-elektroforézissel végeztük. A keletkezett termékhez a 2 %-os agaróz-gélbe való bemérés előtt 10 mg/ml-es EB 5 µl-jét adtuk (Sigma), a termék molekulatömegének megállapításához ismert molekulatömegű DNS-fragmentumokat tartalmazó ún. „létra” 5 µl-jét használtuk (Promega).

4.2.6. Klónozás

A TTV PCR termékek variabilitása miatt az egyes amplikonok szekvenciája csak klónozás utáni szekvenálással állapítható meg. A PCR termékeket a TOPO TA Cloning (Invitrogen) kit használatával pCR2.1 plazmidba ligáltuk, a klónozási protokolt a gyártó útmutatása alapján végeztük.

4.2.7. DNS – szekvenálás

Szekvenálás fluoreszcein jelölt primerrel, klónozást követően: a klónozott TTV PCR termékeket az AutoRead Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) használatával szekvenáltuk, primerként *M13 Reverse primert* használtunk, a gyártó használati utasításait követve. Az elektroforézis az A.L.F. DNA Sequencer berendezésen történt.

Direkt szekvenálás fluoreszcein jelölt primerrel: a GBV-C/HGV PCR termékeket az AutoRead Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) használatával szekvenáltuk, primerként *M13 Universal primert* használtunk, a használati utasításokat követve. Az elektroforézis az A.L.F. DNA Sequencer berendezésen történt.

Ciklikus szekvenálás: a keletkezett PCR termékeket a Viogene PCR-M Clean up System (Viogene) kittel tisztítottuk, a felhasználási útmutató szerint. A szekvenálás és elektroforézis kivitelezése:

1. HBV genotipizálás esetében:

Felhasznált reagenskészlet: ABI PRISM 3.1 BigDye Terminator kit (Perkin Elmer) , a felhasználási útmutató szerint.

Elektroforézis kivitelezése: ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer berendezésen

2. „Vakcinaszökevény” vírusmutánsok kereséséhez:

Felhasznált reagenskészlet: DYEnamic ET (*Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis System*), a felhasználási útmutató szerint.

Elektroforézis kivitelezése: MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences) berendezésen.

4.2.8. Szekvencia azonosítás

A kapott szekvencia eredményeket a nemzetközi génbankban (*EMBL/GenBank – Nucleotide Sequence Database*) található szekvenciákhoz való hasonlítással ellenőriztük az NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) honlapján található BLAST [*Basic Local Alignment Search Tool*] szoftverrel.

4.2.9. Nukleotid szekvencia illesztés

Az ellenőrzött szekvenciákat a „*Pôle Bioinformatique Lyonnais*” internetes oldalán elérhető többszörös illesztést végző szoftverrel [*Multiple alignment - ClustalW DNA sequences*] illesztettük egymáshoz.

4.2.10. Fehérje fordítás, aminosav szekvencia illesztés

Annak eldöntésére, hogy a vírus genetikai állományában észlelt változások aminosav eltérésben is (misszensz mutáció) megjelennek-e, illetve így módon okozhat-e konformációbeli változást az általa kódolt fehérjében, a kapott szekvenciákat a „*Baylor College of Medicine HGSC*” internetes oldalán elérhető, 6 leolvasási keretben fordító szoftverrel aminosav szekvenciára fordítottuk [BCM - 6 Frame Translation]. A megfelelő leolvasási keretben kapott aminosav szekvenciákat a „*Pôle Bioinformatique Lyonnais*” internetes oldalán elérhető többszörös illesztést végző szoftverrel [Multiple alignment - ClustalW Protein sequences] illesztettük egymáshoz és a nemzetközi génbankban található aminosav szekvenciákhoz.

4.2.11. Filogenetikai analízis

Az illesztett nukleotid-szekvenciákat prototípus szekvenciá(k)hoz hasonlítottuk és filogenetikai analízisnek vetettük alá, a következő módokon:

- **TTV esetében** a filogenetikai analízist a v3.573c verziószámú PHYLIP programcsomaggal, *dnadist* módszerrel, Kimura 2-paraméteres szubsztitúciós modell alkalmazásával végeztük, a fa topológiáját 1000x-es ismétléses Bootstrap analízissel ellenőriztük.

- **HBV esetében** a filogenetikai analízist a MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) szoftver 3.1 verziójával végeztük [Kumar, 2004], Neighbor Joining módszerrel, Kimura 2-paraméteres szubsztitúciós modellel, a fa topológiáját 1000x-es ismétléses Bootstrap analízissel ellenőriztük.

4.2.12. HBV Hibridizációs próba

A kapott genotípus eredmények ellenőrzésére kereskedelmi forgalomban beszerezhető, hepatitisz B vírusok genotípusának meghatározására alkalmas, hibridizációs elven alapuló InnoLipa (Innogenetics) kítet használtunk, a felhasználási útmutató szerint.

5. EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

5.1. Hepatitisz B molekuláris vizsgálatok

5.1.1. Genotipizálási eredmények

Magyarországi hepatitisz B vírus fertőzöttek vérmintáit retrospektív módon vizsgáltuk a vírus genotípus-eloszlásának megállapítására. A 24 kiválasztott vérminta közül 10 (42 %) akut hepatitisz B vírusfertőzés, 14 (58 %) pedig krónikus B hepatitisz feltételezett diagnózisával érkezett az intézetbe. A vizsgált betegek közül 15 (63 %) férfi, 9 (37 %) nő volt. A minták részletes szerológiai és a PCR vizsgálatok eredményeit a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat. Genotipizáláshoz kiválasztott vizsgálati anyagok szerológiai eredményei (N.A. - nincs adat)

HBsAg	HBeAg	HBeAb	aHBc (total)	aHBc IgM	DNS	vizsgált minták száma
pozitív	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív	1
pozitív	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív	10
pozitív	negatív	pozitív	pozitív	negatív	pozitív	8
negatív	negatív	pozitív	pozitív	negatív	pozitív	2
negatív	N.A.	N.A.	pozitív	negatív	pozitív	1
pozitív	negatív	pozitív	N.A.	N.A.	pozitív	1
pozitív	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	pozitív	1
összesen						24

A minták PCR vizsgálatát követően meghatároztuk a termékek pontos nukleotid-sorrendjét. A szekvenálási eredményeket közzétettük a nemzetközi génbankban (*EMBL/GenBank - Nucleotide Sequence Database*), AM040684-AM040705 hozzáférési számokon.

A szekvenálás során a felületi fehérjét („surface” antigént) kódoló ~1170 nukleotidnyi génszakasz kb. felét, 650 nukleotidnyi szakaszt vizsgáltuk. A kapott eredményeket nemzetközi publikációkban szereplő, azonos génszakaszt vizsgáló munkacsoportok szekvenálási eredményeivel hasonlítottuk össze, minden geno- vagy szubgenotípusból 1-3 reprezentatív szekvencia felhasználásával, majd filogenetikai analízist végeztünk. Az analízis során nem irányított számítással („unrooted”) törzsfát készítettünk (12. ábra). Kültagként egy, az általunk kapott szekvenciákkal még összeilleszthető, de attól nagyszámú nukleotidban eltérő szekvenciát választottunk: a gyapjas majmocska (*Lagothrix poeppigii* - „woolly monkey”) hepatitisz B vírusát (génbanki azonosítószáma: AF046996). A törzsfán a reprezentatív szekvenciákat génbanki azonosítószámukkal, valamint – ahol annak jelentősége volt – származási helyük feltüntetésével jelöltük:

- A genotípus
 - o A1 szubgenotípus: U87742 (Dél-Afrika); AY344111 (Brazília), M57663 (Fülöp szk.)

- A2 szubgenotípus: Z35717 (Lengyelország), X70185 (Németország), V00866 (USA)
- **B** genotípus: AB033555
- **C** genotípus: AB033553
- **D** genotípus
 - D1 szubgenotípus: AF121242 (Svédország)
 - D2 szubgenotípus: AY090453 (Svédország), X72702 (Németország)
 - D3 szubgenotípus: AJ344117 (Franciaország), AY233296 (Dél-Afrika)
 - D4 szubgenotípus: AB033558 (Japán)
- **E** genotípus: X75664
- **F** genotípus: AB036917
- **G** genotípus: AF405706
- **H** genotípus: AY090460



12. ábra. HBV filogenetikai törzsfája: a hepatitisz B vírus magyarországi genotípusainak előfordulása és a nozokomiális járvány molekuláris epidemiológiai vizsgálata. A gyökértelen („unrooted”) törzsfája nem irányított számítással készült, a filogenetikai fa bemutatásához kültagként a gypjas majmocskára HBV vírusának szekvenciáját használtuk. (A szürke árnyékolásban szereplő minták a nozokomiális járványból származnak, az aláhúzott minták a reprezentatív szekvenciák; szaggatott vonallal bekeretezve az egyes szubgenotípus csoportokat jelöltük.)

A filogenetikai analízis során kapott eredményeink hasonlóak a külföldi munkacsoportok által, nemzetközi publikációkban közöltekhez, ahol a vírus genotípusainak európai populációban való feltérképezésekor az „A” és „D” genotípusok elsődleges előfordulását említették [Arauz-Ruiz, 2002; Kidd-Ljunggren, 2002; Kurbanov, 2005; Olinger, 2008]. A vizsgált magyarországi vérminták ~21 %-a (5/24) „A”, ~79 %-a (19/24) „D” genotípusúnak bizonyult. Nem találtunk egyértelmű szubgenotípusba sorolódást a „D” genotípuson belül, azonban az „A” genotípus esetében a magyarországi izolátumok a várt módon az „A2” szubgenotípus csoportba rendeződtek [Kurbanov, 2005; Sugouchi, 2004]. A szekvenciák között viszonylag nagy eltérés volt tapasztalható, ami a HBV genetikai diverzitásának bizonyítéka. A genotípusok földrajzi eloszlása a 13. ábrán látható.



13. ábra. A HBV genotípusainak magyarországi előfordulása.

A fekete pontok a „D”, az üres körök pedig az „A” genotípusú (azon belül „A2” szubgenotípushoz tartozó) minták földrajzi eredetét jelölik.

5.1.2. Nozokomiális járvány molekuláris epidemiológiai vizsgálatának eredménye

A nozokomiális járvány molekuláris epidemiológiai vizsgálatát megelőzően a járványügyi hatóság (illetékes ÁNTSz járványügyi szakemberei) és az OEK Kórházi járványügyi osztályának munkatársai elvégezték az epidemiológiai adatok begyűjtését, valamint elvégeztették a járványban érintett betegek, és a kórházi személyzet HBsAg szűrését. Az epidemiológiai vizsgálatok alapján a járványban érintett gyermekek száma: 36 fő. Molekuláris vizsgálatokra 29 beteg esetében került sor. A gyermekek átlagéletkora a vizsgálat időpontjában 11 év volt, 55 %-uk fiú (16/29). A személyzet szűrésekor egy fő bizonyult HBsAg pozitívnak (tünetmentes hordozói állapot), aki azonban nem vett részt a közvetlen betegellátásban (adminisztrátori munkakör). A további szerológiai és molekuláris vizsgálatok részleges eredménye (PCR) a 8. táblázatban látható.

8. táblázat. A nozokomiális járványban érintett 29 beteg és a kórházi dolgozó szerológiai eredményeinek összesítése. (N.A. - nincs adat)

HBsAg	HBeAg	HBeAb	aHBc (total)	aHBc IgM	DNS	vizsgált minták száma
pozitív	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	pozitív	10
pozitív	negatív	pozitív	pozitív	negatív	pozitív	3
pozitív	pozitív	negatív	N.A.	pozitív	pozitív	1
pozitív	pozitív	negatív	negatív	negatív	pozitív	3
pozitív	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív	11
pozitív	N.A.	N.A.	pozitív	pozitív	pozitív	1
pozitív	N.A.	N.A.	pozitív	negatív	pozitív	1
összesen:						30

A szóban forgó intézmény Gyermek Onko-hematológiai osztályán egyidejűleg 18 fekvőbeteg ellátására volt lehetőség, évente ~500 beteg fordult meg az osztályon. Az osztályra bekerülő fekvőbetegeket, a kezelési gyakorlat szerint bekerülésük időpontjában általában szűrik HBsAg jelenlétére. A hepatitisz B vírussal történő fertőződés első jelére (HBsAg pozitív eredmény - előzőleg negatív) 2001. áprilisától figyeltek fel (hun28), majd az ezt követő szűrővizsgálatok az előzőleg HBsAg negatív eredményű, HBsAg pozitívvá vált betegek számának emelkedését jelezte. A fertőzés következtében kialakuló, klinikai tünetekkel járó májgyulladást 2002. februárjában észlelték először. Összesen három gyermek esetében alakult ki tünetekkel járó hepatitisz, akik közül ketten elhaláloztak: egynél a fertőzés fatális kimenetelű volt (ettől a gyermektől már nem is érkezett minta az OEK-be), a másik (hun1) alapbetegségében hunyt el. Az utolsóként HBsAg pozitívként kiszűrt gyermek (hun27) fertőződésére 2003. februárjában derült fény. Ezek alapján a járvány lezajlásának időtartama a 2001. januárja és 2003. februárja közötti időszakra tehető.

Az itt kezelt, járványban érintett gyermekek mindegyike súlyos alapbetegségben szenvedett, melynek kezelése során invazív beavatkozások (műtét, biopszia, vérátömlesztés, vérkészítmény adása), és immunszuppresszív kezelés (citosztatikumok adása, sugárkezelés) egyaránt előfordultak. Az epidemiológiai adatok begyűjtése során nyilvánvalóvá vált a járvány kontakt terjedési módja. A közvetlen terjesztő tényezők kizárása megtörtént:

- vér/vérkészítmény donorokat az OVSZ utólag is ellenőrizte,
- a kezelése során más és más sarzs-számú, gyári vagy gyógyszerári készítésű infúziókat alkalmaztak.

A molekuláris epidemiológiai vizsgálat során meghatároztuk az egyes betegek által hordozott vírusok egy genomszakaszának pontos nukleotidsorrendjét. A nukleotidsorrend vizsgálatához a vírusgenom legváltozékonyabb régióját („surface” – felületi antigént kódoló szakasz) választottuk ki, amely megegyezett a genotipizáláshoz kiválasztott génszakasszal, és amely alkalmas a vírus által okozott fertőzések molekuláris epidemiológiai kivizsgálására [van Steenberg, 2002]. A

szekvenáláskor kapott eredményeinket közzétettük a nemzetközi génbankban (*EMBL/GenBank - Nucleotide Sequence Database*), AM040674-AM040683 hozzáférési számokon.

A kapott szekvenálási adatokat filogenetikai analízisnek vetettük alá. Eredményeinket a 12. ábrán található filogenetikai törzsfán szemléltettük, ahol a kórházi járványból származó minták – kivéve a hun24 és hun33 mintákat – a „D” genotípusba, azon belül pedig egyértelműen egy csoportba (a filogenetikai törzsfá egy ágára) sorolódtak. A törzsfá egy ágán, azonos sorban szereplő minták között egyáltalán nem lehetett eltérést kimutatni, és a vizsgált 650 bázispárnnyi génszakaszon az említett azonos csoportba sorolódott minták között tapasztalt legnagyobb eltérés sem volt több 7 nukleotidnál, ezek azonban megmutatkoztak aminosav eltérésben is. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy – ismerve a magyarországi HBV fertőzöttek által hordozott vírusok közötti markáns különbségeket – az onko-hematológiai osztályon lezajlott járványnak közös forrása volt.

A két külön sorolódott minta (hun24 és hun33) „A” genotípusúnak bizonyult. A hun33 jelölésű minta az osztály egyik dolgozójaé, aki azonban – adminisztratív munkakörénél fogva – nem volt közvetlen kapcsolatban a betegekkel, a betegápolásban, betegellátásban nem vett részt. Az ő fertőzőforrásként való kizárását a filogenetikai analízis megerősítette: a hun24 és hun33 szekvenciák teljes bizonyossággal (Bootstrap érték: 100) került két eltérő csoportba. Eredményünket az aminosav szekvencia illesztési eredmények is alátámasztották (9. táblázat).

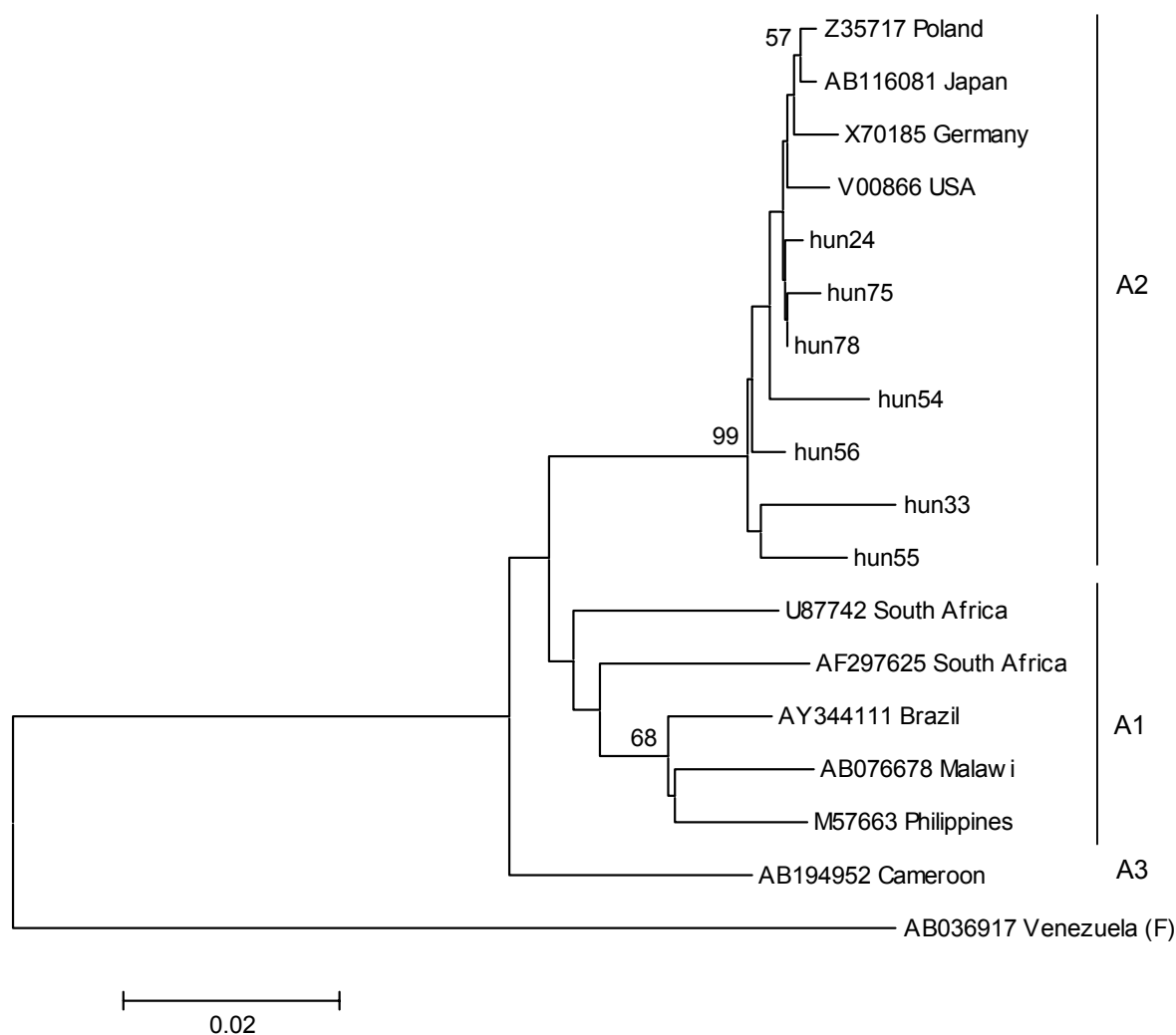
5.1.3. Misszensz mutációk a magyarországi A2 szubgenotípusú HBV izolátumok felületi fehérjét kódoló génszakaszán

A hun24 jelölésű beteget szintén az említett gyermek onko-hematológiai osztályon kezelték, és bár a hun33 jelölésű mintával azonos geno- és szubgenotípusba (A – A2), de a törzsfának két eltérő ágára rendeződtek. A nukleotid szekvencián található 12 ponton tapasztalt eltérés többsége (8/12) a többszörös aminosav szekvencia illesztés alapján eltérő aminosav kifejeződésében is kimutatható volt (9. táblázat).

9. táblázat. Eltérések az „A” genotípus különböző szubgenotípusai között, és a magyarországi „A2” szubgenotípusú szekvenciák összehasonlítása. (A szubgenotípusokra jellemző aminosav szekvenciákat a felső sorban szerepeltettük. A szekvenciákon csak az eltérő aminosavak pozícióját adtuk meg. Az „A2” szubgenotípust meghatározó aminosav eltéréseket szürke árnyékolással, a magyarországi HBV izolátumokon tapasztalt eltéréseket az adott pozíciókban megjelenő aminosav betűjelével jelöltük, a gondolatjelek a csoport reprezentatív szekvenciájával való azonosságot jelölik.)

A	régió	preS1					preS2				S													
	aa kodon	54	67	74	89	90	91	13	22	36	47	7	8	29	40	45	46	47	49	51	57	68	74	
1	AY344111- Brazília	Q	F	V	P	A	V	Q	F	P	S	G	F	Q	N	S	P	V	L	Q	T	I	W	
	M57663 – Fülöp szk.	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	
	U87742 – Dél-Afrika	-	-	-	-	T	A	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	Z35717 – Lengyelország	A	L	I	S	T	I	Q	F	P	A	G	F	Q	N	S	P	V	L	Q	T	I	W	
	X70185 – Németország	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	V00866 – USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AM040682 – hun 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AM040683 – hun 33	-	F	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	P	L	E	-	L	-	-	L	
	AM040701 – hun 54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	P	-	-	P	-	I	-	-	
	AM040702 – hun 75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AM040703 – hun 78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AM040704 – hun 55	-	F	V	-	-	-	-	L	Q	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-
	AM040705 – hun 56	-	F	V	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	AB194952 - Kamerun	Q	F	V	P	A	V	L	F	P	S	G	F	Q	N	A	P	V	L	Q	T	I	W	

Az „A” genotípusú szekvenciák közötti eltérést további szubgenotípus reprezentatív szekvenciákkal (az első filogenetikai analízis során – ld. 12. ábra – felhasználtakon túl: AB116081 Japán, AF297625 Dél-Afrika, és M57663 Fülöp szigetek) illetve még részletesebb filogenetikai analízissel ellenőriztük (14. ábra).



14. ábra. HBV – az „A2” szubgenotípuson belüli eloszlás. A gyökértelen („unrooted”) törzsfá nem irányított számítással készült, a filogenetikai fá bemutatásához kútagként az „F” genotípusú (AB036917) humán HBV szekvenciát használtuk.

A részletesebb törzsfán a hun24 és hun33 jelölésű szekvenciák szintén magas (99) Bootstrap értékkel sorolódtak a fá két külön ágára. Az ismert tények alapján kizárható a hun24-es beteg és a hun33-as tünetmentes hordozó közös fertőzési forrása, illetve kijelenthető az is, hogy bizonyosan nem egymást fertőzték meg a járvány során, sőt: ez a két eset nem tartozik a nozokomiális járványhoz.

5.1.4. HBV: mutációk feltérképezése a felületi-antigént kódoló génszakaszon, „vakcinaszökevény” vírusvariánsok keresése

Várandós kismamák mintáinak vizsgálata: Magyarországon a 90-es évek elején vezették be – először csak Budapesten, pár évvel később országszerte – a terhes kismamák hepatitisz B szűrését, a 16. terhességi héten (az alfa-foetoprotein szűréssel egyidőben) levett vérmintából. A terhesszűrés minden, Magyarországon gondozott terhességnél elvégzik. Vizsgálatainkhoz olyan mintákat kerestünk, amelyek esetében felmerülhet a mutáns vírus előfordulásának lehetősége, irodalmi adatok alapján elsődlegesen „B” és „C” genotípusú vírus hordozók között [Huy, 2003]. Ismerve a magyarországi genotípus eloszlást (vizsgálataink alapján az itt előforduló genotípusok főként az „A” és a „D”), erre leginkább a nem Magyarországon született vírus hordozók között volt esély, emiatt a leánykori név alapján választottuk ki a vizsgálati alanyokat. A kiválasztás elsődlegesen a szerológiai eredmény(ek) alapján történt:

- HBsAg pozitív eredmény (feltehetően nem „A” vagy „D” genotípusú vírus által okozott fertőzés/hordozói állapot)
- HBsAg negatív és antiHBc pozitív eredmény (szintén feltehetően nem „A” vagy „D” genotípusú vírus által okozott fertőzést követően), amely utalhat korábbi, gyógyult fertőzésre, de lehet a mutáns felületi fehérjét tartalmazó vírus szerológiai bizonyítéka is, ha a HBsAg kimutatására használt teszt nem mutatja ki a vírus felületi antigénjét.

A vizsgálatra érkező vérminták mindegyike a terhesszűrés keretén belül –követve a terhesgondozáskor szokásos protokollt – érkezett az intézetbe, beküldéskor nem tettek említést tünetekről, csak a fennálló terhesség volt a vizsgálat indikációja. Feltételezhető tehát, hogy a vizsgálatra beküldött minták tünetmentes vírus hordozó kismamák mintái voltak. Vizsgálataink során nem találtunk olyan vírus hordozót, akinek HBsAg negatív, anti-HBc pozitív és DNS pozitív lett volna a mintája, tehát, akinél feltételezhető lett volna, hogy az általa hordozott vírus felületi fehérjeje – egy esetleges mutáció következtében – szerológiai kittel nem kimutatható. A kiválasztott minták szerológiai és részleges molekuláris eredményeit (PCR) a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat. Terhesszűrés keretén belül érkezett minták szerológiai és PCR vizsgálatainak eredménye.

HBsAg	aHBc (total)	DNS	Megjegyzés		Vizsgált minták száma
pozitív	pozitív	pozitív	vírusreplikáció kimutatható	tünetmentes hordozói állapot	19
negatív	pozitív	negatív	nincs vírusreplikáció	korábban átvészelt fertőzés - gyógyult	21
összesen:					40

Oltott gyermekek mintáinak vizsgálata: a magyarországi gyakorlat szerint a terhességük 16 hetében HBsAg jelenlétére szűrt és pozitívnak bizonyult kismamák gyermekeit születéskor aktív és passzív immunizálásban részesítik. Az oltási rend alapján a gyermekeket 15 hónapos korban újra kell vizsgálni HBsAg jelenlétére. A pozitív HBsAg eredmény alapján kiszűrt gyermeket hepatológiai gondozásba veszik.

Mivel a születéskori immunizációt szerológiai kivizsgálás nem előzi meg, a 15 hónapos korban kapott pozitív HBsAg eredmény alapján nem lehet azt megállapítani, hogy:

- a gyermek már magzati korban (intrauterin) fertőződött-e,
- a gyermek fertőződését születéskor (perinatálisan), vagy azt követően szerzett „vakcinaszökevény” vírusmutáns okozta-e, amellyel szemben sem a passzív immunizálás, sem az aktív védőoltás következtében termelődött neutralizáló ellenanyagok nem védték meg.

Vizsgálatainkhoz a kiválasztás elsődlegesen a szerológiai eredmény(ek) alapján történt, mivel olyan mintákat kerestünk, amelyek esetében felmerülhet a mutáns vírus előfordulásának lehetősége, tehát:

- HBsAg pozitív eredmény (immunizálás után): fertőzés ellenanyag jelenlétében
- HBsAg negatív és antiHBc pozitív eredmény, amely utalhat korábbi, gyógyult fertőzésre, de lehet a mutáns felületi fehérjét tartalmazó vírus szerológiai bizonyítéka is, ha a kimutatásra használt teszt nem mutatja ki a vírus felületi antigénjét.

Az OEK laboratóriumába a születéskor immunizált kisgyermekek 15 hónapos kori HBsAg kontroll vizsgálatra érkező vérmintái közül 28-at választottunk ki további molekuláris vizsgálatokra. A kiválasztott minták szerológiai és részleges molekuláris eredményeit (PCR) a 11. táblázat tartalmazza. A minták mennyisége – kisgyermekekről lévén szó – limitált volt, emiatt a vizsgálatokat úgy terveztük meg, hogy a molekuláris vizsgálatok előnyt élveztek a szerológiai vizsgálatok egy részével szemben: az anti-HBc vizsgálatot csak akkor végeztük el, ha elegendő mennyiségű minta állt rendelkezésre. Vizsgálataink során 3 olyan vírushordozót találtunk (V8, V26, V30), akinek HBsAg negatív, anti-HBc pozitív és DNS pozitív eredményű volt a mintája, tehát, akinél feltételezhető, hogy az általa hordozott vírus felületi fehérjéje – egy esetleges mutáció következtében – szerológiai kittel nem kimutatható. Ennek az eredménynek egy másik lehetséges magyarázata, hogy a vérben keringő HBsAg olyan kis mennyiségben (a kimutathatósági szint alatt), és anti-HBs ellenanyaggal immunkomplexet képezve van jelen, ami szerológiai kittel vizsgálva negatív eredményt ad.

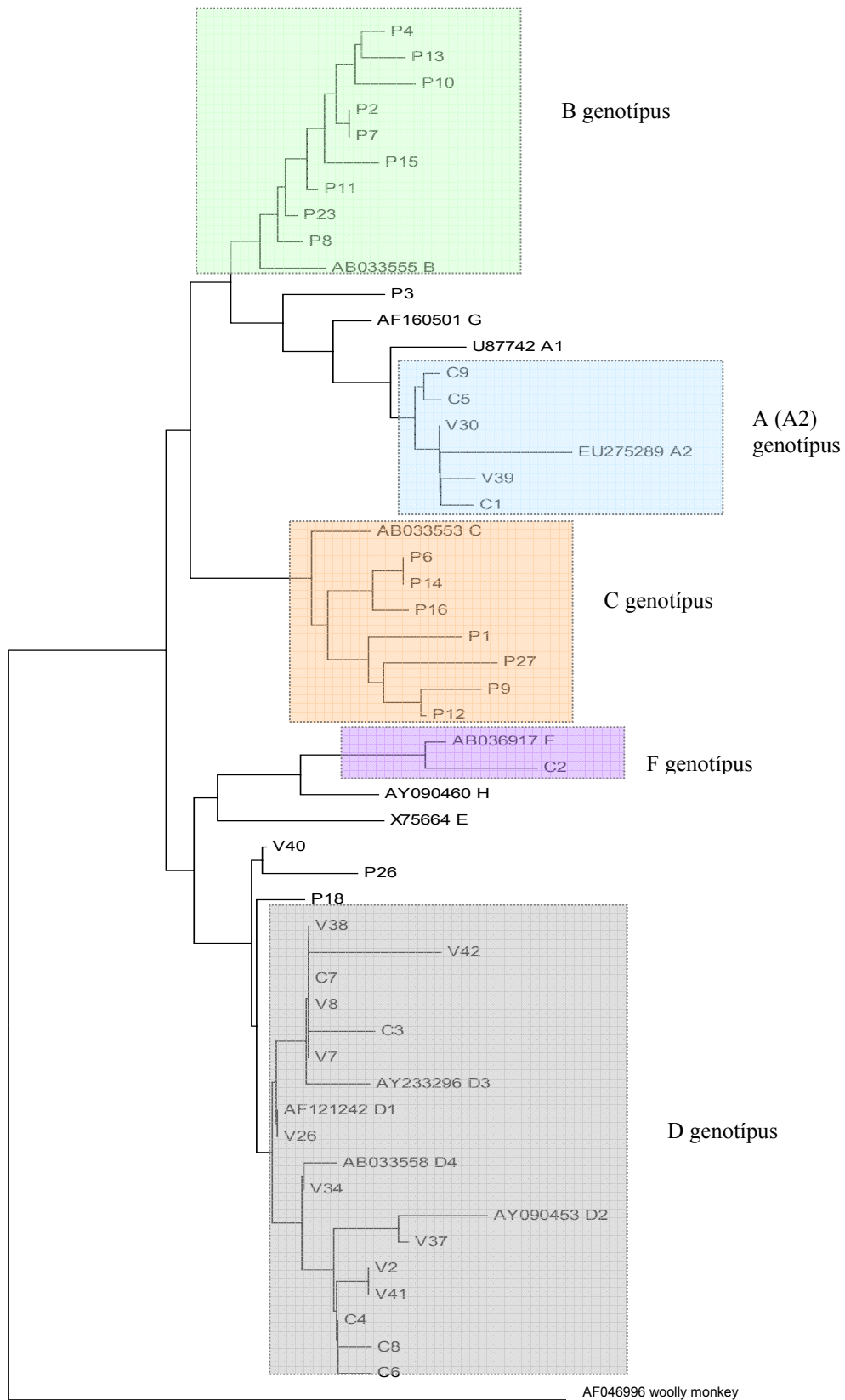
11. táblázat. A 15 hónapos kisgyermekek kontroll HBsAg vizsgálatra érkező vérmintájának eredményei (N.A. - nincs adat, a minta mennyisége nem volt elegendő a vizsgálat elvégzésére)

HBsAg	aHBc (total)	DNS	Megjegyzés		Vizsgált minták száma
negatív	pozitív	negatív	nincs vírusreplikáció	feltételezhetően perinatális fertőződés - gyógyult	16
negatív	pozitív	pozitív	vírusreplikáció kimutatható	mutáns felszíni fehérje? (szerológiai kittel nem kimutatható)	3
pozitív	pozitív	pozitív	vírusreplikáció kimutatható	vírusreplikáció immunizálás ellenére	3
pozitív	N.A.	pozitív	vírusreplikáció kimutatható	vírusreplikáció immunizálás ellenére	6
összesen:					28

Kontrollként vizsgált minták: Kontrollként Magyarország eltérő tájegységeiről diagnosztikus vizsgálatra beérkezett szérumminták közül választottunk ki kilencet (a minták származási helye: Budapest, és környéke: 5 minta; Esztergom, Szeged, Eger, Pécs: 1-1 minta).

Vizsgálataink során megállapítottuk a pozitívnak bizonyult minták PCR termékeinek pontos nukleotidsorrendjét. A nukleotidsorrend vizsgálatához a vírus felületi fehérjét kódoló régiójának egy szakaszát („a” determinánst kódoló régió) választottuk ki, amelynek megváltozása az irodalmi adatok alapján „vakcinaszökevény” vírusmutáns kialakulásához vezethet. A PCR-hez használt primerek vírusgenomon található helye a 11. ábrán látható. A szekvenáláskor kapott eredményeinket közzétettük a nemzetközi génbankban (EMBL/GenBank - Nucleotide Sequence Database), FM163129-FM163168 hozzáférési számokon. A kapott eredményeket nemzetközi publikációkban szereplő szekvenálási eredményekkel hasonlítottuk össze, majd filogenetikai analízist végeztünk (15. ábra). Az összehasonlításhoz minden geno- vagy szubgenotípusból 1-1 reprezentatív szekvenciát használtunk fel, és génbanki azonosítószámukkal jelöltük:

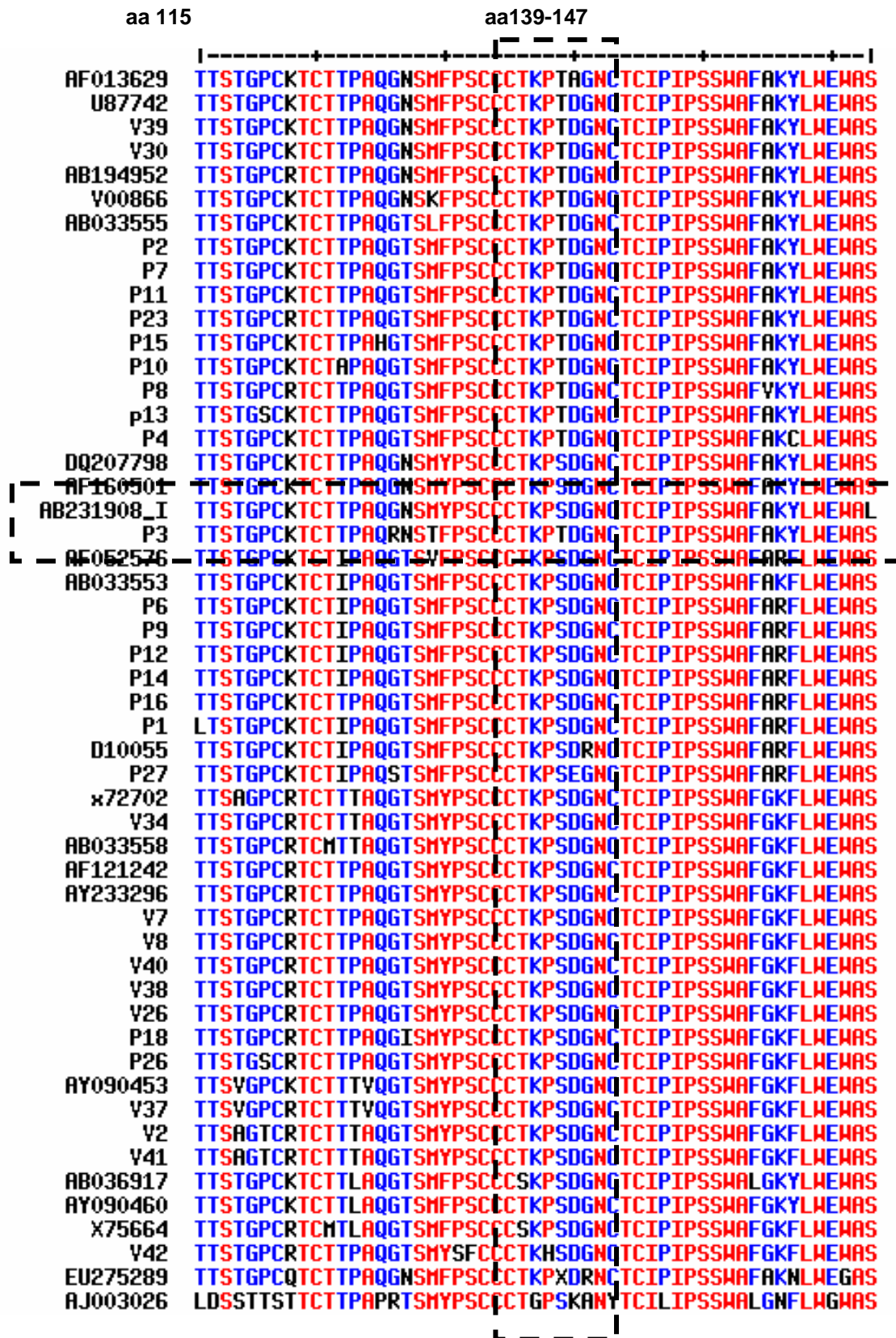
- **A** genotípus
 - o A1 szubgenotípus: U87742
 - o A2 szubgenotípus: EU275289
- **B** genotípus: AB033555
- **C** genotípus: AB033553
- **D** genotípus:
 - o D1 szubgenotípus: AF121242
 - o D2 szubgenotípus: AY090453
 - o D3 szubgenotípus: AY233296
 - o D4 szubgenotípus: AB033558
- **E** genotípus: X75664
- **F** genotípus: AB036917
- **G** genotípus: AF160501
- **H** genotípus: AY090460



15. ábra. Várandós kismamák és oltott gyermekek HBV genotipizálási eredményei. Az analízis során nem irányított számítással generáltuk a törzsfát („unrooted”), a fa bemutatásához kültagként a már előzőekben is használt a gyapjas majmocska hepatitisz B vírusát használtuk.

A filogenetikai analízis alapján többnyire megállapítható volt az egyes minták genotípusa. A várandós kismamák szekvenált mintái 47 %-ban (9/19) „B”, 37 %-ban (7/19) „C” genotípusúnak bizonyultak. A szekvenált szakasz – feltehetőleg rövidege miatt (~200 bp) – egyes esetekben nem tette lehetővé a genotípus egyértelmű meghatározását (P3, P18, P26, V40 jelű minták). A P18, P26, V40 minták esetében a törzsfán való elhelyezkedés alapján lehet következtetni a genotípusra (feltehetően „D”). A kontrollként használt 9 minta között „A” (3/9), „D” (5/9) és „F” (1/9) genotípust azonosítottunk. Az oltott gyermekek mintái között „A” (2/12) és „D” (9/12) genotípusú vírust találtunk. A minták nukleotid szekvenciája alapján elemeztük azok aminosavsorrendjét is (a lefordított szekvencia a kódoló régió által meghatározott 115-166 aminosavpozíciók közötti fehérjeszakaszt ölelte fel), majd többszörös illesztést végeztünk. Az aminosav szekvencia illesztési eredmények az 16. ábrán láthatók. Az illesztéshez a filogenetikai törzsfán szereplő reprezentatív szekvenciákon túl további, génbankban szereplő, geno- és szubgenotípusokat képviselő szekvenciákat: DQ207798 (Németország), AB194952 (Kamerun), V00866 (USA), X72702 (Németország) is felhasználtunk. Illesztettük továbbá a következő – az adott szakaszon jellegzetes mutáció(ka)t mutató – szekvenciákat: AF013629 (Kína) – **D144A**, AF052576 (Kína) – **M133V**, AJ003026 (Németország) – számos mutációval a vizsgált szakaszon, pl. **T115L**, **Q129P**, **G130R**, **K141G**, **D144K**, **G145A**; **C147Y** stb.; D10055 (Japán) – **G145R**.

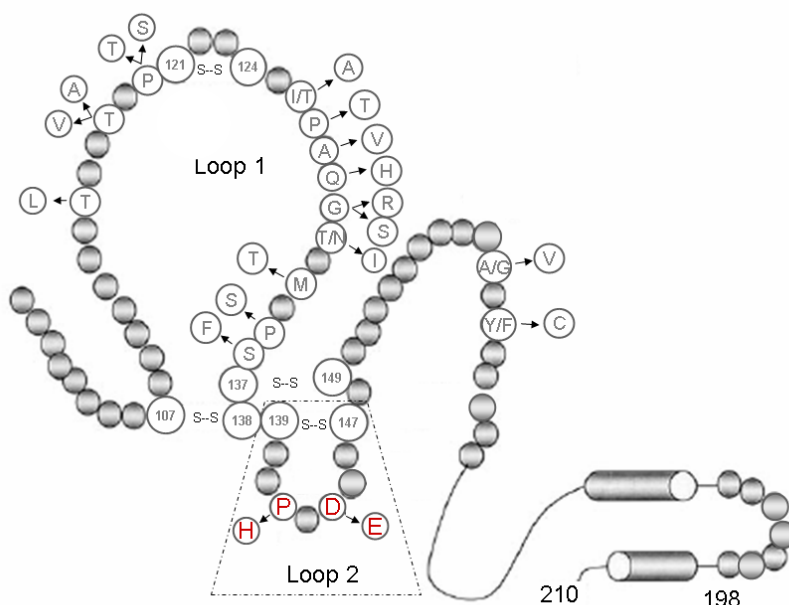
Vizsgálataink lezárta után, 2008-ban közölték a – szekvenciája alapján feltételezhetően legújabb – „I” genotípust (génbanki azonosítószám: AB231908) [Tran, 2008]. A 16. ábrán látható illesztési eredmény – az előzőekben felsorolt reprezentatív szekvenciákon túl – már ezt az új genotípust is tartalmazza. Az illesztés során használt reprezentatív szekvenciák „I” genotípussal történő kiegészítése után a P3-as jelű minta (amelyet genotípusba besorolatlanként értékeltünk) az „I” genotípus mellé sorolódott. Nem kizárt, hogy e minta egy hosszabb génszakaszának vizsgálata bebizonyíthatná ennek a - Távol-Keleten kimutatott - genotípusnak magyarországi előfordulását is.



16. ábra. HBV aminosavsorrend illesztési eredmények.

Az álló téglalap szaggatott körvonalával bekeretezve a HBsAg fehérje „a” determinánsán található hidrofil huroknak („loop2” a neutralizáló ellenanyag kötőhely) aminosavsorrendje látható. A fekvő téglalap szaggatott körvonalával kiemelve az egymás mellé rendeződött P3 jelű minta és az újaonnan leírt „I” genotípus található.

A molekuláris vizsgálatok során a keresett G145R aminosavcserét egyik esetben sem, egyéb, misszensz mutációkat azonban találtunk a vizsgált génszakaszon. Egy-egy aminosavcserével járó nukleotid eltérést mutattunk ki a P1, 4, 8, 10, 13, 15, 18 és 26-os, V34-es jelű minták szekvenciáján. Két-két szubsztitúciót detektáltunk a P3, 27, és hármát-hármát a V2, 37, 41, és V42-es minták szekvenciáján. A „vakcinaszökevény” vírusmutánsok kialakulása a felületi fehérje „a” determinánsán (aa 100–160) található hidrofil hurkon a 139–147-es aminosav-pozíciók közé eső szubsztitúciókkal hozható összefüggésbe, az említett szakaszokon talált aminosavcseréket (azon belül a hidrofil hurkon: P142H és D144E) a 17. ábrán tüntettük fel.



17. ábra. A HBsAg „a” determinánsán, valamint a hidrofil hurkon talált, misszensz mutációk következtében kialakult aminosavcserék. A hidrofil hurok („loop2”) szaggatott vonallal körbekerítve látható.

A jelzett aminosavcseréket eredményező nukleotidváltozások a 18. ábrán láthatók.

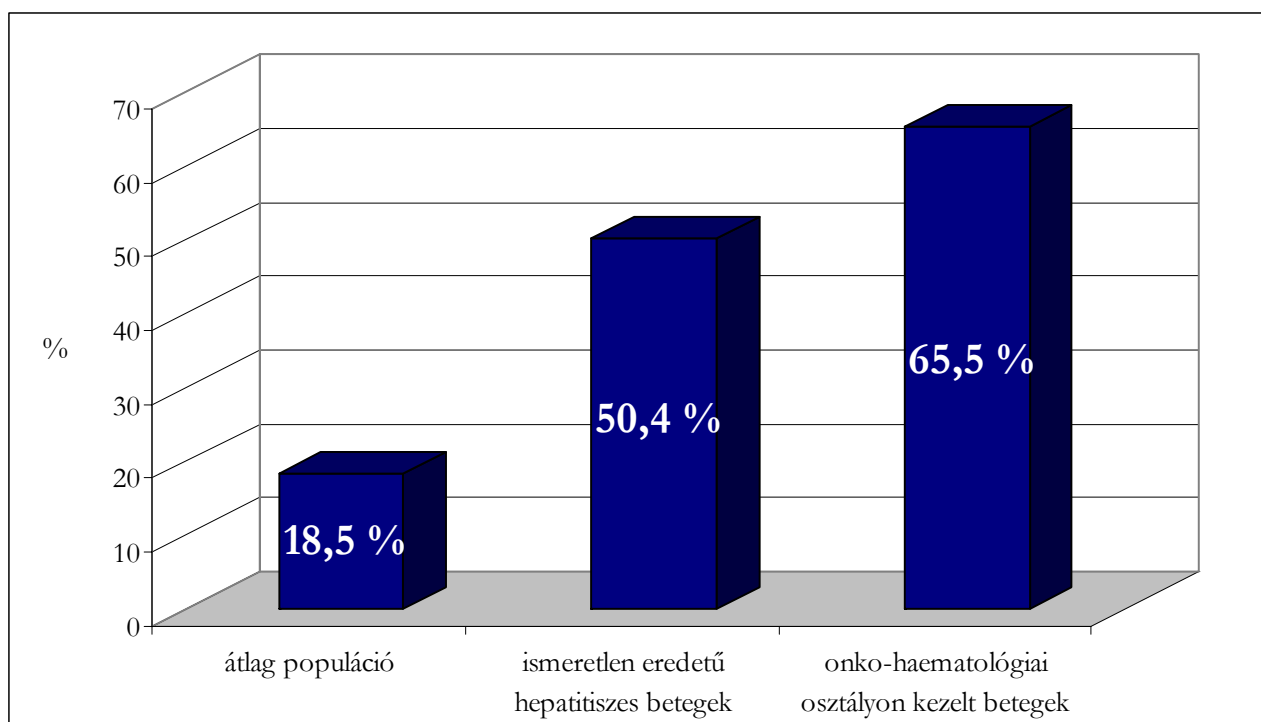
"S" gén aminosav pozíciók (115-161)												
P15			caa	cac								Q129H
P10	att act _gct		I/T126A									
P13	cca	tca	P120S									
P8					gca gga _gia						A/G159V	
P3			gga	aga	atg	acg	M133T					
P4					G130R						tac tfc _tgc	
P1	aca	cia	T115L									Y/F161C
P27					G130S	gac	gaa					D144E
P18					acc aac _atc	T/N131I						
P26	cca	tcc	P120S									
V34			ccd	acd	P127T							
V37	acg	gtg	T118V		ccd	act	gct	gtt	A128V			
V2	acg	gcg	cca	aca	P120T							
V41	acg	gcg	cca	aca	P120T							
V42			ccc	tcc	tcc	tcc	tcc	cat	P142H			
					P135S	S136F						

18. ábra. Aminosav szubsztitúciók a HBV „S” génszakaszán. A jelzett aminosavcsere felett a bal oldali dobozban az eredeti aminosavat meghatározó tripletet, jobb oldalon a talált mutációt / nukleotidváltozást jelöltük, amely eredményeképpen a jelzett aminosavcsere bekövetkezett.

5.2. TTV vizsgálatok eredményei

5.2.1. A TTV előfordulása rizikócsoportokban

Ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő betegek mintáinak vizsgálata: a 228, ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő beteg mintáját megvizsgálva, 115 esetben (50,4 %) tudtuk kimutatni a vírus DNS-ét (19. ábra).

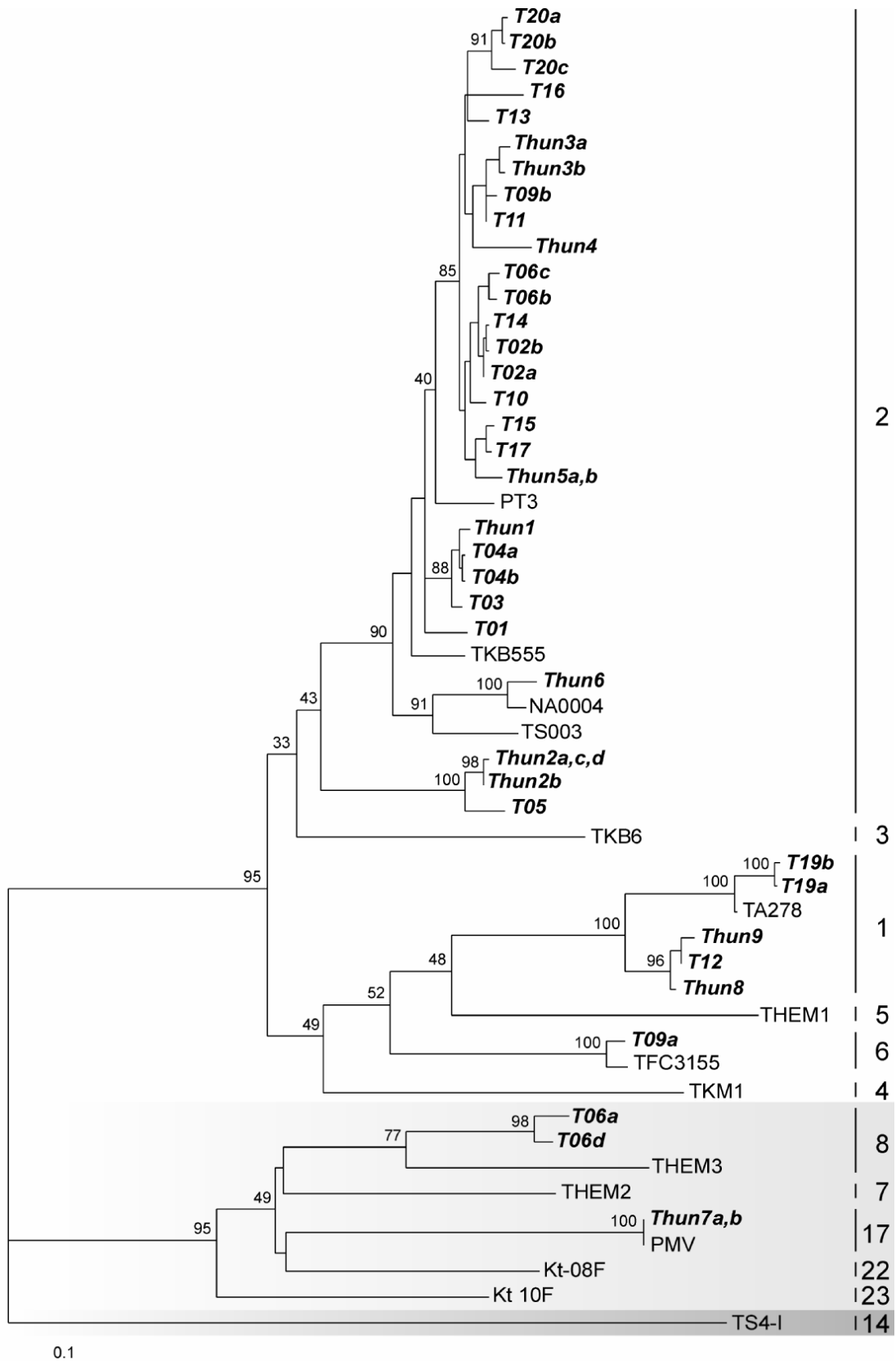


19. ábra. A TTV előfordulása különböző rizikócsoportokban.
(Az onko-hematológiai osztályon kezelt betegek első alkalommal vett vérmintáinak eredményét vettük figyelembe.)

A betegek egy részénél (17/115) a kapott DNS fragmentumokat klónoztuk, majd az így kapott klónokból 26-ot szekvenáltunk. A minták jelölésére a „T” betűt és egy utána álló számot használtunk. Amennyiben a jelölésben szerepelt egy további – kis „a”, „b”, vagy „c” – betű, az a jelölt betegől származó, eltérő klónokat különböztette meg. A szekvenáláskor kapott eredményeinket közzétettük a nemzetközi génbankban (*EMBL/GenBank – Nucleotide Sequence Database*), AJ318994 – AJ319004 és AJ344416 – AJ344430 hozzáférési számokon. A kapott szekvenálási adatokat filogenetikai analízisnek vetettük alá. Eredményeinket a 20. ábrán látható filogenetikai törzsfán szemléltettük, a szekvenciák összehasonlításához génbankban közölt reprezentatív szekvenciákat használtunk:

- PT3: AB017768
- TKB555: AB017773
- NA004: AB017771
- TS003: AB017770
- TKB6: AB017774
- TA278: AB017610
- THEM1: AB017776
- THEM2: AB017778
- THEM3: AB017779
- TFC3155: AB017777
- TKM1: AB017775
- PMV: AF261761
- Kt-08F: AB054647
- Kt 10F: AB054648
- TS4-I: AB021082

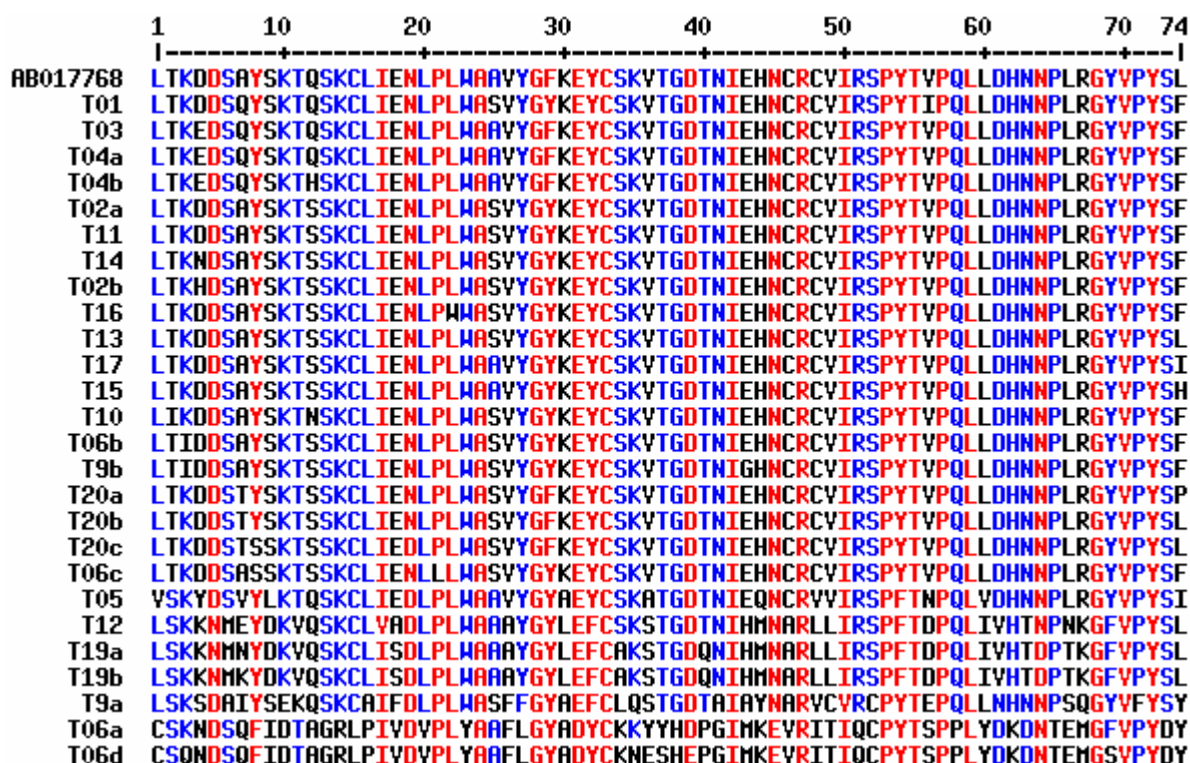
A filogenetikai fa bemutatásához kútagként a 14-es genotípusú TS4-I TTV szekvenciát használtuk.



20. ábra. TTV filogenetikai törzsfá. Árnyékolás nélkül jelöltük az 1-es genocsoportba, világosszürke árnyékolással a 2-es, és sötétebb szürke árnyékolással a 3-as genocsoportba tartozó szekvenciákat.

Annak ellenére, hogy a primereink az irodalmi adatok alapján az 1. genocsoportba tartozó TT vírusok kimutatására voltak alkalmasak, más genocsoportba tartozó vírusokat is találtunk: az ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő betegek TT vírus klónjai nagy többséggel (24/26) az 1-es genocsoportba, míg 2 klón (a T06 beteg „a” és „d” jelű klónjai) a 2-es csoportba sorolódott.

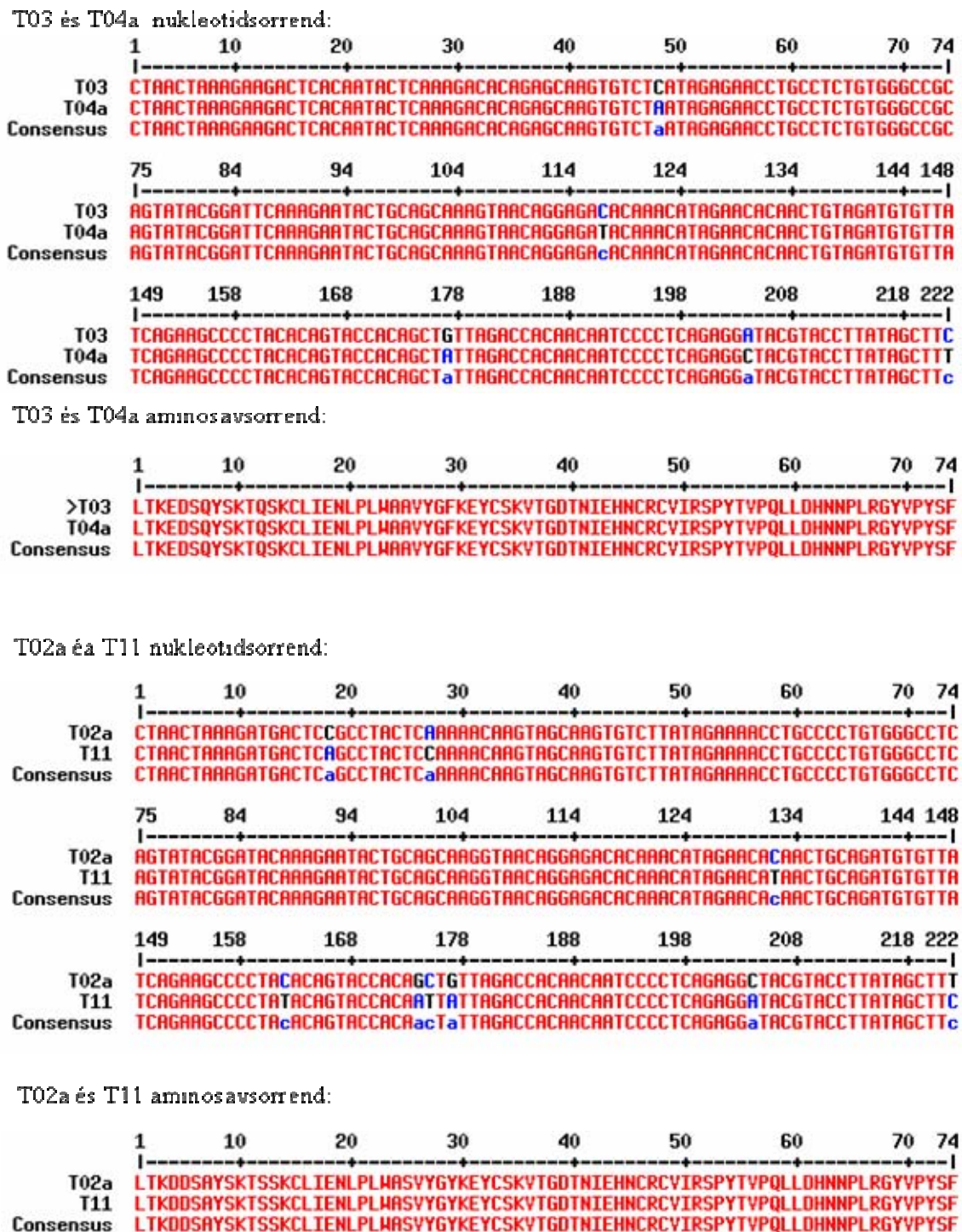
A 222 nukleotidból álló PCR termék a vírus N22 fehérjéjét kódoló szakaszának egy részét ölelte fel, amelyeket fehérjére fordítás után többszörös illesztéssel elemeztünk (21. ábra). Az illesztéshez összehasonlítási alapul a filogenetikai törzsfán is szereplő PT3 reprezentatív szekvenciát (AB017768) használtuk.



21. ábra. TTV aminosavsorrend illesztési eredmények.

Egyazon betegtől származó különböző klónokat vizsgálva azonos genocsoportba tartozó, több genotípussal való kevert fertőződés bizonyítékait találtuk a T02a és „b”, T04a és „b”, T20a, „b”, és „c” (2-es genotípusú vírusvariánsok); a T19a és „b” jelű (1-es genotípusú vírusvariánsok) mintákban. A T09a és „b” jelű mintákban kétféle genotípussal való fertőződést találtunk: a T09b jelű klón a 2-es, a T09a jelű pedig 6-os genotípusúnak bizonyult. Különböző genocsoportba tartozó genotípussal való fertőződésre utalt a T06-os jelű „a”, „b”, „c”, és „d” klónok vizsgálata: a T06b és „c” klónok az 1-es genocsoportba tartozó 2-es genotípusú vírus, a T06a és „d” jelűek a 2-es genocsoportba tartozó 8-as genotípusú vírus jelenlétét bizonyították. A nukleotidsorrendben tapasztalt eltérések azonban nem minden esetben okoztak aminosavsorrendbeli eltéréseket:

összehasonlítva a T03 és T04a valamint a T02a és T11 jelű minták nukleotidsorrendjét, 5 (T03 vs. T04a), illetve 8 (T02a vs. T11) nukleotid pozícióban tapasztaltunk eltérést, a lefordított aminosav szekvenciák összehasonlításakor (22. ábra) a két-két aminosavszekvenciát egyenként azonosnak találtuk.



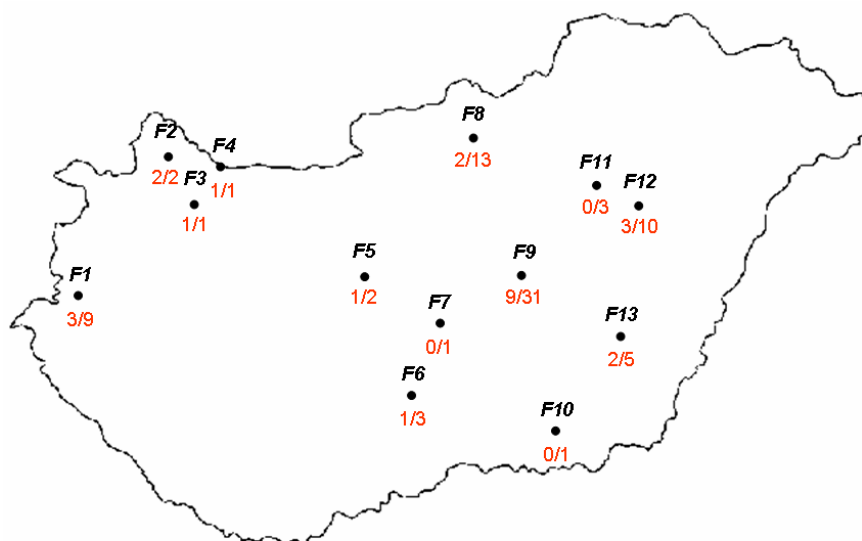
22. ábra. Ismeretlen eredetű hepatitiszes betegek TTV nukleotid- és aminosavsorrend illesztési eredményei.

Onko-hematológiai osztályon kezelt betegek vérmintáinak vizsgálata: az onko-hematológiai osztályon kezelték közül 29 beteg mintáját vizsgáltuk PCR-rel TT vírus előfordulására, 19 esetben tapasztaltunk pozitivitást. Az átlagpopulációban való előfordulásához képest (18,5 %) [Takács 2003], a TTV prevalencia érték itt jóval magasabb volt (65,5 %) (19. ábra). Magyarázható ez a magas előfordulási arány azzal, hogy a betegek – kezelésük során – gyakran kaptak vért- és/vagy vérkészítményt (a donorokat véradáskor nem szűrik TTV előfordulására), de elképzelhető az is, hogy a nozokomiális járványnak egy olyan beteg volt a kiindulópontja, aki TT vírus pozitív volt. A nozokomiális járványtól különálló beteg (hun24) mintája szintén TTV pozitív lett. Három beteg esetében történt két, egymástól egy év különbséggel vett vérminta TTV vizsgálata, kettőnél nem változott az előző eredmény (2002: pozitív - 2003: pozitív) egy betegnél azonban (hun5), a 2002-ben vett vérminta TTV pozitív volt, de 2003-ban már negatív. A kérdéses beteg akut limfoid leukémiában szenvedett, hepatitiszre utaló tünetei nem voltak, kezelésében vér, vérkészítmény (vérlémezke) adása, citosztatikus terápia (immunszuppresszió), invazív beavatkozások (nyirokcsomó, csontvelő biopszia) egyaránt szerepeltek. Nem tisztázott, hogy összefüggött-e a gyermek TTV fertőződése a nozokomiális járvánnyal, illetve, hogy befolyásolhatta-e a kezelés a vírus eliminációját a szervezetből?

Vizsgáltuk a nozokomiális járvány keretén belül beküldött, de a járvánnyal nem összefüggő kórházi dolgozó mintáját is, aki negatív volt TT vírusra.

5.2.2. A TTV előfordulása hazai sertésállományban

A magyarországi sertésneveldekből származó 82 sertés szérummintáját PCR-rel vizsgáltuk sertés TT vírus előfordulására. A vizsgált minták közel egyharmada, 30 % (25/82) bizonyult pozitívnak. A pozitív minták földrajzi megoszlása a 23. ábrán látható. A vizsgálatba bevont 13 farm közül három egyáltalán nem találtunk pozitív egyedeket, bár ezekről a farmokról csak kis számú (1, 1, 3 db) mintát vizsgáltunk.



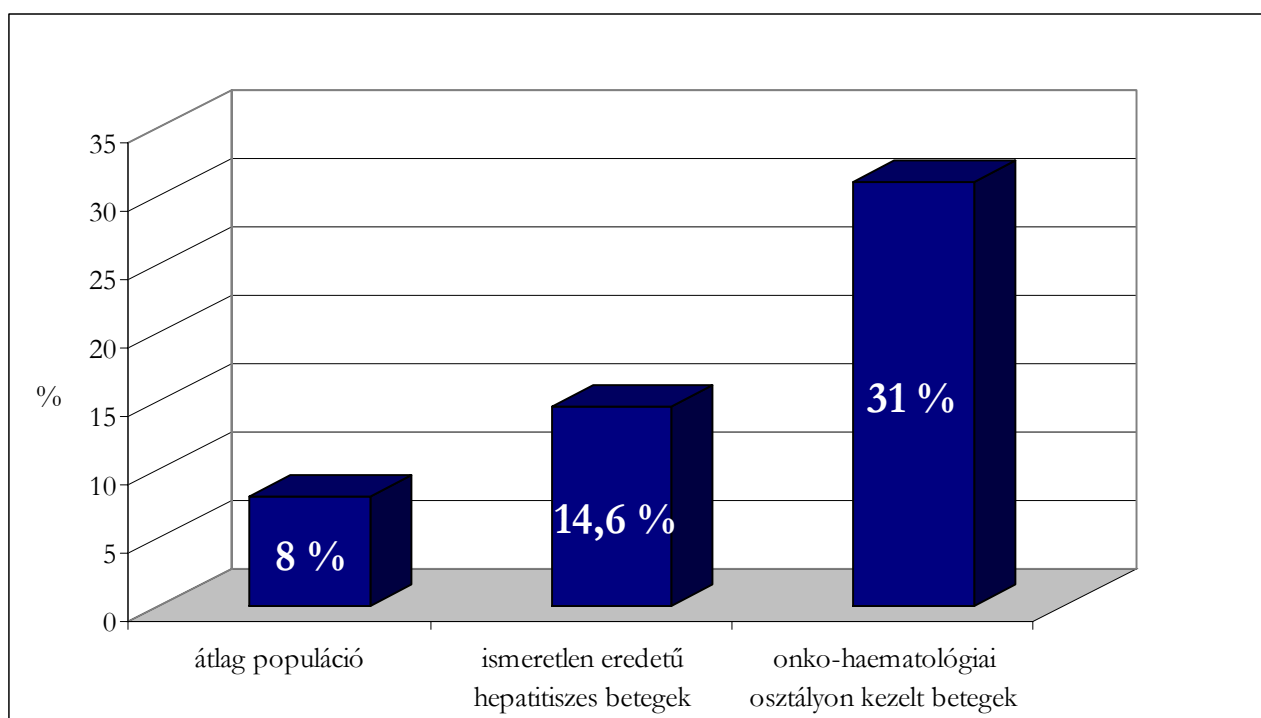
23. ábra. TTV előfordulása sertésbirtalmakon tartott sertések között. (A sertésbirtalmak F betűvel – farm – és egy számmal jelöltek. A farm megjelölése alatt az adott farmon talált TTV pozitív sertések száma található az összes vizsgált egyed számához viszonyítva.)

5.3. GBV-C/HGV vizsgálatok eredményei

5.3.1. GBV-C/HGV előfordulása rizikócsoportokban

Ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő betegek mintáinak vizsgálata: a 247, ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő beteg mintáját megvizsgálva, 36 esetben (14,6 %) tudtuk kimutatni a vírus RNS-ét (24. ábra). A betegek egy részének (9/36) mintáját választottuk ki további molekuláris vizsgálatra: a kapott PCR termékeket szekvenáltuk, a mintákat „G” betűvel és egy számmal jelöltük (G1-9).

Onko-hematológiai osztályon kezelt betegek vérmintáinak vizsgálata: az onko-hematológiai osztályon kezelték közül 29 beteg vérmintáját vizsgáltuk PCR-rel GBV-C/HG vírus előfordulására, 9 esetben kaptunk pozitív eredményt. Ebben a betegcsoportban a GBV-C/HGV prevalenciája (14,6 %) közel kétszerese volt az egészséges átlagpopulációban mért előfordulásnak (8 %) [Takács, 2002]. A magasabb arány ebben az esetben is nagy valószínűséggel a betegek gyakori vér- és/vagy vérkészítménnyel történő kezelésével magyarázható (24. ábra). A nozokomiális járványtól különálló beteg (hun24) mintája GBV-C/HGV pozitív, az adminisztrátoré pedig negatív lett. Három beteg esetében történt két, egymástól egy év különbséggel vett vérminta GBV-C/HGV vizsgálata, egyiknél sem változott az előző eredmény (2002: pozitív - 2003: pozitív).



24. ábra. A HBV előfordulása különböző rizikócsoportokban.

(Az onko-hematológiai osztályon kezelt betegek első alkalommal vett vérmintáinak eredményeit vettük figyelembe.)

5.3.2. GBV-C/HGV anti-E2 ellenanyagvizsgálatok eredményei

Ötvenegy, ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő beteg mintáját vizsgáltuk molekuláris módszerrel (PCR) valamint párhuzamosan szerológiai módszerrel (ELISA a vírus E2 burokfehérjéje ellen termelt ellenanyag kimutatására). Az 51 vizsgált minta közül 20 minta bizonyult szeropozitívnak, de ezek egyikénél sem lehetett a vírus RNS-ét kimutatni. Négy esetben lett pozitív a GBV-C/HGV PCR, ezek a minták azonban még nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű anti E2 ellenanyagot (12. táblázat). Huszonhét esetben nem tudtunk sem ellenanyagot, sem vírus nukleinsavat kimutatni.

12. táblázat. GBV-C/HGV anti-E2 ellenanyag és RNS párhuzamos kimutatására végzett vizsgálatok.

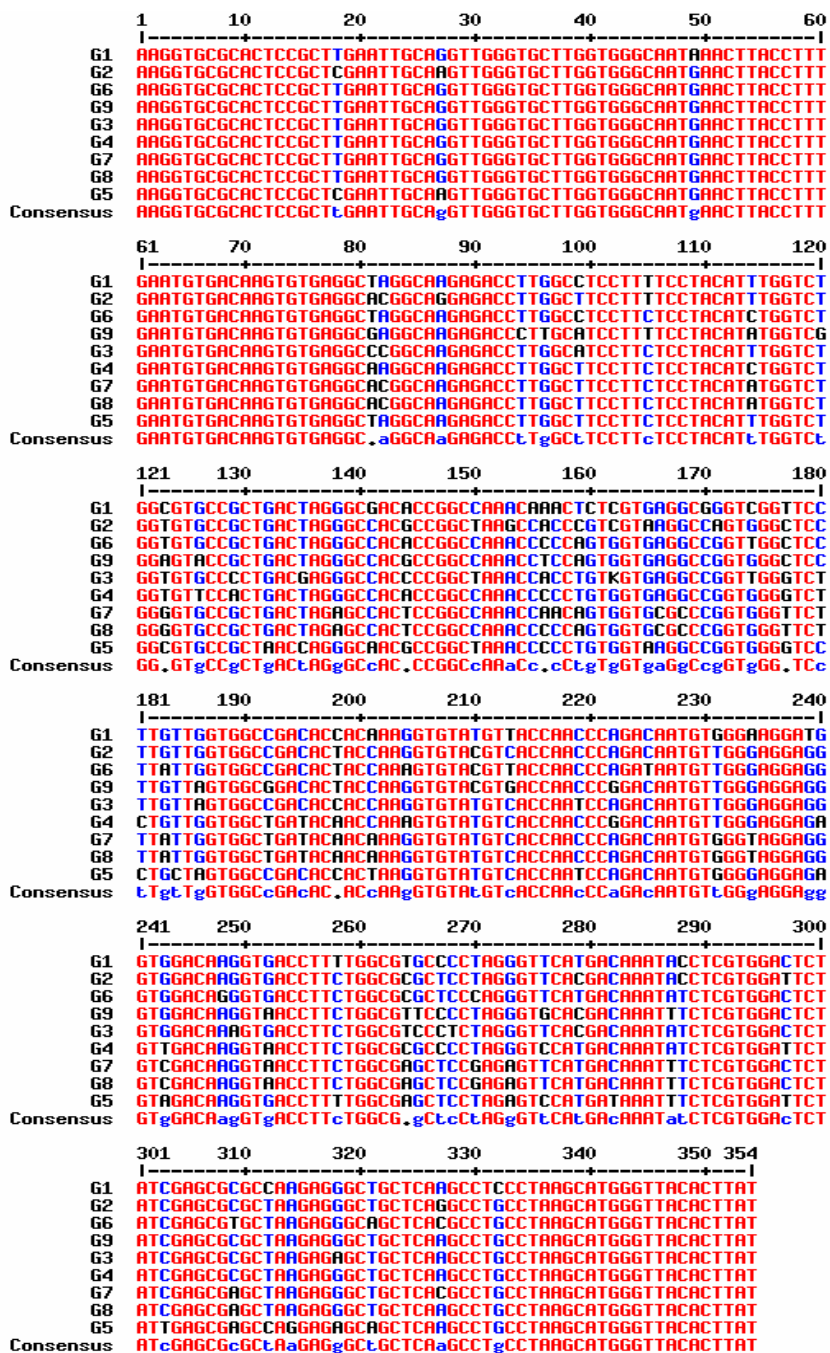
	a-E2 ellenanyag pozitív	a-E2 ellenanyag negatív	összesen:
GBV-C/HGV RNS pozitív	0	4	4
GBV-C/HGV RNS negatív	20	27	47
összesen:	20	31	51

5.3.3. GBV-C/HGV molekuláris vizsgálatok eredményei

Kilenc beteg mintáját választottuk ki szekvenálásra. Egy beteg (G4) esetében nyomonkövetéses vizsgálatot végeztünk: a jelzett betegtől 8 éves időintervallumon belül 6 alkalommal (1999, 2000,

2001, 2003, 2005, 2006 években) kaptunk – minimum egy éves időközökben levéve – vérmintát. A beteg heveny limfoblasztos leukémiában (ALL) szenvedett. Mintáját egyéb virális kórokozókra előzetesen vizsgálták (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV, VZV, TTV). A HGV kimutatása – és a felsoroltakkal együtt csak ez – adott pozitív eredményt.

A kiválasztott mintákat szekvenáltuk, és eredményeinket közzétettük a nemzetközi génbankban (*EMBL/GenBank - Nucleotide Sequence Database*), AJ313318 – AJ313326 hozzáférési számokon. A minták a vizsgált NS5, nem strukturális (foszfoprotein) fehérjét kódoló régió 354 nukleotidnyi génszakaszán átlagosan 22 %-os eltérést mutattak (25. ábra).



25. ábra. GBV-C/HGV nukleotidsorrend illesztési eredmények.

Az eltéréseknek nem mindegyike bizonyult aminosavban is kifejeződő eltérésnek, hiszen ugyanezen minták aminosavsorrend vizsgálata – a kódolt 118 aminosavnyi fehérjeszakasz esetében – mindössze 12 pozícióban eredményezett aminosavban is megmutatkozó eltérést (26. ábra). A G4 jelű beteg esetében vett vérminták nukleotidsorrend vizsgálata megegyeztek az első (1999) vérminta szekvenálási eredményével, azaz a vírus genetikai állományának ezen szakasza nem változott az évek során. (Emiatt a G4 jelű beteg mintája esetében csak egy szekvenálási eredmény szerepel a génbankban – AJ313321 hozzáférési számon.).



26. ábra. GBV-C/HGV aminosavsorrend illesztési eredmények.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A molekuláris módszerek térhódítása és rohamos fejlődése új távlatokat nyitott a kórokozók, azon belül a vírusok felfedezésében: az elmúlt két-három évtizedben majdnem annyi hepatitiszrel összefüggésbe hozott kórokozót azonosítottak, mint az ezt megelőző 100 évben. Míg nem egészen 3 évtizede az ismeretlen, feltehetően virális eredetű hepatitiszeket „*nonA-nonB*” hepatitisz vírusokként említettek, mára ez az elnevezés – a tények ismeretében – leginkább „*nonA-nonG*”-ként használatos.

Munkánk során célunk volt, hogy feltérképezzük a hepatitisz B vírus magyarországi genotípusait, és molekuláris vizsgálatokkal igazoljuk egy kórházi (nozokomiális) járvány etiológiáját. Tisztázni kívántuk, hogy jelen vannak-e Magyarországon is a közelmúltban felfedezett, hepatitiszrel összefüggésbe hozott GBV-C/HGV és TTV vírusok, és ha igen, milyen gyakorisággal mutathatók ki rizikócsoportba tartozó betegek (ismeretlen eredetű májgyulladásban szenvedők; többszörösen vértömlesztettek, vérkészítmény(ek)e)t gyakran kapók) mintáiban. Vizsgáltuk egy bizonyos genetikai variáns („vakcinaszökevény” mutáns) előfordulását feltételezhető rizikócsoportokban – B és C genotípust vírushordozókban, ahol a mutációk előfordulását előzetesen magasabb arányúnak találták – és, tekintettel a tömeges immunizáció immunszelektív hatására, kialakulásuk lehetőségét – születéskor aktívan, passzívan immunizált kisgyermekekben –, mivel ezek a vakcinaszökevény vírusok a vakcináció ellenére is okozhatnak fertőzéseket. Elvégeztük a TT vírus előfordulásának vizsgálatát hazai sertéstelepeken tartott sertésállományban, mivel egyre több érv szól amellett, hogy a sertésekben előforduló vírusok – az állatok húsát elfogyasztva, vagy egyéb, egészségügyi felhasználást (pl. xenotranszplantáció) követően – veszélyt jelenthetnek az emberre.

A munka során elért új eredmények:

1. *Hepatitisz B vírus magyarországi genotípus-eloszlásának meghatározása:* A genotípusok előfordulására irányuló vizsgálatainkhoz kiválasztottunk 24, földrajzilag eltérő helyről származó akut/krónikus (HBsAg pozitív) vírushordozót, akiknek vírusait molekuláris módszerekkel (polimeráz láncreakciót követő szekvenálás) vizsgáltuk. Leggyakrabban a „D” genotípus fordult elő 19/24 (79 %), de 5 beteg mintájában (21 %) „A” genotípusú vírust találtunk [Szomor, 2007]. Az eredményeket génbanki szekvenciákhoz történő hasonlítással és az azt követő filogenetikai analízissel kaptuk, és hibridizációval erősítettük meg. Eredményeink megfelelnek a korábban közölt, közép- és kelet-európai országokban kimutatott genotípus eloszlásnak. A hepatitisz B vírus molekuláris szintű vizsgálatához a vírus genomnak a felületi antigént meghatározó

szakaszát választottuk ki, amely viszonylagos variabilitásánál fogva egyúttal molekuláris epidemiológiai analízisre is alkalmas.

2. *Nozokomiális járvány molekuláris epidemiológiai kivizsgálása:* Egy kórházi osztályon kezelt betegek között tisztázatlan okokból hirtelen megugrott a hepatitisz B vírus hordozók (HBsAg pozitívakká váltak) száma. A betegek és kórházi dolgozók szerológiai szűrését követően 30 HBsAg pozitív minta molekuláris vizsgálatát végeztük el, a közös forrásból való fertőződésük igazolására vagy kizárására. A vizsgálatokat a betegek által hordozott vírusok előzőleg említett génszakaszának analízisével végeztük el. A szóban forgó kórházi osztályon (gyermek onkohematológia) kezelt betegek gyakran kaptak vérátömlesztést, illetve kezelésük során műtétek, invazív beavatkozások (pl. biopszia) gyakran előfordultak. Vizsgálataink alapján a kórházi járványnak közös forrása volt: a filogenetikai analízis eredménye alapján a kórházi minták egy csoportba sorolódtak, egyértelműen különválva a Magyarország eltérő földrajzi helyeiről származó mintáktól [Szomor, 2007]. A járvány kiindulópontja feltehetően az adott osztályon fekvőbetegként ápolatott egyik beteg volt, akinek vérmintájával kontaminálódhatott eszköz, felület stb. A filogenetikai analízis arra nem ad választ, hogy ki lehetett az a beteg, akitől a többiek fertőződhetek, és arra sem, hogy vajon milyen módon történt a fertőződés. Az epidemiológiai kivizsgálás eredményeképpen feltételezhető, hogy a járvány kialakulása higiéniai hiányosságokra és az osztály túlszűfoltóságára vezethető vissza, melyek kiküszöbölése (egyszer-használatos eszközök szigorú bevezetése az invazív beavatkozások és a kezelések során, kéz- és felületfertőtlenítések gyakoriságának emelése, az ágyszám csökkentése az osztályon, vírusfertőzöttek izolált ápolási lehetőségének kialakítása) után újabb fertőzések már nem váltak ismertté.
3. *„Vakcinaszökevény” vírusmutánsok keresése Magyarországon:* Bár a HBV elleni vakcináció sikeresnek mondható, a kórokozó speciális replikációjának következtében spontán, vagy már kisebb immunszelekciós hatásra is könnyen létrejöhet egy, a szelekciós nyomást kikerülő vírusváltozat („vakcinaszökevény” vírusmutánsok kialakulása), ez esetben az oltást követően kialakult védettség ellenére is létrejöhet a fertőzés. „Vakcinaszökevény” vírusmutánsok keresésére két csoport mintáinak vizsgálatát végeztük el:
 - nem magyar születési nevű várandós nők (40), akik szerológiai eredményeik alapján korábban – feltehetően többnyire „B” és „C” genotípusú vírussal – fertőződtek, közülük 19 kismama mintája bizonyult alkalmasnak további molekuláris vizsgálatra. A minták kicsit több, mint felében (10/19 - 52 %) találtunk valamilyen aminosav polimorfizmust a felületi antigén 115-166. aminosav pozíciói közé eső

fehérjeszakaszán, és csak egy esetben (P27) a vírusmutánsok kialakulásában kulcsfontosságúnak tartott hidrofíl hurkon (a 139-147. aminosav pozíciók közé eső fehérjeszakaszon)

- születéskor aktív és passzív immunizálásban részesült csecsemők (28), akik esetében az immunizálás által kiváltott szelekciós nyomás hatására kialakulhatott a keresett vírusvariáns. A 28 mintából csak 12 bizonyult további molekuláris vizsgálatra alkalmasnak, ezek közül 5 esetben (42 %) mutattunk ki olyan vírust, ahol az említett szakaszokon aminosav csere található, és ezek közül csak egy esetében esett ez a szubsztitúció a hidrofíl hurokra (V42). Sajnos nem volt lehetőség a talált vírusvariánsok oltás ellenére való fertőzőképességének bizonyítására, nem állt módunkban a mutációt hordozó kismamák újszülöttjeinek, vagy 15 hónapos korban vett vérmintáinak vizsgálatára.

Az általunk talált aminosav szubsztitúciós eltérések egyik vizsgált csoportban sem érintették a szakirodalomban konzervatívként számon tartott 107 és 138-as, 121 és 124-es, 137 és 149-es, 139 és 47-es (cisztein–cisztein) aminosav pozíciókat, amelyek – a köztük kialakuló kén-hidakkal – a felületi fehérje stabilitását biztosítják. A talált aminosav szubsztitúciós eltérések többségét – eredményeinket ezáltal is alátámasztva – már más kutatócsoportok is publikálták, ezen túlmenően néhány, eddig még nem publikált szubsztitúciós különbséget is sikerült kimutatnunk [Szomor, 2008].

Következtetésként összegezhető, hogy feladataink vannak a vírus elterjedtségének kontrollálásában:

- a szerológiai ellentmondásos eredményeket molekuláris vizsgálatokkal alá kell támasztani,
- az esetlegesen előforduló nozokomiális járványokat molekuláris epidemiológiai módon is ki kell vizsgálni
- további teendő az eredmények folyamatos publikálása is, hiszen ilyen módon érhető el, hogy a tudományos eredmények alapján a szerológiai reagenskészletet gyártó cégek egységesen érzékenyíthessék a tesztek.
- amennyiben a „vakcinaszökevény” variáns vírusok előfordulása a populációban elér egy bizonyos szintet (ennek pontos megállapítása a járványügyi központok — pl. a CDC — feladata lesz) szükségessé válhat a vakcinában alkalmazott rekombináns fehérje-variációk kibővítése, ezáltal a vakcina többféle vírusvariánssal szemben nyújthat majd védelmet. Ezt, a CDC-ben, 2009. június 4-5. között tartott, „*Drug-resistant and Vaccine-escape Hepatitis B Virus*

Mutants: Emergence and Surveillance” címmel megtartott szimpóziumon hallottak alapján, jelenleg még nem tartják szükségesnek.

4. *Torque Teno vírus (TTV) előfordulása rizikócsoportokban; TTV molekuláris vizsgálatok*

a. *Ismeretlen eredetű hepatitiszesek vizsgálata:* 228 ismeretlen eredetű hepatitiszes beteg mintáját vizsgáltuk, a vírus DNS-ét 115 esetben (50,4%) tudtuk kimutatni. Tizenhét beteg esetében végeztünk további molekuláris vizsgálatokat: a kapott PCR termékeket klónoztuk, majd az így kapott 26 klónt szekvenáltuk. Mivel a TTV változékony, egy egyénben egyidejűleg több különböző szekvenciájú TT vírus is jelen lehet, amit eredményeink is tükröztek: mind a 26 klón eltérő szekvenciájú vírus jelenlétét bizonyította, melyek nagy többséggel (24/26) az 1-es genocsoportba, míg két klón a 2-es genocsoportba tartozott. Ugyanazon betegek esetében mind azonos, mind pedig különböző genocsoportokba tartozó, több genotípussal való fertőzésekre is találtunk bizonyítékot. A vírusok nukleotidsorrendjében talált eltérések nem minden esetben fejeződtek ki aminosavsorrendbeli változásban [Takács, 2003].

b. *Onko-hematológiai osztályon kezelt betegek vérmintáinak vizsgálata:* Az említett kórházi osztályon kezelt 29 beteg mintáját vizsgáltuk TT vírus előfordulására. A 29 mintából 19 bizonyult pozitívnak (65,5%).

Összehasonlítva az átlag magyarországi népességgel, a TTV esetében mindkét vizsgált csoportban jóval magasabb vírushordozási arányt találtunk: 18,5 % (egészséges populáció) vs. 50,4 % (ismeretlen eredetű hepatitiszesek) és 65,5 % (onko-hematológiai osztályon kezelték). Kijelenthető, hogy minden bizonnyal szerepet játszik e két vizsgált rizikócsoport magas TTV prevalencia értékeiben a vér (testnedvek) útján történő terjedési mód. Hasonló rizikócsoportok vizsgálatánál szintén magas prevalencia értékeket kaptak más kutatócsoportok is, de – a TTV 1-es genotípusától eltekintve – nem egyértelműen bizonyított a kapcsolat a magas előfordulási arány és bármilyen klinikai kórforma között.

- *Torque Teno vírus előfordulása hazai sertéstelepeken tartott sertésállományban:* A TT vírus előfordulására végzett vizsgálatokhoz 13 hazai sertéstelepet választottunk ki. A vizsgálatokba bevont farmok 77 %-án (10/13) tartott állatállományban előfordult a vírus. Az összesen vizsgált 82 sertés 30 %-a (25 egyed) bizonyult pozitívnak. A vizsgálatok során elsőként mutattunk ki hazai sertésekből TT vírust [Takács, 2008].

5. *GBV-C/HGV vírus vizsgálatok*

- a. *Ismeretlen eredetű hepatitiszesek molekuláris vizsgálata:* 247, ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő beteg mintáját vizsgáltuk GBV-C/HGV jelenlétére, a betegek mintáinak 14,6 %-ában találtunk kimutatható vírus RNS-t (36/247). Kilenc beteg esetében végeztünk további molekuláris vizsgálatokat (szekvenálás), egy beteg esetében pedig éveken át tartó nyomonkövetéses vizsgálatot. A kérdéses beteg nyomonkövetéses vizsgálata során a vírusgenom vizsgált szakaszán az évek során nem tapasztaltunk változást [Takács, 2002].
- b. *Onko-hematológiai osztályon kezelt betegek vérmintáinak vizsgálata:* 29 onko-hematológiai beteg mintáját vizsgáltuk GBV-C/HGV előfordulására, 9 beteg mintája bizonyult pozitívnak (31 %). Összehasonlítva az átlag magyarországi népességgel, a GBV-C/HGV esetében szintén mindkét vizsgált csoportban magasabb vírushordozási arányt találtunk: 8 % (egészséges populáció) vs. 14,6 % (ismeretlen eredetű hepatitiszesek) és 31 % (onko-hematológiai osztályon kezelték).
- c. *GBV-C/HGV vírus ellenanyag vizsgálatok:* Az ismeretlen eredetű hepatitiszben szenvedő betegek mintái közül 51-et vizsgáltuk molekuláris módszerrel (PCR) valamint párhuzamosan szerológiai módszerrel (ELISA a vírus E2 burokfehérjéje ellen termelt ellenanyag kimutatására). Szeropozitivitást 39 %-uknál (20/51) találtunk, de a szeropozitív mintákban egy esetben sem lehetett a vírus RNS-ét kimutatni. Négy esetben lett pozitív a GBV-C/HGV PCR, ezek a minták azonban feltehetően még nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű anti E2 ellenanyagot. Huszonhét esetben nem tudtunk sem ellenanyagot, sem vírus nukleinsavat kimutatni [Takács, 2002].

7. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

1. ABE K, INAMI T, ASANO K, MIYOSHI C, MASAKI N, HAYASHI S, ISHIKAWA K, TAKEBE Y, WIN KM, EL-ZAYADI AR, HAN KH, ZHANG DY (1999): TT virus infection is widespread in the general populations from different geographical regions. *J Clin Microbiol* 37:2703-5.
2. ALLANDER T, TAMMI MT, ERIKSSON M, BJERKNER A, TIVELJUNG-LINDELL A, ANDERSSON B (2005): Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12891-6.
3. ANZOLA M (2004): Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 11:383-93.
4. ARAUZ-RUIZ P, NORDER H, ROBERTSON BH, MAGNIUS LO (2002): Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83: 2059-73.
5. BALAYAN MS, ANDJAPARIDZE AG, SAVINSKAYA SS, KETILADZE ES, BRAGINSKY DM, SAVINOV AP, POLESCHUK VF (1983): Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20:23-31.
6. BARBERA C, CALVO P, COSCIA A, PERUGINI L, DASTOLI G, RANDONE A, BONINO F, BRUNETTO MR (1994): Precore mutant hepatitis B virus and outcome of chronic infection and hepatitis in hepatitis B e antigen-positive children. *Pediatr Res* 36:347-50.
7. BCM - 6 Frame Translation: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>
8. BENDINELLI M, PISTELLO M, MAGGI F, FORNAI C, FREER G, VATTERONI ML (2001): Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* 14:98-113.
9. BIAGINI P, CHARREL RN, DE MICCO P, DE LAMBALLERIE X (2003): Association of TT virus primary infection with rhinitis in a newborn. *Clin Inf Dis* 36:128-9.
10. BIAGINI P: Classification of TTV and related viruses. pp. 21-33. In: ETHEL-MICHELE de VILLIERS, HARALD zur HAUSEN eds. (2008): *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens*. Springer Berlin Heidelberg
11. BIAGINI P: Genus Anellovirus. pp. 335-41. In: FAQUET CM, MAYO MA, MALINOFF J, DESSELBERGER U, BALL LA eds. (2005): *Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York, Elsevier

12. BIGARRÉ L, BEVEN V, DE BOISSÉSON C, GRASLAND B, ROSE N, BIAGINI P, JESTIN A (2005): Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. *J Gen Virol* 86:631-5.
13. BLANC PL, BOUMRAZNE R, SARZIER JM, FOREL C (2008): Extrahepatic symptoms in the course of GBV-C/HGV infection. *Med Mal Infect* 2008 Nov 14. PMID: 19010628
14. BLAST - Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
15. BLAZSEK A, SILLO P, ISHII N, GERGELY P JR, POOR G, PREISZ K, HASHIMOTO T, MEDVECZ M, KÁRPÁTI S (2008): Searching for foreign antigens as possible triggering factors of autoimmunity: Torque Teno virus DNA prevalence is elevated in sera of patients with bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 17:446-54.
16. BLUMBERG BS, GERSTLEY BJ, HUNGERFORD DA, LONDON WT, SUTNICK AI (1967): A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 66:924-31.
17. BLUMBERG BS, SUTNICK AI, LONDON WT (1969): Australia antigen and hepatitis. *JAMA* 207:1895-6.
18. BOZDAYI G, TÜRKYILMAZ AR, IDILMAN R, KARATAYLI E, ROTA S, YURDAYDIN C, BOZDAYI AM (2005): Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol* 76:476-81.
19. BRUNETTO MR, GIARIN MM, OLIVERI F, CHIABERGE E, BALDI M, ALFARANOT A, SERRAT A, SARACCO G, VERME G, WILLS H, BONINO F (1991): Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4186-90.
20. BUDAI J (1999): Védőoltás B hepatitis ellen. *Hippocrates. Családorvosi és foglalkozás-egészségügyi folyóirat*. 1:304.
21. CACOUB P, SAADOUN D, BOURLIÈRE M, KHIRI H, MARTINEAU A, BENHAMOU Y, VARASTET M, POL S, THIBAUT V, ROTILY M, HALFON P (2005): Hepatitis B genotypes and extrahepatic manifestations. *J Hepatol* 43:764-770.
22. 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. *The Lancet* 336:325-9.
23. CÁSTKOVÁ J, BENEŠ C (2009): Increase in hepatitis A cases in the Czech Republic in 2008 – an update. *Euro Surveill* 14:19091.
24. CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2001): Updated U.S. Public Health Service. Guidelines for the Management of Occupational Exposures to

- HBV, HCV, and HIV and Recommendations for Postexposure Prophylaxis. *MMWR* 50(RR-11):3-4.
25. CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2006): <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/TestingChronic.htm>
 26. CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2008): Recommendations for Identification and Public Health Management of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *MMWR* 57(RR-8)
 27. CHEN BP, RUMI MG, COLOMBO M, LIN YH, RAMASWAMY L, LUNA J, LIU JK, PRATI D, MANNUCCI PM (1999): TT virus is present in a high frequency of Italian hemophilic patients transfused with plasma-derived clotting factor concentrates. *Blood* 54: 4333-6.
 28. CHEN GG, LI MY, HO RL, CHAK EC, LAU WY, LAI PB (2005): Identification of hepatitis B virus X gene mutation in Hong Kong patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Virol* 34:7-12.
 29. CHEN WN, OON CJ (2000): Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutants in Singapore adults and vaccinated children with high anti-hepatitis B virus antibody levels but negative for HBsAg. *J Clin Microbiol* 38:2793-4.
 30. CHEN WN, OON CJ, KOH S (2000b): Horizontal transmission of a hepatitis B virus surface antigen mutant. *J Clin Microbiol* 38:938-9.
 31. CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M (1989): Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-62.
 32. CHOO QL, WEINER AJ, OVERBY LR, KUO G, HOUGHTON M, BRADLEY DW (1990): Hepatitis C virus: The major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 46:423-41.
 33. CHU CJ, HUSSAIN M, LOK AS (2002): Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 122:1756–62.
 34. CHU CJ, LOK AS (2002b): Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 35:1274–6.
 35. COLEMAN PF (2006): Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerg Inf Dis* 12:198-203.
 36. COOREMAN MP, LEROUX-ROELS G, PAULIJ WP (2001): Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci* 8:237-47.

37. CSOHÁN Á, MOLNÁR ZS, JELENIK ZS, MELLES M, PAULINY ZS, BÉKÉSI ZS (2008): Módszertani levél a 2008. évi védőoltásokról. *Epinfo*. 15 (1. különszám)
38. DANE DS, CAMERON CH, BRIGGS M. (1970): Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *The Lancet* 1: 695-8.
39. DENCS A, SEBESTYÉN Á (2007): Prevalence and genotypes of hepatitis G virus/GB virus C in a multirisk group in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54:305-16.
40. 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* 69:331-8.
41. EMBL/GenBank - Nucleotide Sequence Database: <http://www.ebi.ac.uk/embl/>
42. EPINFO (2006): A hazai járványügyi helyzet általános jellemzése. *Epinfo* 13:457
43. EPINFO (2007): A hazai járványügyi helyzet általános jellemzése. *Epinfo* 14:424
44. FABRIZI F, MARTIN P (1999): GBV-C/HGV infection in end-stage renal disease *J Nephrol* 12:131-9.
45. FEINSTONE SM, KAPIKIAN AZ, PURCELL RH. (1973): Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-8.
46. GANEM D, PRINCE AM (2004): Hepatitis B virus infection - natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350:1118-29.
47. GERLICH WH (2004): Diagnostic problems caused by HBsAg mutants - A consensus report of an expert meeting. *Intervirology* 47:310-3.
48. GERNER P, OETTINGER R, GERNER W, FALBREDE J, WIRTH S (2000): Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Inf Dis J* 19:1074-8.
49. GIRLANDA R, MOHSEN AH, SMITH H, SABLON E, YUEN MF, O'GRADY J, MUIESAN P, RELA M, HEATON N, NORRIS S (2004): Hepatitis B virus genotype A and D and clinical outcomes of liver transplantation for HBV-related disease. *Liver Transplant* 10: 58-64
50. HASSOBA HM, PESSOA MG, TERRAULT NA, LEWIS NJ, HAYDEN M, HUNT JC, QIU X, LOU SC, WRIGHT TL (1998): Anti-envelope antibodies are protective against GBV-C reinfection: evidence from the liver transplant model. *J Med Virol* 56:253-8.
51. HASSOBA HM, TERRAULT NA, EL-GOHARY AM, SCHEFFEL C, JOU C, BRACKETT J, HUNT J, LOU SC, WRIGHT TL (1997): Antibody to GBV-C second

- envelope glycoprotein (anti-GBV-C E2): is it a marker for immunity? *J Med Virol* 53:354-60.
52. 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* 47:759-63.
53. HATTORI J, OKUMURA N, YAMAZAKI Y, UCHIYAMA M, HAMAGUCHI M, NISHIYAMA Y, KANEDA T (2007): Beneficial effect of GB virus C co-infection in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Microbiol Immunol* 51:193-200.
54. HINO K, KATOH Y, VARDAS E, SIM J, OKITA K, CARMAN WF (2001): The effect of introduction of universal childhood hepatitis B immunization in South Africa on the prevalence of serologically negative hepatitis B virus infection and the selection of immune escape variants. *Vaccine* 19:3912-18.
55. HINO S, MIYATA H.(2007): Torque teno virus (TTV): current status. Review. *Rev Med Virol* 17:45-57.
56. HSU HY, CHANG MH, LIAW SH, NI YH, CHEN HL (1999): Changes of hepatitis B surface antigen variants in carrier children before and after universal vaccination in Taiwan. *Hepatology* 30:1312-7.
57. HUANG LY, OYSTEIN JONASSEN T, HUNGNES O, GRINDE B (2001): High prevalence of TT virus-related DNA (90 %) and diverse viral genotypes in norwegian blood donors. *J Med Virol* 64:381-6.
58. HUY TT, USHIJIMA H, WIN KM, LUENGROJANAKUL P, SHRESTHA PK, ZHONG ZH, SMIRNOV AV, TALTAVULL TC, SATA T, ABE K. (2003): High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol* 41: 5449-55.
59. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4, April 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>
60. IKEDA M, SUGIYAMA K, MIZUTANI T, TANAKA T, TANAKA K, SHIMOTOHNO K, KATO N. (1997): Hepatitis G virus replication in human cultured cells displaying susceptibility to hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 235:505-8.
61. ISHIKAWA T, HAMANO Y, OKAMOTO H (1999): Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. *Infection* 27:298. (letter)
62. KAKKOLA L, BONDÉN H, HEDMAN L, KIVI N, MOISALA S, JULIN J, YLÄ-LIEDENPOHJA J, MIETTINEN S, KANTOLA K, HEDMAN K, SÖDERLUND-

- VENERMO M (2008): Expression of all six human Torque teno virus (TTV) proteins in bacteria and in insect cells, and analysis of their IgG responses. *Virology* 382:182-9.
63. KAO JH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS (2000): Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118:554-9.
64. KARAYIANNIS P, MCGARVEY MJ (1995): The GB hepatitis viruses. *J Viral Hepat* 2:221-6.
65. KIDD-LJUNGGREN K (1996): Variability in hepatitis B virus DNA: phylogenetic, epidemiological and clinical implications. *Scand J Infect Dis* 28:111-6.
66. KIDD-LJUNGGREN K, EKDAHL K, OBERG M, KURATHONG S, LOLEKHA S (1995): Hepatitis B virus strains in Thailand: genomic variants in chronic carriers. *J Med Virol* 47:451-61.
67. KIDD-LJUNGGREN K, MIYAKAWA Y, KIDD AH (2002): Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 83:1267-80.
68. KONDILI LA, GENOVESE D, ARGENTINI C, CHIONNE P, TOSCANI P, FABRO R, COCCONI R, RAPICETTA M (2006): Nosocomial transmission in simultaneous outbreaks of hepatitis C and B virus infections in a hemodialysis center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25:527-31.
69. KRAMVIS A, KEW M, FRANCOIS G (2005): Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23:2409-23.
70. KUMAR S, TAMURA K, NEI M (2004): MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-63.
71. KURBANOV F, TANAKA Y, FUJIWARA K, SUGAUCHI F, MBANYA D, ZEKENG L, NDEMBI N, NGANSOP C, KAPTUE L, MIURA T, IDO E, HAYAMI M, ICHIMURA H, MIZOKAMI M (2005): A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 86:2047-56.
72. LA'ULU SL, ROBERTS WL (2006): The analytic sensitivity and mutant detection capability of six hepatitis B surface antigen assays. *Immunopathology* 125:748-51.
73. LEFRÈRE JJ, 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 co-infected persons. *J Infect Dis* 179:783-9.
74. LEYENDECKER B, KLAPP F (1989): Human hepatitis experiments in the 2d World War. *Z Gesamte Hyg* 35:756-60.

75. LINDH M, HANNOUN C, DHILLON AP, NORKRANS G, HORAL P (1999): Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 179:775–82.
76. LINNEN J, WAGES J JR, ZHANG-KECK ZY, FRY KE, KRAWCZYNSKI KZ, ALTER H, KOONIN E, GALLAGHER M, ALTER M, HADZIYANNIS S, KARAYIANNIS P, FUNG K, NAKATSUJI Y, SHIH JW, YOUNG L, PIATAK M JR, HOOVER C, FERNANDEZ J, CHEN S, ZOU JC, MORRIS T, HYAMS KC, ISMAY S, LIFSON JD, HESS G, FOUNG SK, THOMAS H, BRADLEY D, MARGOLIS H, KIM JP (1996): Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 271:505-8.
77. LOCARNINI S, McMILLAN J, BARTHOLOMEUSZ A (2003): The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis* 23:5-20.
78. LOK AS, HUSSAIN M, CURSANO C, MARGOTTI M, GRAMENZI A, GRAZI GL, JOVINE E, BENARDI M, ANDREONE P (2000): Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. *Hepatology* 32:1145-53.
79. M. BROJNÁS J, RUSVAI E, M. TÓTH E, LENGYEL A, TAKÁCS M, BERENCSI GY: Klasszikus hepatitisz vírusok. 40-51. p. In: BERENCSI GY (szerk.) (2005): *Orvosi molekuláris virológia*. (Medicina Kiadó)
80. MAGGI F, FORNAI C, MORRICA A, CASULA F, VATTERONI ML, MARCHI S, CICCOROSSI P, RIENTE L, PISTELLO M, BENDINELLI M (1999): High prevalence of TT virus viremia in Italian patients, regardless of age, clinical diagnosis, and previous interferon treatment. *J Infect Dis* 180 :838-42.
81. MAGNIUS LO, ESPMARK JA (1972): New Specificities in Australia Antigen Positive Sera Distinct from the Le Bouvier Determinants *J Immunol* 109:1017-21.
82. MARTÍNEZ L, KEKARAINEN T, SIBILA M, RUIZ-FONS F, VIDAL D, GORTÁZAR C, SEGALÉS J (2006): Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol* 118:223-9.
83. MASIA G, INGIANNI A, DEMELIA L, FAA G, MANCONI PE, PILLERI G, CIANCIO A, RIZZETTO M, COPPOLA RC (2001): TT virus infection in Italy: prevalence and genotypes in healthy subjects, viral liver diseases and asymptomatic infections by parenterally transmitted viruses. *J Viral Hepat* 8:384-90.
84. MATSUMOTO A, YEO AE, SHIH JW, TANAKA E, KIYOSAWA K, ALTER HJ (1999): Transfusion associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* 30:283-8.

85. MAYERAT C, MANTEGANI A, FREI PC (1999): Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 6:299–304.
86. McDONALD S (1908): Acute yellow atrophy of the liver. *Edin Med J* 1:83–8.
87. MEEHAN BM, MCNEILLY F, TODD D, KENNEDY S, JEWHRST VA, ELLIS JA, HASSARD LE, CLARK EG, HAINES DM, ALLAN GM (1998): Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79:2171-9.
88. MIHÁLY I, LUKÁCS A, RÓKUSZ L: Injeksiós balesetek és vírusinfekciók egészségügyi dolgozók között. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* 4:160-5.
89. MIZUOCHI T, OKADA Y, UMEMORI K, MIZUSAWA S, SATO S, YAMAGUCHI K (2005): Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial diagnostic kits available in Japan. *Jpn J Infect Dis* 58:83-7.
90. MOROZOV I, SIRINARUMITR T, SORDEN SD, HALBUR PG, MORGAN MK, YOON KJ, PAUL PS (1998): Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36: 2535-41.
91. MPHAHLELE MJ, LAU GK, CARMAN WF (1998): HGV: the identification, biology and prevalence of an orphan virus. *Liver* 18:143-55.
92. MUELLER B, MAERZ A, DOBERSTEIN K, FINSTERBUSCH T, MANKERTZ A (2008): Gene expression of the human Torque Teno Virus isolate P/1C1. *Virology* 381:36-45.
93. 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.
94. MUERHOFF AS, SMITH DB, LEARY TP, ERKER JC, DESAI SM, MUSHAHWAR IK (1997): Identification of GB virus C variants by phylogenetic analysis of the 5'-untranslated and coding region sequences. *J Virol* 71:6501-8.
95. MULTIPLE ALIGNMENT - ClustalW:
http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalwan.html
96. MUSHAHWAR IK, ERKER JC, MUERHOFF AS, LEARY TP, SIMONS JN, BIRKENMEYER LG, CHALMERS ML, PILOT-MATIAS TJ, DEXAI SM (1999): Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3177-82.
97. NAGANUMA M, TOMINAGA N, MIYAMURA T, SODA A, MORIUCHI M, MORIUCHI H (2008): TT virus prevalence, viral loads and genotypic variability in saliva from healthy Japanese children. *Acta Paediatr* 97:1686-90.

98. NIJHUIS M, VAN MAARSEVEEN NM, BOUCHER CA (2009): Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. *Handb Exp Pharmacol* 189:299-320.
99. 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* 241:92-7.
100. NISHIZAWA T, OKAMOTO H, TSUDA F, AIKAWA T, SUGAI Y, KONISHI K, AKAHANE Y, UKITA M, TANAKA T, MIYAKAWA Y, MAYUMI M (1999): Quasispecies of TT virus TTV with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* 73:9604-8.
101. OHTO H, UJIE N, TAKEUCHI C, SATO A, HAYASHI A, ISHIKO H, NISHIZAWA T, OKAMOTO H; VERTICAL TRANSMISSION OF HEPATITIS VIRUSES COLLABORATIVE STUDY GROUP (2002): TT virus infection during childhood. *Transfusion* 42:892-8.
102. OKAMOTO H (2007): Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. (Review) *Virus Res* 127:216-28.
103. OKAMOTO H, AKAHANE Y, UKITA M, FUKUDA M, TSUDA F, MIYAKAWA Y, MAYUMI M (1998): Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 56:128-32.
104. OKAMOTO H, NISHIZAWA T, UKITA M (1999): A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirol* 42:196-204.
105. 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 tupaia. *J Gen Virol* 83:1291-7.
106. OKOCHI K, MURAKAMI S (1968): Observations on Australia antigen in the Japanese. *Vox Sang* 15, 374-85.
107. OLINGER CM, JUTAVIJITTUM P, HÜBSCHEN JM, YOUSUKH A, SAMOUNTRY B, THAMMAVONG T, TORIYAMA K, MULLER CP (2008): Possible New Hepatitis B Virus Genotype, Southeast Asia *Emerg Inf Dis* 14 1777-80.
108. OON CJ, CHEN WN, LIM N, KOH S, LIM GK, LEONG AL, TAN GS (1999): Hepatitis B virus variants with lamivudine-related mutations in the DNA polymerase and the 'a' epitope of the surface antigen are sensitive to ganciclovir. *Antiviral Res* 41:113-8.

109. OON CJ, CHEN WN, ZHAO Y, TENG SW, LEONG AL (1999b): Detection of hepatitis surface antigen mutants and their integration in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 136:95-9.
110. ORITO E, MIZOKAMI M, SAKUGAWA H, MICHITAKA K, ISHIKAWA K, ICHIDA T, OKANOUE T, YOTSUYANAGI H, IINO S (2001) A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 33:218–23.
111. PÁR A, TAKÁCS M, BROJNÁS J, BERENCSEI G, PAÁL M, HORÁNYI M, MISETA A, HEGEDÜS G, MÓZSIK G, HUNYADY B (2004): Co-infections with hepatitis G and TT virus in patients with chronic hepatitis C in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 51:437-47.
112. 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.
113. PEREVOSCIKOV S, LUCENKO I, MAGONE S, BRILA A, CURIKOVA J, VENNEMA H (2009): Community-wide outbreak of hepatitis A in Latvia in 2008 – an update. *Euro Surveill* 14:19092.
114. PRIMI D; FIORDALISI G, MANTERO GL, MATTIOLI S, SOTTINI A, BONELLI F, VAGLINI L, OLIVERO P, DAL CORSO A, BONELLI M (2000): Identification of SENV genotypes. *Internat. Publ.* WO/2000/028039 (szabadalom)
115. PRINCE AM (1968): An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Nat Acad Sci* 60:814-821.
116. RIZZETTO M, CANESE MG, ARICÒ S, CRIVELLI O, TREPO C, BONINO F, VERME G (1977): Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (δ /anti- δ) associated to the hepatitis B virus in the liver and serum of HBsAg carriers. *Gut* 18:997–1003.
117. ROSENHEIM M, CADRANEL JF, STUYVER L, DORENT R, GOLLIOT F, ASTAGNEAU P, DI MARTINO V, DELCOURT A, GANDJBAKHCH I, HURAUX JM, LUNEL F (2006): Nosocomial transmission of hepatitis B virus associated with endomyocardial biopsy. *Gastroenterol Clin Biol* 30:1274-80.
118. ROSS RS, VIAZOV S, RUNDE V, SCHAEFER UW, ROGGENDORF M (1999): Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol* 13:181-4.
119. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. eds. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, USA. 1989.

120. SIMONS JN, LEARY TP, DAWSON GJ, PILOT-MATIAS TJ, MUERHOFF AS, SCHLAUDER GG, DESAI SM, MUSHAHWAR IK (1995): Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1:564-9.
121. SMITH DB, BASARAS M, FROST S, HAYDON D, CUCEANU N, PRESCOTT L, KAMENKA C, MILLBAND D, SATHAR MA, SIMMONDS P (2000): Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus. *J Gen Virol* 81:769-80.
122. SOMINSKAYA I, MIHAILOVA M, JANSONS J, EMELYANOVA V, FOLKMANE I, SMAGRIS E, DUMPIS U, ROZENTALS R, PUMPENS P (2005): Hepatitis B and C virus variants in long-term immunosuppressed renal transplant patients in Latvia. *Intervirolog* 48:192-200.
123. SOSPEDRA M, ZHAO Y, ZUR HAUSEN H, MURARO PA, HAMASHIN C, DE VILLIERS EM, PINILLA C, MARTIN R (2005): Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity. *PLoS Pathog* 1: e41.
124. STAPLETON JT, WILLIAMS CF, XIANG J (2004): GB virus type C: a beneficial infection? *J Clin Microbiol* 42:3915-9.
125. SUGAUCHI F, KUMADA H, ACHARYA SA, SHRESTHA SM, GAMUTAN MT, KHAN M, GISH RG, TANAKA Y, KATO T, ORITO E, UEDA R, MIYAKAWA Y, MIZOKAMI M (2004): Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* 85:811-20.
126. Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Kawabe Y, Yokoyama T, Wada Y (2000): Prevalence of TTV DNA among children with a history of transfusion or liver disease. *J Med Virol* 60:172-6.
127. SZAKMAI KOLLÉGIUMI AJÁNLÁS — összeállította: GERVAIN J, HORVÁTH G, HUNYADY B, MAKARA M, PÁR A, SZALAY F, TORNAI I, TELEGDY L (2008): Protokoll a krónikus B hepatitisek antivirális kezelésére. *Infektológia és klinikai mikrobiológia* 15:126-8.
128. SZOMOR KN, DENCS A, 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* 153:1885-92.
129. 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* 152:697-704.
130. TAKÁCS M, BALOG K, TÓTH G, BALOGH Z, SZOMOR KN, BROJNÁS J, RUSVAI E, MINÁROVITS J, BERENCSI G (2003): TT virus in Hungary: sequence heterogeneity and mixed infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35:153-7.

131. TAKÁCS M, BARCSAY E, DENCS Á, HETTMANN A, TRESÓ B, CSÉPAI MM, GYŐRI Z, RUSVAI E (2009): Hepatitis és HIV-markerek vizsgálata magyarországi börtönökben. Közlésre elfogadva az *Egészségtudomány* c. folyóiratban.
132. 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* 56:547-53.
133. TAKÁCS M, SZOMOR KN, SZENDROI A, DENCS A, BROJNÁS J, RUSVAI E, BERENCSEI G (2002): Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus in Hungary. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34:283-7.
134. TANAKA Y, PRIMI D, WANG RY, UMEMURA T, YEO AE, MIZOKAMI M, ALTER HJ, SHIH JW. (2001): Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *J Inf Dis* 183:359-67.
135. TILLMANN HL, HEIKEN H, KNAPIK-BOTOR A, HERINGLAKE S, OCKENGA J, WILBER JC, GOERGEN B, DETMER J, MCMORROW M, STOLL M, SCHMIDT RE, MANNS MP (2001): Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* 345:715-24.
136. TORRESI J, EARNEST-SILVEIRA L, DELIYANNIS G, EDGTON K, ZHUANG H, LOCARNINI SA, FYFE J, SOZZI T, JACKSON DC (2002): Reduced Antigenicity of the Hepatitis B Virus HBsAg Protein Arising as a Consequence of Sequence Changes in the Overlapping Polymerase Gene That Are Selected by Lamivudine Therapy. *Virology* 293:305-13.
137. TRAN TT, TRINH TN ABE K (2008): New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol* 82:5657-63.
138. TSUDA F, OKAMOTO H, UKITA M, TANAKA T, AKAHANE Y, KONISHI K, YOSHIZAWA H, MIYAKAWA Y, MAYUMI M (1999): Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* 77:199–206.
139. 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. *Hepatology Res* 19:1–11.
140. UKITA M, OKAMOTO H, KATO N, MIYAKAWA Y, MAYUMI M (1999): Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* 179:1245-8.

141. van STEENBERGEN JE, NIESTERS HG, OP de COUL EL, van DOORNUM GJ, OSTERHAUS AD, LEENTVAAR-KUIJPERS A, COUTINHO RA, van den HOEK JA (2002): Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Amsterdam 1992-1997. *J Med Virol* 66:159-65.
142. VIVEKANANDAN P, ABRAHAM P, SRIDHARAN G, CHANDY G, DANIEL D, RAGHURAMAN S, DANIEL HD, SUBRAMANIAM T (2004): Distribution of hepatitis B virus genotypes in blood donors and chronically infected patients in a tertiary care hospital in Southern India. *Clin Infect Dis* 38: e81-6.
143. VOEGT H (1942): Zur Aetiologie der Hepatitis epidemica. *Munch Med Wschr.* 89: 76-9.
144. WEBER B (2005): Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 32:102-12.
145. WHO - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Revised in August 2008
146. WILLIAMS CF, KLINZMAN D, YAMASHITA TE, XIANG J, POLGREEN PM, RINALDO C, LIU C, PHAIR J, MARGOLICK JB, ZDUNEK D, HESS G, STAPLETON JT (2004): Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med* 350:981-90.
147. WILSON JN, NOKES DJ, CARMAN WF (2000): Predictions of the emergence of vaccine-resistant hepatitis B in The Gambia using a mathematical model. *Epidemiol Infect* 124:295-307.
148. XIANG J, MCLINDEN JH, CHANG Q, JORDAN EL, STAPLETON JT (2008): Characterization of a peptide domain within the GB virus C NS5A phosphoprotein that inhibits HIV replication. *PLoS ONE* 3:e2580.
149. YAN J, DENNIN RH (2000): A high frequency of GBV-C/HGV coinfection in hepatitis C patients in Germany. *World J Gastroenterol* 6:833-41.
150. YANG JF, DAI CY, CHUANG WL, LIN WY, LIN ZY, CHEN SC, HSIEH MY, WANG LY, TSAI JF, CHANG WY, YU ML (2006): Prevalence and Clinical Significance of HGV/GBV-C Infection in Patient with Chronic Hepatitis B or C. *Jpn J Infect Dis* 59:25-30.
151. YOSHIBA M, OKAMOTO H, MISHIRO S (1995): Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown etiology. *The Lancet* 346:1131-2.
152. ZANETTI AR, TANZI E, MANZILLO G, MAIO G, SBREGLIA C, CAPORASO N, THOMAS H, ZUCKERMAN AJ (1988): Hepatitis B variant in Europe. *The Lancet* 2(8620):1132-3.

153. ZHENG H, YE L, FANG X, LI B, WANG Y, XIANG X, KONG L, WANG W, ZENG Y, YE L, WU Z, SHE Y, ZHOU X (2007): Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with kappaB kinases. *J Virol* 81:11917-24. Erratum in: *J Virol* 82:593. (2008)

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dolgozatom egyik legfontosabb részének tekintem a köszönetnyilvánítást, hiszen így fejezhetem ki hálámat mindazoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Szeretnék tehát köszönetet mondani *dr. Berencsi Györgynek*, aki felnyitotta szememet a virológia tudományának szépsége iránt, és aki lenyűgözött széleslátókörűségével és mély tudásával, de ugyanígy hálás vagyok témavezetőmnek, *dr. Takács Máriának*, aki remek ötleteivel, gyakorlati tanácsaival tevékenyen irányította munkámat, terápiás célzatú dicsérő szavaival pedig bátorított és előmozdította a néha meg-megakadó munkavégzést. Köszönet illeti *dr. Maráz Annát*, aki egyetemi mikrobiológiai képzésemtől fogva támogatásával és segítőkészségével hozzájárult a dolgozat elkészüléséhez. Köszönöm *Telerovszky Valéria* végtelen türelmét és segítségét az adminisztratív teendők és szervezés útvesztőjében nyújtott támogatásáért.

Köszönöm a *Virologiai főosztály minden munkatársának* segítségét, akik mind szakmai, mind emberi támogatást nyújtottak, és tehermentesítem érdekében sűrűn átvállaltak feladataimból. Köszönettel tartozom *dr. Rusvai Erzsébetnek*, akitől sokat tanultam a hepatitisz laboratóriumi diagnosztikájáról. Köszönöm *Dencs Ági* segítségét is, akivel sokszor már a munkaidő végeztén túl, hosszú órákon át – könnyező szemmel – egyeztettük a szekvenálási és illesztési eredményeket, és akiben nemcsak jó munkatársat kaptam, hanem barátot is találtam. Köszönöm *Kerékgyártóné Zalka Cecília* és *Kunosné Végh Mária* odaadó és pontos asszisztensi munkáját. Hálás vagyok azért is, hogy Cili – asszisztensi teendőin túl – szeretettel istápolta többek között oly módon, hogy felhívta figyelmemet az étkezések fontosságára, mikor úgy tűnt, végleg beletemetkeztem a képernyőn látottakba...

Végül, de egyáltalán nem utolsósorban köszönöm a családom, mindenekelőtt férjem és legjobb barátom: *András* bátorító szeretetét és türelmét, aki – mióta fejszémet (tollamat?, billentyűzetemet?) belevágtam a PhD megszerzésének kemény fájába – sokszor hamarabb ért haza, mint én, és zúgolódás nélkül végezte el azokat a teendőket, amiket bizony nekem kellett volna... és itt köszönöm meg *Marci* és *Réka* engedelmességét is, amivel a munkavégzés és dolgozatírás ideje alatt megkönnyítették anyai feladataimat. Köszönettel tartozom *szüleimnek* is, hogy bíztak bennem, és a háttérben támogattak, bármikor, bármiben csak kellett, és akik csodás példaképeim a becsületes munkavégzésben.

☞ ... , az ÚRat, a menny Istent félelem, aki az tengert és a szárazföldet alkotta. ☛

(Jónás 1:9/b)