

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Humán polyomavírusok prevalenciájának vizsgálata

Jeles Krisztina

Témavezető: Dr. Csoma Eszter



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Humán polyomavírusok prevalenciájának vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Jeles Krisztina okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mikrobiológia programja keretében

Témavezető: Dr. Csoma Eszter, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Fehér Enikő, PhD
Dr. Kaszab Eszter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalin, PhD
tagok: Dr. Fehér Enikő, PhD
Dr. Kaszab Eszter, PhD
Dr. Varga-Kugler Renáta, PhD
Dr. Lekli István, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2024. október 29., 13 óra.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BKPyV	BK polyomavírus
HPyV6	Humán polyomavírus 6
HPyV7	Humán polyomavírus 7
JCPyV	JC polyomavírus
KIPyV	Karolinska Institutet polyomavírus
LTag	nagy tumorantigén (=large tumor antigen)
MCC	Merkel sejt carcinoma (=Merkel cell carcinoma)
MCPyV	Merkel sejt polyomavírus
NCCR	nem kódoló, kontroll régió (=non-coding control region)
SARS-CoV-2	súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 2
sTag	kis tumorantigén (=small tumor antigen)
TSPyV	Trichodysplasia spinulosa-asszociált polyomavírus
VLP	vírusszerű protein (=virus like protein)
VP1	vírus protein 1 (=viral protein 1)
WUPyV	Washington University polyomavírus

BEVEZETÉS

A virológiai kutatások új korszakát nyitotta meg a nukleinsav-amplifikációs módszerek és a szekvenálási technikák fejlődése, olcsóbbá válása. A klasszikus virológiai módszerek mellett, azt kiegészítve, gyorsabbá vált a különféle fertőzőes eredetű betegségek hátterében álló, ismeretlen kórokozók azonosítása. Ugyanakkor a genomvizsgálatok sok esetben random mintákból, klinikai tünetek nélkül, nagy áteresztőképességű szekvenálási technikákkal végzett szekvenanciaanalízisek, metagenom-analízisek. Ennek is köszönhetően a 2000-es években ugrásszerűen megnőtt az újként leírt vírusfajok száma.

A *Polyomaviridae* családban számos állati vírus mellett 2007 óta 16 új, humán polyomavírus genomszekvenciáját írták le, azonban a virionokat nem izolálták [1]. Néhány esetben betegség miatt, célzottan keresték a kórokozót, és a későbbi kutatások igazolták is a vírusok kórképekben betöltött szerepét, azonban a legtöbb vírus klinikai jelentősége, ha van, még feltáratlan. Nem ismert a terjedési módjuk, a replikáció célsejtjei, ahogy néhány kivétellel azt sem tudjuk, okoznak-e betegséget, ha igen, mit [2].

Az alapvető kérdések megválaszolásához több irányban zajló vizsgálatokra van szükség. A szeroprevalencia felmérések választ adhatnak arra, mennyire elterjedt egy adott vírus a populációban, a különböző korcsoportokban, mikor valószínűsíthető a primer fertőzés, kik lehetnek fogékonyak a fertőzésre. Az adatok utalhatnak a terjedés módjára, de akár földrajzi eltéréseket is feltárhatnak. Ezek a vizsgálatok kihívást jelentenek, hiszen nem pusztán ellenanyagok mérését kell megvalósítani – amelyhez vérminták gyűjtése különböző korcsoportokból nagy számban szükséges –, hanem módszereket kell fejleszteni; sőt, a szükséges antigént is elő kell állítani, mivel kereskedelmi forgalomban nem elérhetőek. A DNS prevalencia vizsgálatokból következtethetünk a terjedési módra, a behatolási kapura, a szervezetben belüli disszeminációra, az esetleges látenciára, a szervezetből kiürülés módjára, a vírusreplikáció helyére, megfelelő betegadatokkal az esetleg okozott betegségekre is. Ezekhez különböző klinikai minták gyűjtésére, nukleinsav izolálására, majd PCR módszerekre van szükség.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Humán polyomavírusok

A *Polyomaviridae* család tagjai 40–45 nm átmérőjű, cirkuláris, kettősszalú DNS genommal rendelkező, burok nélküli vírusok. Az ikozahedrális kapszid 72 kapszomerből épül fel, minden pentamer öt VP1 (VP=viral protein, vírus protein) fehérjét és egy VP2-t, a legtöbb faj esetén VP3-at is tartalmaz. A kapszomerek egymáshoz a VP1 fehérje C-terminális részén keresztül kapcsolódnak. A virionok belsejében található virális genom csomagolódását gazdasejt eredetű hiszton proteinek (H2A, H2B, H3 és H4) segítik [2].

A külvilággal kizárólag a virion VP1 fehérjéje érintkezik, a fogékony sejt felszínén lévő receptorhoz kötődik, ez a vírus fő antigénje. A prokarióta vagy eukarióta fehérjeexpressziós rendszerben előállított és tisztított, rekombináns VP1 fehérjék képesek önmagukban – virális DNS, VP2 vagy VP3 fehérjék nélkül – kapszomerekké összeállni, melyek megfelelő körülmények között intakt kapszidot képeznek. Ezt a struktúrát nevezzük VLP-nek (virus like particle, vírusszerű partikulum), amit például szeroprevalencia vizsgálatokhoz használhatnak [2, 3].

A polyomavírusok genomja funkcionálisan három részre osztható: a korai, a késői, illetve az ezek között elhelyezkedő nem kódoló, kontroll régióra (NCCR=non-coding control region). Ez utóbbi tartalmazza a replikációs origót, enhanszereket, promotéereket, valamint a transzkripció startkodonokat. A polyomavírusok sajátossága, hogy a genom mindkét szála kódoló, az NCCR kétirányú transzkripciót tesz lehetővé [3]. Az egyik szálon, egyik irányban a korai régió a replikáció és génexpresszió szabályozását végző, transzformáló hatású kis (sTag=small tumor antigen) és nagy tumorantigéneket (LTag=large tumor antigen) kódolja. A késői régió a másik szálon, ellentétes irányban a virion felépítéséhez szükséges VP1, VP2 és VP3 struktúrfehérjéket, mikroRNS-eket, egyes vírusoknál agnoproteineket, esetleg VP4-et is kódol [2].

Az első két humánpatogén polyomavírust 1971-ben írták le: a BK polyomavírust (BKPyV) egy vesetranszplantált beteg vizeletéből, míg a JC polyomavírust (JCPyV) progresszív multifocalis leukoencephalopathia tüneteit mutató beteg agyszövetéből [4, 5]. Jelentőségüket közel 1 évtized múltán tárták fel, ma már tudjuk, hogy a populáció >80%-át megfertőzik [6]. A primer fertőzés után életreszóló látenciát alakítanak ki, a reaktivációjuk pedig immunszupprimáltak esetén súlyos, akár halállal végződő tüneteket okozhat [7-10].

2007-ben akut légúti megbetegedésben szenvedő gyerekek nasopharyngeális mintájából a KI (KIPyV) és WU polyomavírusok (WUPyV) genomszekvenciáját írták le [11, 12]. Számos

tanulmányban detektálták nukleinsavukat felső légúti váladékokban, ami miatt felvetették kóroki szerepüket különböző légúti megbetegedésekben, önálló vagy akár társfertőző vírusokként. Azonban ezt máig sem sikerült bizonyítani [13-16]. A Merkel sejt polyomavírust (MCPyV) 2008-ban egy igen ritka, rendkívül agresszív bőrtumorból, a Merkel sejt karcinómából (MCC) írták le [17]. Az MCPyV az MCC kialakulásában etiológiai ágens, földrajzi régiótól függően a daganatok közel 80%-ában, a gazdasejt genomjába klonálisan integrált formában megtalálható [18].

Egészséges emberek bőrmintáiból 2010-ben fedezték fel a sorban következő humán polyomavírus 6-ot (HPyV6) és humán polyomavírus 7-et [19]. Ehhez a két vírushoz elsősorban immunszupprimált betegek viszkető, barnás, pikkelyszerű bőrelváltozással kísért, epidermális hyperplasiáját társítják [20, 21]. Szintén 2010-ben egy szívtranszplantált beteg arcának tüskeszerű kinövéseiből a trichodysplasia spinulosa asszociált polyomavírust (TSPyV) írták le [22]. A vírus elnevezését a beteg mintavétel idején fennálló alapbetegségéről, a kizárólag immunszupprimáltakban előforduló trichodysplasia spinulosáról kapta, melynek jellegzetes ismertetőjegyei a főként az arcot, de akár egyéb testrészeket is érintő tüskeszerű bőrkitüremkedések, az érintett területeken alopecia, illetve bőrvastagodás miatti torz kinézet [23].

KI polyomavírus és WU polyomavírus

Annak ellenére, hogy a KI és WU polyomavírusok felfedezését követően azonnal megindultak a szeroprevalencia és DNS prevalencia vizsgálatok, klinikai jelentőségük máig sem tisztázott. A világ különböző régióiból származó, felnőttek körében mért 55–95,7%-os KIPyV és 69–99%-os WUPyV szeropozitivitás alapján a vírusok széles körben elterjedtek, bár az adatok jelentős eltérést mutatnak [24-29]. A néhány kutatócsoport által gyermekek körében detektált, felnőttekéhez hasonló átfertőzöttségi ráta alapján a primer infekciók jelentős része nagy valószínűséggel gyermekkorban következik be.

A terjedési módjuk, a behatolási kapu, a replikáció helye ismeretlen, ahogy azt sem tudjuk, a primer fertőzést követően a vírus látens fertőzősként a szervezetben marad-e. Ubiquiter jellegük miatt felmerül a légúti terjedés, a szájon át behatolás, akár fekál-orál úton történő terjedés is. Mivel a KIPyV-et és a WUPyV-et is légúti tüneteket mutató betegek nasopharyngeális mintájából fedezték fel, így a vizsgálatok jelentős része a légúti mintákra fókuszált.

A KIPyV DNS-t légúti tüneteket mutató vagy egészséges személyektől vett felső légúti minták 0–34,4%-ában [13, 14, 30], míg a WUPyV nukleinsavát a minták 0–33,3%-ában detektálták [15, 16, 31]. A vírusok immunkompetens felnőttek légúti mintáiban ritkán, vagy egyáltalán nem voltak kimutathatók, a KIPyV DNS prevalenciája gyermekek esetében 0,1–10,2%, a WUPyV-é 0,4–27,5% volt [13, 14, 32]. Immunszuppresszált betegek felső légúti mintáiban 0,8–34,4%-os KIPyV és 0,8–25,8%-os WUPyV prevalenciát írtak le [30, 33-35]. Légúti tünetek nélkül is igazolták jelenlétüket, míg az általában enyhe tünetek esetén pedig legtöbbször vagy társfertőzők is jelen voltak, vagy azokat nem is vizsgálták [14, 32, 34, 36-39]. Alsó légúti mintákban, sőt tüdőszövetben is detektálták a vírusokat, a prevalencia szintén az immunszupprimáltakban bizonyult magasabbnak [13, 15, 16, 31, 40-42]. Egy-egy esettanulmányban vírusreplikációra utaló virális antigén jelenlétét és viszonylag magas kópiaszámot detektáltak a légúti mintákban [13, 15, 16, 40], mely alapján feltételezhető, hogy a KIPyV és WUPyV is képes a légutakban replikálódni. Ezt erősíti a megfigyelés, hogy nyomon követéses vizsgálat során a vírusok napokkal vagy hetekkel később is kimutathatók voltak a légutakból [43-45].

KIPyV DNS-t detektáltak még vizeletben, székletben és vérben, lymphoid szövetben, orr- és garatmandulában, agyszövetben és benignus bőrtumorokban is [30, 38, 46-48]. A WUPyV nukleinsavát kimutatták vizeletből, székletből, agy-, és lymphoid szövetből, valamint vérből is [43, 45, 49-52]. Jelenlétük a székletben utalhat fekál-orál módon történő terjedésre. Bár a virális DNS-t kimutatták gastrointestinalis panaszoktól szenvedők székletmintájában, patogén szerepük az egyidejűleg kimutatott egyéb kórokozók miatt kérdéses [11, 13, 48]. Az, hogy bizonyítottan képesek viraemiát és viruriát okozni, számos hipotézist vet fel. Elképzelhető, hogy a vírusok a behatolási kapu(k) helyéről a vérárammal a szervezeten belül disszeminálódhatnak, amelyben a légút másodlagos nyirokszövelei szerepet játszhatnak. A vírusok a vese, húgyutak, nyirokszövetek sejtjeibe jutva perzisztálhatnak, akár látenciát alakíthatnak ki, majd immunszuppresszió hatására reaktiválódhatnak, a légutakon keresztül, vizelettel, széklettel - akár tünetmentesen - ürülhetnek. Hazai szeroprevalencia adatok egyik vírussal kapcsolatban sem állnak rendelkezésünkre. Kutatócsoportunk korábban már publikált prevalencia adatokat légúti minták vizsgálatából. Az eredmények a nemzetközi adatokkal összhangban álltak, azaz magasabb volt a KIPyV és WUPyV DNS prevalencia immunszupprimáltak légúti mintáiban (14,3% és 9,1%), gyermekek légúti váladékában kimutathatók voltak (1,7% és 5%), az egészséges immunrendszerű felnőttektől vett mintákban viszont nem [43, 46, 53, 54].

Bőrbetegséghez köthető polyomavírusok

A nemzetközi szeroprevalencia vizsgálatok alapján a felnőttek 42–88%-a szeropozitív MCPyV-re, 52–93%-a HPyV6-ra, 55–80,3%-a HPyV7-re, míg 63–80%-a TSPyV-re [55-59]. Ezen adatok arra engednek következtetni, hogy a vírusok széles körben elterjedtek a populációban. Figyelemre méltó azonban, hogy milyen nagy az eltérés az egyes kutatócsoportok által publikált, felnőttekre vonatkozó szeroprevalencia adatokban.

A világ különböző pontjairól származó DNS prevalencia felmérések alapján az MCPyV-et egészséges bőrszöveti minták 11%-ából, HPyV6-ot 12–30%-ából, HPyV7-et 9,7–12,4%-ából, míg TSPyV-et 0–1,7%-ából mutatták ki [19, 60-64]. A HPyV6 és HPyV7 esetében igazolták, a bőr felszínéről történő virion ürülést [19, 21, 61]. Az életkorral a HPyV6 és HPyV7 prevalencia mellett a vírusok mennyisége is nőtt, idősebb személyekben fokozottabb vírusreplikációt és vírusürítést figyeltek meg. Bár a HPyV6 és HPyV7 célsejtjei nem ismertek, az epidermis sejtjeinek, a keratinocytáknak a patogenezisben, perzisztáló vírusfertőzésben betöltött szerepe néhány tanulmány alapján felmerül [18, 20, 65].

Különbőféle bőrtumorokban az MCPyV prevalenciája 4–21%, a HPyV6-é 3–42,3%, HPyV7-é 0,4–4,3%, a TSPyV-é 0,8–1,7% volt [62, 64, 66-71]. Esetleges szerepük a carcinogenezisben főként bőrtumorok esetén felmerült ugyan, de a MCPyV MCC-ben betöltött szerepén kívül egyéb esetben nem igazolódott. A vírusok DNS-ét kimutatták már légúti mintából, vérből, székletből és vizeletből is, valamint többféle szöveti mintában. A vírusok terjedési módja nem ismert. Az, hogy egészséges emberek bőrmintájából detektálták, valamint onnan tünetmentes ürülésüket megerősítették, valószínűsíti a közvetlen, bőr a bőrrel érintkezés útján történő terjedést. A nem tumoros szövetekben alacsony kópiaszámmal való jelenlétük, illetve a magas átfertőzöttségi ráta alapján valószínű, hogy látens fertőzést alakítanak ki a szervezetben. Ezek mellett azonban a bizonyított viruria, valamint a légutak különböző sejtjeinek, szöveteinek érintettsége miatt a vizelettel és légúti váladékokkal történő transzmisszió sem vethető el.

Hazánkból még nem publikáltak egyik vírus esetében sem szeroprevalencia adatot, DNS prevalencia vizsgálatokat is csak az MCPyV-vel végeztek. Mivel a tumor ritka, így kisszámú MCC-s esetet dolgoztak fel. Két vizsgálatban a tumorok többségében (77%) igazolták az MCPyV DNS jelenlétét [72, 73], míg egy tanulmányban csak a tumorok 37,5%-a bizonyult vírus DNS pozitívnak [74]. HPyV6-hoz, HPyV7-hez és TSPyV-hez köthető kórképekről hazánkban eddig nem számoltak be.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaink céljait az alábbiak szerint fogalmaztuk meg:

- I. Munkánk egyik célja volt tanulmányozni a KIPyV, WUPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7 és TSPyV szeroprevalenciáját immunkompetens gyermekek és felnőttek körében, amelyhez az alábbi vizsgálatokat terveztük:
 - A vírusok VP1 fehérjének előállítását bakteriális fehérjeexpressziós rendszerben.
 - A vírusellenes IgG ellenanyagok kimutatását humán szérummintákból saját fejlesztésű ELISA módszerrel.
 - Az eredmények értékelését, a már publikált adatokkal összevetését.

- II. Másik célunk a KIPyV és WUPyV DNS prevalenciájának tanulmányozása volt légúti mintákban:
 - A virális DNS jelenlétét gyermekektől és felnőttektől származó, nasopharyngeális mintákban valós idejű PCR módszerrel terveztük vizsgálni.
 - A COVID-19 pandémia alatt gyűjtött légúti mintákban a WUPyV és a KIPyV jelenlétének vizsgálatát terveztük tanulmányozva azt is, hogy társfertőzők-e a SARS-CoV-2 infekció során.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Szeroprevalencia vizsgálatok

Minták

Szeroprevalencia vizsgálatainkhoz a szérummintákat 2016 és 2021 között válogattuk a Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológiára diagnosztikai vizsgálatokra érkező minták közül. A KIPyV szeroprevalenciájának tanulmányozását 692, a WUPyV-ét 705 szérumminta felhasználásával végeztük. Az MCPyV, HPyV6, HPyV7 és TSPyV szeroprevalenciájának vizsgálatát azonos mintaállománnyal, 552-552 szérummal végeztük. A mintákat korcsoportokra osztottuk. A részletes adatokat az **1. és 2. táblázat** mutatja.

1. táblázat: A KIPyV és WUPyV szeroprevalencia vizsgálathoz használt minták adatai

Korcsoportok	KIPyV			WUPyV		
	Mintaszám	Életkor, min-max (medián)	Nő/Férfi	Mintaszám	Életkor, min-max (medián)	Nő/Férfi
0,7–1 év	20	0,7–1,9 év (1,3)	7/13	22	0,7–1,9 év (1,4)	8/14
2–5 év	82	2,1–5,9 év (3,5)	34/48	88	2,1–5,9 év (3,4)	36/52
6–9 év	67	6,1–9,9 év (7,6)	33/34	68	6,1–9,9 év (7,5)	33/35
10–13 év	67	10,1–13,9 év (11,8)	34/33	96	10,1–13,9 év (11,9)	52/44
14–20 év	105	14–20,9 év (16)	59/46	114	14–20,9 év (16)	66/48
21–39 év	101	21–39,6 év (31)	48/53	92	21–39,6 év (31,6)	42/50
40–59 év	125	40–59,5 év (50)	64/61	116	40–59,5 év (50)	59/57
>60 év	125	60–92 év (72)	64/61	109	60–92 év (70,1)	57/52
Összesen	692	0,7–92 év (21,9)	343/349	705	0,7–92 év (16,8)	353/352
Felnőttek	367	18–92 év (50,2)	187/180	332	18–92 év (50,1)	168/164
Gyerekek (<18 év)	325	0,7–17,9 év (9,6)	156/169	373	0,7–17,9 év (7,9)	185/188

2. táblázat: MCPyV, HPyV6, HPyV7 és TSPyV szeroprevalencia vizsgálataikhoz használt minták adatai

Korcsoportok	Mintaszám	Életkor, min-max (medián)	Nő/Férfi
<6 év	38	0,8–5,9 év (2,8)	15/23
6–9 év	36	6,1–9,9 év (7,6)	19/17
10–13 év	45	10,1–13,9 év (11,7)	22/23
14–20 év	87	14–20 év (16)	47/40
21–39 év	114	21–39,5 év (30,8)	57/57
40–59 év	128	40–59,5 év (50)	66/62
>60 év	104	60–85 év (69)	57/47
Összesen	552	0,8–85 év (33)	283/269
Felnőttek	359	18–85 év (47,3)	187/172
Gyerekek (<18 év)	193	0,8–17,9 év (11,7)	96/97

Antigének előállítása, fehérjeexpresszió, fehérje tisztítása

Az ELISA vizsgálatokhoz szükséges antigéneket bakteriális fehérjeexpresszióval állítottuk elő. Ehhez a VP1 kapszid fehérjéjét kódoló gént a referencia szekvenciák alapján szintetizáltattuk – a KIPyV kivételével – kodonoptimalizáltan. Az inzeretet pTriEx™-4 Neo vektorba klónoztuk, *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsében amplifikáltuk, végül szekvenálással ellenőriztük. A VP1 fehérjék expresszióját *Escherichia coli* Origami™ B(DE3)pLacI baktériumban végeztük, kivéve a KIPyV VP1 fehérjéjét, amelyet *Escherichia coli* Rosetta-gami™ B(DE3)pLacI baktériumban termeltettünk. A fehérjék expressziója indukált módon történt. A VP1 fehérjék tisztítását denaturáló körülmények között, a 6xHis tag segítségével, affinitás kromatográfiával (Protino NI-TED Packed Columns) végeztük. A fehérjéket ezt követően Slide-A-Lyzer Dialysis kazettával dializáltuk, szükség esetén Amicon oszlopon koncentráltuk, felhasználásig fagyaszttva tároltuk. A tisztított VP1 fehérjék minőségének vizsgálatát Coomassie Brilliant Blue festéssel és Western blot segítségével végeztük, míg a mennyiségi analízishez BCA assay-t használtunk.

ELISA

A VP1 fehérjék elleni IgG antitestek detektálásához indirekt, kolorimetriás ELISA módszert fejlesztettünk. Az immunszerológiai módszer minden lépését optimalizáltuk, majd elvégeztük a vizsgálatokat. Az optikai denzitást 450 nm-en mértük MultiSkan Sky Microplate spektrofotométerrel, az eredményeket a 620 nm-en mért értékekkel korrigáltuk. Az ELISA méréseinket minden szérumminta esetében duplikátumban végeztük el. Az optikai denzitás (OD) értékeket növekvő sorrendbe rendeztük, majd trendvonalat illesztettünk rá. A kapott függvény alapján inflexiós pontot számítottunk, amely az ELISA cut-off értéke. Azokat a mintákat tekintettük szeropozitívnak, amelyek OD értéke >cut-off+10% volt.

DNS prevalencia vizsgálatok

Minták

A KI és WU polyomavírusok DNS prevalenciájának tanulmányozására a 2020 augusztusától 2021 áprilisáig, valamint a 2021 októberében SARS-CoV-2 PCR vizsgálatra az Orvosi Mikrobiológiára érkező orrgarat minták nukleinsavát válogattuk. Összesen 1030 személytől gyűjtöttünk mintát, amelyek közül 680 SARS-CoV-2 RNS pozitív, míg 350 SARS-CoV-2 negatív betegről származott. A betegek életkora 0–94,2 év (medián: 38,1 év) volt. A nukleinsav izolálása MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kittel

(Roche) vagy Chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (PerkinElmer) Kit segítségével a gyártó utasításai alapján történt.

Valós idejű PCR

A KI és WU polyomavírusok DNS-ének kimutatására TaqMan próbás, kvantitatív, valós idejű PCR módszert alkalmaztunk. Vizsgálatainkhoz a KIPyV VP2-3, valamint a WUPyV VP1 régiójára tervezett primereket és próbát alkalmaztunk [75]. A PCR-t 50 μL végtérfogatban végeztük a következők szerint: 10 μL templát nukleinsav, 500-500 nM forward és reverse primer, 200 nM próba, 25 μL 2X TaqMan Universal PCR Master Mix. A PCR reakció QuantStudio 5 valós idejű PCR készülékben az alábbi protokollal zajlott: 50 °C 2 perc, 95 °C 10 perc, 45 ciklus 95 °C 15 másodperc és 60 °C 1 perc. A fluoreszcens jel detektálása 60 °C-on történt.

Statisztikai vizsgálatok

A statisztikai vizsgálatokhoz Mann-Whitney U tesztet, Fisher-féle egzakt tesztet, χ^2 trend-tesztet és Spearman rank korrelációs analízist használtunk a GraphPad Prism 9.4.0 szoftver segítségével. A különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Minden tanulmányozott vírus esetében az előállított, tisztított VP1 fehérjét az ELISA módszerhez megfelelőnek ítéltük.

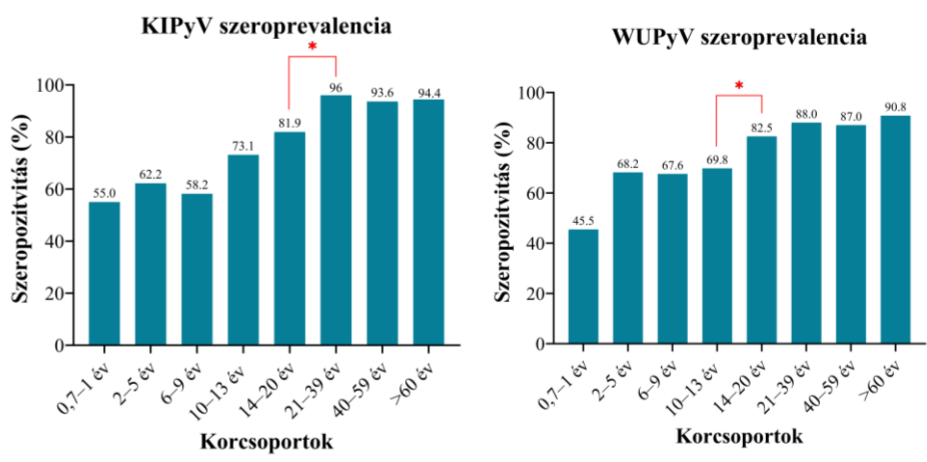
A KIPyV és WUPyV azonos genusba tartozik, VP1 fehérjéinek szekvenciája 65%-ban identikus [76]. A szintén azonos nemzetségbe tartozó MCPyV és TSPyV VP1 fehérjéinek szekvenciája 57%-ban megegyezik [77]. A HPyV6 és HPyV7 is szoros rokonságban áll egymással, VP1 fehérjéjük 69%-ban egyező [65]. Felmerül, hogy a VP1 ellen termelődő ellenanyagok keresztreakálhatnak, nem kellően specifikus szerológiai tesztek esetén az eredmények kétségesek lehetnek. A KIPyV és WUPyV szerológiai vizsgálatához használt mintaállomány részben átfedő volt, így a mindkét tesztben vizsgált minták OD értékeit korrelációanalízisnek vetettük alá. Az MCPyV, HPyV6, HPyV7 és TSPyV ELISA vizsgálatok ugyanazokkal a mintákkal történtek, így a mért OD értékek korrelációanalízisét is elvégeztük. A korrelációanalízis alapján ugyan szignifikáns, de mérsékelt a korreláció ($r=0,335$, $p<0,0001$) a KIPyV és WUPyV OD értékek közt. Hasonlóan mérsékelt, szignifikáns korrelációt ($r=0,326$, $p<0,0001$) tapasztaltunk a HPyV6 és HPyV7 OD értékei között is. Az MCPyV és a TSPyV esetén a korreláció alacsony, ám szignifikáns volt ($r=0,277$, $p<0,0001$). A nem azonos genusba tartozó polyomavírusok esetén a mért szeroreaktivitási értékek nem mutattak korrelációt. Más kutatócsoportok is publikáltak szignifikáns, de gyenge korrelációt [78-81]. Néhány kiválasztott mintával gyakorlatban is megvizsgáltuk az esetleges keresztreakciót. A szérummintákat előinkubáltuk 1000 ng homológ vagy heterológ fehérjével, majd elvégeztük az ELISA mérést. A homológ fehérjéssel történő előinkubálás után a szérumok szeronegatívvá váltak, míg a heterológ fehérjéknek nem volt ilyen hatása. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy ELISA vizsgálataink kellően specifikusak voltak a vizsgált vírusokra.

KI és WU polyomavírus szeroprevalencia vizsgálata

A KIPyV szeroreaktivitás statisztikailag igazolható növekedését, azaz az OD értékek közt szignifikáns eltérést a 10–13 és 14–20 ($p=0,01$), valamint a 14–20 és 21–39 évesek között tapasztaltunk ($p=0,005$). A szeroprevalenciát, azaz a szeropozitív minták arányát az egyes korcsoportokban az **1. ábra** mutatja. Méréseink során a teljes populáció KIPyV átfertőzöttsége 82,1%-nak, a gyerekkori (<18 évesek) 68,9%-nak, míg a felnőtt (>18 évesek) 93,7%-nak bizonyult. A szeropozitívak életkora a teljes populációban ($p=0,0001$), valamint a

gyerekek esetében is ($p=0,0002$) szignifikánsan magasabb volt a szeronegativakhoz képest. A primer fertőzések jelentős része kisgyermekkorban történt, mivel a két év alatti gyermekek körében már 55%-os átfertőzöttségi rátát detektáltunk. A szeropozitívak aránya ezt követően az életkorral növekvő, amit a χ^2 trend teszt is igazolt ($p<0,0001$). Szignifikáns szeropozitivitásbeli növekedést ($p=0,015$) a 14–20 és 21–39 éves korcsoportok között tapasztaltunk, ami összhangban áll a szeroreaktivitási eredményekkel is. A legmagasabb, 96%-os szeropozitivitást a 21–39 évesek körében detektáltuk. Idősebbek közt csak kissé, de statisztikailag nem szignifikánsan volt alacsonyabb az ellenanyag-pozitívak aránya. Mindezek összhangban állnak a nemzetközi közleményekben publikáltakkal [26, 29, 58, 82]. Eredményeink alapján a KIPyV ubiquiter vírus, a populáció nagy része hazánkban is átesik a fertőzésen.

1. ábra: KIPyV és WUPyV szeroprevalencia korcsoportonként



A WUPyV szeroreaktivitásban szignifikáns növekedést állapítottunk meg a 0,7–1 és 2–5 évesek ($p=0,03$), illetve a 14–20 és 21–39 évesek között ($p=0,004$). A teljes populáció 79,1%-ában mutattunk ki WUPyV elleni ellenanyagokat, a felnőttek (>18 évesek) 89,2%-a, míg a gyerekek (<18 évesek) 70,2%-a esett át a fertőzésen (**1. ábra**). A szeronegativak életkora szignifikánsan alacsonyabb volt a teljes vizsgált populációban ($p=0,02$) és a gyermekek körében is ($p=0,004$). A szeropozitivitási arány életkorral növekedését a χ^2 trend teszt a WUPyV esetében is igazolta ($p<0,0001$). Szeroprevalencia eredményeink a mások által publikáltakkal összhangban állnak [24, 25, 76, 83]. Eredményeink alapján a primer infekciók zöme gyerekkorban történik, már a 2 évesnél fiatalabbak 45%-a szeropozitív volt, a 6 évesek közt már a 68%-ot is elérte. Szignifikáns szeropozitivitásbeli növekedés ($p=0,03$) kamaszkorban, illetve fiatal felnőttkorban (18–20 évesek) történt. A felnőttek körében kissé növekvő szeropozitivitási arányt figyeltünk meg, a legmagasabb átfertőzöttségi értéket (90,8%)

az idősek körében detektáltuk. Eredményeink alátámasztják, hogy a WUPyV hazánkban is ubiquiter, a populáció zöme gyerekkorában átesik a fertőzésen [29, 56, 82, 84].

KI és WU polyomavírus prevalencia légúti mintákban

KIPyV DNS-t 2 SARS-CoV-2 fertőzött (2/680; 0,29%) és 3 SARS-CoV-2 RNS negatív beteg légúti váladékában detektáltunk (3/350; 0,86%), a KIPyV prevalenciája a vizsgált kohorszban 0,49% (5/1030). Azonban minden KIPyV pozitív minta felnőttektől származott, így a felnőttek mintáira számított prevalencia 0,74% (5/680). A WUPyV nukleinsavát egy SARS-CoV-2 RNS pozitív felnőtt és egy SARS-CoV-2 RNS negatív gyermek mintájából tudtuk kimutatni (1/680; 0,15% és 1/350; 0,29%). A teljes mintapopulációban így 0,19% (2/1030) gyakorisággal detektáltuk a WUPyV DNS-ét. A felnőtt minták vizsgálatának eredményei nem térnek el jelentősen az immunkompetens felnőttek légúti mintáiban más munkacsoportok által mért eredményektől [43, 46, 53, 85, 86]. Ugyanakkor a várakozásainkkal ellentétben a gyerekek légúti mintáiból KIPyV-et egyáltalán nem, míg WU vírust is csak egy esetben detektáltunk. Ez jelentősen eltér a pandémia előtti, gyermekek légúti mintáinak vizsgálatából származó 5%-os WUPyV és 1,7%-os KIPyV prevalenciától [46]. A SARS-CoV-2 és a két polyomavírus közti kapcsolatot egy olasz kutatócsoport korábban már vizsgálta. Felnőtt betegektől származó, SARS-CoV-2 RNS pozitív légúti minták 24,1%-os KIPyV és 4,5%-os WUPyV DNS prevalenciáját publikálták, míg SARS-CoV-2 RNS negatív mintákban egyik vírust sem mutatták ki [32]. Korábbi, szintén felnőttek légúti mintájának vizsgálatából származó DNS prevalencia eredményekhez képest is kirívóan magas pozitivitást tapasztaltak [13, 85-87].

Felmerül, hogy miért nem detektáltuk a KIPyV-et gyerekek mintáiban, a WUPyV-et is csak egy esetben, illetve miért térnek el adataink az olasz kutatócsoport által publikáltaktól. A magyarázat lehetne metodikai különbség, azonban sok hasonló lépés mellett azonos PCR módszerrel végeztük a vizsgálatot. Ugyan eltérő mintatípusokat dolgoztunk fel, oropharyngeális, illetve nasopharyngeális mintákat, ám az eddigi publikációk alapján mindkét mintatípus egyaránt alkalmas a vizsgálatokra [13, 46, 85, 86, 88-90]. Immunszupprimált betegekben a KIPyV és WUPyV prevalencia is magasabb. Az olasz tanulmány esetén nem ismert a vizsgálatban résztvevők immunológiai státusza, a saját mintaállományunkban sem teljesen. Fontos megjegyezni, hogy az olasz munkacsoport a világvárvány elején gyűjtötte a PCR vizsgálatokhoz használt mintákat, akkor, amikor a korlátozó intézkedéseket Olaszországban éppen bevezették (2020 márciusa és 2020 májusa közt). Ezzel ellentétben mi 2020 augusztusa és 2021 áprilisa közt, valamint 2021 őszén gyűjtöttük a mintákat a hosszú,

kijárási tilalmak, társadalmi érintkezéseket jelentősen korlátozó intézkedések, iskolai és óvodai bezárások után és között. Nemzetközi közlemények jelentek meg arról, hogy a korlátozó intézkedések bevezetésének következtében számos légúti fertőzés terjedése visszaszorult [91, 92]. Mivel a KIPyV és WUPyV esetében az egyik potenciális transzmissziós mód a légúti terjedés, így igen valószínű, hogy az alacsonyabb prevalencia adataink ennek köszönhetőek.

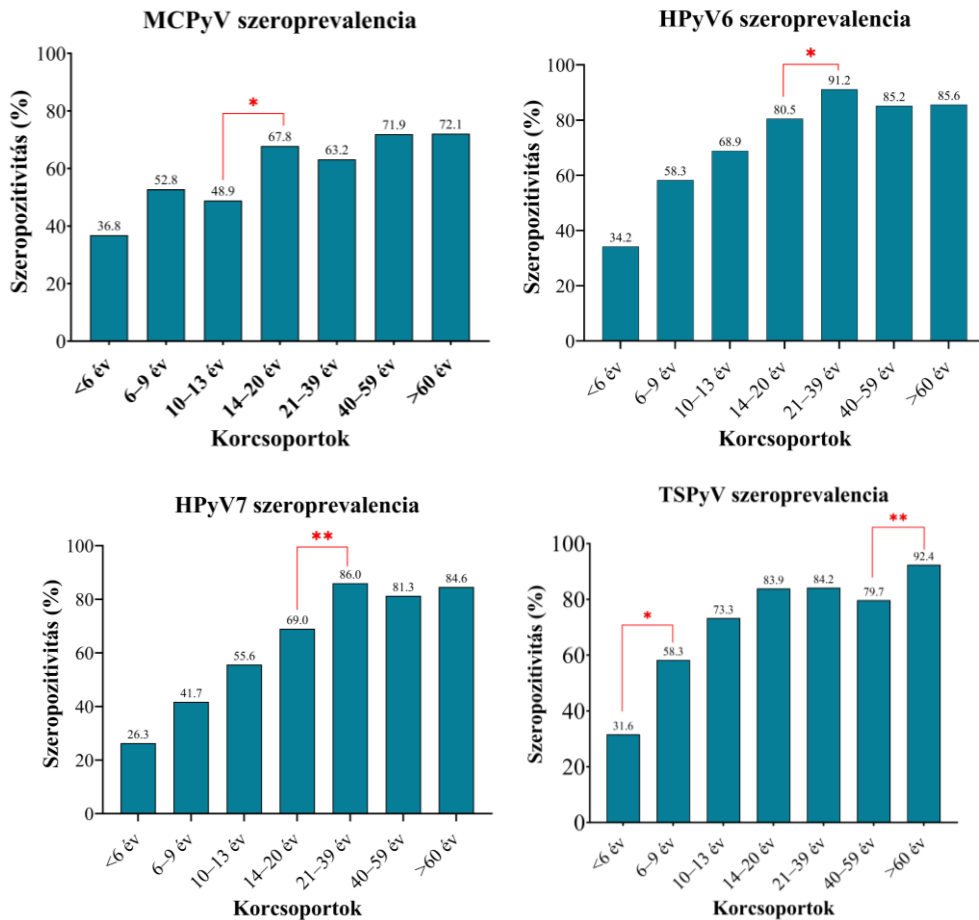
Bőrbetegséghez köthető polyomavírusok szeroprevalencia vizsgálata

MCPyV antigén elleni szeroreaktivitás vizsgálatok az egymást követő életkorcsoportok közt statisztikailag szignifikáns különbséget az OD értékben nem tapasztaltunk. HPyV6 esetében a szeroreaktivitás statisztikailag szignifikáns növekedését a 6–9 éves ($p=0,0359$), illetve a 21–39 éves ($p=0,0192$) korcsoportokban figyeltük meg, míg a HPyV7 esetén a 14–20, valamint a 21–39 évesek körében detektáltunk ($p=0,021$ és $p=0,003$). A TSPyV ELISA-val mért OD értékek szignifikáns növekedését a két legfiatalabb ($p=0,009$), illetve a két legidősebb korcsoport között tapasztaltuk ($p=0,029$).

A teljes vizsgálati csoportban az MCPyV fertőzésen átesettek aránya 63,9%-nak, míg a felnőtt populáció szeroprevalenciája 69,3%-nak bizonyult. A HPyV6, HPyV7 és TSPyV esetében ennél magasabb átfertőzöttséget mértünk: a teljes vizsgálati populáció 79,2%-a, 72,5%-a és 78,4%-a esett át HPyV6, HPyV7 és TSPyV fertőzésen. A felnőttek körében minden esetben 80% feletti volt a szeropozitívok száma. Bár a nemek arányosan reprezentáltak a teljes kohorszban, eredményeink szerint szignifikánsan több nő esett át MCPyV, HPyV6 és HPyV7 fertőzésen a férfiakhoz képest ($p=0,01$, $p=0,046$, $p=0,017$). Felnőttek közt nem, azonban a gyerekek körében szintén nemi különbséget tártunk fel HPyV6 és HPyV7 átfertőzöttség vizsgálatok: szignifikánsan több lány esett át a fertőzésen a fiúkhoz képest ($p=0,0036$, $p=0,0062$). Hasonló adatokat mások nem publikáltak. A nemi különbségek okára jelenleg nincs magyarázatunk, további, nagyobb mintaszámmal végzett vizsgálatokra, illetve a terjedés módjának ismeretére lenne szükség.

A szeropozitivitás mind a négy vírus esetében az életkor előrehaladtával növekvőnek bizonyult, amit a χ^2 trend teszt is megerősített (MCPyV: $p=0,0004$, HPyV6, HPyV7, TSPyV: $p<0,0001$) (2. ábra).

2. ábra: Bőrbetegséghez köthető polyomavírusok szeroprevalenciája



Mind a négy vírus esetében elmondható, hogy a nemzetközi közleményekkel összhangban a fiatal életkorokban is már viszonylag magas volt a fertőzésen átesettek aránya [24, 29, 79, 83, 93-96]. A 6 év alattiak között vírustól függően 26,3–36,8% között volt a szeropozitivitás. A fertőzésen átesettek arányának szignifikáns növekedését MCPyV esetén a 10–13 és 14–20 éves ($p=0,0396$), HPyV6 és HPyV7 vizsgálatok pedig a 14–20 és 21-39 éves korcsoportok között ($p=0,0396$, $p=0,0052$) tapasztaltunk. A TSPyV szeroreaktivitás eredményeivel összhangban a két legfiatalabb ($p=0,0346$) és a két legidősebb ($p=0,0084$) korcsoport között detektáltunk szignifikáns emelkedést a szeropozitívok arányában.

Eredményeink minden esetben a más kutatócsoportok által publikált tartományon belüliek. Igen érdekes azonban, hogy a világ különböző régióiból publikált adatok akár 30–50%-ban eltérnek [29, 79, 80, 93, 97]. Ennek magyarázata lehet az alkalmazott immunszerológiai módszerek változatossága, ugyanakkor akár földrajzi különbségek is lehetnek a vírusok elterjedtségében. Továbbá lehetnek földrajzilag eltérő genetikai vírusvariánsok, amelyek akár antigenitásukban is különbözhetnek. Ennek tanulmányozására eredményeinket minden olyan

publikáció eredményeivel összevetettük, amelyekből saját eredményeinkkel összehasonlítható, statisztikai elemzésre alkalmas adatokat tudtunk kigyűjteni. Az MCPyV szekvenciáinak elemzése során felmerült, hogy a vírus földrajzi régiótól függően genetikai eltéréseket is mutat. Az irodalmi adatok alapján a felnőttek 42–88%-a szeropozitív, a saját 69,3%-os adatunk ez alapján elfogadható. Adataink megegyeznek vagy igen hasonlóak a cseh, olasz, iráni, kameruni és ausztrál adatokkal [24, 79, 98-101]. Szignifikáns eltérést a Japánból, Kínából, Amerikai Egyesült Államokból, valamint Hollandiából és Spanyolországból származó adatok elemzése során tártunk fel [6, 25, 29, 56, 84, 102-106]. Hasonló eredményeket tapasztaltunk nagyon eltérő módszerekkel végzett vizsgálatok esetén, míg szinte azonos metodikát használva is mutattunk ki szignifikáns különbségeket. Ez arra utal, hogy nem a metodikai különbségek állnak az eltérések hátterében, hanem földrajzi különbözőségek is lehetnek akár a vírusok elterjedtségében, akár genetikai változékonyságukban. Ezt erősíti néhány genomszekvencia elemzés, amelyek alapján a genotípusok földrajzi elkülönülését vetették fel, ennek igazolása azonban további vizsgálatokat igényel [107, 108]. Az általunk mért HPyV6 és HPyV7 felnőtt szeroprevalencia (87,7% és 83,8%) szintén jól illeszkedik a nemzetközi adatok sorába [24, 29, 56, 58, 79, 80, 83, 93]. Az összehasonlítások az életkor előrehaladtával növekvő szeropozitivitás trendjében, az egyes korcsoportokban mért ellenanyag-pozitivitás arányában megfigyelhetünk egyezéseket, bár néhány esetben tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket is. Hasonlóan az MCPyV-nél említettekhez, a módszertani és antigénbeli különbözőségek mellett a vírusok genetikai különbözősége is felmerülhet, ami akár földrajzi régiótól függő is lehet. A saját, felnőttek körében mért, 85%-os TSPyV szeroprevalencia kissé magasabb a mások által publikált 63–80% közötti értékektől [25, 29, 79, 80, 109, 110]. Az összehasonlítások során azonban a szeropozitivitás életkorral növekvő trendje, valamint az átfertőzöttség mértéke is hasonló volt más kutatócsoportok adataihoz, szignifikáns eltérést is csak két tanulmányhoz képest tapasztaltunk [29, 56, 79, 80, 94, 111]. Mind a négy vírus esetében felmerül a bőr a bőrrel, közvetlen kontaktussal történő terjedés, de nem zárhatjuk ki a légutakon keresztüli átvitelt sem.

ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori kutatómunka során hat, a *Polyomaviridae* családba tartozó polyomavírus prevalenciáját tanulmányoztuk. A KIPyV, WUPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7 és TSPyV szeroprevalencia vizsgálatainkhoz a vírusok kapszid antigénjét, VP1 proteinjét bakteriális fehérjeexpressziós rendszerekben sikeresen állítottuk elő. Az antigénnel a VP1 elleni IgG ellenanyagok detektálására alkalmas, indirekt, kolorimetriás ELISA módszert fejlesztettünk és optimalizáltunk mind a hat vírusra. A vizsgálatokat nagyszámú, immunkompetenes gyermekektől és felnőttektől származó szérummintával végeztük, a hazai szeroprevalenciát különböző korcsoportokban mértük és elemeztük. Megállapítottuk, hogy a vizsgált polyomavírusok Magyarországon ubiquiterek, amit a felnőtt szeropozitivitási adatok is alátámasztottak. Eredményeink alapján a felnőttek 93,7%-a KIPyV, 89,2%-a WUPyV, 69,3%-a MCPyV, 87,7%-a HPyV6, 83,8%-a HPyV7 és 85%-a TSPyV fertőzésre szeropozitív. A fertőzésen átesettek aránya az életkorral növekvő volt mind a hat vírus esetében, a primer infekciók zömmel gyermekkorban, KIPyV és WUPyV esetében kisgyermekkorban zajlottak. Az ezt követő életkorokban már csak kismértékű változást tapasztaltunk. A nők körében magasabbnak bizonyult az MCPyV, HPyV6 és HPyV7 szeroprevalencia. TSPyV esetében 60 év felett szignifikáns növekedést tapasztaltunk az átfertőzöttség mértékében. Összehasonlító elemzéseink során megállapítottuk, hogy a hazai szeropozitivitás hasonló vagy egyező a más kutatócsoportok által mértékhez. A publikált átfertőzöttségi értékekben mutatkozó viszonylag nagy különbségek hátterében vélhetően nem a mérési módszerek vagy antigén előállítási különbségek állnak.

A SARS-CoV-2 világjárvány idején légúti mintákban vizsgáltuk a KIPyV és a WUPyV DNS prevalenciáját, az esetleges koinfekciót. A polyomavírusok és a SARS-CoV-2 fertőzés között összefüggést nem tártunk fel. Mindkét vírus prevalenciája a várthoz képest jóval alacsonyabbnak bizonyult, gyermekek mintáiban KIPyV DNS-t nem, WUPyV DNS-t pedig mindössze egy mintában detektáltunk. Feltételezésünk szerint mindkét vírus terjedését a korlátozó intézkedések gátolhatták.

ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- ✓ Hat polyomavírus immunszerológiai vizsgálatokra alkalmas antigénjét állítottuk elő, a szeroprevalencia vizsgálatokhoz alkalmas módszert terveztünk, optimalizáltunk.
- ✓ Különböző korcsoportokban vizsgáltuk a KIPyV, WUPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7 és TSPyV polyomavírusok magyarországi szeroprevalenciáját.
- ✓ Megállapítottuk, hogy a KIPyV, WUPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7 és TSPyV szeroprevalenciája életkorral nő, hazánkban is ubiquiter vírusokként vannak jelen. A primer infekciók zömmel gyerekkorban zajlanak.
- ✓ Összehasonlító elemzéssel erősítettük a feltételezést, miszerint az MCPyV szeroprevalencia, vagy akár a vírus is földrajzi eltérést mutat.
- ✓ A KIPyV, WUPyV és a SARS-CoV-2 fertőzés között összefüggést nem tártunk fel. Feltételezéseink szerint a korlátozó intézkedések mindkét polyomavírus terjedését gátolhatták.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom témavezetőmnek, dr. Csoma Eszternek útmutatásáért, tanácsaiért, hogy türelemmel és készséggel segítette az elmúlt négy évben munkámat, mellyel jelentősen hozzájárult szakmai ismereteim bővítéséhez és doktori értekezésem elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kónya József intézetvezetőnek, hogy az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben végezhettem kutatásaimat.

Köszönet illeti Katona Melinda munkatársamat és kutatócsoportunk tagját PhD tanulmányaim során nyújtott segítségéért és az örömteli, laborban töltött órákért.

Köszönetemet szeretném kifejezni az Orvosi Mikrobiológia valamennyi dolgozójának, akik bármilyen módon is hozzájárultak munkámhoz.

Köszönet illet minden beteget, vizsgálatba bevont személyt, akik mintái nélkül a kutatás nem valósulhatott volna meg.

Végül, de nem utolsó sorban mérhetetlen köszönet illeti a családomat, akik az elmúlt négy évben támogattak és biztattak céljaim elérésében.



Nyilvántartási szám: DEENK/430/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jeles Krisztina
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10069548

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Katona, M., **Jeles, K.**, Kovács, R. L., Csoma, E.: KI and WU Polyomaviruses: seroprevalence Study and DNA Prevalence in SARS-CoV-2 RNA Positive and Negative Respiratory Samples.
Microorganisms. 10 (4), 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10040752>
IF: 4.5
2. **Jeles, K.**, Katona, M., Csoma, E.: Seroprevalence of Four Polyomaviruses Linked to Dermatological Diseases: New Findings and a Comprehensive Analysis.
Viruses-Basel. 14 (10), 1-16, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v14102282>
IF: 4.7





További közlemények

3. Katona, M., **Jeles, K.**, Takács, P., Csoma, E.: DNA and seroprevalence study of MW and STL polyomaviruses.
J. Med. Virol. 96 (8), 1-10, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.29860>
IF: 6.8 (2023)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,2**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.08.22.



IRODALOMJEGYZÉK

1. Calvignac-Spencer, S., et al., *A taxonomy update for the family Polyomaviridae*. Arch Virol, **2016**. 161(6): p. 1739-50.
2. Dalianis, T. and H.H. Hirsch, *Human polyomaviruses in disease and cancer*. Virology, **2013**. 437(2): p. 63-72.
3. DeCaprio, J.A. and R.L. Garcea, *A cornucopia of human polyomaviruses*. Nat Rev Microbiol, **2013**. 11(4): p. 264-76.
4. Gardner, S.D., et al., *New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation*. Lancet, **1971**. 1(7712): p. 1253-7.
5. Padgett, B.L., et al., *Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy*. Lancet, **1971**. 1(7712): p. 1257-60.
6. Viscidi, R.P., et al., *Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus*. Clin Vaccine Immunol, **2011**. 18(10): p. 1737-43.
7. Bohl, D.L. and D.C. Brennan, *BK virus nephropathy and kidney transplantation*. Clin J Am Soc Nephrol, **2007**. 2 Suppl 1: p. S36-46.
8. Giraud, G., et al., *BK-viruria and haemorrhagic cystitis are more frequent in allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients receiving full conditioning and unrelated-HLA-mismatched grafts*. Bone Marrow Transplantation, **2008**. 41(8): p. 737-742.
9. Randhawa, P., et al., *A comparative study of BK and JC virus infections in organ transplant recipients*. J Med Virol, **2005**. 77(2): p. 238-43.
10. Tan, C.S. and I.J. Koralnik, *Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis*. Lancet Neurol, **2010**. 9(4): p. 425-37.
11. Allander, T., et al., *Identification of a third human polyomavirus*. J Virol, **2007**. 81(8): p. 4130-6.
12. Gaynor, A.M., et al., *Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections*. PLoS Pathog, **2007**. 3(5): p. e64.
13. Bialasiewicz, S., et al., *Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples*. J Clin Virol, **2009**. 45(3): p. 249-54.
14. Suzuki, A., et al., *Respiratory viruses from hospitalized children with severe pneumonia in the Philippines*. BMC Infect Dis, **2012**. 12: p. 267.
15. Astegiano, S., et al., *Prevalence and clinical impact of polyomaviruses KI and WU in lung transplant recipients*. Transplant Proc, **2010**. 42(4): p. 1275-8.
16. Wurzel, D.F., et al., *Respiratory virus detection in nasopharyngeal aspirate versus bronchoalveolar lavage is dependent on virus type in children with chronic respiratory symptoms*. J Clin Virol, **2013**. 58(4): p. 683-8.
17. Feng, H., et al., *Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma*. Science, **2008**. 319(5866): p. 1096-100.
18. Sheu, J.C., et al., *Polyomaviruses of the skin: integrating molecular and clinical advances in an emerging class of viruses*. Br J Dermatol, **2019**. 180(6): p. 1302-1311.
19. Schowalter, R.M., et al., *Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin*. Cell Host Microbe, **2010**. 7(6): p. 509-15.
20. Nguyen, K.D., et al., *Human polyomavirus 6 and 7 are associated with pruritic and dyskeratotic dermatoses*. J Am Acad Dermatol, **2017**. 76(5): p. 932-940 e3.
21. Ho, J., et al., *Human polyomavirus 7-associated pruritic rash and viremia in transplant recipients*. J Infect Dis, **2015**. 211(10): p. 1560-5.
22. van der Meijden, E., et al., *Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient*. PLoS Pathog, **2010**. 6(7): p. e1001024.
23. Haycox, C.L., et al., *Trichodysplasia spinulosa--a newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host*. J Investig Dermatol Symp Proc, **1999**. 4(3): p. 268-71.

24. Cason, C., et al., *Antibody response to polyomavirus primary infection: high seroprevalence of Merkel cell polyomavirus and lymphoid tissue involvement*. Journal of Neurovirology, **2018**. 24(3): p. 314-322.
25. Kean, J.M., et al., *Seroepidemiology of human polyomaviruses*. PLoS Pathog, **2009**. 5(3): p. e1000363.
26. Teras, L.R., et al., *Prediagnostic circulating polyomavirus antibody levels and risk of non-Hodgkin lymphoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, **2015**. 24(2): p. 477-80.
27. Antonsson, A., et al., *Prevalence and stability of antibodies to thirteen polyomaviruses and association with cutaneous squamous cell carcinoma: A population-based study*. J Clin Virol, **2018**. 101: p. 34-37.
28. Kamminga, S., et al., *Prevalence of DNA of fourteen human polyomaviruses determined in blood donors*. Transfusion, **2019**. 59(12): p. 3689-3697.
29. Kamminga, S., et al., *Seroprevalence of fourteen human polyomaviruses determined in blood donors*. PLoS One, **2018**. 13(10).
30. Csoma, E., et al., *Novel human polyomaviruses in pregnancy: higher prevalence of BKPyV, but no WUPyV, KIPyV and HPyV9*. J Clin Virol, **2012**. 55(3): p. 262-5.
31. Sumino, K.C., et al., *Detection of respiratory viruses and the associated chemokine responses in serious acute respiratory illness*. Thorax, **2010**. 65(7): p. 639-44.
32. Prezioso, C., et al., *KI and WU Polyomavirus in Respiratory Samples of SARS-CoV-2 Infected Patients*. Microorganisms, **2021**. 9(6).
33. Nunes, M.C., et al., *Polyomaviruses-associated respiratory infections in HIV-infected and HIV-uninfected children*. J Clin Virol, **2014**. 61(4): p. 571-8.
34. Okada, M., et al., *WU polyomavirus detected in respiratory tract specimens from young children in Japan*. Pediatr Int, **2013**. 55(4): p. 536-7.
35. Venter, M., A. Visser, and R. Lassauniere, *Human polyomaviruses, WU and KI in HIV exposed children with acute lower respiratory tract infections in hospitals in South Africa*. J Clin Virol, **2009**. 44(3): p. 230-4.
36. van der Zalm, M.M., et al., *Prevalence and pathogenicity of WU and KI polyomaviruses in children, the Netherlands*. Emerg Infect Dis, **2008**. 14(11): p. 1787-9.
37. Bialasiewicz, S., et al., *A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian children*. J Clin Virol, **2007**. 40(1): p. 15-8.
38. Song, X., et al., *Characterization of the non-coding control region of polyomavirus KI isolated from nasopharyngeal samples from patients with respiratory symptoms or infection and from blood from healthy blood donors in Norway*. J Gen Virol, **2016**. 97(7): p. 1647-1657.
39. Wattier, R.L., et al., *Role of human polyomaviruses in respiratory tract disease in young children*. Emerg Infect Dis, **2008**. 14(11): p. 1766-8.
40. Teramoto, S., et al., *Detection of KI polyomavirus and WU polyomavirus DNA by real-time polymerase chain reaction in nasopharyngeal swabs and in normal lung and lung adenocarcinoma tissues*. Microbiol Immunol, **2011**. 55(7): p. 525-30.
41. Babakir-Mina, M., et al., *Identification of the Novel KI Polyomavirus in Paranasal and Lung Tissues*. Journal of Medical Virology, **2009**. 81(3): p. 558-561.
42. Bergallo, M., et al., *Quantitative detection of the new polyomaviruses KI, WU and Merkel cell virus in transbronchial biopsies from lung transplant recipients*. J Clin Pathol, **2010**. 63(8): p. 722-5.
43. Csoma, E., et al., *Prevalence of WU and KI polyomaviruses in plasma, urine, and respiratory samples from renal transplant patients*. J Med Virol, **2011**. 83(7): p. 1275-8.
44. Siebrasse, E.A., et al., *Human polyomaviruses in children undergoing transplantation, United States, 2008-2010*. Emerg Infect Dis, **2012**. 18(10): p. 1676-9.
45. Bialasiewicz, S., et al., *Detection of Recently Discovered Human Polyomaviruses in a Longitudinal Kidney Transplant Cohort*. American Journal of Transplantation, **2016**. 16(9): p. 2734-2740.
46. Csoma, E., et al., *Study of Karolinska Institutet and Washington University polyomaviruses in tonsil, adenoid, throat swab and middle ear fluid samples*. Future Microbiology, **2018**. 13(16): p. 1719-1730.

47. Sharp, C.P., et al., *Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals*. J Infect Dis, **2009**. 199(3): p. 398-404.
48. Bergallo, M., et al., *Real Time PCR TaqMan assays for detection of polyomaviruses KIV and WUV in clinical samples*. Journal of Virological Methods, **2009**. 162(1-2): p. 69-74.
49. Miller, M.A., et al., *WU polyomavirus in patients infected with HIV or hepatitis C virus, Connecticut, USA, 2007*. Emerg Infect Dis, **2009**. 15(7): p. 1095-7.
50. Prezioso, C., et al., *Polyomaviruses shedding in stool of patients with hematological disorders: detection analysis and study of the non-coding control region's genetic variability*. Medical Microbiology and Immunology, **2019**. 208(6): p. 845-854.
51. Comar, M., et al., *Secondary lymphoid tissue as an important site for WU polyomavirus infection in immunocompetent children*. J Med Virol, **2011**. 83(8): p. 1446-50.
52. Kourieh, A., et al., *Prevalence and risk factors of human polyomavirus infections in non-malignant tonsils and gargles: the SPLIT study*. J Gen Virol, **2018**. 99(12): p. 1686-1698.
53. Csoma, E., et al., *WU and KI polyomaviruses in respiratory, blood and urine samples from renal transplant patients*. J Clin Virol, **2015**. 64: p. 28-33.
54. Csoma, E., et al., *Survey of KI, WU, MW, and STL Polyomavirus in Cancerous and Non-Cancerous Lung Tissues*. Pathobiology, **2017**.
55. Karachaliou, M., et al., *The Natural History of Human Polyomaviruses and Herpesviruses in Early Life-The Rhea Birth Cohort in Greece*. American Journal of Epidemiology, **2016**. 183(7): p. 671-679.
56. Robles, C., et al., *Seroreactivity against Merkel cell polyomavirus and other polyomaviruses in chronic lymphocytic leukaemia, the MCC-Spain study*. Journal of General Virology, **2015**. 96: p. 2286-2292.
57. Egan, K.M., et al., *Prospective investigation of polyomavirus infection and the risk of adult glioma*. Sci Rep, **2021**. 11(1): p. 9642.
58. Gossai, A., et al., *Seroepidemiology of Human Polyomaviruses in a US Population*. American Journal of Epidemiology, **2016**. 183(1): p. 61-69.
59. van Rijn, A.L., et al., *Impact of HPyV9 and TSPyV coinfection on the development of BK polyomavirus viremia and associated nephropathy after kidney transplantation*. J Med Virol, **2019**. 91(6): p. 1142-1147.
60. Wijaya, W.A., et al., *Prevalence of Merkel Cell Polyomavirus in Normal and Lesional Skin: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Front Oncol, **2022**. 12: p. 868781.
61. Hashida, Y., et al., *Prevalence and Genetic Variability of Human Polyomaviruses 6 and 7 in Healthy Skin Among Asymptomatic Individuals*. J Infect Dis, **2018**. 217(3): p. 483-493.
62. Wang, Y., et al., *Occurrence of newly discovered human polyomaviruses in skin of liver transplant recipients and their relation with squamous cell carcinoma in situ and actinic keratosis - a single-center cohort study*. Transpl Int, **2019**. 32(5): p. 516-522.
63. Ribero, S., et al., *No evidence of association of human polyomaviruses V6, V7 and V12, and Saint Louis human polyomavirus with squamous cell carcinoma*. Br J Dermatol, **2017**. 177(4): p. e112-e113.
64. Dona, M.G., et al., *Prevalence of 13 polyomaviruses in actinic keratosis and matched healthy skin samples of immunocompetent individuals*. Infect Agent Cancer, **2022**. 17(1): p. 59.
65. Klufah, F., et al., *Emerging role of human polyomaviruses 6 and 7 in human cancers*. Infect Agent Cancer, **2021**. 16(1): p. 35.
66. Andres, C., et al., *Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors*. J Cutan Pathol, **2010**. 37(1): p. 28-34.
67. Mohebbi, E., et al., *Low viral load of Merkel cell polyomavirus in Iranian patients with head and neck squamous cell carcinoma: Is it clinically important?* J Med Virol, **2018**. 90(2): p. 344-350.
68. Prezioso, C., et al., *Prevalence of MCPyV, HPyV6, HPyV7 and TSPyV in Actinic Keratosis Biopsy Specimens*. Viruses, **2022**. 14(2).
69. Fukumoto, H., et al., *Frequent detection of Merkel cell polyomavirus DNA in sera of HIV-1-positive patients*. Virol J, **2013**. 10: p. 84.

70. Fava, P., et al., *HPyV6, HPyV7 and TSPyV DNA sequences detection in skin disease patients and healthy subjects*. J Eur Acad Dermatol Venereol, **2016**. 30(4): p. 624-7.
71. Imajoh, M., et al., *Prevalence and viral DNA loads of three novel human polyomaviruses in skin cancers from Japanese patients*. J Dermatol, **2013**. 40(8): p. 657-60.
72. Varga, E., et al., *Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas*. Br J Dermatol, **2009**. 161(4): p. 930-2.
73. Mokanzski, A., et al., *Molecular Profiling of Merkel Cell Polyomavirus-Associated Merkel Cell Carcinoma and Cutaneous Melanoma*. Diagnostics (Basel), **2021**. 11(2).
74. Horvath, K.B., et al., *Epidemiological, Clinicopathological and Virological Features of Merkel Cell Carcinomas in Medical Center of University of Pecs, Hungary (2007-2012)*. Pathol Oncol Res, **2016**. 22(1): p. 71-7.
75. Kuypers, J., et al., *WU and KI polyomaviruses in respiratory samples from allogeneic hematopoietic cell transplant recipients*. Emerg Infect Dis, **2012**. 18(10): p. 1580-8.
76. Nguyen, N.L., B.M. Le, and D. Wang, *Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses*. Emerg Infect Dis, **2009**. 15(8): p. 1199-205.
77. Norkiene, M., et al., *Production of recombinant VP1-derived virus-like particles from novel human polyomaviruses in yeast*. BMC Biotechnol, **2015**. 15: p. 68.
78. Nicol, J.T.J., et al., *Age-Specific Seroprevalences of Merkel Cell Polyomavirus, Human Polyomaviruses 6, 7, and 9, and Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus*. Clinical and Vaccine Immunology, **2013**. 20(3): p. 363-368.
79. van der Meijden, E., et al., *Different serologic behavior of MCPyV, TSPyV, HPyV6, HPyV7 and HPyV9 polyomaviruses found on the skin*. PLoS One, **2013**. 8(11): p. e81078.
80. Sroller, V., et al., *Seroprevalence rates of HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9, MWPyV and KIPyV polyomaviruses among the healthy blood donors*. Journal of Medical Virology, **2016**. 88(7): p. 1254-1261.
81. Moens, U., et al., *Serological cross-reactivity between human polyomaviruses*. Rev Med Virol, **2013**. 23(4): p. 250-64.
82. Neske, F., et al., *High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors*. BMC Infect Dis, **2010**. 10: p. 215.
83. Karachaliou, M., et al., *Common infections with polyomaviruses and herpesviruses and neuropsychological development at 4years of age, the Rhea birth cohort in Crete, Greece*. Journal of Child Psychology and Psychiatry, **2016**. 57(11): p. 1268-1276.
84. Carter, J.J., et al., *Association of Merkel Cell Polyomavirus-Specific Antibodies With Merkel Cell Carcinoma*. Jnci-Journal of the National Cancer Institute, **2009**. 101(21): p. 1510-1522.
85. Mourez, T., et al., *Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease*. Emerg Infect Dis, **2009**. 15(1): p. 107-9.
86. Huijskens, E.G., et al., *Human polyomavirus KI and WU in adults with community acquired pneumonia in The Netherlands, 2008-2009*. J Clin Virol, **2010**. 49(4): p. 306-7.
87. Hormozdi, D.J., et al., *KI polyomavirus detected in respiratory tract specimens from patients in St. Louis, Missouri*. Pediatr Infect Dis J, **2010**. 29(4): p. 329-33.
88. Babakir-Mina, M., et al., *The human polyomaviruses KI and WU: virological background and clinical implications*. Apmis, **2013**. 121(8): p. 746-54.
89. Bialasiewicz, S., et al., *Development and evaluation of real-time PCR assays for the detection of the newly identified KI and WU polyomaviruses*. J Clin Virol, **2007**. 40(1): p. 9-14.
90. Greer, R.M., et al., *Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections?* J Clin Virol, **2009**. 45(1): p. 10-5.
91. Haapanen, M., et al., *The impact of the lockdown and the re-opening of schools and day cares on the epidemiology of SARS-CoV-2 and other respiratory infections in children - A nationwide register study in Finland*. Eclinicalmedicine, **2021**. 34.
92. The Lancet Respiratory, M., *Patterns of respiratory infections after COVID-19*. Lancet Respir Med, **2024**. 12(1): p. 1.
93. Karachaliou, M., et al., *Is early life exposure to polyomaviruses and herpesviruses associated with obesity indices and metabolic traits in childhood?* Int J Obes (Lond), **2018**. 42(9): p. 1590-1601.

94. van der Meijden, E., et al., *Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus*. *Emerg Infect Dis*, **2011**. 17(8): p. 1355-63.
95. Mazziotta, C., et al., *Immunological evidence of an early seroconversion to oncogenic Merkel cell polyomavirus in healthy children and young adults*. *Immunology*, **2023**. 168(4): p. 671-683.
96. Nicol, J.T., et al., *Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9*. *Emerg Infect Dis*, **2012**. 18(8): p. 1329-32.
97. Nicol, J.T., et al., *Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, Human polyomaviruses 6, 7 and 9 and Trichodysplasia Spinulosa-associated polyomavirus*. *Clin Vaccine Immunol*, **2013**.
98. Sroller, V., et al., *Seroprevalence rates of BKV, JCV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population*. *J Med Virol*, **2014**. 86(9): p. 1560-8.
99. Mazziotta, C., et al., *Serum Antibodies Against the Oncogenic Merkel Cell Polyomavirus Detected by an Innovative Immunological Assay With Mimotopes in Healthy Subjects*. *Front Immunol*, **2021**. 12: p. 676627.
100. Vahabpour, R., et al., *Prevalence of Merkel Cell Polyomavirus in Tehran: An Age-Specific Serological Study*. *Iran Red Crescent Med J*, **2016**. 18(5): p. e26097.
101. Martel-Jantin, C., et al., *Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings*. *J Clin Virol*, **2013**. 58(1): p. 288-91.
102. Robles, C., et al., *Antibody response to Merkel cell polyomavirus associated with incident lymphoma in the Epilymph case-control study in Spain*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2012**. 21(9): p. 1592-8.
103. Robles, C., et al., *Bladder cancer and seroreactivity to BK, JC and Merkel cell polyomaviruses: the Spanish bladder cancer study*. *Int J Cancer*, **2013**. 133(3): p. 597-603.
104. Touze, A., et al., *Generation of Merkel Cell Polyomavirus (MCV)-Like Particles and Their Application to Detection of MCV Antibodies*. *Journal of Clinical Microbiology*, **2010**. 48(5): p. 1767-1770.
105. Li, T.C., et al., *Characterization of self-assembled virus-like particles of Merkel cell polyomavirus*. *PLoS One*, **2015**. 10(2): p. e0115646.
106. Zhang, C., et al., *Seroprevalence of Merkel cell polyomavirus in the general rural population of Anyang, China*. *PLoS One*, **2014**. 9(9): p. e106430.
107. Hashida, Y., et al., *Genetic Variability of the Noncoding Control Region of Cutaneous Merkel Cell Polyomavirus: Identification of Geographically Related Genotypes*. *J Infect Dis*, **2018**. 217(10): p. 1601-1611.
108. Martel-Jantin, C., et al., *Molecular epidemiology of merkel cell polyomavirus: evidence for geographically related variant genotypes*. *J Clin Microbiol*, **2014**. 52(5): p. 1687-90.
109. Chen, T., et al., *Seroepidemiology of the newly found trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus*. *J Infect Dis*, **2011**. 204(10): p. 1523-6.
110. Sadeghi, M., et al., *Detection of TS polyomavirus DNA in tonsillar tissues of children and adults: evidence for site of viral latency*. *J Clin Virol*, **2014**. 59(1): p. 55-8.
111. Fukumoto, H., et al., *Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in Japan*. *J Clin Virol*, **2015**. 65: p. 76-82.