

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Feltörekvő, új humán polyomavírusok és humán herpeszvírus 6A prevalenciájának vizsgálata

Mészáros Beáta

Témavezető:
Dr. Csoma Eszter



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

**FELTÖREKVŐ, ÚJ HUMÁN POLYOMAVÍRUSOK ÉS HUMÁN HERPESZVÍRUS
6A PREVALENCIÁJÁNAK VIZSGÁLATA**

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

Írta:

Mészáros Beáta

okleveles molekuláris biológus (mikrobiológus)

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
Mikrobiológia programja keretében

Témavezető: Dr. Csoma Eszter

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

2013. december 6. 11 óra, DE ÁOK, Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Deák Judit, PhD
Dr. Csire Márta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora
Prof. Dr. Deák Judit, PhD
Dr. Csire Márta, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2014. október 6. 13 óra, DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

BEVEZETÉS

Napjainkban a szekvenálási technikák fejlődésének és kedvezőbb költségeinek köszönhetően egyre több vírusszekvenciát azonosítanak. Ugyanakkor hiányosak az információk ezeknek a vírusoknak a prevalenciájáról és patogenitásáról, mivel nem valamilyen betegséget okozó ágensként fedezték fel őket, hanem ismeretlen vírusszekvenciák keresése közben. Megismerésükhöz tisztázni kellene a vírusok behatolási kapuját, terjedésük mechanizmusát, replikációjuk helyét, illetve azonosítani a fertőzés során kialakuló tüneteket, betegségeket, ha vannak.

Az utóbbi évek során a Polyomaviridae család tagjai ugrásszerűen gyarapodtak. Vizsgálatuk több szempontból is fontos lehet: egyrészt azért, mert hasonlóan a már régóta ismert BK és JC polyomavírusokhoz az akár tünetmentes primer fertőzés után bizonyos körülmények között súlyos megbetegedéseket okozhatnak. Korábban már több látens vírusferőzésről, így a BK és JC polomavírusról is bebizonyosodott, hogy míg a primer fertőzés általában tünetmentes vagy enyhe lefolyású, addig az immunrendszer működésének zavara következtében reaktivációjuk súlyos megbetegedéseket okozhat. A szervtranszplantációt követő immunszuppresszív terápia és a terhesség miatt kialakuló immunológiai változás a fertőzésekkel szembeni fogékonyság növekedéséhez vezethet, emellett a látens fertőzések reaktivációjának és a reinfekcióknak a kockázatát is fokozhatja. Ezért a doktori munka egyik célja volt vizsgálni, hogy vajon az eddig ismeretlen, betegségekkel, illetve tünetekkel egyértelműen összefüggésbe nem hozott polyomavírusok, a WU, KI és humán polyomavírus 9 is ilyen patogének lehetnek-e, milyen gyakran fordul elő a vírusfertőzés, mik lehetnek a behatolási kapuk, hogyan terjedhetnek a szervezeten belül.

A humán cytomegalovírus (HCMV) fertőzés miatti betegségek kialakulásának kockázata szervtranszplantált betegek és terhes nők esetében már ismert, diagnosztikája rutinszerűen végzett Magyarországon is. Azonban míg a humán herpeszvírus 6A és 6B (HHV-6A és HHV-6B) fertőzések diagnosztikája és kezelése más országokban már a HCMV-hez hasonlóan gyakori, a Debreceni Egyetemen és az ország más területein nem. Ezért célunk volt vizsgálni, hogy az immunszuppresszív terápia vagy a terhesség miatti átmeneti immunológiai változás, immunszuppresszió milyen gyakran okozhat ilyen fertőzéseket, milyen tünetekkel járhat, indokolt lehet-e kimutatásuk bevezetése a rutin diagnosztikába.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Herpeszvírusok

A látens vírusfertőzést kialakítani képes Herpesviridae családnak 3 alcsaládját különböztetjük meg: az Alpha-, Beta- és Gammaherpesvirinae alcsaládokat. Vizsgálataink során a Betaherpesvirinae alcsaládba tartozó humán herpeszvírus 5, általánosan használt nevén humán cytomegalovírus, illetve a humán herpeszvírus 6A és 6B okozta fertőzésekkel foglalkoztunk.

Humán herpeszvírus 6A és 6B

A HHV-6-ot 1986-ban izolálták először lymphoproliferatív betegségben szenvedő beteg véréből. A vírus világszerte elterjedt, a felnőtt populáció szeropozitivitása meghaladja a 95%-ot, bár fontos megjegyezni, hogy a legtöbb tanulmány nem tesz különbséget a HHV-6A és 6B között. A primer fertőzés a korai gyerekkorban, átlagosan 6 hónapos kor után, de leggyakrabban még 3 éves kor előtt bekövetkezik szinte kizárólag a HHV-6B-vel. Még ma sem tisztázott, hogy a HHV-6A-val mikor zajlik a primer fertőzés, de valószínűleg felnőttkorban, a HHV-6B fertőzést követően, bár bizonyos esetekben primer, gyerekkori HHV-6A fertőzésről is beszámoltak. A HHV-6B DNS-t főként nyálban és a nyálmirigyek sejtjeiben mutatták ki, így a vírus cseppfertőzéssel is terjed. A HHV-6 vertikális, transzplacentális terjedése is lehetséges. Az, hogy a HHV-6A hogyan terjed még ma sem egyértelmű, ugyanis nyálból nem mutatható ki. Néhány tanulmány arra utal, hogy szexuális úton terjedhet, mivel nemi váladékokban viszont detektálható. Az agy számos régiójának szöveteiből és a liquorból is detektálták. A HHV-6 sokféle szövetben, sejtben hozhat létre látens fertőzést, így a mononukleáris sejtekben, a csontvelőben, lépben, májban, vesében, ezért az is elképzelhető, hogy transzplantáció esetén a beültetett szerv által okozott HHV-6 reinfekció jelenti a fertőzést a donor szerv által a recipiensben. Feltételezhető, hogy a primer HHV-6A fertőzés valószínűleg tünetmentesen vagy szubklinikai formában zajlik. A HHV-6B a primer fertőzéskor, immunkompetens egyének mintegy harmadában enyhe, lázzal, kiütéssel járó betegséget, az exanthema subitumot (roseola infantumot) okozza, de tünetmentes is lehet. Immunszuppresszált egyénekben a látens fertőzés reaktivációjának vagy a reinfekciónak akár súlyos következményei lehetnek, így láz, kiütések, thrombocytopenia, leukopenia, pneumonia, hepatitis, pancreatitis, colitis, encephalitis, meningoencephalitis, sőt akár csontvelő-suppresszió is. A HHV-6 képes integrálódni a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe (ciHHV-6). A ciHHV-6 alatt azt értjük, amikor a teljes HHV-6 genom integrálódik az ivarsejtek kromoszómájába, így az utódokra átörökíthető.

Humán herpeszvírus 5 (humán cytomegalovírus, HCMV)

A humán herpeszvírus 5 fertőzés szintén elterjedt a populációban, a szeropozitivitás a 6-11 éves korcsoportban közel 40%, a felnőttek körében már meghaladja a 90%-ot. A vírus a fertőzött személy testváladékaival terjed, így például nyállal, vizelettel, széklettel, vérrel, nemi váladékokkal és anyatejjel is. Szervátültetés esetében a beültetett szervvel is átvihető a donorból a recipiensbe. Az anyáról magzatra, illetve csecsemőre történő átvitele történhet transzplacentálisan, a szülőcsatornán való áthaladásakor, a fertőzött anya testváladékaival, illetve az anyatejjel is. Egészséges egyénekben a primer fertőzés általában szubklinikai vagy mononucleosis infectiosát okoz. Transzplacentális terjedése során a magzatot az első két trimeszterben ért primer fertőzés kongenitális defektusokat okozhat. A primer fertőzés során a vírus a monocitákon és limfocitákon kívül az epitheliális sejteket is fertőzi. Ezt követően a vírus látenciát alakít ki a szervezet számos szövetében és sejtjében, így például a monocitákban, makrofágokban, limfocitákban, a monocita/makrofág sejtvonala előalakjaiban, a nyálmirigyekben, a csontvelőben, a vese epitheliális sejtjeiben, sőt az agyban is. A látens fertőzés az immunrendszer működésének zavara miatt (AIDS-esekben, szervtranszplantáltakban) reaktiválódhat. A reaktiválódás során főként a monocitákban, makrofágokban, a vesetubulusok epitheliális sejtjeiben szaporodik. Ugyanakkor nem csak reaktiváció történhet, hanem új vírustörzsekkel reinfekció is. A reaktiváció és reinfekció immunszuppresszált egyénekben súlyos tünetekkel járhat: pneumonia, gastrointestinalis megbetegedések, hepatitis, retinitis, szövet- és szervkilökődés.

Polyomavírusok

2007-ig a Polyomaviridae családnak mindössze két humánpatogén tagját ismerték: a BK (BKPyV) és a JC polyomavírust (JCPyV). Azóta a szekvenálási technológiáknak köszönhetően 12 új humán polyomavírus-szekvenciát fedeztek (KI és WU polyomavírus, Merkel-sejtes polyomavírus, humán polyomavírus 6, 7, trichodysplasia spinulosa-asszociált polyomavírus, humán polyomavírus 9, 10, Malawi polyomavírus, MX polyomavírus, humán polyomavírus 12, Saint Louis polyomavírus) fel. 2007-ben írták le a 3. humán polyomavírus teljes genom szekvenciáját akut légúti megbetegedés tüneteitől szenvedő gyerekek légúti mintáiban, melyet KI polyomavírusnak (KIPyV) neveztek el. Még ugyanebben az évben, szintén légúti fertőzés tüneteit mutató gyerek légúti váladékában azonosították a 4. humán polyomavírust: a WU polyomavírust (WUPyV). A humán polyomavírus 9-et (HPyV9) 2011-ben Scuda és munkatársai azonosították vesetranszplantált beteg vérmintájában. Az értekezésben szereplő vizsgálatainkat 2009-ben kezdtük, amikor még nagyon korlátozottan

áltak rendelkezésünkre információk. A teljes munka alatt csak kilenc humán polyomavírust ismertünk, melyek közül a WUPyV, KIPyV és HPyV9 vírusok tanulmányozását tűztük ki célul.

WU polyomavírus (WUPyV)

A szeroprevalencia-vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a WU vírusfertőzés világszerte elterjedt, az 1-5 éves korcsoportban a WUPyV szeropozitivitása eléri a 44-87%-ot, míg a felnőtt populációban 69-98%. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a primer WUPyV fertőzés általában kisgyermekkorban következhet be. A terjedésről keveset tudunk, feltételezések szerint légúti vagy fekál-orál úton történik. Az is feltételezhető, hogy látens fertőzést alakítanak ki a szervezetben, és immunszuppresszió hatására reaktiválódhatnak. Az elmúlt években egyre több prevalencia adat jelent meg a vírusról: a légúti mintákon kívül kimutatták vérben, székletben, mandulában, liquorban. Immunkompetens egyéneknél leggyakrabban légúti fertőzés tüneteivel szenvedő gyerekeknél mutatták ki a vírust, a legnagyobb gyakorisággal (16,4%) Japán gyerekek légúti mintáiban. Úgy tűnik, hasonlóan a BK és JC polyomavírushoz az immunszuppresszáltak körében nagyobb gyakorisággal mutatható ki a vírus (0,9-8,3%). Feltételezhetjük, hogy az immunkompetens egyéneknél esetleg tünetmentesen vagy enyhe tünetekkel zajló fertőzéssel szemben a WUPyV fertőzés súlyosabb következményekkel járhat immunszuppresszáltakban.

KI polyomavírus (KIPyV)

A prevalenciavizsgálatok során minden kontinensről származó légúti mintából kimutatták a KI vírust, a PCR pozitivitás 0,5-8% volt. A populáció fertőzöttségét tekintve az eddigi adatok szerint az 5 éves korcsoportban a szeropozitivitás 45-94%, míg a felnőttekben 55-100%, ami arra utal, hogy – hasonlóan a WUPyV-hoz – a vírus valószínűleg elterjedt a humán populációban, és a primer fertőzés általában gyermekkorban következik be. Több munkacsoport vizsgálta a vírus prevalenciáját a humán populációban, és a légúti mintákon kívül kimutatták vérben, székletben, mandulában, tüdőszövetben különböző gyakorisággal szinte minden kontinensen. Immunkompetens egyének esetében a legnagyobb gyakoriságot (12%) mandulaszövetből írták le. Ennél a vírussal is elmondható, ami a WUPyV esetében: a légúti váladékokban, mandulában, tüdőszövetben történő kimutatása miatt egyre valószínűbb a légúti terjedés, de nem kizárt a fekál-orál terjedés sem. Az is feltételezhető, hogy a disszemináció a szervezetben a vér által történik. Hasonlóan a BK és JC polyomavírushoz, a KI vírusfertőzés kockázatát is növelheti az immunszuppresszió (a vírus előfordulásának gyakorisága immunszuppresszáltakban 1-45%, míg immunkompetens egyéneknél 0,5-12%).

Humán polyomavírus 9 (HPyV9)

A vírust egy immunuszuppresszív terápiában részesülő vesetranszplantált beteg szérumában és vizeletében mutatták ki először. A szerológiai vizsgálatok alapján a HPyV9 szeropozitivitás 1-14 éves gyerekek esetében 10,4-18,6%, 15-19 éves kamaszok körében 33,7%. Az egészséges felnőtteknek pedig mindössze 39,4-47%-a szeropozitív, 80 éves korra elérheti a 69,6%-ot. A szeropozitivitás a korral nő, ami arra utalhat, hogy a HPyV9-el történő fertőzés az élet bármely szakaszában bekövetkezhet, vagyis a felnőtt populáció jelentős része még fogékony a fertőzésre. Hasonlóan a WU és KI polyomavírushoz az sem kizárt, hogy az immunuszuppresszió növeli a fogékonyságot a HPyV9 fertőzésre. A vese- és csontvelő-transzplantáltak körében a szeropozitivitás 63-69% volt, ami meghaladta az egészséges kontrollcsoportét (41-43%). Máig sem tisztázott a terjedés módja, a behatolási kapu, illetve a vírusreplikáció helye. Kimutatták szérumban, plazmában, teljes vérben, vizeletben. Leírták bőrmintákban is, az egészséges kontrollcsoportban 0,9%-os gyakorisággal, Merkel-sejtes karcinómás betegek bőrmintájában 25%-os gyakorisággal. Számos más mintában is keresték a virális DNS-t, de nem tudták kimutatni székletben, alsó légúti mintában, nasopharingealis aspirátumban, liquorban. A HPyV9-et is kimutatták immunuszuppresszált egyéneknél, és nem kizárt, hogy hasonlóan a többi polyomavírushoz, főként immunuszuppresszált egyéneknél okozhat megbetegedést, illetve a fertőzés gyakorisága is nagyobb lehet ezekben a betegekben.

CÉLKITŰZÉSEK

- Vizsgálataink során a HHV-6A, HHV-6B, HCMV, KIPyV, WUPyV és HPyV9 vírusok prevalenciáját tanulmányoztuk egészséges felnőttekben, terhes nőkben és vesetranszplantált betegekben.
- Mivel vesetranszplantáltak esetén a HHV-6A és HHV-6B fertőzések nyomonkövetése, diagnosztikája a Debreceni Egyetemen, de Magyarországon máshol sem rutinszerűen végzett,
 - így célunk volt vizsgálni, hogy milyen gyakorisággal fordulnak elő ezek a vírusok, a fertőzés a transzplantációt követően mikor fordul elő, jár-e tünetekkel, ha igen, melyek ezek.
 - Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a HCMV fertőzés és a HHV-6A, illetve HHV-6B fertőzés közt van-e összefüggés.
- Az új humán polyomavírusok, a KI, WU és HPyV9 esetén a vírusokról

prevalenciaadatok gyűjtését tűztük ki célul.

- Különböző klinikai minták vizsgálatával a vírusok lehetséges behatolási kapuit, szervezeten belüli esetleges terjedését kívántuk vizsgálni.
- Tanulmányoztuk, hogy az egészséges immunrendszerűek, az átmenetileg, a magzat védelme miatt természetes módon immunszuppresszált, illetve megváltozott immunstátuszú terhes nők, valamint tartósan, erősen immunszuppresszált vesetranszplantáltak esetén van-e különbség a vírusok előfordulási gyakoriságában a különböző minták esetén.
- Célunk volt azt is vizsgálni, hogy ha ezek a vírusok kimutathatóak, a terhesség mely szakaszában, illetve a transzplantációt követően mikor, milyen mennyiségben jelennek meg.
- Vizsgálni kívántuk, hogy van-e összefüggés a tünetek és a különböző vírusfertőzések közt.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Minták és betegcsoportok

Vesetranszplantált betegek és nem transzplantált, egészséges személyek mintái

A herpeszvírusok vizsgálatához a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézetében vesetranszplantáción átesett 200 beteg (114 férfi, 86 nő; életkor: 11 év- 69 év, medián: 46 év) 200 EDTA-val alvadásgátolt, perifériás vérmintáját gyűjtöttük a transzplantációt követő különböző időpontokban (3-7115 nap; medián: 1270 nap). Kontrollként 200 egészséges személy EDTA-s vérmintáját használtuk (75 férfi, 125 nő; életkor: 10-74 év, medián: 39 év).

A polyomavírusok vizsgálatához 195 vesetranszplantált beteg 195 EDTA-s vérmintáját gyűjtöttük (82 nő, 113 férfi; életkor: 7-69 év, medián: 46 év) a transzplantációt követő különböző időpontokban (3-7108 nap, medián: 1188 nap). Kontrollként 200 egészséges egyén vérmintáját használtuk (75 férfi, 125 nő, életkor: 10-74 év, medián: 39 év). Továbbá 50 vesetranszplantált betegtől vizeletmintát is gyűjtöttünk a transzplantáció után (5-6230 nap, medián: 141 nap), 90 betegtől pedig 90 felső légúti (tamponnal vett torokváladék) mintát a transzplantációt követően 18-6230 nappal (medián: 1177 nap). Kontrollként 36 egészséges személytől gyűjtött vizeletminta szolgált (17 férfi, 19 nő, életkor: 58-21 év).

A vizsgálatokat a DE OEC Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte.

Egészséges terhes és nem terhes nők mintái

A DE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 100 egészséges terhes nő (életkor: 17-42 év, medián: 32 év; a terhesség 5-39 hetében, medián: 26 hét) és 100 egészséges, nem terhes nő (életkor: 18-44 év, medián: 32 év) alvadásgátolt perifériás vér-, légúti és vizeletmintáját gyűjtöttük. A három különböző mintát minden személy esetében egy időben vettük. A terhes nők mintái mindhárom trimeszterből származtak: az első trimeszterből 28, a második trimeszterből 27, a harmadik trimeszterből 45 minta. Kontrollként egészséges, nem terhes, fertilitási vizsgálatra érkező nőktől gyűjtöttünk mintákat. A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta.

Minták előkészítése és nukleinsav izolálás

A mintagyűjtés követően azonnal a vér plazma és sejtes állományát centrifugálással (10 perc, 1500 g) elválasztottuk. A sejtes állományból a vörösvértesteket lizálással eltávolítottuk.

A 200-200 μL plazmából, vizeletből és 200 μL pufferbe mosott légúti mintából, valamint $1,5 \times 10^6$ sejtből a virális nukleinsavat High Pure Viral Nucleic Acid Kittel (Roche, Svájc) a gyártó utasításai szerint izoláltuk. Az izolálás sikerességét, a DNS amplifikálhatóságot β -globin PCR-rel, az RNS-ét pedig GAPDH mRNS RT-PCR segítségével ellenőriztük.

Vírusok kimutatása

HHV-6 nested PCR

A HHV-6 DNS jelenlétét olyan nested polimeráz láncreakcióval mutattuk ki, mely alkalmas a HHV-6A és a HHV-6B elkülönítésére az amplifikált termékek mérete alapján. A primerek a vírusok nagyon korai régiójának U90 génszakaszára specifikusak. Pozitív kontrollként HHV-6A GS, illetve HHV-6B Z29 vírusszuspenzióból nyert DNS-t használtunk. A PCR reakció 2. körében keletkezett termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el etidium-bromid festéket tartalmazó 1,5 %-os agaróz gélben. A detektálást Bio-Rad Gel Doc 2000 géldokumentációs rendszerrel végeztük. A vírusokat az amplifikált termék mérete alapján azonosítottuk.

HHV-6 real-time PCR

A HHV-6 kvantitatív kimutatásához TaqMan próbás detektálással real-time PCR-t optimalizáltunk. Abszolút kvantifikációhoz a HHV-6A-ra és HHV-6B-re jellemző U65-66

genomrégiót tartalmazó plazmidot használtunk. A két vírus esetén a forward primer és a TaqMan próba közös, míg a reverz primer eltérő volt.

A virális DNS mennyiségi meghatározásához a kereskedelmi forgalomban kapható, klinikai diagnózishoz validált kitet (HHV-6 Q-PCR AlertAmpliMix) is használtunk, mely a HHV-6 ORF 13 régiójára és humán β -globin génre specifikus primereket, próbákat tartalmaz.

HHV-6 RT-PCR

Ahhoz, hogy elkülönítsük az aktív és látens HHV-6 fertőzést, reverz transzkripció PCR-t (RT-PCR) végeztünk. Az RNS átírását cDNS-sé High Capacity cDNA Reverse Transcription Kittel végeztük a fehérvérsejt mintákból izolált nukleinsav DNáz enzim kezelését követően. Az RT-PCR primerei a HHV-6 genom U79/80 génszakaszára illeszkednek.

WUKI nested PCR

A WUPyV és KIPyV DNS kimutatásához olyan WUKI nested PCR-t használtunk, amely mindkét vírus DNS-ét amplifikálja. A WUKI PCR primerei a vírusok VP2 génszakaszára tervezettek. Pozitív kontrollként WUPyV és KIPyV genomrészletet tartalmazó plazmidokat használtunk. A vírusok azonosításához a PCR termékeket 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk, majd ezt követően a megfelelő méretű amplifikált terméket a gélből preparáltuk, QIAquick Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk és ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer-rel szekvenáltattuk.

WU és KI real-time PCR

A WUPyV és KIPyV DNS mennyiségi meghatározásához TaMan próbás detektálással real-time PCR-t is végeztük. A primerek és próbák a vírusok VP1 génszakaszára voltak specifikusak. Abszolút kvantifikációhoz a korábban említett KIPyV és WUPyV plazmidokat használtuk.

HPyV9 nested PCR

A HPyV9 PCR-t a felfedezők által leírt diagnosztikai primerekkel végeztük, melyek a HPyV9 VP1 génszakaszára specifikusak. A pozitív kontroll HPyV9 genomrészletet tartalmazó plazmid volt. A vírus azonosításához a PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélen futtattuk, majd ezt követően a megfelelő méretű amplifikált terméket a gélből preparáltuk, QIAquick Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk és ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer-rel szekvenáltattuk.

HCMV pp65 antigenémia

A HCMV pp65 antigén kimutatása fehérvérsejtekben immunfluoreszcens technikával, CINAkittel, a gyártó utasításai szerint a mintavételek napján a rutin diagnosztika részeként történt. Az adataink elemzésénél ezeket az eredményeket is felhasználtuk.

Statisztika

A statisztikai elemzésekhez chi-négyzet tesztet, Fisher-féle egzakt tesztet, és Mann-Whitney U-tesztet használtunk. A különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

EREDMÉNYEK

Humán herpeszvírus 6 fertőzés

Vesetranszplantált betegek és egészséges felnőttek vizsgálata

A vesetranszplantált betegek 4,5 %-ánál (8 HHV-6A és 1 HHV-6B pozitív) igazoltunk aktív HHV-6 fertőzést. Nem mutattunk ki HHV-6 viraemiát az egészséges, felnőttkorú személyek között. Fisher-féle egzakt teszttel végzett elemzés alapján a HHV-6 viraemia szignifikánsan gyakoribbnak bizonyult a vesetranszplantált betegekben, mint az egészséges donorokban (9/200 vs. 0/200; $p=0,004$).

A HHV-6 kvantitatív real-time PCR eredményei alapján a vesetranszplantált betegek esetében a virális DNS mennyisége a plazmamintákban 5×10^2 - 6×10^5 genomekvivalens/mL (GEq/mL), míg az egészséges felnőtt személy esetében a detekciós küszöb alatti, azaz <250 GEq/mL volt. A vírusszám a fehérvérsejt-mintákban vesetranszplantált betegek esetén $5,1 \times 10^2$ - $2,1 \times 10^6$ az egészséges személy esetében $5,8 \times 10^3$ GEq/ $1,5 \times 10^6$ sejt. Azon egyének esetében, akik ivarsejt-eredetű kromoszómaintegrált HHV-6-tal rendelkeznek, jelentős mennyiségű virális DNS mutatható ki a vérben, vagyis a legalább 1 víruskópia / 1 sejt arány következtében több millió GEq/mL vér. Egy vesetranszplantált beteg esetében (0,5 %) a virális DNS mennyisége alapján (a fehérvérsejt-mintában $2,1 \times 10^6$ GEq/ $1,5 \times 10^6$ sejt, a plazmában $6,2 \times 10^3$ GEq/mL) ciHHV-6-ot mutattunk ki.

Mindezek mellett a vesetranszplantált betegek 6%-ánál (12/200) HHV-6B, míg 2%-uknál (4/200) HHV-6A látenciát mutattunk ki. A kontrollcsoportba tartozó egészséges felnőttek 9%-ánál (18/200) HHV-6B, 1%-ánál (2/200) pedig HHV-6A látenciát detektáltunk. A látenciagyakoriságok a két csoportban szignifikáns különbséget nem mutatnak (16/200 vs. 20/200; $p > 0,005$). A statisztikai elemzés alapján látens fertőzés esetén a HHV-6B

szignifikánsan gyakrabban fordult elő, mint a HHV-6A mind a vesetranszplantált betegek (18/20 vs. 2/20), mind pedig az egészséges személyek (18/20 vs. 2/20) közt ($p=0,01$; illetve $p=0,0001$). Ugyanakkor a HHV-6A szignifikánsan gyakoribb volt aktív vírusfertőzésben, mint látencia esetében a vesetranszplantáltakban (8/9 vs. 4/16; $p=0,0036$). A statisztikai analízis alapján a transzplantáció és a mintavétel közt eltelt időben nem volt szignifikáns különbség az aktív HHV-6 fertőzött (21 nap-13,1 év; medián 6,2 év) és a HHV-6 negatív (3 nap-19,6 év; medián 3,3 év) betegek közt. Szintén nem tapasztaltunk szignifikáns életkori eltérést a HHV-6 viraemiás (17,9-61,7 év, medián 45,4 év) és HHV-6 negatív (11,2-68,8 év; medián 45,4 év) betegek közt.

A vizsgált beteg közül 31 páciens volt tünetmentes a mintavétel időpontjában; a többi betegnél láz, légúti, gasztrointesztinális tünetek jelentkeztek. A HHV-6 viraemia és a klinikai adatok statisztikai elemzése alapján nem találtunk összefüggést a HHV-6A és HHV-6B, illetve a betegek klinikai tünetei közt.

Terhes és nem terhes nők vizsgálata

A terhes és nem terhes nők vizsgálata során HHV-6A DNS-t mutattunk ki nested PCR-rel a terhes (1/100, 1 %) és a nem terhes nők (3/100, 3 %) plazma- és fehérvérsejt-mintájában is egyidejűleg, azonban aktív víruszaporodást nem igazoltak a vizsgálataink. A HHV-6 DNS mennyisége a terhes nő esetében a plazmában $2,03 \times 10^2$ GEq/mL, míg a fehérvérsejt-mintában $5,07 \times 10^5$ GEq/ $1,5 \times 10^6$ sejt volt. A nem terhes nők esetében a plazmákban mért virális DNS mennyisége $<250 - 2,55 \times 10^3$ GEq/mL, a fehérvérsejt-mintákban $<250 - 1,6 \times 10^5$ GEq/ $1,5 \times 10^6$ sejt. Habár a HHV-6 nukleinsav mennyisége a fehérvérsejt-minták többségében magas volt, a HHV-6 mennyisége/fehérvérsejt arány (0,08-0,33 GEq/1 fehérvérsejt) nem igazolta a HHV-6 jelenlétét.

Terhes nők 14%-ánál (14/100) HHV-6B, míg 2%-ánál (2/100) HHV-6A látenciát mutattunk ki a fehérvérsejtekben. A nem terhes nők közül 15%-uk (15/100) esetében látens HHV-6B, 4%-uk (4/100) esetében pedig látens HHV-6A DNS-t detektáltunk a fehérvérsejtekben, míg egy személy esetében HHV-6A és HHV-6B egyszerre volt jelen a fehérvérsejt-mintában. A HHV-6 látenciát mindhárom trimeszterben kimutattuk. A HHV-6B látencia szignifikánsan gyakoribb volt a HHV-6A látenciánál mind a terhes (14 vs. 2; $p=0,0035$), mind a nem terhes nők körében (15 vs. 4; $p=0,014$). Statisztikailag szignifikáns különbség azonban nem volt a terhes és nem terhes nők körében detektált látenciagyakoriság közt (16/100 vs. 19/100; $p>0,005$).

Vesetranszplantált betegek humán cytomegalovírus fertőzése

A vesetranszplantált betegek 3,5%-a (7/200) esetében a pp65 antigén kimutatása a fehérvérsejtekben HCMV fertőzést igazolt. HHV-6A vagy HHV-6B és HCMV koinfekciót egy betegnél sem detektáltunk. HHV-6 fertőzést, aktív vírusreplikációt ugyan valamivel gyakrabban mutattunk (9/200; 4,5%) a vesetranszplantált betegek közt, ám a különbség statisztikailag nem szignifikáns (9/200 vs. 7/200; $p > 0,05$).

Statisztikailag szignifikáns életkori eltérést nem mutattunk ki a HCMV pozitív (32,7-61,6 év; medián 55,4 év) és negatív (11,2-68,8 év; medián 44,8 év) betegek közt. A statisztikai analízis alapján a transzplantáció és a mintavétel közt eltelt időben nem volt szignifikáns különbség a HCMV pozitív (50 nap-15,7,6 év; medián 124 nap) és negatív (3 nap- 19,6 év; medián 3,5 év) betegek közt. Statisztikailag igazolható összefüggést nem tapasztaltunk a betegek klinikai tünetei és a vírusfertőzés közt.

Polyomavírusok

Vesetranszplantált betegek és egészséges személyek vizsgálata

A vesetranszplantáltak vizsgálata során a plazmaminták 3,6%-a (7/195) volt WUKI PCR pozitív (2/195, 1% KIPyV; 5/195, 2,6% WUPyV). A DNS mennyisége egy KIPyV pozitív minta kivételével ($2,5 \times 10^2$ GEq/mL) a real-time PCR detektálási küszöbe alatt volt (< 250 GEq/mL plazma). Szignifikánsan gyakrabban mutattunk ki WUPyV és KIPyV pozitivitást a transzplantáció után rövid időn belül (8-2122 nap, medián 24 nap), mint a későbbi időpontokban (3-7108 nap, medián 1271 nap). A statisztikai analízis nem igazolt összefüggést a tünetek és a WUKI PCR pozitívitás között. Az egészséges személyektől származó plazmamintákban nem tudtunk kimutatni sem KIPyV, sem WUPyV DNS-t.

A vesetranszplantált betegek vizeletmintájának 14%-a (7/50) volt WUKI PCR pozitív (1/50, 2% KIPyV; 6/50, 12% WUPyV). A virális DNS mennyisége 2 WUPyV pozitív minta kivételével (5×10^2 GEq/mL és $1,1 \times 10^3$ GEq/ml vizelt) a real-time PCR detektálási küszöbe alatti volt. Két beteg esetében a WUPyV viruriával egyidejűleg viraemiát is detektáltunk. Az egészséges személyek vizeletmintájában sem WU, sem KI vírust nem detektáltunk. Szignifikánsan gyakrabban mutattunk ki WUPyV és KIPyV pozitivitást a transzplantáció után rövid időn belül (8-58 nap, medián 30 nap), mint a későbbi időpontokban (7-6230 nap, medián 745 nap). Nem volt statisztikailag igazolható összefüggés a tünetek és a WUKI PCR pozitívitás között.

A vesetranszplantált betegekről származó légúti minták 10%-a (9/90) volt WUKI PCR pozitív (6/90, 6,67% KIPyV; 3/90, 3,33% WUPyV). A KIPyV DNS mennyisége a mintákban

$2,8 \times 10^2 - 3,7 \times 10^5$ GEq/mL volt, egy WUPyV pozitív mintában pedig $6,3 \times 10^2$ GEq/mL-t mutattunk ki. Két WUPyV és KIPyV pozitív mintában nem volt detektálható real-time PCR-rel a virális nukleinsav. Egy KIPyV pozitív légúti mintával rendelkező vesetranszplantált betegnek a légúti mintájával egyidőben vett plazmamintájában WUPyV DNS-t mutattunk ki. Statisztikailag szignifikáns eltérést mutattunk ki a transzplántáció óta eltelt időben a WU és KI pozitív minták és a negatívak közt (21-822 nap, medián 101 vs. 18-6230 nap, medián 1177 nap ; $p=0,002$). Azon betegek, akik légúti mintáiban WU/KI vírus pozitívitást mutattunk ki, a mintavétel idején valamennyien légúti tünetektől szenvedtek. A légúti tünetek megléte szignifikánsan gyakoribb volt esetükben, mint azon betegek körében, akik légúti mintájában egyik vírust sem tudtuk kimutatni (9/9 vö. 47/81; $p=0,01$).

Terhes és nem terhes nők vizsgálata

WUPyV DNS-t a vizsgált terhes és nem terhes nők plazmamintájában nem mutattunk ki. KIPyV DNS-t két nem terhes nő plazmamintájában (2%) detektáltunk, bár a virális DNS mennyisége a real-time PCR detektálási küszöbe alatt volt. A vizelet- és légúti mintákban sem KI, sem WU vírus genomot nem tudtuk kimutatni.

HPyV9 polyomavírust azonban mindkét vizsgált csoport minden mintatípusában sikerült kimutatni. A terhes nők plazmamintáinak 2%-ában (2/100), a nem terhes nők plazmamintáinak 6%-ában (6/100) mutattuk ki, a különbség a két csoport közt statisztikailag nem szignifikáns (2/100 vs. 6/100; $p>0,05$). A HPyV9 DNS gyakorisága a két vizsgált csoport légúti mintáiban nem különbözött, 2% (2/100) volt a gyakorisága a HPyV9 pozitív légúti mintáknak a terhes és a nem terhes nők csoportjában is. HPyV9 DNS-t a terhes nők vizeletmintájának 3%-ában (3/100) és a nem terhes nő vizeletmintájának 2%-ában (2/100) mutattunk ki. Nem volt szignifikáns különbség a terhes és nem terhes nők HPyV9 pozitív vizeletmintáinak gyakorisága között (3/100 vs. 2/100; $p>0,005$). HPyV9 és KIPyV koinfekciót mutattunk ki két nem terhes nő plazmamintájában.

MEGBESZÉLÉS

Irodalmi adatok szerint mind a HCMV, mind a HHV-6 fertőzés súlyos tüneteket okozhat immunszuppresszált, így vesetranszplantált betegekben, ám Magyarországon még kevésbé vizsgált a HHV-6 infekcióból vagy reaktivációból származó komplikációk jelentősége. Munkánk során ezért célul tűztük ki a HHV-6 viraemia gyakoriságának vizsgálatát ezekben a betegekben. Eredményeink szerint a vesetranszplantált betegek 4,5%-ánál HHV-6 viraemiát, 3,5%-ánál HCMV fertőzést mutattunk ki, ami statisztikailag nem

szignifikáns különbség. A HHV-6 fertőzés gyakorisága a vesetranszplantált betegekben a HCMV-vel hasonlónak bizonyult. A HHV-6 fertőzés, reaktiváció monitorozása indokolt lenne, hiszen az okozott tünetek nagyon hasonlóak lehetnek. Bár több esetben is HHV-6 és HCMV koinfekciót írtak le, az általunk vizsgált vesetranszplantált betegekben egyidejűleg nem mutattunk ki HCMV pp65 antigén pozitivitást és HHV-6A/HHV-6B viraemiát, ami azonban nem zárja ki a kölcsönhatást a vírusok között. Vizsgálataink során elemeztük, milyen tünetek jelentkeztek a HHV-6 viraemia idején, ám a statisztikai elemzés nem igazolt összefüggést a HHV-6 fertőzés és a különböző klinikai tünetek között. A HHV-6, illetve a HCMV fertőzés idején a betegeknek hasonló tüneteik voltak, így láz, légúti tünetek, emésztőszervrendszeri panaszok, vagy ezek kombinációi. Ám csak a mintavétel időpontjáról vannak adataink, a pontos kóroki szerep, a HHV-6A, -6B és HCMV közti kölcsönhatás tisztázásához egy nyomonkövetéses vizsgálat célravezetőbb lehetne.

Korábban publikált adatok szerint a HHV-6 fertőzés általában a transzplantáció után 2-4 héttel vagy évekkel később következik be, míg a HCMV fertőzést főként 1-3 hónapon belül írtak le. Az irodalmi adatokkal részben összhangban HHV-6A és -6B viraemiát a transzplantációt követő egy hónapon belül vagy évekkel később (5-15 év), míg HCMV pp65 antigén pozitivitást a transzplantációt követő 2-5 hónapon belül, valamint 8-15 év múlva mutattunk ki.

Az aktív HHV-6A és -6B replikáció igazolásához megfelelően választott klinikai mintákra és diagnosztikai módszerekre van szükség, hiszen amellet, hogy több sejttípusban látenciát kialakítani képes DNS genomú vírusok, még kromozómaintegráció is előfordulhat. Vizsgálataink során így a kvalitatív, nested PCR mellett kvantitatív real-time PCR és RT-PCR vizsgálatokat is végeztünk. Azoknál az egyéneknél, akiknél a teljes vérben $>5 \times 10^6$ kópia/mL, a plazmában $>10^3$ kópia/mL HHV-6 DNS detektálható, felmerül a ciHHV-6 gyanúja. Az általunk vizsgált vesetranszplantált betegek közül 1 személy esetén a virális DNS mennyisége alapján ciHHV-6-ot mutattunk ki (0,5%), ami megfelel az irodalmi adatoknak (0,2-3%). Az aktív fertőzés során keletkező virális mRNS-eket kimutatni képes RT-PCR módszer használatával munkánk során egyértelműen elkülöníthető volt az aktív vírusfertőzés, ám ez a módszer költsége, idő- és munkaigénye miatt nem rutinszerű.

Vizsgálataink során vesetranszplantált betegekben szignifikánsan gyakoribbnak bizonyult a HHV-6 viraemia (8 HHV-6A és 1 HHV-6B) az egészséges személyekhez képest, ami erősíti a felvetést, hogy a transzplantáció miatti immunszuppresszív terápia növeli a HHV-6, különösen a HHV-6A fertőzésre való fogékonyságot vagy a reaktiváció lehetőségét.

Az irodalmi adatokkal ellentétben a HHV-6A viraemia dominanciáját mutattuk ki ezekben a betegekben, mely statisztikailag is szignifikáns különbségnek bizonyult.

Mindemellett mind a vesetranszplantáltakban, mind az egészséges személyekben látens HHV-6 fertőzést is kimutattunk. A HHV-6 látencia prevalenciájában nem volt szignifikáns különbség a vesetranszplantált betegek és az egészséges személyek között. Az irodalmi adatokkal összhangban szignifikánsan gyakrabban mutattuk ki a HHV-6B látenciát, mint a HHV-6A-t mind a vesetranszplantált betegek, mind az egészséges személyek esetében.

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a HHV-6 prevalenciájáról terhes nők esetében. Így vizsgálatainkat a magzati tolerancia miatt fiziológiásan megváltozott immunstátuszú terhes nők mintáival is elvégeztük. Ennek során HHV-6A látenciát a terhes nők 2 %-ában, a nem terhes nők 4 %-ában, HHV-6B látenciát pedig a terhes nők 14 %-ában, a nem terhes nők 15 %-ában mutattunk ki. Egy terhes nő fehérvérsejt-mintája látens HHV-6A és 6B genomot is hordozott egyidejűleg. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan látencia esetén mind a terhes, mind a nem terhes nőknél szignifikánsan gyakoribb volt a HHV-6B mint a HHV-6A. Bár virális nukleinsavat néhány plazmamintában is kimutattunk a fehérvérsejtek HHV-6 pozitívításával egyidejűleg, az RT-PCR nem igazolt aktív fertőzést, a virális DNS jelenléte a plazmában a sejtek líziséből származhatott. Fertőzés vagy reaktiváció röviddel a mintagyűjtés előtt, akár a terhesség korábbi szakaszában azonban egyik esetben sem kizárt. Egy terhes nő esetében HHV-6A DNS-t csak a plazmamintában tudtuk kimutatni, a fehérvérsejt-mintában nem. Feltételezzük, hogy a vírus más szövetben replikálódott, és a véráramba ürülő virális nukleinsavat detektáltunk.

A virális DNS mennyiségi meghatározását is elvégeztük. A real-time PCR eredménye szerint egy HHV-6A pozitív fehérvérsejtben a virális DNS mennyisége magas volt ($5,07 \times 10^5$ GEq/ $1,5 \times 10^6$ sejt), a HHV-6 kópia/fehérvérsejt arány (0,08-0,33 GEq/1 fehérvérsejt) azonban nem igazolta a HHV-6 jelenlétét.

Adatainkat együttesen elemezve, az aktív HHV-6 fertőzés a vesetranszplantált betegek esetében szignifikánsan gyakoribb volt, mint a terhes nők csoportjában bár nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a nemi arány eltérő (114 vesetranszplantált férfi és 86 nő vs. 100 terhes nő). Vesetranszplantált betegekben HHV-6A viraemia dominanciáját figyeltük meg, mely talán azzal magyarázható, hogy a transzplantáció miatti erős immunsuppresszió elősegíti az HHV-6A fertőzés, esetleg reaktiváció kockázatát. Még napjainkban is keveset tudunk a HHV-6A okozta megbetegedésekről, de az egyre inkább „feltörekvő”, a HHV-6B-nél virulensebb kórokozónak tartott vírus által okozott fertőzéseknek lehetnek súlyos klinikai következményei.

A polyomavírusok vizsgálata során olyan újonnan felfedezett vírusok, a WUPyV, KIPyV és HPyV9 prevalenciavizsgálatát végeztük, melyeket 2007-ben és 2011-ben írtak le. Vizsgálataink idején még nagyon keveset tudtak ezekről a vírusokról, bár azóta gyarapodtak a publikált adatok, jelentőségük, illetve szinte egyetlen lényeges kérdés sem tisztázott továbbra sem.

Vizsgálataink során WUPyV és KIPyV DNS-t mutattunk ki vesetranszplantált betegek vér-, vizelet- és légúti mintáiban, de egészséges donorok vér- és vizeletmintáiban nem. A transzplantált betegek 2,6%-ában WUPyV, 1%-ában KIPyV viraemiát igazoltunk, a WU vírus volt gyakoribb a KIPyV-vel szemben. Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a transzplantáció után eltelt időben a vírus DNS pozitív és negatív minták közt, mindkét vírust főként a transzplantációt követő korai időpontokban (1-5 hónapon belül) detektáltuk. A virális DNS mennyisége viszont minden mintában nagyon alacsony, ≤ 250 GEq/mL plazma volt. Adataink összhangban állnak az irodalmi adatokkal. Más munkacsoportok a WU polyomavírust 1,6-8,3%, a KIPyV-et 2,6-3,2% gyakorisággal mutatták ki immunszuppresszált egyének plazmamintáiban, míg immunkompetens egyénekében megközelítőleg 1% volt a gyakorisága a WUPyV-nak, és 3,1% a KIPyV-nek. Ezek alapján feltételezzük, hogy mindkét vírus bekerül a vérkeringésbe, így a szervezetben más szövetekhez, sejtekhez is eljuthat.

Elsőként munkacsoportunk írta le a KI és WU vírusok jelenlétét vizeletben. A vesetranszplantált betegek 12%-ának vizeletében WUPyV, 2%-ában, KIPyV vírust mutattunk ki, főként a transzplantációt követő 2 hónapon belül. A virális DNS mennyisége a vizeletmintákban alacsony volt ($\leq 1 \times 10^3$ GEq/mL), ám 2 betegben WUPyV viraemiát mutattunk ki egyidejűleg. Egészséges személyek vizeletmintáiban egyik vírus sem volt kimutatható. Ugyan a vizsgált mintaszám kevés, mégis jelentős eredmény, hiszen más munkacsoportok a vizsgálatunk előtt nem mutatták ki ezeket a vírusokat vizeletben, ám eredményeinket később megerősítették. Tehát WUPyV és KIPyV viruria előfordulhat, így a vizelet forrása is lehet az infekciónak. Az is elképzelhető, hogy a vírusok a behatolási kapuk helyéről – ami lehet a légút, gasztrointesztinális traktus – eljuthatnak (esetleg a vérárammal) a vesébe, és fertőzik a vese és a húgyutak sejtjeit. WUPyV viruriát és viraemiát egyidejűleg, ha mindösszesen csak két betegnél is, de kimutattunk.

A vesetranszplantáltak légúti mintáinak 6,7%-ában KIPyV, 3,3%-ában pedig WUPyV DNS-t mutattunk ki. Szignifikánsan gyakoribb volt a WUKI PCR pozitivitás a transzplantáció után korán (3 hónapon belül), mint később. Mind a WU, mind a KI polyomavírust számos munkacsoport kimutatta a légúti mintákban. Immunkompetens egyéneknél a WUPyV előfordulása gyerekekben elérte a 16,4 %-ot is, míg egészséges felnőttekben már jóval

kevesebb (0,75%) volt a gyakorisága. A szeroprevalencia vizsgálatok szerint az 5 éves korcsoportban a szeropozitivitás már elérte a 87%-ot. Emiatt feltételezzük, hogy a primer fertőzés valószínűleg gyermekkorban következik be, és felnőtt korban már ritkábban fordul elő. Az általunk tapasztalt WUPyV prevalencia immunuszpresszált egyénekben korrelál az irodalmi adatokkal. A KIPyV esetében immunkompetens egyénekben 0,5-3%, immunuszpresszált egyénekben pedig 5,6%-os gyakoriságot írtak le. Bár mindössze 90 beteg légúti mintáját vizsgáltuk meg, a betegek 10%-ánál mutattunk ki polyomavírus fertőzést. Azon betegek körében, akik légúti mintájában WU és KI polyomavírust mutattunk ki, szignifikánsan gyakoribb volt a légúti tünetek megléte a mintavétel idejében, mint azoknál a betegeknél, akik légúti mintájában egyik vírust sem tudtuk kimutatni. Mivel azonban más légúti megbetegedés tüneteit okozó fertőzések kimutatását nem végeztük el, így nem vonható le egyértelmű következtetés a patogenitásukra vonatkozóan.

Vizsgálataink során vesetranszplantált betegek vér, vizelet és légúti mintáiban is kimutattuk a WU és KI polyomavírust, ám egészséges egyénekében nem. Saját, illetve más kutatócsoportok eredményei alapján is felmerül, hogy az immunstátusz változása növelheti a fertőzés kockázatát. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy terhesség során milyen gyakran mutathatók ki ezek a vírusok a vér, vizelet és légúti mintákban. Vizsgálataink megkezdése előtt sem terhes nők vizelet mintáiban, sem magzati szövetekben nem tudtuk WU és KI polyomavírust kimutatni. WU és KI vírust a terhesség alatt gyűjtött vizelet-, légúti és plazmamintákban mi sem mutattunk ki. A nem terhes nők csoportjában KIPyV DNS jelenlétét igazoltuk 2 plazmamintában (2%), de a vizelet és légúti mintákban nem. Vizsgálatunk során minden terhes nőtől egy mintát gyűjtöttünk be a terhesség alatt, ám egy nyomonkövetéses vizsgálat pontosabb információt nyújthat a vírusok előfordulásáról a vizsgált csoportban.

A HPyV9-et 2011-ben fedezték fel. A vírusról a mai napig igen keveset tudunk. Kis számban jelentek meg publikációk, melyek többségében arról számoltak be, hogy a HPyV9-et nem sikerült kimutatni a tanulmányozott mintákban. A szeroepidemiológiai vizsgálatok szerint azonban a vírus elterjedt, bár a felnőttek körében is jelentős a fogékonyság, a szeropozitivitás mindössze 39,4-47 %. Vizsgálatainkat a terhes és nem terhes nők mintáival rövidebb idővel a felfedezést követően kezdtük el. Mind a terhes, mind a nem terhes nők vér, vizelet és légúti mintáiban is megvizsgáltuk a HPyV9 DNS jelenlétét. A vírust mindkét csoportban minden mintatípusban kimutattuk. Terhes nők esetén 2-3%-os gyakoriságot, míg a nem terhes nők esetében 2-6%-os HPyV9 előfordulást tapasztaltunk. Statisztikailag szignifikáns prevalenciakülönbség egyik mintatípusban sem volt a két csoport közt. A hasonló pozitívítási gyakoriság valószínűleg azzal magyarázható, hogy a primer fertőzés nem korlátozódik a

gyermekkorra, a szeropozitivitás az életkor előrehaladtával nő, így az egész élet során bármikor bekövetkezhet HPyV9 fertőzés. A vizsgált személyeknek nem voltak klinikai tünetei.

Eredményeink közül talán a legértékesebb, hogy a humán polyomavírus 9-et kimutattuk légúti mintákban, ami alapján felvetődik, hogy ez a vírus is terjedhet cseppfertőzéssel, a behatolási kapu lehet a légút. Immunszuppresszált egyének vizeletmintáiban a HPyV9 0,6%-os, vérmintákban 4,8 %-os előfordulását írták le.

Vizsgálataink során összehasonlítottuk a vesetranszplantált betegek, terhes nők, valamint az egészséges személyek (nem terhes nők, illetve a transzplantált betegek mintáival egyidőben gyűjtött egészséges személyek) körében tapasztalt WU és KI polyomavírus gyakoriságokat. Fontos megjegyezni, hogy a nemi arányok és az életkor eloszlás is eltérőek voltak. Adatainkat együttesen elemezve nem volt szignifikáns különbség a KIPyV és/vagy WUPyV DNS pozitivitás gyakoriságában a vesetranszplantáltak és terhes nők plazmamintái között. Ám WU polyomavírust szignifikánsan gyakrabban mutattunk ki a vesetranszplantált betegek plazmamintáiban a kontrollcsoportokéhoz képest. A vizeletminták elemzése során szignifikáns különbség volt a vesetranszplantáltak és terhes nők vizeletmintáinak WUPyV pozitivitásában. A kontrollcsoportokhoz képest is szignifikánsan gyakoribb volt a WUPyV pozitivitás a vesetranszplantáltak vizeletmintáiban. Szintén szignifikáns különbséget mutattunk ki a vesetranszplantáltak és terhes nők légúti mintáinak KIPyV pozitivitásában. A KIPyV pozitivitás gyakorisága is szignifikánsan nagyobb volt a vesetranszplantáltak légúti mintáiban a kontrollcsoportok mintáihoz képest is. Mindez arra utalhat, hogy a szervtranszplantáció miatti immunszuppresszív terápia az immunrendszer működését olyan mértékben befolyásolja, ami növelheti a fertőzés iránti fogékonyságot vagy a reaktiváció kockázatát a WU és KI polyomavírusok esetében is, míg a terhesség csak oly mértékű és jellegű immunológiai változást eredményez, ami nem. KIPyV pozitivitást inkább a légúti mintákban, WUPyV pozitivitást pedig a plazma- és vizeletmintákban tapasztaltunk. A vírusok terjedése nem tisztázott, de ezen eredmények alapján is feltételezhető, hogy a légutakon és/vagy a húgyutakon át terjedhetnek. Nem kizárt, hogy a primer fertőzést követően látenciát alakítanak ki a vesében és a húgyutakban, immunszuppresszió hatására reaktiválódhatnak, és ezért kimutathatók a vizeletből akár viraemiával egyidejűleg. Eredményeink szerint a szervtranszplantáció miatti immunszuppresszív terápia növelheti a kockázatot a fertőzésekre vagy reaktivációra mind a HHV-6A, mind pedig a WU és KI polyomavírusok esetében.

ÖSSZEFOGLALÁS

HHV-6 viraemiát a vesetranszplantált betegek 4,5%-ánál mutattunk ki, ami nem különbözött szignifikánsan a HCMV fertőzés gyakoriságától (3,5%). Számos korábbi publikációval ellentétben a HHV-6A vírus dominanciáját igazoltuk. A HHV-6 fertőzés szignifikánsan gyakoribb volt a vesetranszplantált betegek esetében, mint az egészséges személyek (0%), illetve a terhes nők esetében (1%). A látenciagyakoriságok nem különböztek a vizsgált csoportokban, az irodalmi adatokkal összehangban ez esetben a HHV-6B nagyobb gyakoriságát mutattuk ki. Vizsgálatunk alapján a vesetranszplantációval együtt járó immunszuppresszív terápia fokozhatja a HHV-6A fertőzés kockázatát, ami akár súlyos klinikai következményekkel is járhat. Bár a HHV-6 fertőzés és a klinikai tünetek közt statisztikailag igazolható összefüggést nem tapasztaltunk. A pontos kóroki szerep feltárásához nyomonkövetéses vizsgálatokra van szükség. Mindezek alapján felvetjük, hogy a HHV-6 fertőzés diagnosztizálása vesetranszplantált betegek esetén indokolt. Munkánk során 0,5 %-os gyakorisággal kromoszómaintegrált HHV-6 jelenlétét mutattuk ki vesetranszplantált betegekben.

A közelmúltban felfedezett humánpatogén polyomavírusokkal kapcsolatos prevalenciaeredményeink alapján is úgy tűnik, hogy a vesetranszplantációval együtt járó immunszuppresszió fokozza a fertőzésre való fogékonyságot mind a KI, mind a WU vírus esetében. Terhes nők légúti, vizelet- és vérmintájában egyik vírust sem mutattuk ki, egészséges személyek esetén is csak a KI vírust csak a plazmaminták 0,6%-ában. A vesetranszplantált betegek légúti mintáinak 6,6%-ában KIPyV, 3,3%-ában pedig WUPyV DNS-t mutattunk ki, ezeknek a személyeknek légúti tüneteik voltak. Elsőként mutattuk ki ezeket a vírusokat vizeletmintában: a vesetranszplantáltak 2%-ában KIPyV, 12%-ában pedig WUPyV DNS-t. KI és WU viraemiát is detektáltunk (1 és 2,6 %). A vírusokat statisztikailag is igazolhatóan főként a transzplantáció után rövid időn (1-3 hónap) belül mutattuk ki. HPyV9-et mind a terhes, mind a nem terhes nők légúti, vizelet- és vérmintájában is kimutattuk 2-6 % gyakorisággal. A két csoportban tapasztalt előfordulási gyakoriságok statisztikailag nem különböztek. A légúti mintákban való előfordulást elsőként írtuk le, felvetve ezzel a vírus esetleges légúti terjedését. Eredményeink alapján is feltételezhető, hogy a KIPyV, WUPyV és HPyV9 a behatolási kapu helyéről, a légutakból eljutnak a vérkeringésbe, a vérrel a vesébe, és fertőzik a vese és a húgyutak sejtjeit, így a vizelet forrása is lehet az infekciónak.



Iktatószám: DEENKÉTK/189/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Mészáros Beáta
Neptun kód: XEAH2D
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mtmt azonosító: 10040266

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mészáros, B.**, Sápy, T., Gergely, L., Csoma, E.: Prevalence of human herpesvirus 6A and 6B during pregnancy.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. Epub ahead of print (2014), p. 1-8, p. 1-8. -
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.3.5>
IF:0.78 (2013)
2. Csoma, E., Sápy, T., **Mészáros, B.**, Gergely, L.: Novel human polyomaviruses in pregnancy: Higher prevalence of BKPyV, but no WUPyV, KIPyV and HPyV9.
J. Clin. Virol. 55 (3), 262-265, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2012.07.009>
IF:3.287
3. Csoma, E., **Mészáros, B.**, Asztalos, L., Kónya, J., Gergely, L.: Prevalence of WU and KI polyomaviruses in plasma, urine, and respiratory samples from renal transplant patients.
J. Med. Virol. 83 (7), 1275-1278, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.22083>
IF:2.82
- *4. Csoma, E., **Mészáros, B.**, Gáll, T., Asztalos, L., Kónya, J., Gergely, L.: Dominance of variant A in human Herpesvirus 6 viraemia after renal transplantation.
Virol. J. 8, 403, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-8-403>
IF:2.343



*Csoma Eszter és Mészáros Beáta megosztott első szerzők.



További Közlemények

5. Hernádi, K., Gyöngyösi, E., **Mészáros, B.**, Szakács, L., Szalmás, A., Csoma, E., Mogyorósi, R., Czompa, L., Veress, G., Varga, I., Márton, I.J., Kónya, J.: Elevated Tumor Necrosis Factor-alpha Expression in Periapical Lesions Infected by Epstein-Barr Virus. *J. Endod.* 39 (4), 456-460, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.028>.
IF:2.788

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12.018

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 9.23

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, 2014.08.12

