

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Mészáros Beáta

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

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Mészáros Beáta

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

Témavezető:

dr. Csoma Eszter



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
I. Herpeszvírusok	7
I.1. Humán herpeszvírus 6A és 6B (HHV-6A és HHV-6B)	7
I.2. Humán herpeszvírus 5 (HCMV)	10
II. Polyomavírusok	12
II.1. BK (BKPyV) és JC polyomavírus (JCPyV)	14
II.2. WU polyomavírus (WUPyV)	16
II.3. KI polyomavírus (KIPyV)	20
II.4. Humán polyomavírus 9 (HPyV9)	25
CÉLKITŰZÉSEK	29
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
I. Minták és betegcsoportok	30
I.1. Vesetranszplantált betegek és nem transzplantált, egészséges személyek mintái	30
I.2. Egészséges terhes és nem terhes nők mintái	30
I.3. Minták előkészítése nukleinsav izolálásra	31
II. A nukleinsav izolálás menete	31
III. Vírusok kimutatása	32
III.1. HHV-6 nested PCR	32
III.2. HHV-6 real-time PCR	33
III.3. HHV-6 RT-PCR	35
III.4. WUKI nested PCR	36
III.5. WU és KI real-time PCR	38
III.6. HPyV9 nested PCR	39
III.7. PCR termék tisztítása gélből és szekvenálása	41
III.8. Aktív HCMV fertőzés azonosítása a vírus pp65 antigénjének kimutatásával	41
IV. Statisztikai elemzés	41
EREDMÉNYEK	42
I. Humán herpeszvírus 6 fertőzés	42

II. Vesetranszplantált betegek humán cytomegalovírus fertőzése	47
III. Polyomavírusok.....	48
MEGBESZÉLÉS.....	55
ÖSSZEFOGLALÁS.....	63
SUMMARY	64
IRODALOMJEGYZÉK.....	65
TÁRGYSZAVAK.....	79
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	80
FÜGGELÉK.....	81

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BKPyV	BK polyomavírus
ciHHV-6	kromoszómaintegrált humán herpeszvírus 6
GAPDH	gliceraldehid 3-foszfát-dehidrogenáz
GEq/mL	genom ekvivalens/ milliliter
HCMV	humán cytomegalovírus
HHV-6	humán herpeszvírus 6
HHV-6A	humán herpeszvírus 6A
HHV-6B	humán herpeszvírus 6B
HPyV9	humán polyomavírus 9
JCPyV	JC polyomavírus
KIPyV	KI polyomavírus
PCR	polimeráz láncreakció
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
VLP	vírusszerű partikulum, virus like particle
WUPyV	WU polyomavírus

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, másrészt onkoproteineket kódolnak, így akár daganatok kialakulásában is szerepük lehet. Ezt a feltételezést erősíti, hogy a 2008-ban felfedezett Merkel-sejtes polyomavírus a Polyomaviridae család első olyan tagja, amely a tudomány mai állása szerint egyértelműen dagantkeltő hatással rendelkezik, egy agresszív, bőrben kialakuló, malignus daganatot, a Merkel-sejtes karcinómát okozhat. Korábban már több, látens fertőzést okozó vírusról, így a BK és JC polyomavírusról 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 megvizsgálni, hogy vajon az eddig ismeretlen, betegségekkel, illetve tünetekkel egyértelműen összefüggésbe nem hozott polyomavírusok is ilyen patogének lehetnek-e, milyen gyakran okozhatnak vírusfertőzést, mik lehetnek a behatolási kapuk, hogyan terjedhetnek a szervezetben belül.

A humán cytomegalovírus (HCMV) fertőzés miatti betegségek kialakulásának kockázata szervtranszplantált betegek és terhes nők esetében már ismert, indikáció esetén 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 rutinszerű, 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

I. 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 (HCMV), illetve a humán herpeszvírus 6A és 6B (HHV-6A és HHV-6B) okozta fertőzésekkel foglalkoztunk. 2012-ig a HHV-6A-t és 6B-t ugyanazon vírus, a humán herpeszvírus 6 (HHV-6) két variánsának tekintették [1], ám a legújabb, a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee of Taxonomy of Viruses) által elfogadott taxonómia szerint két különböző vírusról van szó [2], melyek a Roseolovirus genusba tartoznak.

I.1. Humán herpeszvírus 6A és 6B (HHV-6A és HHV-6B)

A HHV-6-ot 1986-ban izolálták először lymphoproliferatív betegségben szenvedő beteg véréből [3]. 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 [4-7]. 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 [8]. Még ma sem tisztázott, hogy az HHV-6A-val mikor zajlik le a primer fertőzés, de valószínűleg felnőttkorban, a HHV-6B fertőzést követően, bár bizonyos esetekben primer, gyerekkori HHV-6A fertőzésről is beszámoltak [9]. Azt is megfigyelték, hogy egy egyénből több törzs kimutatható mind a HHV-6A, mind a HHV-6B vírus esetében akár felnőttekben, akár gyerekekben, ami arra utal, hogy HHV-6 reinfekció is bekövetkezhet [10-13].

A HHV-6B DNS-t főként nyálban és a nyálmirigyek sejtjeiben mutatták ki [14-17], így a vírus cseppfertőzéssel is terjed [12, 18, 19]. A HHV-6 vertikális, transzplacentális terjedése is lehetséges, de nem gyakori, a terhességek 1-2%-ában fordul elő [20-23]. A terhesség alatti primer fertőzés ritka, de a reaktiváció gyakori [23]. Habár a HHV-6A vagy HHV-6B kimutatható a terhes nők genitális traktusából, a perinatális terjedés nem igazolt [24, 25]. 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 [26-28]. A HHV-6A-t gyakrabban központi idegrendszeri megbetegedésekben (sclerosis multiplexben és rhomboencephalitisben) szenvedő betegekben mutatták ki [29, 30]. Neurotropizmusát az is igazolhatja, hogy az agy számos régiójának szöveteiből és a liquorból is detektálták [31-34]. A HHV-6 sokféle szövetben, sejtből hozhat létre látens fertőzést, így a mononukleáris sejtekben, a csontvelőben, lépben, májban, vesében, ezért az is elképzelhető, hogy transzplantáció esetén a beültetett szervben zajló HHV-6 reinfekció (a donor korábbi látens fertőzése) redményez fertőzést a recipiensben [10-13].

Feltételezhető, hogy a primer HHV-6A fertőzés valószínűleg tünetmentesen vagy szubklinikai formában zajlik. A HHV-6B a primer fertőzéskor, mely zömében 6 hónapos és 3 éves kor között történik, immunkompetens egyének mintegy harmadában enyhe, lázzal, kiütéssel járó betegséget, az exanthema subitumot (roseola infantumot) okozza, de tünetmentes is lehet [8, 35-38]. A legáltalánosabb komplikációja a primer fertőzésnek a rossz közérzet, myringitis, gasztrointesztinális és légúti tünetek [36], illetve nagyon ritkán központi idegrendszeri megbetegedések, például meningoencephalitis és encephalopathia [39-41]. A primer HHV-6 fertőzés immunszuppresszált egyéneknél sokkal súlyosabb megbetegedéseket okozhat. Primer HHV-6A és HHV-6B fertőzést írtak le transzplantált egyéneknél a HHV-6 pozitív donor szerv miatt, bár számos publikáció nem vizsgálta, hogy primer fertőzés vagy reaktiváció történt-e [10, 42, 43]. Immunszuppresszált egyéneknél 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-szuppresszió is [44]. Vesetranszplantált betegeknél gyakran tünetmentes vagy nem specifikus tünetekkel, lázzal, gasztrointesztinális tünetekkel jár a reaktiváció, reinfekció, ám kiütés, veseelégtelenség (emelkedett szérum kreatinin szint), hepatitis és májelégtelenség, valamint colitis is előfordulhat, bár az utóbbiak inkább májtranszplantáltak esetében gyakoriak [9]. Néhány publikáció HHV-6 okozta haemophagocytosis szindrómáról, encephalitisről is beszámol [45]. HHV-6 fertőzést gyakran mutatnak ki immunszuppresszált egyéneknél, melyért a legtöbb esetben a HHV-6B reaktivációja a felelős. Ez általában a transzplantáció után 2-4 héttel következik be, de későbbi fertőzéseket is leírtak. A fertőzések, reaktivációk gyakorisága eltérő, csontvelő-transzplantáltaknál 28-75%, míg szervtranszplantáltaknál 0-82%-ig változik [9].

Mindemellett nem szabad figyelmen kívül hagyni azt sem, hogy a HHV-6 képes integrálódni a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe (ciHHV-6) [34, 46]. A ciHHV-6 alatt azt

értjük, amikor a teljes HHV-6 genom integrálódik az ivarsejtek kromoszómájába, a telomer régióba, így a Mendeli öröklődés szabályának megfelelően az utódokra átörökíthető [47]. Mind a HHV-6A, mind a HHV-6B integrálódhat a kromoszómákba, de a ciHHV-6B-t gyakrabban mutatták ki [48]. Mivel a virális DNS együtt osztódik a celluláris genommal, ezért legalább egy integrálódott HHV-6 genom jelenlétére lehet számítani minden osztódó sejtben. Azokban az egyéneknél, akiknél ciHHV-6-ot diagnosztizálnak, a virális nukleinsav mennyisége mindig nagyon magas, nagyobb, mint 10^6 genom/mL teljes vér [49]. Ugyanakkor, ha a minta, amelyből a vírust kimutatjuk olyan testfolyadék, ami csak kevés sejtet tartalmaz (pl. szérum, plazma, liquor), akkor a magas vírusrészlet aktív vírusreplikációra utalhat. A ciHHV-6-ot köldökzsínórvérben és egészséges egyéneknél mind az USA-ban, mind Európában 1% gyakorisággal mutatták ki, transzplantáltakban azonban magasabb előfordulási gyakoriságot (5%-ot májtranszplantált betegekben, 2,13%-ot vesetranszplantált betegekben) is leírtak [50].

A HHV-6 fertőzés kimutatására leggyakrabban PCR módszert használnak. A különböző mintákból való virális DNS kimutatás diagnosztikai értékét viszont rontja, hogy nem mind tesz különbséget az aktív és látens fertőzés között. Ezért fontos a virális DNS mennyiségi meghatározása, illetve a megfelelő minta választása. A HHV-6 DNS kimutatása kvalitatív, akár netsed PCR-rel a fehérvérsejtekből kevésbé informatív, mint ugyanezzel a módszerrel a szérumból, plazmából vagy liquorból, amelyekben a virális nukleinsav jelenléte inkább utal aktív, mint látens fertőzésre [9]. A virális nukleinsav mennyiségi meghatározása biztosabb eredményt nyújt az aktív fertőzés igazolására, és kellő körültekintéssel elkerülhető a ciHHV-6 miatt jelenlévő nagy kópiaszám félrediaosztizálása, mivel ez esetben a nagy mennyiségű vírus DNS jelenléte nem az aktív fertőzés során keletkező új virionokból származik [50]. A reverz transzkripció PCR alkalmazása, mely a látens és aktív fertőzés elkülönítésében jól alkalmazható, általában nem rutin diagnosztikai eljárás. A szerológiai tesztek nem minden esetben alkalmasak az aktív fertőzés igazolására, mivel a felnőttek mintegy 5%-ában mindig ki lehet mutatni IgM antitesteket, és immundeficiens egyéneknél, akikben a reinfekciók, reaktivációk vizsgálata különösen fontos, a szerológiai vizsgálatok nem relevánsak. A vírusantigének kimutatása fehérvérsejteknél immunfluoreszcencia technikával szintén alkalmazható, de költséges, és kevés információt nyújt például a vesében vagy központi idegrendszerben történő vírusszaporodásról [51].

Ugyanakkor rendkívül fontos a korai diagnózis. A tünetek megjelenése előtt kimutatott aktív fertőzés révén az időben elkezdett antivirális terápia megelőzheti a súlyos

komplikációk kialakulását, illetve a szervkilökődést [52]. A leggyakrabban használt antivirális szerek a HHV-6 esetén a ganciclovir és a valganciclovir, melyeket vesetranszplantált betegeknél is alkalmazhatnak [53].

A HHV-6 immunmoduláns hatással rendelkezik, illetve más vírusokkal kölcsönhatásban a betegségek lefolyását súlyosbíthatja [54]. Egyes irodalmak arra utalnak, hogy a HHV-6-nak szerepe van a JC polyomavírus (JCPyV) okozta progresszív multifokális leukoencephalopathia (PML) kialakulásában [46, 55]. A HHV-6A szerepét az AIDS és a HPV okozta méhnyakrák progressziójában is igazolták [56, 57]. A HHV-6 és a HCMV fertőzés között is összefüggést feltételeznek, egyes megfigyelések szerint a HHV-6 a HCMV-t megelőzően reaktiválódhat, mely predisponáló tényező lehet a HCMV reaktivációjához [58, 59]. A HHV-6, mely transzaktivátor géntermékekkel is rendelkezik, befolyásolja a fertőzött mononukleáris sejtek citokinexpresszióját, TNF- α termelést indukál [60, 61]. A HCMV reaktivációja és az emelkedett TNF- α szint között is korrelációt mutattak ki [62, 63]. A HHV-6 és a HCMV fertőzés közötti kapcsolat azonban még máig sem tisztázott egyértelműen.

I.2. Humán herpeszvírus 5 (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 [64]. A primer fertőzés bármikor bekövetkezhet, de a kisgyermekkorban (anya és csecsemője közötti, illetve gyerekek közötti szorosabb kontaktus révén) és a szexuális aktivitás megkezdésekor a leggyakoribb. Ez azzal magyarázható, hogy a vírus a fertőzött személy testváladékaival terjed, így például nyállal, vizelettel, széklettel, vérrel, nemi váladékokkal és anyatejjel is [65]. Szervátültetés esetében a beültetett szervvel is átvihető a donorból a recipiensbe [66]. Az anyáról magzatra, illetve csecsemőre történő átvitele történhet transzplacentálisan, a szülőcsatornán való áthaladáskor, a fertőzött anya testváladékaival, illetve az anyatejjel is [67].

Egészséges egyéneknél a primer fertőzés általában szubklinikai vagy mononucleosis infectiosát okoz [68]. Transzplacentális terjedése során a magzatot az első két trimeszterben ért primer fertőzés kongenitális defektusokat okozhat [69]. A primer fertőzés során a vírus a monocitákon és limfocitákon kívül az epitheliális sejteket is fertőzi [70]. Ezt követően a vírus látenciát alakít ki a szervezet számos szövetében és sejtjében, így például a monocitákban, makrofágokban, limfocitákban, a monocita/makrofág sejtvonal 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 [70]. Ugyanakkor nem csak reaktiváció történhet, hanem új vírustörzsekkel reinfekció is, melyek ellen a korábban kialakult immunválasz nem feltétlenül nyújt védelmet [71]. Transzplantált egyének 20-60%-ában tünetekkel járó HCMV fertőzés alakul ki a transzplantációt követő 1-3 hónapon belül [72, 73]. A vesetranszplantált egyénekben a HCMV fertőzésnek három fő módja van. Az első esetben HCMV szeronegatív egyén fertőzött szervet kap a donortól, ilyen esetben a recipiensek 65-88%-ánál alakul ki fertőzés, és mintegy 50-60%-uknál tünetek is [72, 74, 75]. Aktív HCMV fertőzést okozhat a látens fertőzés reaktivációja HCMV-pozitív személyekben a transzplantációt követően, illetve hogyha a donor szervvel eltérő vírustörzs került a recipiensbe [73]. Szeronegatív recipiens szeronegatív donorszerv transzplantációja után is áteshet primer HCMV fertőzésen. A reaktiváció és reinfekció immunszuppresszált egyénekben súlyos tünetekkel járhat: pneumonia, gastrointestinalis megbetegedések, hepatitis, retinitis, szövet- és szervkilökődés [76].

A reaktiválódás során főként a monocitákban, makrofágokban, a vesetubulusok epitheliális sejtjeiben szaporodik [70], így a vérben és a vizeletben kimutatható a vírus, amit a diagnosztikai eljárások során érdemes figyelembe venni. Az aktív fertőzés kimutatására többféle módszert is alkalmaznak a rutin diagnosztikában. PCR alapú módszerekkel a virális DNS kimutatását végezhetik liquorból, vérből, vizeletből, a kvantitatív vizsgálat pedig a beteg fertőzésének, terápiájának nyomonkövetését is lehetővé teszi [72]. A PCR alapú víruskimutatás érzékenysége nagy, költséghatékony, és a rutin diagnosztikában is jól alkalmazható. A vesetranszplantált betegek esetében az egyik legelterjedtebben használt módszer a HCMV antigenémia, mely során a HCMV pp65 antigénjét (nagyon korán expresszáldó 65-68 kDa-os ppUL83 mátrix foszfoprotein) mutatják ki a perifériás vér fehérvérsejtállományából immunfluoreszcens technikával [77, 78]. Ennek nagy előnye, hogy a fehérvérsejtek fagocitózisa révén lehetővé teszi a különböző szervekben, szövetekben (például a vesében) történő aktív vírusreplikáció kimutatását is a fertőzést követően rövid időn belül, és jól használható a vesetranszplantált betegek monitorozására [79]. A szerológiai vizsgálatok immunszuppresszált, így vesetranszplantált betegek esetében kevésbé vagy egyáltalán nem használható módszerek [80].

Az aktív vírusreplikáció kimutatása a súlyos tünetek kialakulása előtt a terápia szempontjából rendkívül fontos, hiszen jól kezelhető ganciclovir, valganciclovir antivirális szerekkel. Több országban vesetranszplantált betegek esetén antivirális profilaxisként alkalmazva ezeket a szereket jelentősen csökkentették a betegségek kialakulásának kockázatát

[81]. Az acyclovir ugyan nem a HCMV, hanem az Alphaherpesvirinae tagjai ellen kifejlesztett szer, de a klinikai tapasztalatok szerint profilaktikus alkalmazásával mégis csökkenthető a HCMV fertőzés és a súlyos tünetek kialakulásának kockázata [72, 82]. Ez valószínűleg inkább más, acyclovir érzékeny herpeszvírusok prediszponáló szerepe miatt lehetséges. A profilaxis egyik nagy hátránya azonban, hogy rezisztencia kialakulását eredményezheti [82]. A preemptív terápia esetén ez elkerülhető, ami azonban a beteg folyamatos, költséges vizsgálatát, a fertőzések monitorozását igényli [72].

II. Polyomavírusok

2007-ig a Polyomaviridae családnak mindössze két humánpatogén tagját ismerték: a BK (BKPyV) és a JC polyomavírust (JCPyV). A BKPyV-et 1971-ben mutatták ki először egy vesetranszplantált beteg vizeletmintájában Gardner és munkatársai [83]. Ugyanebben az évben írták le a JC polyomavírust progresszív multifokális leukoencephalopáthiában (PML) szenvedő beteg agyszövetében [84]. Elnevezésük a betegek monogramja alapján történt. Azóta a szekvenálási technológiáknak köszönhetően 12 új humán polyomavírus-szekvenciát fedeztek fel (1. táblázat). 2007-ben írták le a 3. humán polyomavírus teljes genomszekvenciáját akut légúti megbetegedés tüneteitől szenvedő gyerekek légúti mintáiban, melyet a felfedezés helyéről, a Karolinska Intézetéről (Karolinska Institute) KI polyomavírusnak (KIPyV) neveztek el [85]. A vírus nukleotidszekvenciája csak részben hasonlít más ismert polyomavírusokéhoz, a filogenetikai analízis szerint a KIPyV egyértelműen elkülönül a BK és JC vírustól [85]. Még ugyanebben az évben, szintén légúti fertőzés tüneteit mutató gyerek légúti váladékában azonosították a 4. humán polyomavírust: a WU polyomavírust (WUPyV). Gaynor és munkatársai, hasonlóan a KIPyV-hez a felfedezés helyéről, a Washingtoni Egyetemről (Washington University-ről) nevezték el a vírust [86]. A szekvenanciaanalízis szerint a WUPyV a KI vírushoz áll a legközelebb [96]. A sorrendben következő, 5. polyomavírust egy ritka daganatból, a Merkel-sejtes karcinómából mutatták ki először 2008-ban Feng és munkatársai, melyről a vírus a Merkel-sejtes polyomavírus (MCPyV) nevet kapta [87]. 2010-ben Schowalter és munkatársai azonosították a 6. és a 7. humán polyomavírust (HPyV6 és HPyV7) egészséges egyének fejbőréről [88]. Ugyanebben az évben van der Meijden és munkatársai egy másik bőrbetegséggel kapcsolatba hozható humán polyomavírust, a trichodysplasia spinulosa-asszociált polyomavírust (TSPyV) is leírták. A felfedezők a 8. humán polyomavírust a bőrbetegségről nevezték el [89]. A víruscsaládban a következőt, a humán polyomavírus 9-et (HPyV9) 2011-ben Scuda és

munkatársai azonosították vesetranszplantált beteg vérmintájában [90]. 2012-ben újabb két vírus teljes genomi szekvenciáját, a Malawi polyomavírusét (MWPyV) és a humán polyomavírus 10-ét (HPyV10) publikálták. A szekvenciák elemzése során a HPyV10 és a MWPyV izolátumai között 95-99%-os azonosságot mutattak ki, ami felveti a lehetőségét annak, hogy nem különböző vírusfajokról van szó. Az előbbit egészséges gyerek székletmintájában Siebrasse és munkatársai [91], az utóbbit egy ritka genetikai betegség, a WHIM-szindrómás (warts with hypoglobulinemia, infections, and myelocathexis; hypogammaglobulinaemiával, szemölcsökkel, ismétlődő fertőzésekkel és myelocathexissel járó betegség) beteg condylómájából Buck és munkatársai mutatták ki [92]. Szintén ebben az évben fedezték fel az MX polyomavírust (MXPpyV) egy hasmenéses, mexikói gyerek székletmintájából [93]. 2013-ban további 2 polyomavírust fedeztek fel, a HPyV12-t és az STLPyV-t. A HPyV12-t Németországban azonosították humán májszövetben a Robert Koch Intézet munkatársai [94]. Az STLPyV-t egy gyerek székletmintájából mutatták ki, és a felfedezés helyéről, Saint Louisról nevezték el [95].

2007 óta tehát számos új, humánpatogén polyomavírust fedeztek fel, ugyanakkor rendkívül keveset tudunk ezekről a vírusokról. Ez részben annak köszönhető, hogy nagyon korlátozottak a lehetőségek a vizsgálataikhoz, ezen új vírusok esetén csak a vírusok genomjának teljes szekvenciáját, több esetében csak egy-egy genomot ismerünk. Mivel magukat a virionokat eddig még nem izolálták, így *in vitro* kísérletekhez szükséges vírusizolátumok nem állnak rendelkezésünkre. Jelenleg a vírusok kimutatására, jelenlétüknek, gyakoriságuknak tanulmányozására PCR módszereket használhatunk. Mesterségesen előállított virális fehérjék, vírusszerű partikulumok (VLP, virus like particle) használatával az elmúlt években lehetőség nyílt a vírusokkal való fertőzöttség, seroprevalencia vizsgálatok elvégzésére is, így ma már néhány új humán polyomavírus esetén, ha igencsak korlátozott számban, de ilyen adatokkal is rendelkezünk.

Az értekezésben szereplő vizsgálatainkat 2009-ben kezdtük, amikor még nagyon korlátozottan álltak rendelkezésünkre információk. A teljes munka alatt csak kilenc humán polyomavírust ismertünk, melyek közül a WUPyV, KIPyV és HPyV9 vírusok tanulmányozását tűztük ki célul, a többi vírust (MCPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV) feltételezett bőrtropizmusa miatt nem vizsgáltuk. Az irodalmi áttekintés, valamint a megbeszélés későbbi fejezeteiben azonban a doktori értekezés elkészültéig publikált, nemzetközi adatbázisokban elérhető adatok is szerepelnek.

1. táblázat: Polyomavírusok és felfedezésük

Vírus neve	Felfedezés éve	Név eredete	Minta, amiből először kimutatták
BKPyV	1971	beteg monogramja	vizeletminta
JCPyV	1971	beteg monogramja	agyszövet
KIPyV	2007	felfedezés helye	<u>légúti minta</u>
WUPyV	2007	felfedezés helye	<u>légúti minta</u>
MCPyV	2008	bőrbetegség	bőrminta
HPyV6	2010	sorrend	bőrminta
HPyV7	2010	sorrend	bőrminta
TSPyV	2010	bőrbetegség	bőrminta
HPyV9	2011	sorrend	<u>vérminta</u>
HPyV10	2012	sorrend	székletminta
MWPyV	2012	felfedezés helye	condyloma
MPyV	2012	felfedezés helye	székletminta
HPyV12	2013	sorrend	humán májszövet
STLPyV	2013	felfedezés helye	székletminta

II.1. BK (BKPyV) és JC polyomavírus (JCPyV)

Bár a dolgozatban részletezett vizsgálatokban nem szerepel a BK és JC polyomavírus, mégis szükséges bemutatni. Ennek oka jórészt az, hogy ismereteink az új humán polyomavírusokról igencsak korlátozottak, azonban e két, négy évtizede ismert vírusról már meglévő információink részben irányíthatják, segíthetik a kutatásukat. A BK és JC vírus esetén is a felfedezést követően mintegy évtizeddel később igazolódott klinikai jelentőségük, ám még korántsem tisztázott minden kérdés velük kapcsolatban sem.

A primer BKPyV fertőzés általában a kora gyermekkorban történik. A BKPyV gyermekkori fertőzését igazolja, hogy a szeroprevalencia-vizsgálatok szerint 5 éves korukra a gyerekek 38-50%-a átesik a fertőzésen [97-99], míg a szeropozitivitás a felnőtt populációban magas, eléri a 82-99%-ot [100, 101]. A vírus elterjedt, a BKPyV elleni antitestek prevalenciája a világ minden részén magas [100]. A JCPyV szeroprevalencia a kor előrehaladtával lassan gyarapszik, a primer JCPyV fertőzés jelentős része felnőttkorban, általában a BKPyV fertőzés után történik. A JCPyV szeropozitivitás 50-70%, magasabb

szeropozitivitást idősebb korban írtak le [100, 101].

A primer BK és JC vírusfertőzés valószínűleg a légutakon át történik inhalációval. A terjedés módja máig sem teljesen tisztázott, de feltételezések szerint a virionokat tartalmazó váladékokkal, aeroszollal terjed, de akár a kontaminált étel vagy víz is szolgálhat a vírusfertőzés forrásaként, így a fekálorál terjedés sem kizárt [100, 102, 103]. Egyes szerzők feltételezték, hogy a terhesség alatti aktív BKPyV vagy JCPyV replikáció a magzat fertőzését eredményezheti transzplacentálisan vagy a szülőcsatornán való áthaladáskor, így tehát a polyomavírusok vertikális terjedése sem kizárt [104, 105]. Ezt a feltételezést támasztja alá a BKPyV DNS kimutatása placentában és abortált magzatokban [104], valamint a BKPyV és JCPyV elleni IgM antitestek kimutatása újszülöttekben [106].

Mindkét vírus a primer fertőzést követően látens fertőzést alakít ki: a BKPyV főként a vese és a húgyutak tubuláris epithelsejtjeiben, valamint a limfoid rendszer sejtjeiben [107]. Ennek megfelelően BKPyV szekvenciát nagy gyakorisággal mutattak ki az urogenitális traktus szöveteiben és folyadékaiban, így a méhnyakban, vulvában, prosztatában, ondóban, sőt ritkán detektálták agyszövetben is [108]. Emellett BKPyV DNS-t mutattak ki a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben és a lépben, ami arra utal, hogy az immunrendszer is hozzájárulhat a BKPyV terjedéséhez. Ráadásul képes *in vitro* replikálódni az endothelsejtekben, ami növeli a lehetőségét annak, hogy a BKPyV átjuthasson az endothel barrieren, szétterjedjen a perifériáról a vérrel a különböző szervekbe [108, 109]. Az egészséges felnőttek mintegy 7%-a tünetmentesen üríti a vírust a vizeletével viraemia nélkül [110]. A JCPyV látenciát alakít ki a központi idegrendszerben, de a BKPyV-hez hasonlóan a vese és a húgyutak sejtjeiben, és a limfocitákban is perzisztál. Kimutatták már számos szövetben és sejtben, így például a májban, lépben, tüdőben, nyirokcsomókban a bélben is [108].

A primer fertőzés valószínűleg mindkét vírus esetében általában szubklinikai vagy enyhe megbetegedéssel, tonsillitisszel jár. A vírusok reaktivációja vagy a reinfekció főként immunszuppresszált egyéneknél okozhat megbetegedéseket, a reaktiváció révén látenciából kialakuló lítikus fertőzés okozta direkt sejtkárosító hatása miatt tünetekkel járhat. Ezek közül a 3 legjelentősebb BKPyV reaktivációhoz kapcsolódó betegség a haemorrhagias cystitis (HC), a polyomavírus nephropathia (PVN) és az urethrostenosis [100, 108]. A BKPyV reaktiváció okozta viruria és viraemia a vesetranszplantált betegek 80%-ánál bekövetkezik és a betegek 1-10%-ánál PVN-t okoz, ami az esetek 90%-ában a szerv kilökődéséhez vezethet [111]. A vírus nemcsak a transzplantált betegeknél okoz problémát, reaktivációját megfigyelték más

megváltozott immunstátuszú egyéneknél, így autoimmun, valamint AIDS-es betegeknek [112-114]. A terhesség alatt a szemiallogén magzat toleranciája miatt immunológiai változások zajlanak az anya szervezetében, ami növeli a fogékonyságot a különböző fertőzésekkel szemben [115]. Ez a tranzienst változás a BK polyomavírus reaktivációját, 3-54%-os gyakorisággal általában tünet nélküli viruriát eredményez [106, 108, 116, 117]. A virurián kívül BKPyV viraemiát is kimutattak terhes nőkben. A legjelentősebb JCPyV asszociált betegség a PML. Ez a JCPyV lítikus vírusreplikációjának oligodendrocytákat károsító következménye, mely demyelinizációhoz vezet a központi idegrendszerben. Ilyenkor a vírus az agyszöveten kívül a liquorban is megjelenik [108].

A BK és JC vírusfertőzés kimutatását többféle módon végezhetik: direkt vírusantigén kimutatásával és PCR-rel. A kvantitatív PCR vizsgálatok mellett a pontos PVN diagnózis felállításához a vesebiopszia hisztológiai vizsgálata, a citopátiás elváltozások kimutatása is szükséges. A vizeltminta mellett a vérplazma kvantitatív PCR vizsgálata is szükséges. A PML diagnózisában a virális genom kimutatása a liquorban, esetleg agybiopsziás mintában nyújtja a legtöbb információt. A PVN korai állapotának kimutatása lehetővé teszi a gyors beavatkozást, ami növeli a szerv túlélését [118, 119]. Napjainkban az újabb és hatékonyabb immunszuppresszív terápiának köszönhetően a PVN kialakulásának kockázata is nőtt, mely alátámasztja a feltételezést, hogy a polyomavírusok reaktivációja és az immunrendszer állapota között szoros kapcsolat van [120].

Mindezidáig hatékony és specifikus BKPyV antivirális terápia nincs: a leggyakoribb kezdeti beavatkozás az immunszuppresszió mértékének csökkentése ahhoz, hogy a gazdaszervezet immunrendszere visszaszerezze a kontrollt a fertőzés fölött, illetve vesetoxikussága ellenére a cidofovir jótékony hatását írták le vesetranszplantált egyének nephropathiájának kezelésében [121].

Mindezek alapján hasonlóan a BK és JC vírushoz feltételezhető, hogy az újonnan felfedezett polyomavírusok is immunszuppresszált egyéneknél fordulhatnak elő nagyobb gyakorisággal, ezekben az egyéneknél okozhatnak megbetegedést.

II.2. WU polyomavírus (WUPyV)

A néhány munkacsoport által, mesterségesen előállított vírusfehérjékkel és VLP-kel elvégzett 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% [99, 100, 122-125]. 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 [126, 127].

Az elmúlt években egyre több prevalencia adat jelent meg a vírusról: a légúti mintákon kívül kimutatták vérben, székletben, HCV (hepatitis C vírus) és HIV (humán immundeficiencia vírus) pozitív egyének szérumában, mandulában, liquorban (részletesen a 2. táblázatban összefoglalva). Immunkompetens egyéneknél leggyakrabban légúti fertőzés tüneteitől szenvedő gyerekeknél mutatták ki a vírust, a legnagyobb gyakorisággal (16,4%) Japán gyerekek légúti mintáiban (2. táblázat) [128]. A légút lehet a behatolási kapu. A primer fertőzés lehet tünetmentes vagy akár légúti tünetekkel is járhat. Számos tanulmányban légúti tünetektől szenvedő betegek légúti mintájában mutatták ki a jelenlétét, ám sok esetben más légúti vírusok vizsgálatát a mintákban nem végezték el. Néhány kutatócsoport azonban a WU vírussal egyidejűleg egyéb vírusokat, például RSV-t (respiratory syncytial vírust), influenza A-t és B-t, rhinovírust, parainfluenza vírust, adenovírust is kimutatott [129]. Az is elképzelhető, hogy a vírus tünetmentesen perzisztál a légutakban és véletlenszerűen detektáljuk, esetleg valamilyen gyulladásoz folyamat révén reaktiválódik, predisponáló tényező vagy súlyosbító körülmény más légúti fertőzésekben [130]. A vírus mennyisége a mintában utalhat arra, hogy esetleg képes szaporodni a légutakban, új virionok kerülnek a légúti váladékokba [131]. Ezért a prevalenciavizsgálatok rendkívül fontosak a vírus terjedésének, behatolási kapujának, a fertőzések forrásainak, a vírusreplikáció vagy a látencia helyének meghatározásához. A vírusok jelenléte a székletben (0,5-8,1%) [127, 131, 132] utalhat arra, hogy a vírus fekál-orál módon terjed, a széklet forrása lehet a fertőzésnek, a száj, illetve a gasztrointesztinális traktus pedig a vírus behatolási kapuja lehet. A vírus jelenlétét kimutatták gasztrointesztinális panaszoktól szenvedők székletmintáiban, ugyanakkor a panaszok ellenére nem lehetett patogén szerepüket tisztázni, mivel egyidejűleg például rotavírust is kimutattak a vizsgált egyének székletében [127, 131, 132]. Az sem kizárt, hogy a vírus kolonizálja a bélrendszert anélkül, hogy megbetegedést okozna, ha látenciát képes kialakítani, akkor esetleg reaktiválódhat más vírusfertőzések következtében [126, 127].

Egy másik lényeges szempont a vírus patogenezisével kapcsolatban, hogy úgy tűnik, hasonlóan a BK és JC polyomavírushoz az immunszuppresszáltak körében nagyobb gyakorisággal mutatható ki a vírus (0,9-8,3%) [133-135]. Ez, illetve a BK és JC vírusról meglévő ismereteink alapján feltételezhetjük, hogy az immunkompetens egyéneknél esetleg tünetmentesen vagy enyhe tünetekkel zajló fertőzéssel szemben a WUPyV fertőzés súlyosabb

következményekkel járhat immunszuppresszáltakban. Valószínűleg nem véletlen, hogy a vírust felnőttkorban az immunszuppresszáltak körében detektálták gyakrabban (0,75-4,4% vs. 1-8,1%; 2. táblázat) [136]. Ezt támasztja alá, hogy AIDS-es betegek limfoid szövetmintájában 7,1% volt [129], transzplantáltak székletmintáiban pedig elérte a 8,1%-ot a WUPyV pozitivitás [132]. Ez a felismerés is arra utal, hogy az immunszuppresszált egyének szervezetében a vírus gyakrabban okozhat fertőzést, esetleg az immunszuppresszió növeli a reinfekciók, reaktivációk kockázatát. Nem kizárt tehát, hogy a jövőbeli vizsgálatok pont ezekben a betegcsoportokban mutatnak rá a vírus betegségkötő képességére, mint oportunistá patogénre. Jelenleg még nem tisztázott, hogy sok esetben a légúti megbetegedés tüneteit ez a vírus okozza-e. Ez részben annak köszönhető, hogy a tünetek megjelenésével egyidejűleg más kórokozókat is kimutattak, vagy éppenséggel pont nem vizsgáltak más vírusokat, kórokozókat, így nehéz egyértelműen igazolni a WUPyV patogén szerepét [137-140].

2. táblázat: A WU polyomavírus előfordulása a különböző mintákban

Minta típusa	WUPyV fertőzött egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	WUPyV pozitivitás %	Ország	Referencia /év
légúti minta	immunkompetens	0,1-5,9 (0,9) 0,1-6,5(1,2)	7 (34/486) 4,2 (3/72)	Dél-Korea	[141] 2007
		1,1 (1,1) 1,1-2 (1,8)	2,5 (2/79) 6,4 (5/78)	Kanada	[142] 2007
		<0,1-8 (2,2)	4,2 (17/406)	Kína	[143] 2008
		<0,1-22 (1,6)	4,9 (62/1277)	Németország	[130] 2008
		<0,1-14 (1)	6,3 (19/302)	Thaiföld	[137] 2008
		0,1-14 (0,8)	2,4 (10/415)	Kína	[144] 2008
		<0,1-95 (1,38)	4,5 (128/2866)	Ausztrália	[140] 2008

Minta típusa	WUPyV fertőzött egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	WUPyV pozitivitás %	Ország	Referencia /év	
légtúti minta	immunkompetens	0,2-4 (0,11)	2,4 (13/537)	Franciaország	[145] 2008	
		<0,1-5 (3)	0,35 (1/278)	Kína	[139] 2008	
		3,6-85,3 (46)	0,75 (2/265)	Franciaország	[138] 2009	
		<3	3 (3/98)	Németország	[146] 2008	
		(4,9)	5 (14/295)	USA	[147] 2011	
		0,1-7,6	16,4 (38/232)	Japán	[128] 2011	
	immunszuppressz- szált	2,3-16,3 (5,4)	0,9 (1/106)	Finnország	[148] 2009	
		(4,9)	3 (5/161)	USA	[147] 2011	
		0,8-75,2 (51,5)	1,0 (35/2732)	USA	[149] 2012	
		ismeretlen	2,7 (1/37 beteg)	Németország	[150] 2012	
	immunkompetens és immunszuppressz- szált is	0,3-34	1,0 (10/983)	Egyesült Királyság	[136] 2007	
		0,3-53 (2) 0,3-51 (3)	3 (37/1245) 0,7 (6/890)	Ausztrália USA	[86] 2007	
	nem ismert pontosan	<0,1-79 (0,8)	1 (4/371)	Egyesült Királyság	[151] 2008	
	limfoid szövet	immunkompetens	1,5-72 (21)	2,2 (5/229)	Finnország	[148] 2009
			10-88 (42)	4,4 (4/91)	Olaszország	[152] 2009
immunszuppressz- szált		nem ismert	7,1 (3/42)	Egyesült Királyság	[129] 2009	

Minta típusa	WUPyV fertőzött egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	WUPyV pozitivitás %	Ország	Referencia /év
széklet	immunkompetens	0,1-13 (0,9)	0,5 (2/377)	Kína	[127] 2009
		<0,1-11,8 (1,3) 0,1-97,6 (41,8)	3,6 (7/193) 0,9 (2/221)	Ausztrália	[131] 2009
	immunszuppresszált	1-27 (7,1) 17-75 (54)	8,1 (7/86)	Olaszország	[132] 2009
		ismeretlen	2,7 (1/37 beteg)	Németország	[150] 2012
vizelet	immunszuppresszált	ismeretlen	2,7 (1/37 beteg)	Németország	[150] 2012
agy-gerincvelői folyadék	immunszuppresszált	4-88 (44)	1,7 (1/60)	Olaszország	[133] 2009
plazma	immunszuppresszált	37-54 (45,5)	1,6 (1/62)	Olaszország	[126] 2009
		nem ismert	8,3 (10/121)	USA	[135] 2009
		33,8-47,3 (41,9)	4,6 (7/153)	Olaszország	[153] 2010
	immunkompetens	32-47,5 (41)	0,8 (1/130)	Olaszország	[153] 2010
szérum	immunkompetens (de HCV pozitív)	nem ismert	2,5 (2/79)	USA	[135] 2009
teljes vér	immunszuppresszált	23-82 (46)	1 (1/100)	Olaszország	[134] 2009

II.3. KI polyomavírus (KIPyV)

A prevalenciavizsgálatok során minden kontinensről származó légúti mintából kimutatták a KI vírust, a PCR pozitivitás 0,5-8% volt [138, 144, 154]. A populáció fertőzöttségét tekintve az eddigi adatok szerint az 5 éves korcsoportban a szeropozitivitás 45-94%, míg a felnőttekben 55-100% [99, 100, 122, 124, 125], ami arra utal, hogy – hasonlóan a

WUPyV-hoz – a vírus valószínűleg elterjedt a humán populációban, és a primer fertőzés általában gyerekkorban következik be. Hasonló következtetés vonható le abból az észrevételből, hogy immunkompetens egyének esetében a vírust főként gyermekkorban mutatták ki (0,6-3%-os gyakorisággal) sok esetben légúti megbetegedés tüneteitől szenvedő betegekben [137, 141, 143]. Ennek ellenére máig sem hozták egyértelmű összefüggésbe megbetegedésekkel, mivel a vírus jelenléte mellett tapasztalt tünetek sok esetben más fertőzések miatt is kialakulhattak.

Amint az a 3. táblázatban is jól látható, több munkacsoport vizsgálta a vírus prevalenciáját a humán populációban, és a légúti mintákon kívül kimutatták vérben, székletben, mandulában, tüdőszövetben különböző gyakorisággal, de szinte minden kontinensen (3. táblázatban). Immunkompetens egyének esetében a legnagyobb gyakoriságot (12%) mandulaszövetből írták le [152], de székletben (11,1%) és légúti mintákban (6,5%) [138] is gyakran kimutatták a vírust. A WUPyV és KIPyV közti nagymértékű genetikai hasonlóság, illetve az eddigi ismeretek alapján ennél a vírussal is elmondható, ami a WUPyV esetében: a légúti váladékokban, mandulában, tüdőszövetben történő kimutatása [128, 140, 143] miatt egyre valószínűbb a légúti terjedés, de nem kizárt a fekély-orál terjedés sem [85, 155]. Az is feltételezhető, hogy a disszemináció a szervezetben a vér által történik [134]. Mindezeket azonban nehéz a vírus izolálása, *in vitro* sejt kultúrában történő szaporítása nélkül tanulmányozni, igazolni.

Hasonlóan a BK és JC polyomavírusokhoz, a KI vírusfertőzés kockázatát is növelheti az immunszuppresszió (a vírus előfordulásának gyakorisága immunszuppresszáltakban 1-45%, míg immunkompetens egyékekben 0,5-12%; lásd 3. táblázatban összefoglalva). Babakir-Mina és munkatársai igen jelentős, 45%-os gyakorisággal mutatták ki a vírust immunszuppresszált felnőttek tüdőszövetében, míg Teramoto és munkatársai immunkompetens egyénekében csak 3,3%-os KIPyV gyakoriságot detektáltak [128, 155].

3. táblázat: A KI polyomavírus előfordulása a különböző mintákban

Minta típusa	KIPyV pozitív egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	KIPyV pozitívitás %	Ország	Referencia /év
légtúti minta	immunkompetens	3,6-85,3 (46)	6,5 (17/265)	Franciaország	[138] 2009
		0,1-7,6	3 (7/232)	Japán	[128] 2011
		<0,1-90 (7)	1 (6/637)	Svédország	[85] 2007
		0,1-5,9 (0,9)	1 (5/486)	Dél-Korea	[141] 2007
		0,1-95 (1,5)	2,5 (24/951)	Ausztrália	[156] 2007
		<0,1-95(1,38)	2,6 (75/2866)	Ausztrália	[140] 2008
		<0,1-9 (0,8)	2,7 (11/406)	Kína	[143] 2008
		<0,1-14 (1)	1,9 (6/302)	Thaiföld	[137] 2008
		0,1-14 (8,2)	0,5 (2/415)	Kína	[144] 2008
		0,5-82 (27)	0,5 (1/222)	Olaszország	[154] 2008

Minta típusa	KIPyV pozitív egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	KIPyV pozitivitás %	Ország	Referencia /év	
légúti minta	immunkompetens	0,10-2,6 (1,6)	0,6 (3/537)	Franciaország	[145] 2008	
		nem ismert (4,9)	2,3 (7/295)	USA	[147] 2011	
	immunszuppresszált	nem ismert (4,9)	5,6 (9/161)	USA	[147] 2011	
		2,3-16,3 (5,4)	3,8 (4/106)	Finnország	[148] 2009	
		0,8-75,2 (51,5)	7 (203/2732)	USA	[149] 2012	
		ismeretlen	10,8 (4/37 beteg)	Németország	[150] 2012	
	immunkomp. és immunszuppr.	0,3-34	1,4 (14/983)	Egyesült Királyság	[136] 2007	
	nem ismert	<0,1-79 (0,8)	2,7 (10/371)	Egyesült Királyság	[151] 2008	
	mandula	immunkompetens	10-88 (42)	12 (11/91)	Olaszország	[152] 2009
	limfoid szövet	immunszuppresszált	nem ismert	7,1 (3/42)	Egyesült Királyság	[129] 2009

Minta típusa	KIPyV pozitív egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	KIPyV pozitivitás %	Ország	Referencia /év
tüdő szövet	immunszuppresszált	40-85 (68)	45 (9/20)	Olaszország	[155] 2009
	immunkompetens	45-77	3,3 (1/30)	Japán	[128] 2011
széklet	immunkompetens	<0,1-17 (1)	0,5 (1/192)	Svédország	[85] 2007
		<0,1-11,8 (1,3)	0,5 (1/193)	Ausztrália	[131] 2009
		2,3-16,3 (5,4)	2,7 (2/75)	Finnország	[148] 2009
		3,6-85,3 (46)	11,1 (1/9)	Franciaország	[138] 2009
	immunszuppresszált	1-27 (7,1) 17-75 (54)	11,6 (10/86)	Olaszország	[132] 2009
		ismeretlen	10,8 (4/37 beteg)	Németország	[150] 2012
plazma	immunszuppresszált	37-54 (45,5)	3,2 (2/62)	Olaszország	[126] 2009
		33,8-47,3 (41,9)	2,6 (4/153)	Olaszország	[153] 2010

Minta típusa	KIPyV pozitív egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	KIPyV pozitivitás %	Ország	Referencia /év
plazma	immunkompetens	32-47,5 (41)	3,1 (4/130)	Olaszország	[153] 2010
teljes vér	immunszuppressz-szált	46 (23-82)	1 (1/100)	Olaszország	[134] 2009

II.4. Humán polyomavírus 9 (HPyV9)

A vírust egy immunszuppresszív terápiában részesülő vesetranszplantált beteg szérumában és vizeletében mutatták ki először, és a filogenetikai vizsgálat szerint legközelebbi rokonságban a szavannacerkófból izolált, majom B-limfotróp polyomavírussal (LPyV) áll [96]. Korábban a humán populációban közel 30%-os LPyV szeropozitivitás detektálásánál már felmerült a gyanú, hogy az egyébként majmokat fertőző vírus helyett egy ismeretlen vírus ellen termelődő, keresztreakáló antitesteket mutattak ki [157]. Mivel a HPyV9-et eddig még nem izolálták, a virális kapszid proteinszekvenciájának ismeretében rekombináns fehérjét, illetve VLP-t állítottak elő a szerológiai vizsgálatokhoz. Az ezekkel végzett vizsgálatok alapján a HPyV9 szeropozitivitás 1-14 éves gyerekek esetében 10,4-18,6%, 15-19 éves kamaszok körében 33,7%. A 20-80 év közötti egészséges felnőtteknek pedig mindössze 39,4-47%-a szeropozitív [157-160], ami alacsonyabb, mint a BK vagy a WU és KI polyomavírusok esetében. A szeropozitivitás a korrallal nőtt, Nicol és munkatársai adatai szerint 80 éves korra eléri a 69,6%-ot, ami arra utalhat, hogy a HPyV9-el történő fertőzés az élet bármely szakaszában bekövetkezhet, vagyis a felnőtt populáció jelentős része még fogékony a fertőzésre [159]. Hasonlóan a WU és KI polyomavírushoz az sem kizárt, hogy az immunszuppresszió növeli a fogékonyságot a HPyV9 fertőzésre. Ezt is alátámaszthatja az a megfigyelés, hogy vese- és csontvelő-transzplantáltak körében a szeropozitivitás 63-69% volt, ami meghaladta az egészséges kontrollcsoport szeropozitivitását (41-43%) [157]. Máig sem tisztázott a terjedés módja, a behatolási kapu, illetve a vírusreplikáció lokalizációja. Nagyon kevés publikáció áll rendelkezésünkre, csak néhány munkacsoport tanulmányozta a vírusok prevalenciáját, zömében nem is tudták kimutatni a

vizsgált mintákban. Scuda és munkatársai szérumban, plazmában, teljes vérben (lásd 4. táblázat) és vizeletben (0,6%-os gyakorisággal) is kimutatták a vírust. Ezután leírták bőrmintákban is, az egészséges kontrollcsoportban 0,9%-os gyakorisággal, Merkel-sejtes karcinómás betegek bőrmintájában 25%-os gyakorisággal [161]. Számos más mintában is keresték a virális DNS-t, de nem tudták kimutatni székletben, alsó légúti mintában, nasopharingealis aspirátumban, liquorban [91, 162-164]. A vérből való kimutatás mindenesetre felveti annak lehetőségét, hogy a kórokozó eljuthat a keringésbe és a vér által szétterjedhet a szervezetben, más szöveteket és szerveket fertőzve. Így például a BK és JC polyomavírushoz hasonló módon akár a vesébe, ahonnan a vizelettel ürülhet [108, 109]. A HPyV9-et is kimutatták immunszuppresszált egyéneknél, és nem kizárt, hogy hasonlóan a többi polyomavírushoz, főként immunszuppresszált egyéneknél okozhat megbetegedést, illetve a fertőzés gyakorisága is nagyobb lehet ezekben a betegekben. Mivel kevés tanulmány áll még rendelkezésünkre a HPyV9-ről, az egészséges kontrollcsoportokban történő vizsgálatokról, ezért nem vonhatunk le messzemenő következtetéseket a HPyV9 fertőzésre vonatkozólag.

4.táblázat: A HPyV9 előfordulása a különböző mintákban

Minta típusa	HPyV9 pozitív egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	HPyV9 pozitivitás %	Ország	Referencia /év
plazma	immunszuppresszált	nem ismert	0,6 (1/176)	Németország	[90] 2011
szérum			2,3 (2/88)		
teljes vér			4,8 (1/21)		
vizelet			0,6 (1/179)		
vizelet	immunszuppresszált	nem ismert (3,1)	0,6 (1/169)	USA	[91] 2012
	ismeretlen	0,03-94,8 (16,33)	0 (0/189)	Ausztrália	[162] 2013
bőrminta	immunkomp. és immunszuppr.	19-96 (48)	2,5 (3/119)	Franciaország	[161] 2011

Minta típusa	HPyV9 pozitív egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	HPyV9 pozitivitás %	Ország	Referencia /év
bőrminta	immunkompetens	32-63, 75	17 (1/6)	Franciaország	[164] 2012
széklet	immunkompetens	nem ismert	0 (0/38)	Németország	[90] 2011
			0 (0/92)	Franciaország	[161] 2011
	immunszuppresszált	nem ismert (3,1)	0 (0/122)	USA	[91] 2012
	immunkompetens	0,07-94,8 (4,4)	0 (0/185)	Ausztrália	[162] 2013
0-7,46 (1,2)		0 (0/78)			
liquor	immunszuppresszált	nem ismert	0 (0/74)	Németország	[90] 2011
	immunkompetens	0-92,6 (23,17)	0 (0/171)	Ausztrália	[162] 2013
nasopharyngealis asp.	immunkompetens	nem ismert	0 (0/46)	Franciaország	[161] 2011
	immunszuppresszált	nem ismert (3,1)	0 (0/160)	USA	[91] 2012
brancheo-alveolaris asp.	immunkompetens	nem ismert	0 (0/21)	Németország	[90] 2011
			0 (0/46)	Franciaország	[161] 2011
légúti minta	immunkomp. és immunszuppr.	0,02-92,4 (1,7)	0 (0/1232)	Ausztrália	[162] 2013
	immunkompetens	0-17,2 (8,4)	0 (0/153)		

Minta típusa	HPyV9 pozitív egyének immunológiai státusza	Vizsgált egyének kora korhatár, év (medián)	HPyV9 pozitivitás %	Ország	Referencia /év
plazma	immunszuppresszált	nem ismert (3,1)	0 (0/265)	USA	[91] 2012
teljes vér	immunszuppresszált	49-93 (63)	0 (0/27)	Japán	[163] 2012
	immunkompetens	27-55 (48)	0 (0/18)		
	immunkomp. és immunszuppr.	1,2-77,3 (49,97)	0 (0/161)	Ausztrália	[162] 2013
szérum	immunszuppresszált	21-74 (47)	5 (27/541)	Hollandia	[165] 2014
	immunkompetens	29-68 (52)	0 (0/174)		

CÉLKITŰZÉSEK

- Vizsgálataink során a HHV-6A, HHV-6B, HCMV, KIPyV, WUPyV és HPyV9 vírusok prevalenciáját tanulmányoztuk egészséges egyéneken, terhes nőkben és vesetranszplantált betegekben.
- Mivel vesetranszplantáltak esetén a HHV-6A és HHV-6B fertőzések nyomkövetése, diagnosztikája a Debreceni Egyetemen, de Magyarországon máshol sem rutinszerűen végzett,
 - így célunk volt vizsgálni, hogy milyen gyakorisággal fordulnak elő ezek a vírusok, aktív 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 ezek a vírusok kimutathatóak-e, ha igen, 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.
- Végül a vírusok jelenléte és az esetleges klinikai tünetek közti összefüggést is tanulmányozni kívántuk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Minták és betegcsoportok

I.1. 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.

I.2. 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.

I.3. Minták előkészítése nukleinsav izolálásra

Az alvadásgátolt vért először centrifugáltuk (10 perc, 1500 g), majd a vér sejtcsomóját és a vérplazmát külön használtuk.

A sejtcsomót homogenizáltuk, és 2 mL vérhez 8 mL nukleázmentes, steril líziszfert (8,24 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 20 µL 0,5 M-os EDTA 1 L ioncserélt, steril vízben) adtunk. 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 4 °C-on centrifugáltuk 180 g-vel 10 percig. A csapadékot újraszuszpendáltuk 8 mL líziszfertben, majd inkubálás nélkül ismét centrifugáltuk (180 g-vel 10 percig 4 °C-on). Eltávolítottuk a felülúszót, majd a sejteket steril, nukleázmentes foszfátszferttel (PBS-sel) kétszer mostuk (szuszpendáltuk a sejteket PBS-ben, centrifugáltuk 4 °C-on 180 g-vel 10 percig). Végül a lizálás után a sejteket 1,5x10⁶ sejt/200µL koncentrációnak megfelelően PBS-ben szuszpendáltuk.

A natív vizeletmintákból 200 µL-t használtunk fel a nukleinsav izoláláshoz.

A légúti minta esetében a vattapálcával vett torok váladék mintát a mintavételt követően azonnal 400 µL steril, nukleázmentes PBS-be mosva használtuk fel az izoláláshoz.

II. A nukleinsav izolálás menete

A 200-200 µL plazmából, vizeletből és légúti mintából, valamint PBS-ben felvett sejtcsomóból a virális nukleinsavat High Pure Viral Nucleic Acid Kittel (Roche, Svájc) a gyártó utasításai szerint izoláltuk a következők szerint:

- 200 µL mintához 50 µL proteínáz-K-t, 4 µL poli-A-t és 200 µL kötőszfert mértünk, majd alapos vortexelés után 10 percig 72 °C-on inkubáltuk.
- A mintához 100 µL kötőszfert adtunk, majd alapos homogenizálást követően a mintát az oszlopra pipettáztuk.
- 1 percig 8000 g-vel centrifugáltuk.
- 500 µL inhibitorpuffert mértünk az oszlopra, majd 1 percig 8000 g-vel centrifugáltuk.
- Az oszlopra 450 µL mosószfert mértünk, ismét egy percig centrifugáltuk 8000 g-vel. A mosást megismételtük.
- Ezután az oszlopot 1 percig 15000 g-vel centrifugáltuk, hogy eltávolítsuk a maradék mosószfert.
- Az oszlopról a nukleinsavat 50 µL eluálószferttel, 8000 g-vel történő 1 perces centrifugálással oldottuk le. A nukleinsavat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

Az izolálás sikerességét, a DNS amplifikálhatóságot β-globin PCR-rel, az RNS-ét pedig

GAPDH mRNS RT-PCR segítségével ellenőriztük (a későbbiekben részletezett módon).

III. Vírusok kimutatása

III.1. HHV-6 nested PCR

A virális nukleinsav jelenlétét olyan nested polimeráz láncreakcióval mutattuk ki, mely alkalmas a HHV-6A és a HHV-6B elkülönítésére az amplifikált termékek mérete alapján [166].

A PCR reakció 1. körében 5 µL izolált nukleinsavat amplifikáltunk 25 µL végtérfogatban. A reakcióelegy 2xRedTaq Ready Mixet (Sigma-Aldrich, USA) és 10-10 pmol IE1 és IE2 primert tartalmazott. Pozitív kontrollként HHV-6A GS, illetve HHV-6B Z29 vírusszuspenzióból nyert DNS-t használtunk. A 2. körben a reakcióelegy össztérfogata 20 µL volt. A reakció során 2xRedTaq Ready Mixet (Sigma-Aldrich, USA), 10-10 pmol nIE1 és nIE2 primer-t, valamint templákként 2 µL-t az 1. kör végtermékéből használtunk.

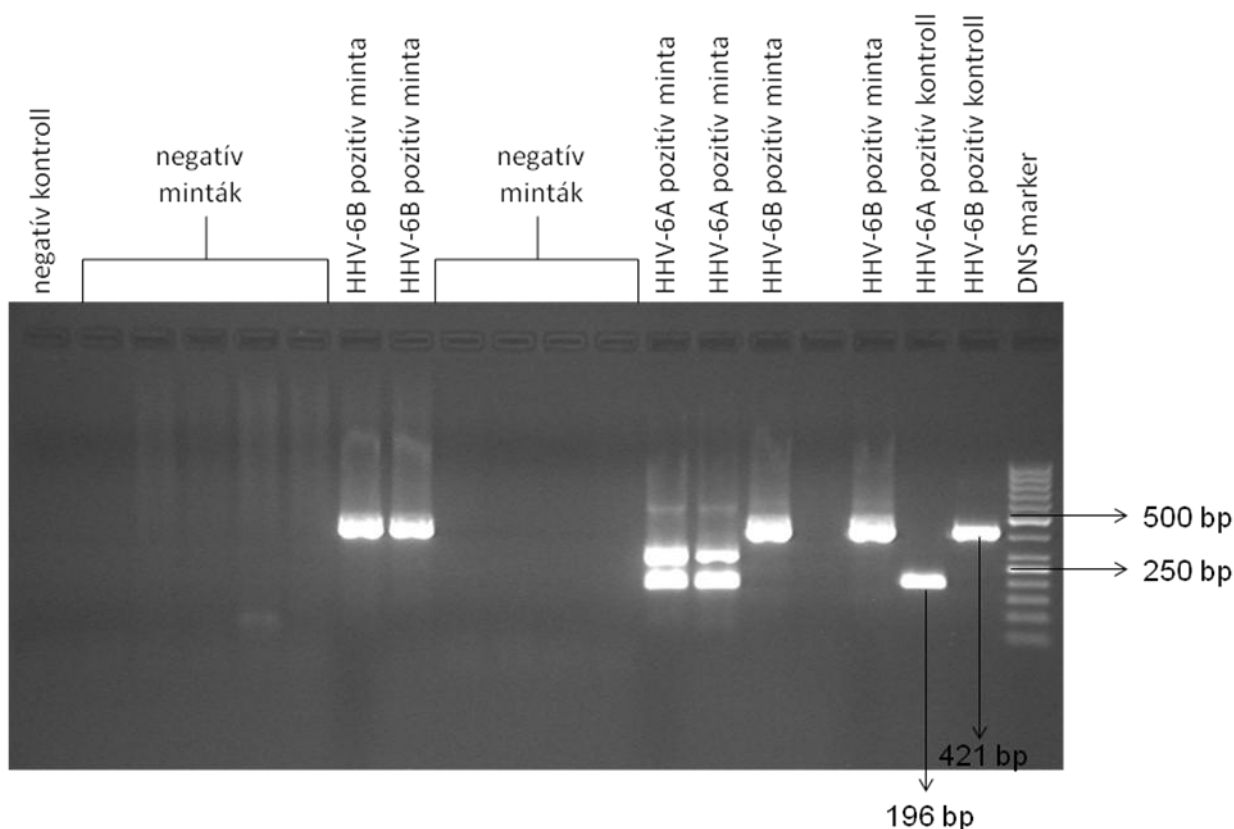
A PCR reakció 2. körében keletkezett termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el etidium-bromid festéket tartalmazó 1,5 %-os agaróz gélben. A detektálást Bio-Rad Gel Doc 2000 géldokumentációs rendszerrel végeztük. A vírusokat az amplifikált termék mérete alapján (a DNS marker és a kontrollok segítségével) azonosítottuk. Az 1. ábra, vizsgálataink reprezentatív fotójaként, a HHV-6 nested PCR 2. körében keletkezett termékeket mutatja be. A primerek szekvenciáját és a PCR reakció körülményeit az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat: HHV-6 nested PCR primer szekvenciái és a reakció körülményei

Primer neve	Target HHV-6A GenBanki A.: KC4659 51.1	Target HHV-6B GenBanki A.: AF15770 6.1	Primer szekvenciája 5'- 3'	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
IE1	IE;U90 gén 134301- 134277	IE;U90 gén 136737- 136713	TTCTCCAGATGTGCCAGGGAAAT CC	HHV-6A:328 bp HHV-6B:553 bp	94 °C 3 m 94 °C 1 m 62 °C 2 m 72 °C 3 m 72 °C 5 m } 30 ciklus
IE2	IE;U90 gén 133973- 133997	IE;U90 gén 136184- 136208	CATCATTGTTATCGCTTTCCTCT C		

Primer neve	Target HHV-6A GenBanki A.: KC4659 51.1	Target HHV-6B GenBanki A.: AF15770 6.1	Primer szekvenciája 5'- 3'	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
nIE1	IE;U90 gén 134196- 134167	IE;U90 gén 136632- 136603	AGTGACAGATCTGGGCGGCCCTA ATAACTT	HHV-6A:196 bp	94 °C 3 m 94 °C 1 m 62 °C 2 m 72 °C 3 m 72 °C 5 m 30 ciklus
nIE2	IE;U90 gén 134002- 134030	IE;U90 gén 136212- 136241	AGGTGCTGAGTGATCAGTTTCAT AACCAAA	HHV-6B:421 bp	

1. ábra: HHV-6A és 6B specifikus DNS kimutatása a mintákban



III.2. HHV-6 real-time PCR

A HHV-6 kvantitatív kimutatásához TaqMan próbás detektálással real-time PCR-t optimalizáltunk Boutolleau és kollégái által publikált primerek és próba használatával [167].

Abszolút kvantifikációhoz a HHV-6A-ra és HHV-6B-re jellemző U65-66 genomrégiót tartalmazó plazmidot (pGL2-Basic vektorba klónozva, Promega, USA) használtunk. A két vírus esetén a forward primer és a TaqMan próba közös, míg a reverz primer eltérő volt. A PCR specificitását HHV-6A GS, illetve HHV-6B Z29 nyert DNS-en teszteltük. A PCR reakciót 50 µL végtérfigatban 10-10 pmol forward és reverz primerrel, 12,5 pmol TaqMan próbával és 10 µL templát nukleinsavval 2xTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) használva végeztük.

A primerek szekvenciáját és a PCR reakció körülményeit a 6. táblázat mutatja be.

6. táblázat: HHV-6 real-time PCR primer szekvenciái és a reakció körülményei

Primer neve	Target HHV-6A GenBanki A.: KC465951.1	Target HHV-6B GenBanki A.: AF157706.1	Primer szekvenciája 5'-3'	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
HHV-6 forward primer	U65-66 régió 101723-101701	U65-66 régió 102999-102977	GACAATCACATGCCTGGATAATG	166bp	95 °C 10 m 95 °C 15 s } 60 °C 1 m } 45 ciklus
HHV-6A reverz primer	U65-66 régió 101558-101586	-	TGGTAATGGACTAATTGTGTGTTGTTTTA		
HHV-6B reverz primer	-	U65-66 régió 102834-102862	TGGTAATGGACTAAGTGTGCGTTATTTTC		
TaqMan próba	U65-66 régió 101647-101670	U65-66 régió 102923-102946	5'FAM AGCAGCTGGCGAAAAGTGCTGTGC Tamra 3'		

A terhes nők vizsgálata során a virális DNS mennyiségi meghatározásához egy a kereskedelmi forgalomban kapható, klinikai diagnózishoz validált kitet (HHV-6 Q-PCR AlertAmpliMix, Nanogen Advanced Diagnostic S.r.L, Olaszország) használtunk, mely a HHV-6 ORF 13 régiójára specifikus és humán β-globin génre specifikus primereket, próbákat tartalmaz.

III.3. HHV-6 RT-PCR

Ahhoz, hogy elkülönítsük az aktív és látens HHV-6 fertőzést, reverz transzkripció PCR-t (RT-PCR) végeztünk korábban már közölt primereket használva [168]. Mivel a primerek egy exonra illeszkednek, ezért a nukleinsav mintákat a reverz transzkripció lépést megelőzően DNáz enzimmel (AMPD1-1KT; Sigma Aldrich, USA) DNS mentesítettük a gyártó utasításai alapján. Ezt követően az RNS átírását cDNS-sé High Capacity cDNA Reverse Transcription Kittel (Applied Biosystems, USA) végeztük. A reverz transzkripció során 0,2 µg RNS-t használtunk az 1 µL 25x dNTP Mix-et, 1 µL 10x RT random primereket, 2 µL 10x RT puffert, 1 µL RNáz inhibitor és 1 µL MultiScribe™ reverz transzkriptázt tartalmazó reakcióban. A cDNS szintézist a gyártó utasítása szerinti hőmérsékleten (25 °C 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 min) végeztük.

A nested PCR reakció 1. köréhez 5 µL cDNS-t használtunk. A reakciót 25 µL végtérfogatban 10-10 pmol U79-1 és U79-2 primerrel, valamint 2xABI Fast PCR Master Mix-et (Applied Biosystems, USA) használva végeztük. Pozitív kontrollként HHV-6A GS RNS-t használtunk. A 2. körben a reakcióelegy szintén 25 µL végtérfogatú volt, amelyhez 10-10 pmol U79-3 és U79-4 primert, 2xABI Fast PCR Master Mix-et (Applied Biosystems, USA) és templátként 3 µL 1. körös PCR terméket használtunk.

A primerek szekvenciáját és a PCR reakció körülményeit a 7. táblázat foglalja össze.

Az RNS minta amplifikálhatóságát GAPDH RT-PCR-rel ellenőriztük korábban már közöltek alapján [169]. A reakciót 25 µL végtérfogatban 10-10 pmol GAPDH-1 és GAPDH-2 primerrel (8. táblázat), valamint 2xABI Fast PCR Master Mix-et (Applied Biosystems, USA) használva végeztük. Templátként 2 µL cDNS-t mértünk a reakcióelegybe. Az RT-PCR specifikusságát reverz transzkriptáz nélküli kontrollal is ellenőriztük, így bizonyosan nem genomiális DNS-ről képződött specifikus PCR terméket mutattunk ki.

7. táblázat: HHV-6 RT-PCR primer szekvenciái és a reakció körülményei

Primer neve	Target HHV-6A GenBanki A.: KC465951.1	Target HHV-6B GenBanki A.: AF157706.1	Primer szekvenciája 5'-3'	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
U79-1	U79/80 gén 120192- 120214	U79/80 gén 121482- 121504	TAAGATGTATGCTGAAGAACGTG	608 bp	94 °C 3 m 94 °C 30 s 53 °C 30 s 72 °C 1 m 72 °C 7 m } 35 ciklus
U79-2	U79/80 gén 120799- 120781	U79/80 gén 122089- 122071	GCTTGTCTTCGTCGTTTCG		
U79-3	U79/80 gén 120396- 120415	U79/80 gén 121686- 121705	AATGGGTTCTCTAACGGTGG	107 bp	94 °C 3 m 94 °C 30 s 52 °C 30 s 72 °C 1 m 72 °C 7 m } 35 ciklus
U79-4	U79/80 gén 120502- 120483	U79/80 gén 121792- 121774	TCTGAGAAATCGACGTGATC		

8. táblázat: GAPDH PCR primer szekvenciái és a reakció körülményei

Primer neve	Target humán GAPDH	Primer szekvenciája 5'-3'	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
GAPDH-1	GAPDH1 gén	AATCCCATCACCATCTTCCAG	312 bp	95 °C 2 m 95 °C 30 s 55 °C 90 s 72 °C 90 s 72 °C 3 m } 35 ciklus
GAPDH-2	GAPDH1 gén	TCATGAGTCCTTCCACGATACC		

III.4. WUKI nested PCR

A WUPyV és KIPyV DNS kimutatásához a Sharp és munkatársai által leírt WUKI nested PCR primereket alkalmaztuk [129].

A PCR reakció 1. körében 5 µL izolált nukleinsavat amplifikáltunk 20 µL végtérfogatban. A reakcióelegy 2xGenAmp Fast PCR Master Mix-et (Applied Biosystems, Foster City, CA) és 10-10 pmol WUKI_OS és WUKI_OAS primert tartalmazott. Pozitív kontrollként a vírusok leírójától származó, WUPyV és KIPyV genomrészletet tartalmazó

plazmidokat használtunk [86, 170]. A 2. körben a reakcióelegy összetérfogata 20 µL, a PCR mix az első körben használttal megegyező volt. A reakció során 10-10 pmol WUKI_IS és WUKI_IAS primert, valamint templátként 4 µL első körből származó PCR terméket használtunk. A nested PCR érzékenysége <100 genom ekvivalens/mL (GEq/mL) volt. A 2. ábra, reprezentatív fotóként a WUKI nested PCR 2. körében keletkezett PCR termékek gélfotója.

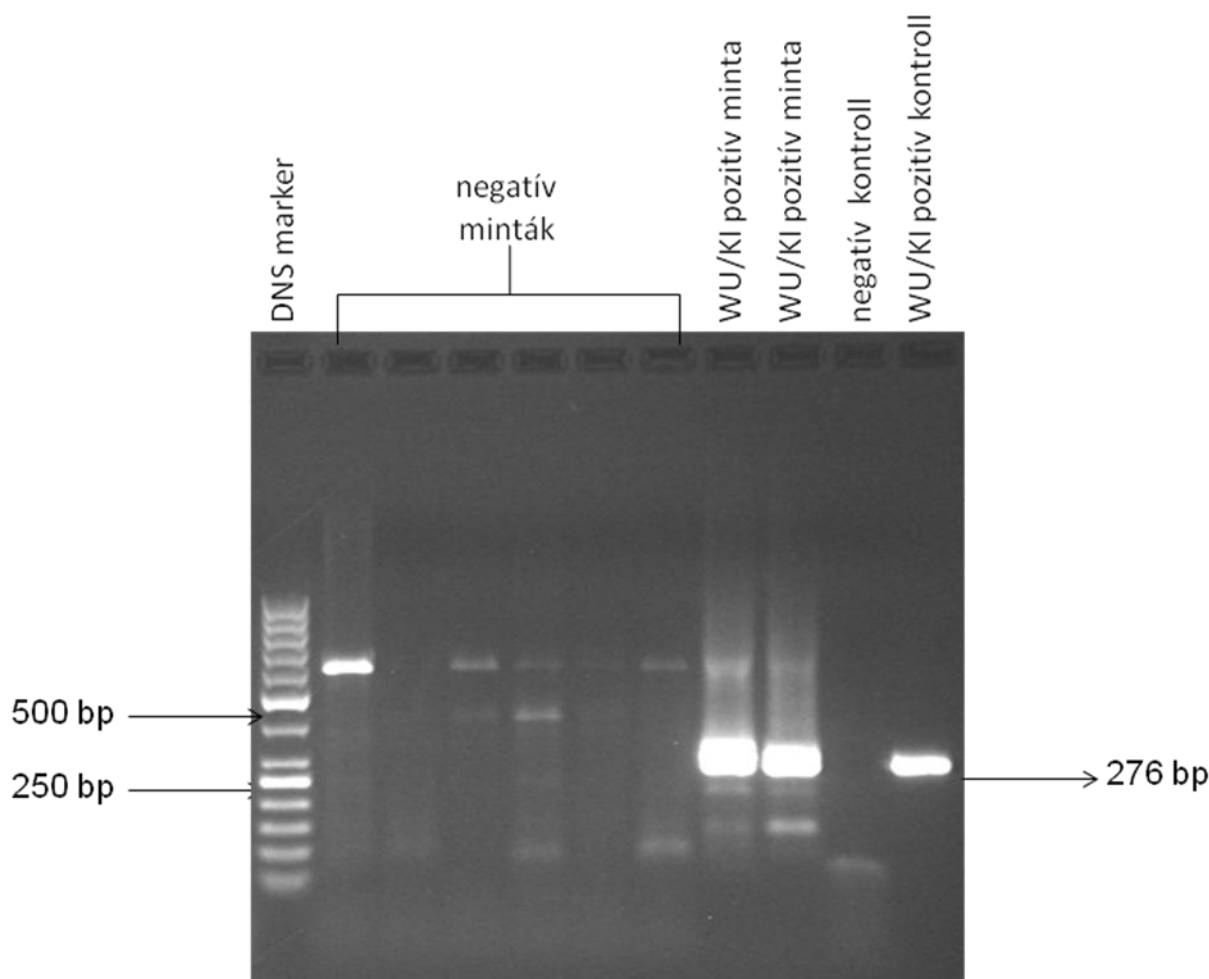
A WUKI nested PCR mindkét vírus DNS-ét amplifikálja. A vírusok azonosításához a PCR termékeket 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk, majd ezt követően a megfelelő méretű amplifikált terméket a gélből kipreparáltuk, QIAquick Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk és szekvenáltattuk (lásd lentebb részletesen a III.8. részben).

A primerek szekvenciáját és a PCR reakció körülményeit a 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat: A WUKI PCR primer szekvenciái és a reakció körülményei

Primer neve	Target WUPyV GenBanki A.: BJF5276	Target KIPyV GenBanki A.: EF127906.1	Primer szekvenciája 5'-3'	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
WUKI_OS	VP2 gén 612-633	VP2 gén 479-500	ATCTRTRTAGCTGGAGGAGCAGAG	468 bp	94 °C 3 m 94 °C 30 s 60 °C 30 s 72 °C 1 m 72 °C 5 m } 35 ciklus
WUKI_OAS	VP2 gén 947-926	VP2 gén 814-793	CCYTGGGGATTGTATCCTGMGG		
WUKI_IS	VP2 gén 639-662	VP2 gén 506-529	RTCAATTGCTGGWTCTGGAGCTGC	276 bp	94 °C 3 m 94 °C 30 s 60 °C 30 s 72 °C 1 m 72 °C 5 m } 35 ciklus
WUKI_IAS	VP2 gén 915-894	VP2 gén 782-761	TCCACTTGSACTTCCTGTTGGG		

2. ábra: A WUPyV és KIPyV specifikus DNS kimutatása a mintákban



III.5. WU és KI real-time PCR

A WUPyV és KIPyV DNS mennyiségi meghatározásához real-time PCR-t is végeztük a Lindau és munkatársai által publikált primerekkel és próbákkal [170]. A PCR reakciót 25 μ L végtérfogatban végeztük, ehhez TaqMan Universal PCR Master Mixet (Applied Biosystems, USA), 10-10 pmol KIPyV2263 forward és KIPyV2404 reverz primert, valamint 5 μ L DNS templátot használtunk a vírusspecifikus TaqMan próbák (12,5 pmol) jelenlétében. Abszolút kvantifikációhoz a korábban említett KIPyV és WUPyV plazmid (AP-p003 plazmid) hígítási sorát használtuk.

A primerek szekvenciáját és a PCR reakció körülményeit a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: A WU és KI real-time PCR primer szekvenciái és a reakció körülményei

Primer neve	Target WUPyV GenBanki A.: BJF5276	Target KIPyV GenBanki A.: EF127906 .1	Primer szekvenciája 5'-3'	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
KIPyV2263 F	VP1 gén 2411- 2430	VP1 gén 2263- 2282	TTGGATGAAAATGGCATTGG	142 bp	50 °C 2 m 95 °C 10 m 95 °C 5 s 60 °C 1 m } (detektálás) 45 ciklus
KIPyV2404 R	VP1 gén 2552- 2526	VP1 gén 2404- 2378	TAACCCCTTCTTTGTCTAAAATGTAGCC		
KIPyV próba	-	VP1 gén 2309- 2339	5' HEX- ACATTACTTGTGCAGATATGCTTGGAA CAGC-BHQ1-3'		
WUPyV próba	VP1 gén 2458- 2486	-	5' FAM- CATAACTTGTGCTGACCTTTTGGGAGT TAAC- BHQ1-3'		

III.6. HPyV9 nested PCR

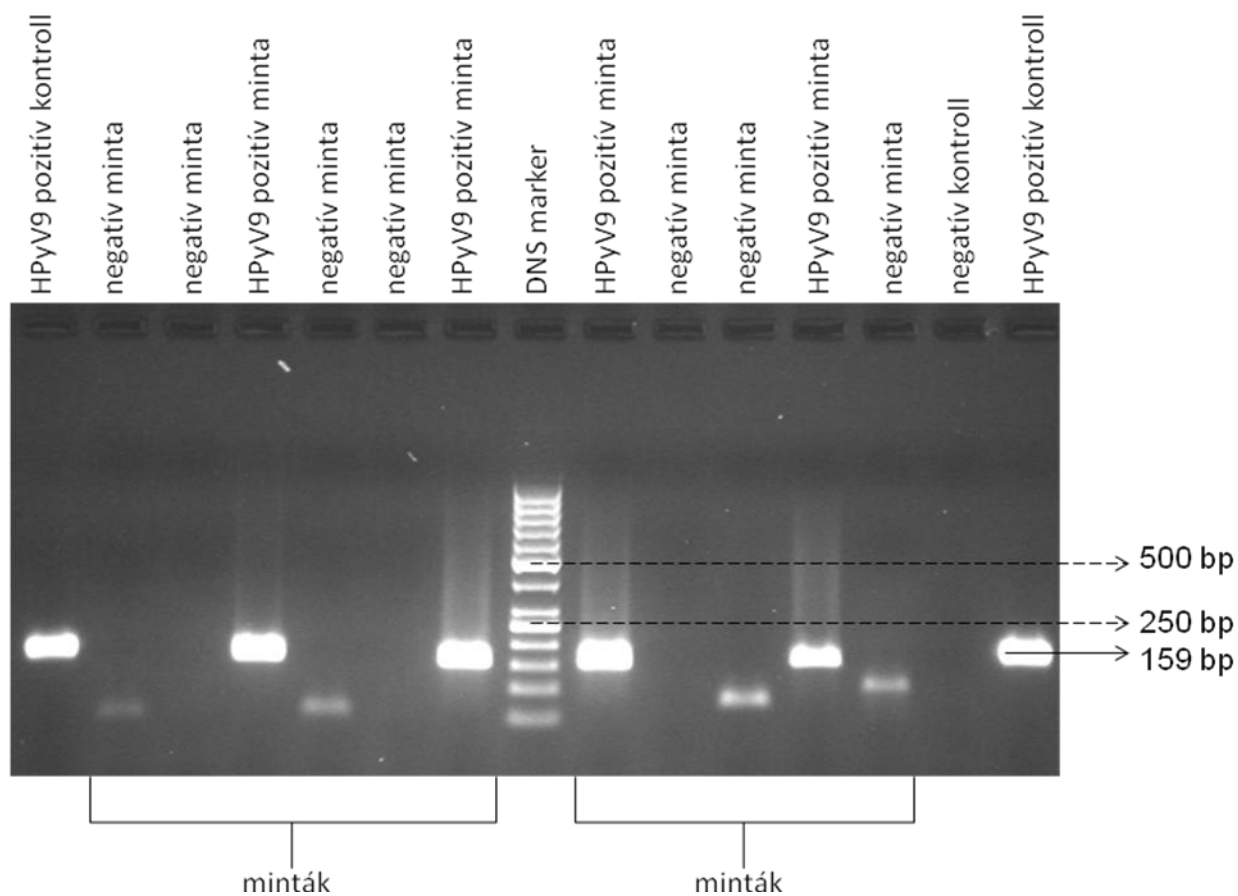
A HPyV9 PCR-t a felfedezők által leírt diagnosztikai primerekkel végeztük [90]. A PCR reakció 1. körében 10 µL izolált nukleinsavat amplifikáltunk 25 µL végtérfogatban. A reakcióelegy 2xAmpliTaq Gold 360 Master Mixet (Applied Biosystems, USA) és 10-10 pmol HPyV9-D-1 S és -D-1 AS primert tartalmazott. A pozitív kontroll HPyV9 genom részletet tartalmazó plazmid volt, amit Echlers és munkatársai bocsátottak rendelkezésünkre [160]. A 2. körben a reakcióelegy össztérfogata 20 µL volt. A reakció során az első körben használttal megegyező PCR mixet, 10-10 pmol HPyV9-D-2 S és D-2 AS primert, valamint templátként az 1. kör végtermékéből 5 µL-t használtunk. A vírus azonosításához a PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélen futtattuk, majd ezt követően a megfelelő méretű amplifikált terméket a gélből kipreparáltuk, QIAquick Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk és szekvenáltattuk (lásd lentebb részletesen a III.8. részben). A 3. ábra, reprezentatív fotóként a HPyV9 nested PCR 2. körében keletkezett terméket mutatja be.

A primerek szekvenciáját és a PCR reakció körülményeit a 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat: A HPyV9 PCR primer szekvenciái és a reakció körülményei

Primer neve	Target HPyV9 GenBanki A.: HQ696595.1	Primer szekvenciája 5'- 3'	PCR termék hossza (bp)	PCR hőmérsékleti profilja
HPyV9-D-1 S	VP1 gén 2224-2246	GGGACAAGCTGTTTTTGTCTGCT	186 bp	94 °C 5 m 94 °C 30 s 60 °C 30 s 72 °C 30 s } 35 ciklus
HPyV9-D-1 AS	VP1 gén 2387-2410	CCCTGAATTTGAGGCATAAGACCA		
HPyV9-D-2 S	VP1 gén 2239-2262	TGTCTGCTGTTGATATTGTTGGAA	159 bp	94 °C 5 m 94 °C 30 s 60 °C 30 s 72 °C 30 s } 35 ciklus 72 °C 5 m
HPyV9-D-2 AS	VP1 gén 2377-2398	GGCATAAGACCAGAGAACAAGC		

3. ábra: HPyV9 specifikus DNS kimutatása a mintákban



III.7. PCR termék tisztítása gélből és szekvenáltatása

A PCR során amplifikált termékeket szekvenáláshoz QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. Az oszlopról a nukleinsavat 30 µL steril, nukleázmentes desztillált vízzel eluáltuk. A tisztított PCR termékeket ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer-rel (Applied Biosystems) szekvenáltattunk.

III.8. Aktív HCMV fertőzés azonosítása a vírus pp65 antigénjének kimutatásával

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

IV. Statisztikai elemzés

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

EREDMÉNYEK

I. Humán herpeszvírus 6 fertőzés

Munkánk során 200-200 immunuszpresszív terápiaiban részesülő, vesetranszplantált beteg, illetve egészséges személyek 200-200 vérmintájában, valamint 100-100 terhes és egészséges immunrendszerű, nem terhes nő 100-100 vérmintájában vizsgáltuk a HHV-6 fertőzést.

A virális DNS kimutatását, illetve a HHV-6A és HHV-6B elkülönítését nested HHV-6 PCR-rel, a virális DNS mennyiségi meghatározását kvantitatív real-time PCR-rel végeztük. Ez utóbbi módszert a ciHHV-6 igazolására is alkalmaztuk. Az aktív víruszaporodás és a látencia elkülönítésére a virális DNS jelenlétét a fehérvérsejtekben, illetve a plazmában is vizsgáltuk, illetve olyan RT-PCR-t végeztünk, mely az aktív víruszaporodás során keletkező virális mRNS kimutatására alkalmas.

1. Vesetranszplantált betegek és egészséges felnőttek vizsgálata

A 200 vesetranszplantált beteg 200 vérmintája közül 10 (5 %) esetében HHV-6A, kettő esetében (1 %) pedig HHV-6B DNS jelenlétét mutattuk ki nested PCR-rel egyidejűleg a betegek fehérvérsejt- és plazmamintáiban. RT-PCR-rel 9 mintában (4,5 %) (8 HHV-6A és 1 HHV-6B pozitív) igazoltunk aktív fertőzést, azaz vírusreplikáció során keletkező virális mRNS-ek jelenlétét. Az RNS izolálás azonban minden minta esetében sikeres volt, amplifikálható GAPDH mRNS-t valamennyi mintában detektáltunk. A 200 egészséges felnőttkorú személy közül mindössze egy személy vérmintájában mutattuk ki virális DNS, HHV-6A egyidejű jelenlétét a plazma- és fehérvérsejt-mintájában. HHV-6 RT-PCR-rel azonban kizártuk az aktív vírusfertőzést, míg az RNS izolálás sikerességét e minta esetében is igazoltuk (12. táblázat). A HHV-6 képes látenciát kialakítani, integrálódni a humán kromoszómákba, így a virális DNS a plazmában a sejtek líziséből is származhat. A gondos, azonnali mintafeldolgozás ellenére is, a sejtek fiziológias lízise folytán mind genomi, mind látens virális nukleinsav jelen lehet a plazmamintákban. Ezek eliminálására a mintákat nukleázzal kezelhetjük, ami után az izolálás során csak a víruskapszidba zárt nukleinsav nyerhető ki. Mivel a mintáinkat a nukleinsav izolálása előtt nukleázzal nem kezeltük, így valószínű, hogy 3 vesetranszplantált beteg és 1 egészséges felnőtt esetében a plazmában

kimutatott HHV-6 DNS a virális genomot látens hordozó sejtek líziséből származott. 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; $p=0,004$; 13. táblázat).

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 (medián $5,9 \times 10^3$) genomekvivalens/mL (GEq/mL), míg az egészséges felnőtt személy esetében a detekciós küszöb alatt, azaz <250 GEq/mL volt. A vírusrészecske a fehérvérsejt-mintákban vesetranszplantált betegek esetén $5,1 \times 10^2$ - $2,1 \times 10^6$ (medián $1,8 \times 10^3$), az egészséges személy esetében $5,8 \times 10^3$ GEq/ $1,5 \times 10^6$ sejt volt (12. táblázat).

Azon egyének esetében, akik ivarsejt-eredetű kromoszóma-integrált 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 fehérvérsejt-mintában $2,1 \times 10^6$ GEq/ $1,5 \times 10^6$ sejt volt a vírus mennyisége, ugyanakkor az RT-PCR nem igazolt aktív fertőzést. Mindezek alapján ezen beteg esetében a ciHHV-6 jelenléte igen valószínű. Így a plazmamintában detektált igen magas, $6,2 \times 10^3$ GEq/mL HHV-6 DNS feltehetően a sejtek fiziológiai líziséből származott.

Mindezek mellett a 200 vesetranszplantált beteg vérmintáiból további 11 esetben HHV-6B (összesen tehát 12 esetben; 6%) , míg két esetben HHV-6A látenciát (összesen tehát 4 esetben; 2 %) mutattunk ki. A kontrollcsoportba tartozó 200 egészséges felnőtt közül 18 személynél HHV-6B (9 %), egy személynél (összesen tehát 2 személynél; 1 %) pedig HHV-6A látenciát detektáltunk. A virális DNS jelenlétét nested PCR-rel mutattuk ki a fehérvérsejt-mintákban, azonban HHV-6 mRNS-t nem detektáltunk, illetve ezen vérminták esetében virális DNS nem volt jelen a plazmamintákban. A kontrollként alkalmazott PCR és RT-PCR azonban igazolta mind a DNS, mind az RNS izolálás sikerességét (12. táblázat). Így ezen minták esetében az aktív vírusreplikációt kizártuk, a detektált virális DNS látens fertőzésre utal. A látenciagyakoriságok a két csoportban $-X^2$ teszttel vizsgálva – szignifikáns különbséget nem mutatnak (16/200 vs. 20/200; $p > 0,05$; 13. táblázat). A Fisher-féle egzakt teszttel végzett statisztikai elemzés alapján látens fertőzés esetén a HHV-6B szignifikánsan gyakoribban fordult elő, mint a HHV-6A mind a vesetranszplantált betegek (12/16 vs. 4/16), mind pedig az egészséges személyek (18/20 vs. 2/20) közt ($p=0,01$; illetve $p=0,0001$; 13. táblázat). Ugyanakkor a HHV-6A szignifikánsan gyakoribb volt aktív vírusfertőzésben, mint látencia esetében a vesetranszplantáltakban (8/9 vs. 4/16; $p=0,0036$; 13. táblázat). 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 200 beteg közül 31 páciens volt tünetmentes a mintavétel időpontjában; a többi betegnél láz, légúti, gasztrointesztinális tünetek jelentkeztek (16. táblázat). 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.

12. táblázat: A HHV-6A és 6B előfordulása a vesetranszplantált betegekben és egészséges felnőttekben

	Vesetranszplantált betegek		Egészséges személyek	
	HHV-6A	HHV-6B	HHV-6A	HHV-6B
HHV-6 nested PCR pozitív minták (plazma és fehérvérsejt együtt) száma / összes minta	10/200	2/200	1/200	0/200
HHV-6 real-time PCR pozitív DNS mennyisége 1 mL plazmában	5×10^2 - 6×10^5 GEq	<250- $1,1 \times 10^2$ GEq	<250 GEq	0
HHV-6 real-time PCR pozitív DNS mennyisége $1,5 \times 10^6$ sejtben	$5,1 \times 10^2$ - $2,1 \times 10^6$ GEq	<250 GEq	$5,8 \times 10^3$ GEq	0
* RT-PCR pozitív minták száma	8	1	0	0
HHV-6 nested PCR pozitív minták (csak fehérvérsejt, plazma nem) száma / összes minta	2/200	11/200	1/200	18/200
‡ RT-PCR pozitív minták száma	0	0	0	0

* Azon HHV-6 nested PCR pozitív fehérvérsejt-minták közül, amik esetében a plazma is HHV-6 nested PCR pozitív volt

‡ Azon HHV-6 nested PCR pozitív fehérvérsejt-minták közül, amik esetében a plazma HHV-6 nested PCR negatív volt

GEq: genom ekvivalens

13. táblázat: A HHV-6A és 6B, HCMV fertőzés gyakorisága vesetranszplantált betegekben és egészséges személyekben

	Aktív vírusreplikáció		Látencia	
	Transzplantált betegek	Egészséges donorok	Transzplantált betegek	Egészséges donorok
HHV-6 pozitív minták száma / összes minta	9/200	0/200	16/200	20/200
	p=0,004		p > 0,05	
HHV-6B pozitív minták száma/ HHV-6 pozitív minták	1/9	0/0	12/16	18/20
HHV-6A pozitív minták száma/ HHV-6 pozitív minták	8/9	0/0	4/16	2/20
HCMV pozitív minták száma / összes minta	7/200	nem vizsgáltuk	nem vizsgáltuk	nem vizsgáltuk

2. Terhes és nem terhes nők vizsgálata

A terhes és nem terhes nők vizsgálata során HHV-6A DNS-t mutattunk ki nested PCR-rel 1 terhes (1 %) és 3 nem terhes nő (3 %) plazma- és fehérvérsejt-mintájában is egyidejűleg. A HHV-6 RT-PCR-rel aktív víruszaporodás során keletkező virális mRNS-t nem tudtunk kimutatni, azonban a kontrollként alkalmazott GAPDH RT-PCR alapján amplifikálható RNS-t valamennyi mintából izoláltunk. 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 (15.

táblázat). 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. Ugyanakkor valamennyi minta esetében a sejttájományból származó β -globin DNS-t detektáltunk a plazmamintákban, így valószínű, hogy a plazmában kimutatott HHV-6A virális DNS a látens HHV-6A fertőzést hordozó sejtek líziséből származott. Ezt erősíti, hogy virális mRNS-t nem detektáltunk egyik minta esetében sem.

Terhes nők csoportjában 14 személy fehérvérsejt-mintájában HHV-6B (14%), míg egy személyében HHV-6A (1%) virális DNS-t mutattunk ki. A nem terhes nők közül 14 nő esetében HHV-6B DNS-t detektáltunk a fehérvérsejtekben, míg egy személy esetében HHV-6A és HHV-6B egyszerre volt jelen a fehérvérsejt-mintában (14. táblázat). Ezen személyeknél nem detektáltunk virális DNS-t a plazmamintákból, illetve a HHV-6 RT-PCR nem igazolt aktív vírusszaporodást. A HHV-6 látenciát mindhárom trimeszterben (1. trimeszterben: 2, 2. trimeszterben: 1, 3. trimeszterben: 13) 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 (4 vs. 15; $p=0,014$) körében. Statisztikailag szignifikáns különbség azonban nem volt a terhes és nem terhes nők körében detektált látenciagyakoriság közt (16/100 vs. 19/100; $p> 0,05$; 14. táblázat).

Egy nem terhes nő esetében (1%) a HHV-6A DNS-t csak a plazmában mutattuk ki, a virális DNS mennyisége < 250 GEq/mL volt. HHV-6 nested PCR-rel virális DNS-t, míg RT-PCR-rel virális RNS-t nem tudtunk kimutatni ezen személy fehérvérsejt-mintájában. A kontrollként alkalmazott PCR, illetve RT-PCR azonban igazolta a nukleinsav izolálásának sikerességét, amplifikálható RNS és DNS is kimutatható volt.

14. táblázat: A HHV-6A és 6B viraemia és látencia gyakorisága terhes és nem terhes nőkben

	Viraemia		Látencia	
	Terhes nők	Nem terhes nők	Terhes nők	Nem terhes nők
HHV-6 pozitív minták száma / összes minta	0/100	1?/100	16/100	19/100
HHV-6B pozitív minták száma/ HHV-6 pozitív minták	0/0	0/0	14/16	15*/19
HHV-6A pozitív minták száma/ HHV-6 pozitív minták	0/0	1?/1?	2/16	4*/19

* HHV-6A-t és HHV-6B-t is kimutattunk ugyanabban a mintában

15. táblázat: A HHV-6A és 6B előfordulása terhes és nem terhes nőkben

		Terhes nők		Nem terhes nők	
		HHV-6 real-time PCR		HHV-6 real-time PCR	
		Pozitív minták száma (virális DNS mennyisége)	Negatív minták száma	Pozitív minták száma (virális DNS mennyisége)	Negatív minták száma
Nested PCR	HHV-6A pozitív plazma	1 (2,03x10 ² GEq/mL)	0	3 (2,52x10 ² ; 3,66x10 ² ; 2,55x10 ³ GEq/mL)	1
	HHV-6B pozitív plazma	0	0	0	0
	HHV-6A pozitív sejtek	1 (5,07x10 ⁵ GEq/1,5x10 ⁶ sejt)	1	3 (1,98x10 ⁵ ; 1,28x10 ⁵ ; 1,6x10 ⁵ GEq/1,5x10 ⁶ sejt)	1
	HHV-6B pozitív sejtek	0	14	4 (< 1,25x 10 ² GEq/1,5x10 ⁶ sejt)	11

GEq: genom ekvivalens

II. Vesetranszplantált betegek humán cytomegalovírus fertőzése

A 200 vesetranszplantált beteg közül 7 (3,5 %) esetében a pp65 antigén kimutatása a fehérvérsejtekben aktív HCMV fertőzést igazolt. HHV-6A vagy HHV-6B és HCMV koinfekciót egy betegnél sem detektáltunk. HHV-6 fertőzést, aktív vírusreplikációt ugyan valamivel gyakrabban mutattunk ki (9/200; 4,5 %) a vesetranszplantált betegek közt, ám a különbség statisztikailag nem szignifikáns (9/200 vs. 7/200; p>0,05; lásd 13. táblázat).

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 szignifikáns különbség sem a betegek életkora (p>0,05), sem a

mintavétel és a transzplantáció óta eltelt idő ($p>0,05$) között nem volt a HCMV pozitív és a HHV-6 pozitív betegek esetében. Statisztikailag igazolható összefüggést nem tapasztaltunk a betegek klinikai tünetei és a vírusfertőzés közt (16. táblázat).

16. táblázat: 200 vesetranszplantált beteg klinikai adatai

	Betegek száma				
	HHV-6A pozitív	HHV-6B pozitív	HHV-6 negatív	HCMV pozitív	HCMV negatív
Légúti tünetek	1	1	78	3	77
Légúti tünetek lázzal	4	1	53	1	57
Légúti tünetek és emésztőszervrendszeri panaszok	1	0	1	0	2
Emésztőszervrendszeri panaszok	1	0	10	2	9
Emésztőszervrendszeri panaszok és láz	0	0	6	0	6
Láz	0	0	12	0	12
Tünetmentes	0	0	31	1	30
Összes	7	2	191	7	193

III. Polyomavírusok

Munkánk során a polyomavírusok vizsgálatához 195 immunszuppresszív terápiában részesülő, vesetranszplantált beteg, illetve 200 egészséges személy vérmintáját gyűjtöttük. Továbbá 50 vesetranszplantált betegtől vizeletmintát, 90 betegtől pedig felső légúti mintát is vizsgáltunk. Emellett 100-100 fiziológiásan, a magzat védelme érdekében is megváltozott immunstátuszú, terhes, illetve egészséges immunrendszerű, nem terhes nő 100-100 vér-,

vizelet-, és légúti mintájában vizsgáltuk a polyomavírus fertőzéseket.

A virális DNS kimutatását WUKI és HPyV9 nested PCR-rel végeztük, a virális DNS mennyiségi meghatározását WU és KI vírus esetén kvantitatív real-time PCR-rel határoztuk meg. A nested PCR során amplifikált PCR termékeket minden esetben szekvenáltattuk is, így tudtuk elkülöníteni a WU és KI polyomavírusokat, illetve igazolni, hogy valóban HPyV9-et mutattunk ki. A DNS amplifikálhatóságot a korábban leírtak alapján ellenőriztük.

1. Vesetranszplantált betegek és egészséges személyek vizsgálata

A vesetranszplantáltak plazmamintájának WUKI nested PCR-rel történő vizsgálata során a 195 transzplantált betegből 7 (3,6%) plazmamintája volt pozitív. A PCR termékek szekvenciavizsgálata alapján 2 (1%) mintában KIPyV, 5 (2,6%) mintában pedig WUPyV DNS-t mutattunk ki (21. táblázat). 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). WU és KI polyomavírus pozitivitást főként a transzplantáció után korán, az első négy hónapon belül mutattunk ki (17. táblázat). A transzplantáció óta eltelt idő statisztikai elemzése alapján az általunk vizsgált minták, betegek esetében szignifikáns különbséget mutattunk ki a WU és KI vírus pozitív, illetve negatív minták közt. A statisztikai analízis nem igazolt összefüggést a tünetek és a WUKI PCR pozitivitas között (lásd 18. táblázat). A 200 egészséges személytől származó plazmamintákban nem tudtunk kimutatni sem KIPyV, sem WUPyV DNS-t (21. táblázat).

17. táblázat: A WU és KI polyomavírusok kimutatása a transzplantáció utáni különböző időpontokban.

	Transzplantáció után eltelt napok száma, min-max (medián)	
Vesetranszplantált betegek mintái	WU és KI polyomavírus pozitívak	WU és KI polyomavírus negatívak
plazma	8-2122 (24)*	3-7108 (1271)
vizelet	8-58 (30)*	7-6230 (745)
légúti	21-822 (101)**	18-6230 (1177)

*p=0,001 (WU, KI pozitív vs. negatív)

**p=0,002 (WU, KI pozitív vs. negatív)

18. táblázat: A betegek klinikai adatai a plazmaminták gyűjtése idején

	Betegek száma		
	WUPyP pozitív	KIPyV pozitív	negatív
Légúti tünetek	4	1	75
Légúti tünetek lázzal	0	1	44
Légúti tünetek és emésztő- szervrendszeri panaszok	0	0	0
Emésztő-szervrendszeri panaszok	0	0	6
Emésztő-szervrendszeri panaszok és láz	0	0	3
Láz	0	0	10
Tünetmentes	1	0	50
Összes	5	2	188

Az 50 vesetranszplantált közül 7 beteg vizeletmintájában (14%) WUKI PCR pozitivitást detektáltunk. A szekvenálás 1 minta esetében KIPyV (2%), 6 esetben pedig WUPyV (12 %) DNS jelenlétét igazolta (21. táblázat). A virális DNS mennyisége 2 WUPyV pozitív minta kivételével (5×10^2 GEq/mL és $1,1 \times 10^3$ GEq/ml vizelet) a real-time PCR detektálási küszöbe alatti volt. Két beteg esetében a WUPyV viruriával egyidejűleg viraemiát is detektáltunk. A 36 egészséges személy vizeletmintájában sem WU, sem KI vírust nem detektáltunk. Szignifikánsan gyakrabban mutattunk ki WUPyV és KIPyV pozitivitást a transzplantáció után rövid időn belül, mint a későbbi időpontokban (lásd a 17. táblázatban). A betegek klinikai adatait a vizeletminták gyűjtése idején a 19. táblázat foglalja össze. Nem volt statisztikailag igazolható összefüggés a tünetek és a WUKI PCR pozitivitás között.

19. táblázat: A betegek klinikai adatai a vizeletminták gyűjtése idején

	Betegek száma		
	WUPyP pozitív	KIPyV pozitív	negatív
Légúti tünetek	6	1	6
Légúti tünetek lázzal	0	0	0
Légúti tünetek és emésztő- szervrendszeri panaszok	0	0	0
Emésztő-szervrendszeri panaszok	0	0	0
Emésztő-szervrendszeri panaszok és láz	0	0	0
Láz	0	0	0
Tünetmentes	0	0	37
Összes	6	1	43

90 vesetranszplantált beteg légúti mintája közül 9 (10%) volt WUKI PCR pozitív, 6 mintában (6,67%) KIPyV DNS, 3-ban (3,33%) pedig WUPyV DNS jelenlétét igazoltuk (19. táblázatban). A KIPyV DNS mennyisége a mintákban $2,8 \times 10^2 - 3,7 \times 10^5$ GEq/mL (medián: $4,2 \times 10^4$) 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. A többi vizsgált transzplantált beteg plazmamintájában nem tudtunk sem KI, sem WU polyomavírust kimutatni egyidejűleg a légúti minta WUKI PCR pozitivitásával. Statisztikailag szignifikáns eltérést mutattunk ki a transzplantáció óta eltelt időben a WU és KI pozitív minták és a negatívak közt ($p=0,002$; 17. táblázat). Pozitivitást főként a transzplantációt követő első 5 hónapon belül mutattunk ki.

Azon betegek, akik légúti mintáiban WU/KI vírus pozitivitást 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 vs. 47/81; $p=0,01$).

20. táblázat: A betegek klinikai adatai a légúti mintavétel idejében

	Betegek száma		
	WUPyP pozitív	KIPyV pozitív	negatív
Légúti tünetek	3	6	43
Légúti tünetek lázzal	0	0	2
Légúti tünetek és emésztő- szervrendszeri panaszok	0	0	1
Emésztő-szervrendszeri panaszok	0	0	1
Emésztő-szervrendszeri panaszok és láz	0	0	0
Láz	0	0	7
Tünetmentes	0	0	27
Összes	3	6	81

21. táblázat: A polyomavírusok prevalenciája

		WU és KI polyomavírus DNS a mintában, mintaszám (%)				
Vizsgált csoport	Minta típusa	KIPyV pozitív (%)	WUPyV pozitív (%)	HPyV9 pozitív (%)	Negatív (%)	Összmintaszám (betegszám)
Vesetranszplantált beteg	plazma	2(1)	5 (2,6)	nem vizsgáltuk	188 (96,4)	195(195)
	vizelet	1 (2)	6 (12)	nem vizsgáltuk	43 (86)	50 (50)
	légúti	6 (6,6)	3 (3,3)	nem vizsgáltuk	81 (90)	90 (90)
Egészséges kontroll	plazma	0	0	nem vizsgáltuk	200 (100)	200 (200)
	vizelet	0	0	nem vizsgáltuk	36 (100)	36 (36)
Terhes nők	plazma	0	0	2 (2)	98 (98)	100 (100)
	vizelet	0	0	3 (3)	97 (97)	
	légúti	0	0	2 (2)	98 (98)	
Nem terhes nők	plazma	2 (2)	0	6 (6)	92 (92)	
	vizelet	0	0	2 (2)	98 (98)	
	légúti	0	0	2 (2)	98 (98)	

2. Terhes és nem terhes nők vizsgálata

WUPyV DNS-t a vizsgált 100 terhes és 100 nem terhes nő plazmamintájában nem mutattunk ki. KIPyV DNS-t 2 nem terhes nő plazmamintájában (2%) detektáltunk, bár a virális DNS mennyisége a real-time PCR detektálási küszöbe (<250GEq/mL; genome ekvivalens/mL) alatt volt. A vizelet- és légúti mintákban sem KI, sem WU vírus genomot nem tudtunk kimutatni (21. táblázat).

HPyV9 polyomavírust azonban mindkét vizsgált csoport minden mintatípusában sikerült kimutatni. HPyV9 DNS jelenlétét két (2%), a 2. trimeszterben lévő terhes és hat nem terhes nő plazmamintájában (6%) igazoltuk, a különbség a két csoport közt statisztikailag nem szignifikáns (6/100 vs. 2/100; $p>0,05$; 21. táblázat). A HPyV9 DNS gyakorisága a két vizsgált csoport légúti mintáiban nem különbözött, 2-2 terhes és nem terhes nő légúti mintája volt pozitív (2-2 %). A két pozitív légúti minta a terhes nők csoportjában a terhesség első trimeszteréből származott. HPyV9 DNS 3 terhes (3%) és 2 nem terhes nő (2%) vizeletmintájában volt kimutatható, akik közül két terhes nő az első, egy pedig a terhességének 2. trimeszterében volt a mintavétel idejében. Nem volt szignifikáns különbség a terhes és nem terhes nők HPyV9 pozitív vizeletmintáinak gyakorisága között (3/100 vs. 2/100; $p>0,05$; 21. táblázat). HPyV9 és KIPyV koinfekciót mutattunk ki 2 nem terhes nő (2%) plazmamintájában.

MEGBESZÉLÉS

A HCMV fertőzés régóta ismert súlyos kockázati tényező a vesetranszplantált betegekben. Ma már a HHV-6-ot is egyre inkább hasonló súlyosságú kórokozónak tekintik, ám Magyarországon még kevésbé vizsgált a HHV-6 infekcióból vagy reaktivációból származó komplikációk jelentősége. Irodalmi adatok szerint mind a HCMV, mind a HHV-6 fertőzés súlyos tüneteket okozhat immunszuppresszált, így vesetranszplantált betegekben [44, 76]. 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 aktív HCMV fertőzést mutattunk ki, ami statisztikailag nem szignifikáns különbség (9/200 vs. 7/200; $p > 0,05$). Bár a HHV-6 fertőzés gyakorisága a vesetranszplantált betegekben a HCMV-vel hasonlónak bizonyult, míg a HCMV fertőzés gyanúja esetén azonnal elvégzik a víruskimutatást, majd megkezdik a kezelést, a HHV-6 esetében Magyarországon ez még nem rutinszerű. A HHV-6 fertőzés, reaktiváció monitorozása indokolt lenne, hiszen az okozott tünetek nagyon hasonlóak lehetnek [44, 76]. Bár több esetben is HHV-6 és HCMV koinfekciót írtak le [58, 171-173], 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. Irodalmi adatok szerint a HHV-6 immunmoduláns hatásának és transzaktivátor géntermékeinek köszönhetően predisponáló tényező lehet a HCMV reaktivációjához [58, 59]. 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. Mivel azonban nem folyamatos monitorozás történt, egy betegről egy mintát vizsgáltunk, így csak a mintavétel időpontjáról vannak adataink, sem az igazolt vírusfertőzést megelőzően, sem azt követően. A pontos kóroki szerep, a HHV-6A, -6B és HCMV közti kölcsönhatás tisztázásához egy nyomonkövetéses vizsgálat célravezetőbb lehetne.

Vizsgálataink során, 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. Korábban publikált adatok szerint a HHV-6 fertőzés általában a transzplantáció után 2-4 héttel vagy évekkel később következik be, míg HCMV fertőzést főként 1-3 hónapon belül írtak le [44, 171, 172].

Az aktív HHV-6A és -6B replikáció igazolásához megfelelően választott klinikai mintákra és diagnosztikai módszerekre van szükség, hiszen amellett, hogy több sejt típusban látenciát kialakítani képes DNS genomú vírusok, még kromoszómaintegráció is előfordulhat [48]. A fehérvérsejteket tartalmazó minták kvalitatív PCR vizsgálata esetén a látencia és az aktív víruszaporodás nem különíthető el. A sejtmentes plazma, szérum vizsgálata esetén is előfordulhat, hogy a körültekintő mintafeldolgozás ellenére széteső fehérvérsejtekből származó genomi, illetve virális nukleinsav mutatható ki. Ezért a kvalitatív PCR mellett a kópiaszám mennyiségi meghatározása is indokolt. Vizsgálataink során így a kvalitatív, nested PCR-t a két vírus elkülönítésére használtuk. Emellett kvantitatív real-time PCR vizsgálatokat is végeztünk. A kromoszómaintegrált HHV-6 (ciHHV-6) előfordulása mintegy 0,2-3% [50, 174]. Azoknak az egyéneknek, akiknek kromoszómaintegrált HHV-6 fertőzésük van, jelentős mennyiségű virális DNS van a vérükben. Amennyiben a teljes vérben $>5 \times 10^6$ kópia/mL, a szérumban $>3 \times 10^3$ kópia/mL, a plazmában $>10^3$ kópia/mL HHV-6 DNS detektálható, felmerül a ciHHV-6 gyanúja [48, 49]. Az aktív fertőzés során keletkező virális mRNS-eket kimutatni képes RT-PCR módszer használatával munkánk során – megfelelő kontrollokat alkalmazva – egyértelműen elkülöníthető volt az aktív vírusfertőzés. Az RT-PCR használata azonban általában a költségek, idő- és munkaigény miatt nem rutin diagnosztikai eljárások. Kvantitatív PCR vizsgálat esetén, ha a ciHHV-6 gyanúja felmerül, egyéb minták (pl. hajhagyma, bőr) vizsgálatával is igazolható. Az általunk vizsgált 200 vesetranszplantált beteg közül 1 személy esetén a virális DNS mennyisége alapján (4,1 GEq/sejt, illetve $6,2 \times 10^3$ GEq/mL plazma) ciHHV-6-ot mutattunk ki. A betegek körében így az irodalmi adatoknak megfelelő 0,5 %-os előfordulási gyakoriságot tapasztaltunk.

Vizsgálataink során vesetranszplantált betegekben szignifikánsan gyakoribbnak bizonyult a HHV-6 viraemia (8 HHV-6A és 1 HHV-6B) az egészséges személyekhez képest (9/200 vs. 0/200; $p=0,004$), 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 [53, 175-177] a HHV-6A viraemia dominanciáját mutattuk ki ezekben a betegekben, mely statisztikailag is szignifikáns különbségnek bizonyult (8/9 HHV-6A vs. 1/9 HHV-6B; $p=0,0034$). Azonban fontos megemlíteni, hogy számos publikációban a kimutatáshoz használt

módszerek nem különítették el a két vírust [171-173].

Vizsgálatunk során 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 (16/200 vs. 20/200; $p > 0,05$). Az irodalmi adatokkal összhangban [175, 178] szignifikánsan gyakrabban mutattuk ki a HHV-6B látenciát, mint HHV-6A-t mind a vesetranszplantált betegek (4/16 vs 12/16; $p=0,01$), mind az egészséges személyek (4/16 vs 8/9; $p=0,0001$) esetében.

Kiváncsiak voltunk arra, hogy a vesetranszplantáltaknál aktív vírusfertőzésekben megfigyelt HHV-6A dominancia más, megváltozott immunstátuszú személyekben is megfigyelhető-e. 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. Bár virális nukleinsavat néhány plazmamintában is kimutattunk a fehérvérsejtek HHV-6 pozitívításával egyidejűleg, az RT-PCR nem igazolt aktív fertőzést. Így a virális DNS jelenléte a plazmában a sejtek líziséből származhatott, amit alátámasztott az a tény, hogy humán genom is detektálható volt a plazmamintákban. Fertőzés vagy reaktiváció rövidebbel 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. Kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a HHV-6 prevalenciájáról terhes nők esetében. Egyes adatok szerint szignifikánsan gyakoribb a HHV-6 DNS jelenléte a terhes nők fehérvérsejt-mintáiban, mint a nem terhes nőkében (41-44% a terheseikében, 24% a nem terhes nőkében), ám egyik mintában sem tudtak RT-PCR-rel aktív vírusreplikációt igazolni [23]. Caserta és munkatársai azonban közel azonos gyakoriságot tapasztaltak: 22,2-25,8%-ot a terhes nők körében, 19,4%-ot a kontrollcsoportban [179]. Ezek a különbségek a választott módszerek miatt is adódhattak. Vizsgálataink során HHV-6 látenciát a terhes nők 16%-ában, a nem terhes nők 19%-ában mutattunk ki, ami nem különbözik jelentősen a fent említett terhes nőknél kimutatott 22,2-25,8%-os és a kontroll csoportban tapasztalt 19,4%-os gyakoriságoktól [179]. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan [23, 179] látencia esetén mind a terhes, mind a nem terhes nőknél HHV-6B dominanciát figyeltünk meg, a HHV-6B szignifikánsan gyakrabban volt kimutatható, mint

a HHV-6A (14/100 vs. 2/100; $p=0,0029$; 15/100 vs. 4/100; $p=0,0140$).

A virális DNS mennyiségi meghatározását is elvégeztük kvantitatív real-time PCR-rel. 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 ciHHV-6 jelenlétét. A plazmában detektált nagy mennyiségű virális DNS valószínűleg a sejtek líziséből származott, amit erősít a tény, hogy az azonnali, gondos mintafeldolgozás ellenére jelentős mennyiségű humán genomi DNS jelenlétét is kimutattuk a plazmában.

A datainkat együttesen elemezve, az aktív HHV-6 fertőzés a vesetranszplantált betegek esetében szignifikánsan gyakoribb volt, mint a terhes nők csoportjában (9/200 vs. 0/100; $p=0,0319$), 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 immunszuppresszió 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 [180].

A polyomavírusok vizsgálata során olyan újonnan felfedezett vírusok, a WUPyV, KIPyV és HPyV9 prevalenciavizsgálatát végeztük, melyeket 2007-ben és 2011-ben fedeztek fel. 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. Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a transzplantáció után eltelt időben a vírus DNS pozitív és negatív minták közt ($p=0,001$), mindkét vírust főként a transzplantációt követő korai időpontokban (1-5 hónapon belül) detektáltuk. A vizsgált mintáinkban a WU vírus volt gyakoribb a KIPyV-vel szemben (5/7 vs. 2/7). A virális DNS mennyisége viszont minden mintában nagyon alacsony, ≤ 250 GEq/mL plazma volt. Adataink összhangban állnak az irodalmi adatokkal. Más munkacsoportok a WU polyomvírust 1,6 -8,3% gyakorisággal [126, 135, 153] mutatták ki immunszuppresszált egyének plazmamintáiban, míg immunkompetens egyénekében megközelítőleg 1% gyakorisággal detektálták [153]. Babakir-Mina és

munkatársai KIPyV esetében 2,6-3,2% [126, 153] előfordulást írtak le immunszuppresszáltak plazmamintáiban, de immunkompetens egyéneknél is 3,1% előfordulást detektáltak [153]. 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 ($\leq 1,1 \times 10^3$ 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 korábban nem mutatták ki ezeket a vírusokat vizeletben [86, 131, 181]. Eredményeink publikálása után azonban már más kutatók is megerősítették, hogy a vírusok jelen lehetnek a vizeletben [150]. 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 ha mindösszesen csak két betegnél is, de kimutattunk. A BKPyV esetében a viruria esetén a virális DNS mennyisége korrelál az immunszuppresszió mértékével, a magas vírus DNS mennyiség a vizeletben gyakran jár együtt viraemiával, illetve súlyos klinikai következményekkel [182]. Bár vizsgálataink kis számú betegmintán történtek, az eredmények alapján további, elsősorban nyomonkövetéses vizsgálatok mindenképpen indokoltak.

A vesetranszplantáltak légúti mintáiban 6 esetben (6,7%) KIPyV, 3 esetben (3,3%) pedig WUPyV DNS-t mutattunk ki. Szignifikánsan gyakoribb volt a WUKI PCR pozitivitás a transzplantáció után korán, mint később ($p=0,002$), virális DNS-t főként a transzplantáció után korán (3 hónapon belül) mutattunk ki. Mind a WU, mind a KI polyomavírust számos munkacsoport kimutatta a légúti mintákban [183]. Immunkompetens egyéneknél a WUPyV előfordulása gyerekekben elérte a 16,4 %-ot is [128], míg egészséges felnőttekben már jóval kevesebb (0,75%) légúti minta bizonyult pozitívnak Mourez és munkatársai vizsgálata során [138]. Emiatt feltételezzük, hogy a primer fertőzés valószínűleg gyermekkorban következik be, és felnőtt korban már ritkábban fordul elő. Ezt támasztják alá a szeroprevalencia vizsgálatok is, mivel az 5 éves korcsoportban a szeropozitivitás már elérte a 87%-ot [100]. Az általunk tapasztalt WUPyV prevalencia immunszuppresszált egyéneknél korrelál a Rao és

munkatársai által kapott eredményekkel (3%) [147]. A KIPyV esetében immunkompetens egyénekben 0,5-3%, immunszuppresszált egyénekben pedig 5,6%-os gyakoriságot írtak le [147]. 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 (9/9 vs. 47/81; $p=0,01$). Mivel azonban más légúti megbetegedés tüneteit okozó fertőzések kimutatását nem végeztük el, így nem vonható le egyértelmű következtetés a patogenitásukra vonatkozóan. Elképzelhető, hogy a vírusok csak társfertőzők, nem okoznak légúti tüneteket, de akár az is, hogy légúti tüneteket okoznak vagy más fertőzéseket súlyosbítanak [183].

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 Bofill-Mas és munkatársai 4 terhes nő vizeletmintáját vizsgálták meg, de nem mutattak ki WU és KI polyomavírust [181]. A magzati szövetek szintén negatívak voltak mindkét vírust [184]. 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 [91, 161, 163]. 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 a plazmaminták 2%-a, a vizeletminták 3 %-a, míg a légúti minták 2 %-a volt HPyV9 DNS pozitív. A vírust nem terhes nők plazmájának 6 %-ában, a vizeletminták 2 %-ában, míg a légúti minták szintén

2 %-ában mutattuk ki. Statisztikailag szignifikáns prevalenciakülönbség egyik mintatípusban sem volt a két csoport közt. A hasonló pozitívítási gyakoriság valószínűleg azzal magyarázható, hogy a szerológiai adatok szerint a primer fertőzés nem korlátozódik a gyermekkorra, 14 éves korig mindössze 10,4-18,6%, a szeropozitivitás az életkor előrehaladtával nő (felnőttekben 39,4-47%), így az egész élet során bármikor bekövetkezhet HPyV9 fertőzés [159]. 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 kaput lehet a légút. Egy ausztrál kutatócsoport azonban nem tudta kimutatni a vírust egyik vizsgált mintatípusban sem [162]. Immunszuppresszált egyének vizeletmintáiban a HPyV9 0,6%-os, vérmintákban 4,8 %-os előfordulását írták le [90, 91]. A doktori disszertáció készültében egy holland kutatócsoport vesetranszplantált betegekkel végzett tanulmányuk eredményeit publikálta. A vizsgált 101 beteg 20,8 %-a esetén mutattak ki HPyV9 viraemiát. Fontos azonban megjegyezni, hogy a vírusrészek nagyon alacsonyok voltak (átlag 137 kópia/mL ; 25–530 kópia/mL), ami rendkívül érzékeny real-time PCR metodika használatát követelte meg. A kimutathatóságot nagyban befolyásolja a mintákban lévő vírusrészek mennyisége, illetve a PCR módszer érzékenysége. Maguk a vírust felfedezők későbbi közleményükben, nem publikált adatként hivatkozták, hogy az általuk korábban vizsgált mintákban a vírus mennyisége < 20 kópia/μL izolált DNS volt [160]. Az általunk használt, a felfedezők által publikált primerekkel végzett nested PCR ilyen alacsony vírusrészek kimutatására is alkalmas volt. Ez lehet az egyik magyarázat, hogy több munkacsoporttal ellentétben, akik más metodikát alkalmaztak, miért tudtuk a HPyV9-et kimutatni.

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 (195 vesetranszplantált beteg: 82 nő, 113 férfi; életkor: 11év-69 év; 100 terhes nő; életkor: 17-42 év; 300 egészséges személy: 75 férfi, 225 nő; életkor: 10-74 év). Adatainkat együttesen elemezve nem volt szignifikáns különbség a KIPyV és/vagy WUPyV DNS pozitívítási gyakoriságában a vesetranszplantáltak és terhes nők plazmamintái között. Ám WU polyomavírust szignifikánsan gyakrabban mutattunk ki a vesetranszplantált betegek plazmamintáiban a kontrollcsoportokéhoz képest (5/195 vs. 0/300; $p=0,0092$). A

vizeletminták elemzése során szignifikáns különbség volt a vesetranszplantáltak és terhes nők vizeletmintáinak WUPyV pozitívitasában (6/50 vs. 0/100; $p=0,0011$). A kontrollcsoportokhoz képest is szignifikánsan gyakoribb volt a WUPyV pozitívitas a vesetranszplantáltak vizeletmintáiban (6/50 vs. 0/136; $p=0,0003$). Szintén szignifikáns különbséget mutattunk ki a vesetranszplantáltak és terhes nők légúti mintáinak KIPyV pozitívitasában (6/90 vs. 0/100; $p=0,0103$). A KIPyV pozitívitas gyakorisága is szignifikánsan nagyobb volt a vesetranszplantáltak légúti mintáiban a kontrollcsoportok mintáihoz képest is (6/90 vs. 0/100; $p=0,0103$). 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 pozitívitas inkább a légúti mintákban, WUPyV pozitívitas 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 hasonlóan a BKPyV-hoz a primer fertőzést követően látenciát alakítanak ki a vesében és a húgyutakban [107], 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 összhangban 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 nyomkövetéses 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 vérrrel a vesébe, és fertőzik a vese és a húgyutak sejtjeit, így a vizelet forrása is lehet az infekciónak.

SUMMARY

HHV-6 viraemia detected in 4.5 % of renal transplant patients did not differ from frequency of HCMV infection (3.5%). Contrary to previous publications dominance of HHV-6A was observed. HHV-6 infection was significantly more frequent among renal transplant patients than healthy individuals (0) or pregnant women (1%). Latent HHV-6 infection was dominated by HHV-6B, and frequencies did not show difference between the patients groups studied. Based on our study, immunosuppression due to renal transplantation may result in higher susceptibility to HHV-6A infection. Although statistical analysis did not reveal interaction between HHV-6 viraemia and clinical symptoms in our study, HHV-6A infection may have clinical consequences. Based on our results it is suggested that monitoring, diagnosis of HHV-6 infection is needed, a follow up study may help to reveal the consequences of HHV-6A infection. Chromosomally integrated HHV-6 was observed in a renal transplant patient, the frequency (0.5%) is in accordance with the literature.

Our prevalence data of novel human polyomaviruses also strengthen the hypothesis that immunosuppression might result in higher susceptibility to WU and KI viruses. Neither WUPyV, nor KIPyV was detected in respiratory, urine and blood samples from pregnant women. KIPyV was detected only in two plasma samples (2%) from healthy individuals and not in other sample types. WUPyV was not found in any sample types from healthy individuals. KIPyV and WUPyV were observed in 6.6 % and 3.3 % of respiratory samples from renal transplant patients. Respiratory symptoms were observed in all virus positive patients. We described first the presence of KI (2%) and WU virus (12%) in urine samples. KI and WU viraemia was also found in renal transplant patients (1 and 2.6 %). WUPyV and KIPyV were detected mainly early after renal transplantation. HPyV9 was detected in urine, respiratory and blood samples from both healthy pregnant and non pregnant women, the frequencies were 2-6 %. There was no statistically significant difference of prevalence in any sample types between the two studied groups. This was the first observation of HPyV9 in respiratory sample which suggests the respiratory transmission of this virus. Based on our results it is suggested that WUPyV, KIPyV and HPyV9 from the portal entries (possible the respiratory tract) might invade into blood circulation, might infect kidney and cells of the urine tract by blood and might be secreted by urine.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Ablashi, D.V., et al., *Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates*. Virology, 1991. **184**(2): p. 545-552.
2. Adams, M.J. and E.B. Carstens, *Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012)*. Archives of Virology, 2012. **157**(7): p. 1411-1422.
3. Salahuddin, S.Z., et al., *Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders*. Science, 1986. **234**(4776): p. 596-601.
4. Baillargeon, J., J. Piper, and C.T. Leach, *Epidemiology of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in pregnant and nonpregnant women*. Journal of Clinical Virology, 2000. **16**(3): p. 149-157.
5. Ihira, M., et al., *Serological examination of human herpesvirus 6 and 7 in patients with coronary artery disease*. Journal of Medical Virology, 2002. **67**(4): p. 534-537.
6. Parker, C.A. and J.M. Weber, *An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG and IgM antibodies to human herpesvirus type 6*. Journal of Virological Methods, 1993. **41**(3): p. 265-275.
7. Saxinger, C., et al., *Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in U.S. populations*. Journal of Virological Methods, 1988. **21**(1-4): p. 199-208.
8. Dewhurst, S., et al., *Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants*. Journal of Clinical Microbiology, 1993. **31**(2): p. 416-418.
9. De Bolle, L., L. Naesens, and E. De Clercq, *Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy*. Clinical Microbiology Reviews, 2005. **18**(1): p. 217-245.
10. Cone, R.W., et al., *Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue*. Journal of Clinical Microbiology, 1996. **34**(4): p. 877-881.
11. Kusuhara, K., et al., *Do second attacks of exanthema subitum result from human herpesvirus 6 reactivation or reinfection?* Pediatric Infectious Disease Journal, 1991. **10**(6): p. 468-470.
12. Van Loon, N.M., et al., *Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6)*

- sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. Clinical Infectious Diseases, 1995. 21(4): p. 1017-1019.*
13. Yoshikawa, T., et al., *Endonuclease analysis of DNA of human herpesvirus-6 isolated from blood before and after bone marrow transplantation. Journal of Medical Virology, 1992. 37(3): p. 228-231.*
 14. Collot, S., et al., *Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. Journal of Clinical Microbiology, 2002. 40(7): p. 2445-2451.*
 15. Di Luca, D., et al., *Human herpesviruses 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. Journal of Medical Virology, 1995. 45(4): p. 462-468.*
 16. Suga, S., et al., *Prospective study of persistence and excretion of human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum and their parents. Pediatrics, 1998. 102(4 I): p. 900-904.*
 17. Zhao, J., et al., *Detection of human herpesvirus 6(HHV-6) DNA in salivary glands by the polymerase chain reaction. Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k"o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences, 1997. 12(2): p. 126-128.*
 18. Mukai, T., et al., *Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. Journal of Medical Virology, 1994. 42(3): p. 224-227.*
 19. Tanaka-Taya, K., et al., *Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. Journal of Medical Virology, 1996. 48(1): p. 88-94.*
 20. Adams, O., et al., *Congenital infections with human herpesvirus 6. Journal of Infectious Diseases, 1998. 178(2): p. 544-546.*
 21. Aubin, J.T., et al., *Intrauterine transmission of human herpesvirus 6 [5]. Lancet, 1992. 340(8817): p. 482-483.*
 22. Boutolleau, D., et al., *No evidence for a major risk of Roseolovirus vertical transmission during pregnancy [9]. Clinical Infectious Diseases, 2003. 36(12): p. 1634-1635.*
 23. Dahl, H., et al., *Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. Journal of Infectious Diseases, 1999. 180(6): p. 2035-2038.*
 24. Okuno, T., et al., *Human herpesviruses 6 and 7 in cervixes of pregnant women. J Clin Microbiol, 1995. 33(7): p. 1968-70.*
 25. Maeda, T., et al., *Outcomes of infants whose mothers are positive for human*

- herpesvirus-6 DNA within the genital tract in early gestation. Acta Paediatr Jpn, 1997. 39(6): p. 653-7.*
26. Leach, C.T., et al., *Human herpesvirus 6 infection of the female genital tract. Journal of Infectious Diseases, 1994. 169(6): p. 1281-1283.*
 27. Bezold, G., et al., *Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. Fertility and Sterility, 2007. 87(5): p. 1087-1097.*
 28. Kaspersen, M.D., et al., *Human Herpesvirus-6A/B Binds to Spermatozoa Acrosome and Is the Most Prevalent Herpesvirus in Semen from Sperm Donors. PLoS ONE, 2012. 7(11).*
 29. Alvarez-Lafuente, R., et al., *Clinical parameters and HHV-6 active replication in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2006. 37 Suppl 1: p. S24-26.*
 30. Crawford, J.R., et al., *Human herpesvirus 6 rhombencephalitis in immunocompetent children. Journal of Child Neurology, 2007. 22(11): p. 1260-1268.*
 31. Chan, P.K.S., et al., *Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. Journal of Medical Virology, 2001. 64(1): p. 42-46.*
 32. Cuomo, L., et al., *Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue. Journal of Medical Virology, 2001. 63(1): p. 45-51.*
 33. Donati, D., et al., *Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. Neurology, 2003. 61(10): p. 1405-1411.*
 34. Luppi, M., et al., *Human herpesvirus-6: A survey of presence and distribution of genomic sequences in normal brain and neuroglial tumors. Journal of Medical Virology, 1995. 47(1): p. 105-111.*
 35. Okuno, T., et al., *Human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. Transplantation, 1990. 49(3): p. 519-522.*
 36. Hall, C.B., et al., *Human herpesvirus-6 infection in children: A prospective study of complications and reactivation. New England Journal of Medicine, 1994. 331(7): p. 432-438.*
 37. Portolani, M., et al., *Human herpesvirus-6 infections in infants admitted to hospital. Journal of Medical Virology, 1993. 39(2): p. 146-151.*
 38. Pruksananonda, P., et al., *Primary human herpesvirus 6 infection in young children.*

- New England Journal of Medicine, 1992. **326**(22): p. 1445-1450.
39. Ishiguro, N., et al., *Menigo-encephalitis associated with HHV-6 related exanthem subitum*. Acta Paediatrica Scandinavica, 1990. **79**(10): p. 987-989.
 40. Jones, C.M.V., et al., *Acute encephalopathy and status epilepticus associated with human herpes virus 6 infection*. Developmental Medicine and Child Neurology, 1994. **36**(7): p. 646-650.
 41. McCullers, J.A., F.D. Lakeman, and R.J. Whitley, *Human herpesvirus 6 is associated with focal encephalitis*. Clinical Infectious Diseases, 1995. **21**(3): p. 571-576.
 42. Lau, Y.L., et al., *Primary human herpes virus 6 infection transmitted from donor to recipient through bone marrow infusion*. Bone Marrow Transplantation, 1998. **21**(10): p. 1063-1066.
 43. Rossi, C., et al., *Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variant A in a renal transplant recipient*. Transplantation, 2001. **71**(2): p. 288-292.
 44. Fischer, S.A., *Emerging viruses in transplantation: There is more to infection after transplant than CMV and EBV*. Transplantation, 2008. **86**(10): p. 1327-1339.
 45. Lautenschlager, I. and R.R. Razonable, *Human herpesvirus-6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review*. Transpl Int, 2012. **25**(5): p. 493-502.
 46. Daibata, M., et al., *Detection of human herpesvirus 6 and JC virus in progressive multifocal leukoencephalopathy complicating follicular lymphoma*. American Journal of Hematology, 2001. **67**(3): p. 200-205.
 47. Luppi, M., et al., *Human herpesvirus 6 latency characterized by high viral load: Chromosomal integration in many, but not all, cells [2]*. Journal of Infectious Diseases, 2006. **194**(7): p. 1020-1021.
 48. Pellett, P.E., et al., *Chromosomally integrated human herpesvirus 6: Questions and answers*. Reviews in Medical Virology, 2012. **22**(3): p. 144-155.
 49. Ward, K.N., et al., *Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(4): p. 1571-1574.
 50. Lee, S.O., et al., *Chromosomally integrated human herpesvirus-6 in kidney transplant recipients*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2011. **26**(7): p. 2391-2393.
 51. Volin, L., et al., *Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: impact on clinical course and association with other beta-herpesviruses*. Br J Haematol, 2004. **126**(5): p. 690-6.

52. Razonable, R.R., *Infections due to human herpesvirus 6 in solid organ transplant recipients*. Current Opinion in Organ Transplantation, 2010. **15**(6): p. 671-675.
53. Dockrell, D.H., *Human herpesvirus 6: Molecular biology and clinical features*. Journal of Medical Microbiology, 2003. **52**(1): p. 5-18.
54. Lusso, P., *HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape*. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2006. **37 Suppl 1**: p. S4-10.
55. Mock, D.J., et al., *Association of human herpesvirus 6 with the demyelinating lesions of progressive multifocal leukoencephalopathy*. Journal of NeuroVirology, 1999. **5**(4): p. 363-373.
56. Amirian, E.S., K. Adler-Storhiz, and M.E. Scheurer, *Associations between human herpesvirus-6, human papillomavirus and cervical cancer*. Cancer Letters, 2013. **336**(1): p. 18-23.
57. Lusso, P., et al., *Human herpesvirus 6A accelerates AIDS progression in macaques*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(12): p. 5067-5072.
58. DesJardin, J.A., et al., *Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection*. Journal of Infectious Diseases, 1998. **178**(6): p. 1783-1786.
59. Humar, A., et al., *Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients*. J Infect Dis, 2000. **181**(4): p. 1450-3.
60. Flamand, L., et al., *Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures*. J Virol, 1991. **65**(9): p. 5105-10.
61. Flamand, L., et al., *Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation*. Blood, 1995. **85**(5): p. 1263-71.
62. Stein, J., et al., *Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells*. J Gen Virol, 1993. **74 (Pt 11)**: p. 2333-8.
63. Fietze, E., et al., *Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor*. Transplantation, 1994. **58**(6): p. 675-80.

64. Staras, S.A., et al., *Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(9): p. 1143-51.
65. Cannon, M.J., T.B. Hyde, and D.S. Schmid, *Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection*. Rev Med Virol, 2011. **21**(4): p. 240-55.
66. Rubin, R.H., *The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the 'silo hypothesis'*. Curr Opin Infect Dis, 2007. **20**(4): p. 399-407.
67. Johnson, J., B. Anderson, and R.F. Pass, *Prevention of maternal and congenital cytomegalovirus infection*. Clin Obstet Gynecol, 2012. **55**(2): p. 521-30.
68. Wreghitt, T.G., et al., *Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(12): p. 1603-6.
69. White, A.L., G.L. Hedlund, and J.F. Bale, Jr., *Congenital cytomegalovirus infection and brain clefting*. Pediatr Neurol, 2014. **50**(3): p. 218-23.
70. Grinde, B., *Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response*. J Oral Microbiol, 2013. **5**.
71. Ishibashi, K., O. Yamaguchi, and T. Suzutani, *Reinfection of cytomegalovirus in renal transplantation*. Fukushima J Med Sci, 2011. **57**(1): p. 1-10.
72. Brennan, D.C., *Cytomegalovirus in renal transplantation*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(4): p. 848-55.
73. Cukuranovic, J., et al., *Viral infection in renal transplant recipients*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 820621.
74. Hartmann, A., S. Sagedal, and J. Hjelmesaeth, *The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients*. Transplantation, 2006. **82**(2 Suppl): p. S15-7.
75. Mwitshi, K. and D.C. Brennan, *Prevention and management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplantation*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2007. **5**(2): p. 295-304.
76. Fishman, A.J., et al., *Cytomegalovirus in transplantation - Challenging the status quo*. Clinical Transplantation, 2007. **21**(2): p. 149-158.
77. Machida, U., et al., *Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(7): p. 2536-42.

78. Moses, S., et al., *Determination of human cytomegalovirus pp65 antigenemia among renal transplant patients*. Indian Journal of Nephrology, 2012. **22**(5): p. 347-352.
79. Grefte, J.M.M., et al., *The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection*. Journal of General Virology, 1992. **73**(11): p. 2923-2932.
80. Bhatia, J., et al., *Comparing serology, antigenemia assay and polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection in renal transplant patients*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 297-300.
81. Diaz, J., et al., *Incidence and risk factors for cytomegalovirus disease in a colombian cohort of kidney transplant recipients*. Transplant Proc, 2014. **46**(1): p. 160-6.
82. Boeckh, M., *Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 305-9.
83. Gardner, S.D., et al., *New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation*. Lancet, 1971. **1**(7712): p. 1253-1257.
84. Padgett, B.L., et al., *Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy*. Lancet, 1971. **1**(7712): p. 1257-1260.
85. Allander, T., et al., *Identification of a third human polyomavirus*. Journal of Virology, 2007. **81**(8): p. 4130-4136.
86. Gaynor, A.M., et al., *Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections*. PLoS Pathogens, 2007. **3**(5): p. 0595-0604.
87. Feng, H., et al., *Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma*. Science, 2008. **319**(5866): p. 1096-1100.
88. Schowalter, R.M., et al., *Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin*. Cell Host and Microbe, 2010. **7**(6): p. 509-515.
89. van der Meijden, E., et al., *Discovery of a new human polyomavirus associated with Trichodysplasia Spinulosa in an immunocompromized patient*. PLoS Pathogens, 2010. **6**(7): p. 1-10.
90. Scuda, N., et al., *A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus*. Journal of Virology, 2011. **85**(9): p. 4586-4590.
91. Siebrasse, E.A., et al., *Human polyomaviruses in children undergoing transplantation*,

- United States, 2008-2010*. Emerging Infectious Diseases, 2012. **18**(10): p. 1676-1679.
92. Buck, C.B., et al., *Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus*. Journal of Virology, 2012. **86**(19): p. 10887-10887.
 93. Yu, G., et al., *Discovery of a Novel Polyomavirus in Acute Diarrheal Samples from Children*. PLoS ONE, 2012. **7**(11).
 94. Korup, S., et al., *Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract*. PLoS ONE, 2013. **8**(3): p. e58021.
 95. Lim, E.S., et al., *Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing*. Virology, 2013. **436**(2): p. 295-303.
 96. Van Ghelue, M., et al., *Genome analysis of the new human polyomaviruses*. Rev Med Virol, 2012. **22**(6): p. 354-77.
 97. Kean, J.M., et al., *Seroepidemiology of human polyomaviruses*. PLoS Pathogens, 2009. **5**(3).
 98. Stolt, A., et al., *Seroepidemiology of the human polyomaviruses*. Journal of General Virology, 2003. **84**(6): p. 1499-1504.
 99. Kean, J.M., et al., *Seroepidemiology of human polyomaviruses*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000363.
 100. Dalianis, T. and H.H. Hirsch, *Human polyomaviruses in disease and cancer*. Virology, 2013. **437**(2): p. 63-72.
 101. Antonsson, A., et al., *Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 7): p. 1849-53.
 102. Bofill-Mas, S., S. Pina, and R. Girones, *Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(1): p. 238-245.
 103. Bofill-Mas, S., et al., *Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA*. Journal of Virology, 2001. **75**(21): p. 10290-10299.
 104. Pietropaolo, V., et al., *Transplacental transmission of human polyomavirus BK*. Journal of Medical Virology, 1998. **56**(4): p. 372-376.
 105. Rziha, H.J., G.W. Bornkamm, and H. zur Hausen, *BK virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection*. Med Microbiol Immunol, 1978.

- 165**(2): p. 73-81.
106. Boldorini, R., et al., *Serological evidence of vertical transmission of JC and BK Polyomaviruses in humans*. Journal of General Virology, 2011. **92**(5): p. 1044-1050.
107. Wiseman, A.C., *Polyomavirus Nephropathy: A Current Perspective and Clinical Considerations*. American Journal of Kidney Diseases, 2009. **54**(1): p. 131-142.
108. Jiang, M., et al., *The role of polyomaviruses in human disease*. Virology, 2009. **384**(2): p. 266-273.
109. Hanssen Rinaldo, C., H. Hansen, and T. Traavik, *Human endothelial cells allow passage of an archetypal BK virus (BKV) strain - A tool for cultivation and functional studies of natural BKV strains*. Archives of Virology, 2005. **150**(7): p. 1449-1458.
110. Egli, A., et al., *Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors*. Journal of Infectious Diseases, 2009. **199**(6): p. 837-846.
111. Van Aalderen, M.C., et al., *BK virus infection in transplant recipients: Clinical manifestations, treatment options and the immune response*. Netherlands Journal of Medicine, 2012. **70**(4): p. 172-183.
112. Chang, D., et al., *Different genotypes of human polyomaviruses found in patients with autoimmune diseases in Taiwan*. Journal of Medical Virology, 1996. **48**(2): p. 204-209.
113. Muñoz, P., et al., *Prevalence of BK virus replication among recipients of solid organ transplants*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **41**(12): p. 1720-1725.
114. Sundsfjord, A., et al., *BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: Prevalent and persistent BK viruria, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia*. Journal of Infectious Diseases, 1999. **180**(1): p. 1-9.
115. Sappenfield, E., D.J. Jamieson, and A.P. Kourtis, *Pregnancy and susceptibility to infectious diseases*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 2013. **2013**.
116. Kalvatchev, Z., et al., *Reactivation of Polyomavirus hominis 1 (BKV) during pregnancy and the risk of mother-to-child transmission*. Journal of Clinical Virology, 2008. **43**(3): p. 328-329.
117. Boldorini, R., et al., *Latent human polyomavirus infection in pregnancy: Investigation of possible transplacental transmission*. Pathology, 2008. **40**(1): p. 72-77.
118. Hirsch, H.H., et al., *Prospective monitoring of BK virus load after discontinuing sirolimus treatment in a renal transplant patient with BK virus nephropathy [1]*

- (multiple letters). *Journal of Infectious Diseases*, 2001. **184**(11): p. 1494-1496.
119. Viscount, H.B., et al., *Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy*. *Transplantation*, 2007. **84**(3): p. 340-345.
120. Acott, P. and N. Babel, *BK virus replication following kidney transplant: does the choice of immunosuppressive regimen influence outcomes?* *Ann Transplant*, 2012. **17**(1): p. 86-99.
121. Kwon, H.J., et al., *Treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients with cidofovir: a single-center experience*. *Transpl Infect Dis*, 2013. **15**(6): p. 569-74.
122. Nguyen, N.L., B.M. Le, and D. Wang, *Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses*. *Emerging Infectious Diseases*, 2009. **15**(8): p. 1199-1205.
123. Miller, M.A., et al., *Seroepidemiology of WU polyomavirus among children exposed perinatally to HIV-1*. *J Med Virol*, 2012. **84**(2): p. 188-93.
124. 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.
125. Carter, J.J., et al., *Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(21): p. 1510-22.
126. Babakir-Mina, M., et al., *KI and WU polyomaviruses in patients infected with HIV-1, Italy*. *Emerging Infectious Diseases*, 2009. **15**(8): p. 1323-1325.
127. Ren, L., et al., *WU polyomavirus in fecal specimens of children with acute gastroenteritis, China*. *Emerging Infectious Diseases*, 2009. **15**(1): p. 134-135.
128. 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*. *Microbiology and Immunology*, 2011. **55**(7): p. 525-530.
129. Sharp, C.P., et al., *Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals*. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. **199**(3): p. 398-404.
130. Neske, F., et al., *WU polyomavirus infection in children, Germany*. *Emerging Infectious Diseases*, 2008. **14**(4): p. 680-681.
131. Bialasiewicz, S., et al., *Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal,*

- urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *Journal of Clinical Virology*, 2009. **45**(3): p. 249-254.
132. Babakir-Mina, M., et al., *Excretion of the novel polyomaviruses KI and WU in the stool of patients with hematological disorders*. *Journal of Medical Virology*, 2009. **81**(9): p. 1668-1673.
133. Barzon, L., et al., *Detection of WU polyomavirus in cerebrospinal fluid specimen from a patient with AIDS and suspected progressive multifocal leukoencephalopathy*. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. **200**(2): p. 314-315.
134. Barzon, L., et al., *Human KI and WU polyomavirus infection in immunocompromised subjects*. *Journal of Clinical Virology*, 2009. **45**(4): p. 370.
135. Miller, M.A., et al., *WU polyomavirus in patients infected with HIV or hepatitis C virus, Connecticut, USA, 2007*. *Emerging Infectious Diseases*, 2009. **15**(7): p. 1095-1097.
136. Norja, P., et al., *No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease*. *Journal of Clinical Virology*, 2007. **40**(4): p. 307-311.
137. Payungporn, S., et al., *Prevalence and molecular characterization of WU/KI polyomaviruses isolated from pediatric patients with respiratory disease in Thailand*. *Virus Research*, 2008. **135**(2): p. 230-236.
138. Mourez, T., et al., *Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease*. *Emerging Infectious Diseases*, 2009. **15**(1): p. 107-109.
139. Lin, F., et al., *WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, China*. *Journal of Clinical Virology*, 2008. **42**(1): p. 94-102.
140. Bialasiewicz, S., et al., *Presence of the newly discovered human polyomaviruses KI and WU in Australian patients with acute respiratory tract infection*. *Journal of Clinical Virology*, 2008. **41**(2): p. 63-68.
141. Han, T.H., et al., *WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea*. *Emerg Infect Dis*, 2007. **13**(11): p. 1766-8.
142. Abed, Y., D. Wang, and G. Boivin, *WU polyomavirus in children, Canada*. *Emerging Infectious Diseases*, 2007. **13**(12): p. 1939-1941.
143. Yuan, X.H., et al., *Prevalence of human KI and WU polyomaviruses in children with acute respiratory tract infection in China*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008. **46**(10): p. 3522-3525.

144. Ren, L., et al., *WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults*. Journal of Clinical Virology, 2008. **43**(3): p. 330-333.
145. Foulongne, V., et al., *KI and WU polyomaviruses in children, France*. Emerging Infectious Diseases, 2008. **14**(3): p. 523-525.
146. Kleines, M., et al., *Low to medium wu-virus titers in young children with lower respiratory tract infections*. Intervirology, 2008. **51**(6): p. 444-446.
147. Rao, S., et al., *WU and KI polyomavirus infections in pediatric hematology/oncology patients with acute respiratory tract illness*. Journal of Clinical Virology, 2011. **52**(1): p. 28-32.
148. Kantola, K., et al., *Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: Implications for respiratory transmission and latency*. Journal of Clinical Virology, 2009. **45**(4): p. 292-295.
149. 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.
150. Motamedi, N., et al., *The polyomaviruses WUPyV and KIPyV: a retrospective quantitative analysis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation*. Virol J, 2012. **9**: p. 209.
151. Abedi Kiasari, B., et al., *Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection*. Journal of Clinical Virology, 2008. **43**(1): p. 123-125.
152. Babakir-Mina, M., et al., *Identification of the novel KI and WU polyomaviruses in human tonsils*. Journal of Clinical Virology, 2009. **46**(1): p. 75-79.
153. Babakir-Mina, M., et al., *KI and WU polyomaviruses and CD4+ cell counts in HIV-1-infected patients, Italy*. Emerging Infectious Diseases, 2010. **16**(9): p. 1482-1485.
154. Babakir-Mina, M., et al., *Identification of the novel KI polyomavirus in the respiratory tract of an Italian patient*. Journal of Medical Virology, 2008. **80**(11): p. 2012-2014.
155. 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.
156. Bialasiewicz, S., et al., *A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian children*. Journal of Clinical Virology, 2007. **40**(1): p. 15-18.
157. Trusch, F., et al., *Seroprevalence of human polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus*. Journal of General

- Virology, 2012. **93**(4): p. 698-705.
158. 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.
159. Nicol, J.T., et al., *Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(8): p. 1329-32.
160. Ehlers, B. and U. Wieland, *The novel human polyomaviruses HPyV6, 7, 9 and beyond*. APMIS, 2013. **121**(8): p. 783-95.
161. Sauvage, V., et al., *Human polyomavirus related to african green monkey lymphotropic polyomavirus*. Emerging Infectious Diseases, 2011. **17**(8): p. 1364-1370.
162. Rockett, R.J., et al., *Detection of Novel Polyomaviruses, TSPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9 and MWPpyV in Feces, Urine, Blood, Respiratory Swabs and Cerebrospinal Fluid*. PLoS ONE, 2013. **8**(5).
163. Imajoh, M., et al., *Novel human polyomaviruses, Merkel cell polyomavirus and human polyomavirus 9, in Japanese chronic lymphocytic leukemia cases*. Journal of Hematology and Oncology, 2012. **5**.
164. Foulongne, V., et al., *Human skin Microbiota: High diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing*. PLoS ONE, 2012. **7**(6).
165. van der Meijden, E., et al., *Human polyomavirus 9 infection in kidney transplant patients*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(6): p. 991-9.
166. Yalcin, S., et al., *Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey*. Arch Virol, 1994. **136**(1-2): p. 183-90.
167. Boutolleau, D., et al., *Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology*. Journal of Clinical Virology, 2006. **35**(3): p. 257-263.
168. Pradeau, K., et al., *A reverse transcription-nested PCR assay for HHV-6 mRNA early transcript detection after transplantation*. J Virol Methods, 2006. **134**(1-2): p. 41-7.
169. Borbely, A.A., et al., *Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 2): p. 287-94.
170. Lindau, C., et al., *A single-tube, real-time PCR assay for detection of the two newly characterized human KI and WU polyomaviruses*. Journal of Clinical Virology, 2009. **44**(1): p. 24-26.

171. Gentile, G., *Post-transplant HHV-6 diseases*. Herpes, 2000. **7**(1): p. 24-27.
172. Härmä, M., et al., *HHV-6 and HHV-7 antigenemia related to CMV infection after liver transplantation*. Journal of Medical Virology, 2006. **78**(6): p. 800-805.
173. Ratnamohan, V.M., et al., *Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause viral disease after renal transplantation*. Transplantation, 1998. **66**(7): p. 877-882.
174. Mori, T., et al., *Transmission of chromosomally integrated human herpesvirus 6 (HHV-6) variant A from a parent to children leading to misdiagnosis of active HHV-6 infection*. Transpl Infect Dis, 2009. **11**(6): p. 503-6.
175. Ljungman, P. and N. Singh, *Human herpesvirus-6 infection in solid organ and stem cell transplant recipients*. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2006. **37 Suppl 1**: p. S87-91.
176. Loginov, R., et al., *Quantitative HHV-6B antigenemia test for the monitoring of transplant patients*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(7): p. 881-6.
177. Chapenko, S., et al., *Association of HHV-6 and HHV-7 reactivation with the development of chronic allograft nephropathy*. J Clin Virol, 2009. **46**(1): p. 29-32.
178. Singh, N., *Human herpesviruses-6, -7 and -8 in organ transplant recipients*. Clinical Microbiology and Infection, 2000. **6**(9): p. 453-459.
179. Caserta, M.T., et al., *Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7 infections in pregnant women*. J Infect Dis, 2007. **196**(9): p. 1296-303.
180. Campadelli-Fiume, G., P. Mirandola, and L. Menotti, *Human herpesvirus 6: An emerging pathogen*. Emerg Infect Dis, 1999. **5**(3): p. 353-66.
181. Bofill-Mas, S., et al., *Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants*. Virol J, 2010. **7**: p. 141.
182. Ahsan, N. and K.V. Shah, *Polyomaviruses and human diseases*. Adv Exp Med Biol, 2006. **577**: p. 1-18.
183. Babakir-Mina, M., et al., *The novel KI, WU, MC polyomaviruses: Possible human pathogens?* New Microbiologica, 2011. **34**(1): p. 1-8.
184. Sadeghi, M., et al., *Newly discovered KI, WU, and Merkel cell polyomaviruses: no evidence of mother-to-fetus transmission*. Virol J, 2010. **7**: p. 251.

TÁRGYSZAVAK

prevalencia

humán herpeszvírus 6A (HHV-6)

humán herpeszvírus 6B (HHV-6B)

WU polyomavírus (WUPyV)

KI polyomavírus (KIPyV)

humán polyomavírus 9 (HPyV9)

vesetranszplantált betegek

terhes nők

KEYWORDS

prevalence

human herpesvirus 6A (HHV-6)

human herpesvirus 6B (HHV-6B)

WU polyomavirus (WUPyV)

KI polyomavirus (KIPyV)

human polyomavirus 9 (HPyV9)

renal transplant patients

pregnant women

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom Dr. Csoma Eszternek a témavezetésért, a segítségért és szakmai irányításért.

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

Külön köszönöm Dr. Gergely Lajos professzor úrnak, hogy támogatta, segítette a munkámat.

Köszönet illeti Dr. Asztalos Lászlót és Dr. Sápy Tamást, akik részt vettek a vesetranszplantált betegek és terhes nők vizsgálatában, illetve köszönöm a segítséget a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézet és a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika azon dolgozóinak, akik a vizsgálatokhoz felhasznált minták gyűjtésében részt vettek.

Köszönettel tartozom az Orvosi Mikrobiológiai Intézet azon dolgozóinak, akik munkám során segítségemre voltak.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon köszönöm a családomnak és a barátaimnak a lelkes támogatásukat.

FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



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.
Virology 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.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu



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 alapjául szolgáló közleményekre):
9.23

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

Debrecen, 2014.08.12

