

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Torque teno vírus epidemiológiája és filogenetikája Kelet-
Magyarországon**

Fehér Enikő

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
<i>A torque teno vírus (TTV) felépítése</i>	6
<i>A TTV kimutatása</i>	10
<i>A TTV szöveti előfordulása</i>	11
<i>A TTV előfordulása májbetegségekben</i>	12
<i>A TTV előfordulása a légutakban és fej-nyaki régióban</i>	13
<i>A TTV előfordulása nőgyógyászati mintákban</i>	14
<i>A TTV előfordulása egyéb kórképekben</i>	15
<i>TTV vizsgálatok Magyarországon</i>	16
<i>Humán papillomavírusok</i>	17
<i>Célkitűzések</i>	20
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	22
<i>Betegcsoportok</i>	22
<i>DNS izolálás</i>	23
<i>Polimeráz láncreakció</i>	24
<i>Restrikciós fragment hossz polimorfizmus</i>	25
<i>Az eredmények statisztikai értékelése</i>	25
<i>Szekvenálás és TTV törzsfa elemzés</i>	26
EREDMÉNYEK	28
<i>A TTV előfordulási gyakorisága szájüregi mintákban</i>	28
<i>HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció a szájüregi mintákban</i>	28
<i>A TTV előfordulási gyakorisága méhnyaki mintákban</i>	29
<i>HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció méhnyaki mintákban</i>	30
<i>A TTV, ggr1TTV és ggr1TTV-HPV előfordulási gyakoriságának összevetése LSCC, OSCC és CC betegeken</i>	31
<i>ggr1TTV és ggr1TTV-HPV koinfekció hatása a daganatos betegek túlélésére</i>	31
<i>A TTV-specifikus amplimerek szekvenálásának eredménye</i>	33
<i>A TTV szekvenciák genetikai diverzitása</i>	39
MEGBESZÉLÉS	40
ÖSSZEFOGLALÁS	51
SUMMARY	52
IRODALOMJEGYZÉK	53

<i>Hivatkozott közlemények jegyzéke</i>	<i>53</i>
<i>Saját közlemények jegyzéke.....</i>	<i>67</i>
TÁRGYSZAVAK.....	70
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	71
FÜGGELÉK	72
<i>Az értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye</i>	<i>72</i>

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACM	atípiás citológiájú méhnyaki nyálkahártya (atypical cervical mucosa)
CC	méhnyakrák (cervical cancer)
DNS	dezoxiribonukleinsav
ggr1TTV	egyes genocsoportú TTV (genogroup 1 TTV)
HCV	hepatitis C vírus
HPV	humán papillomavírus
ICTV	Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
kb	kilobázis
LCR	hosszú szabályozó régió (long control region)
LSCC	laryngealis laphámsejtes carcinoma (laryngeal squamous cell cancer)
MP	malignusan transzformált gége papillomatosis
mRNS	messenger ribonukleinsav
NCM	normál méhnyaki nyálkahártya (normal cervical mucosa)
NOM	normál szájüregi nyálkahártya (normal oral mucosa)
nt	nukleotid
OL	oralis leukoplakia
OLP	oralis lichen planus
ORF	nyitott olvasási keret (open reading frame)
OSCC	szájüregi laphámsejtes carcinoma (oral squamous cell carcinoma)
PBMC	perifériás vér mononuklearis sejtjei (peripheral blood mononuclear cells)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
RRP	recurrens légúti papillomatosis (recurrent respiratory papillomatosis)
TTV	torque teno vírus
UTR	nem kódoló régió (untranslated region)

BEVEZETÉS

A torque teno vírus (TTV) az *Anelloviridae* családba tartozó egyszálú DNS vírus, amelyet japán kutatók azonosítottak 1997-ben poszttranszfúziós hepatitises beteg szérumából (Nishizawa és mtsai, 1997). Ezt követően számos szövetben kimutatták a vírus jelenlétét, de patológiai szerepére eddig nem derült fény.

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában gégetumoros és légúti papillomatosisos betegekben vizsgálta a TTV, az egyes genocsoportú TTV (ggr1TTV), a humán papillomavírus (HPV) és a ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakoriságát (Szládek és mtsai, 2005). Abban a betegcsoportban, ahol tumor progresszió lépett fel, nagyobb ggr1TTV és ggr1TTV-HPV prevalenciát, és ehhez kapcsolatosan jelentősen rosszabb tünetmentes túlélést tapasztaltunk, mint azoknál a betegeknél, akiknél tumor progresszió nem fordult elő. Ebben a tanulmányban más, HPV-asszociált szájüregi (oralis leukoplakia, oralis lichen planus, oralis laphámsejtes carcinoma) és méhnyaki (atípiás méhnyaki lézió, méhnyaki carcinoma) beteg- és kontroll csoportokban kívántuk megállapítani a TTV, ggr1TTV, HPV, és ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakoriságát, és a fertőzések jelentőségét.

A TTV esetében a jelenlegi taxonómiai besorolás szerint 29 faj, míg a korábbi besorolás szerint több mint 30 genotípus különíthető el. A vírus genomja igen változatos, ami eltérő fehérje expressziót, ezáltal patogenitásbeli különbségeket eredményezhet, így a vírusfaj vagy genotípus megállapítása fontos tényező lehet a vírus patogenitásának megismerése szempontjából. Mivel a szakirodalomban a mai napig a genocsoport/genotípus/szubtípus felosztást alkalmazzák, szekvenálást követően saját mintáink és az adatbázisban fellelhető magyarországi szekvenciák esetében is elvégeztük vírustörzsfa elemzéssel a szekvenciák faji, illetve szubtípus szintű besorolását.

Célunk tehát a TTV esetleges patogén szerepének megerősítése, megállapítása, a TTV fajok, geno- és szubtípusok előfordulásának és eloszlásának meghatározása volt az általunk vizsgált betegcsoportokban.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A torque teno vírus (TTV) felépítése

A TTV egy 30-33 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, burok nélküli, körülbelül 3800 bázis hosszúságú, negatív polaritású, cirkuláris, egyszálú DNS genommal rendelkező vírus (Mushahwar és mtsai, 1999; Okamoto és mtsai, 1998a), melyet 1997-ben Nishizawa és munkacsoportja mutatott ki elsőként poszttranszfúziós hepatitiszes beteg szérumából (Nishizawa és mtsai, 1997). Felfedezése után a TT vírus nevet kapta (a beteg nevének kezdőbetűi után, akiből a vírust izolálták), illetve „transfusion transmitted virus”-ként hivatkoztak rá. A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) később a torque teno vírus (a latin „torques” szó jelentése nyaklánc, az ugyancsak latin „tenuis” szó jelentése vékony) elnevezés használatát fogadta el (Biagini, 2009a; Nishizawa és mtsai, 1997). A TTV, vagy a TT vírus rövidítés tehát minden esetben helytálló lehet és általánosan használt is.

A vírus filogenetikai hovatartozása vitatott. Több munkacsoport igyekezett besorolni különböző, már létező családokba, így helyet kapott a *Parvoviridae* (Okamoto és mtsai, 1998b) és *Circoviridae* (Miyata és mtsai, 1999) családban, valamint új taxonómiai csoportok létrehozását is javasolták, a *Circinoviridae* (Mushahwar és mtsai, 1999), később a *Paracircoviridae* (Takahashi és mtsai, 2000) családokét. Jelenleg az ICTV az *Anelloviridae* család Alphatorquevirus nemzetségébe sorolja, a családon belül pedig 29 fajt különítenek el. A fajok között legalább 35%, a nemzetségek között legalább 56% a különbség nukleotid szinten. A szintén humán mintákban előforduló torque teno mini vírus (Takahashi és mtsai, 2000) kilenc faja a Betatorquevirus, a torque teno midi vírus (Ninomiya és mtsai, 2007) két faja a Gammatorquevirus nemzetségbe tartozik az *Anelloviridae* családon belül (King és mtsai, 2011).

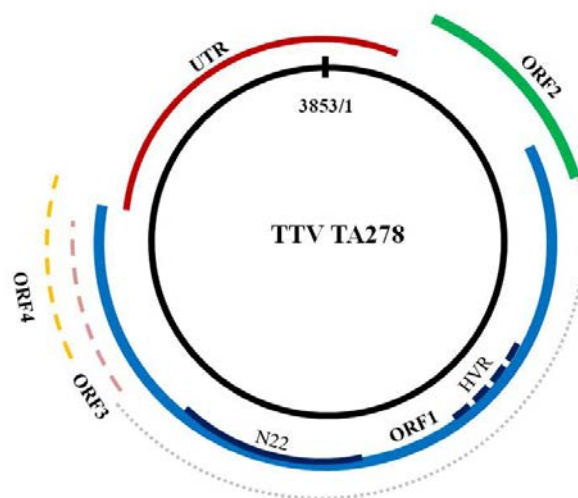
A TTV első detektálása óta eltelt időszakban egymást követték az újabb és újabb azonosított szekvenciák, amelyek igen nagy diverzitást mutatnak mind nukleotid, mind aminosav szinten. Bár az ICTV fajokba (species), a szakirodalom viszont a mai napig genocsoportokba, genotípusokba és szubtípusokba sorolja a TTV-ket (Biagini, 2009a; Mushahwar és mtsai, 1999; Peng és mtsai, 2002). A GenBank adatbázisban jelenleg fellelhető szekvenciák nagy része ORF1 (open reading frame 1) részleges szekvencia, az N22 régió vagy azzal átfedő szakasz. Az N22 annak a körülbelül 500 bázis hosszú szakasznak a neve, amelyet először azonosítottak (Nishizawa és mtsai, 1997). Bár ez a szakasz csak kisebb hányadát teszi ki a teljes vírusgenomnak, Tanaka és munkatársai (2000a) szerint a prototípus

(egyes genocsoportú) szekvenciák filogenetikai vizsgálatára ez a régió is alkalmas, mivel a részleges ORF1 szekvenciák alapján megállapított rokonsági viszonyok megfelelnek a teljes genom vizsgálata alapján megállapított rokonsági viszonyoknak. Az ICTV jelenleg elfogadott besorolásához készített javaslatban szereplő TTV törzsfa génbanki szekvenciák ORF1 szakasza alapján készült (Biagini, 2009b). A pontos filogenetikai hovatartozás tisztázásához azonban kétségtelenül fontos a genomok teljes szekvenciájának ismerete és összehasonlítása (Lemey és mtsai, 2002).

A szakirodalomban a régi besorolás szerint öt genocsoportot és több mint 30 genotípust különböztetnek meg (Peng és mtsai, 2002). Bizonyos genotípusok esetében beszélhetünk szubtípusokról is, amelyeket a genotípus számát követő betűvel jelölnek, például az 1a, 1b, 2a, 2b, 2c szubtípusoknál (Höhne és mtsai, 1998; Okamoto és mtsai, 1999a). Néhány szerző 2d, 2e, vagy 3a szubtípust is leírt (Okamoto és mtsai, 1999a), ezeket azonban nem használják általánosan. Ebben a besorolási rendszerben a különböző genocsoportok között legalább 50%, a genotípusok között legalább 30%, a szubtípusok között legalább 15% a különbség az N22 régióban nukleotid szinten (Okamoto és mtsai, 1998a, 1998b; Peng és mtsai, 2002).

A vírusgenom körülbelül 3,8 kilobázis (kb) nagyságú; a TA278 prototípus izolátum genomja 3852 nukleotidból (nt) áll, amely tartalmazza a körülbelül 1,2 kb hosszú nem kódoló régiót (untranslated region, UTR), és a körülbelül 2,6 kb hosszú kódoló régiót, amelyek hossza izolátumtól függően változó (Okamoto és mtsai, 1998a; Mushahwar és mtsai, 1999). A prototípus törzs genomjának sematikus felépítése az 1. ábrán látható.

Az UTR a TA278 prototípus izolátumban a 2898-107 nukleotidok között helyezkedik el. Szerepet játszik a transzkripció és transláció kontrolljában, így tartalmazza a promoter és enhancer elemeket, transzkripciós faktor kötőhelyeket, valamint egy, a különböző genotípusok között is igen konzervatív szakaszt (nt 3175-3282 a TA278 prototípus izolátumban) és egy GC gazdag régiót (nt 3736-3852 a TA278 prototípus izolátumban), ami bár eltérő hosszúságú (108-160 nukleotid), mégis minden izolátumban megtalálható. A két utóbbi szakasz szekvenciája alapján hurok formálásra lehet képes (Hijikata és mtsai, 1999; Kamada és mtsai, 2004; Miyata és mtsai, 1999; Mushahwar és mtsai, 1999; Suzuki és mtsai, 2004). A circovírusoknál, köztük a csirke anaemia vírusnál specifikus, jól konzervált genomi szekvenciák segítik a replikációt, transzkripciót és translációt, valamint a vírus összeszerelődését. A TTV kódoló régiójában és az UTR-ben lévő szakaszok a circovírusokéhoz hasonlóak, így a mechanizmusok hasonlósága is feltételezhető (Erker és mtsai, 1999; Mushahwar és mtsai, 1999; Niagro és mtsai, 1998; de Villiers és mtsai, 2011).



1. ábra. A torque teno vírus (TTV) genomjának sematikus felépítése.

A TTV kódoló régiója több nyitott olvasási keretet foglal magában, amelyek száma genotípusonként változó. A két fő ORF, az ORF1 és ORF2 azonban mindegyikben megtalálható (Hijikata és mtsai, 1999).

Az ORF1 (nt 589-2898 a TA278 prototípus izolátumban) körülbelül 770 aminosavat kódol, köztük feltehetően a kapszid fehérjét (Hijikata és mtsai, 1999; Miyata és mtsai, 1999; Mushahwar és mtsai, 1999; Kamahora és mtsai, 2000). N-terminálisán magában foglal a csirke anaemia vírushoz hasonlóan egy argininben gazdag régiót, valamint a csirke anaemia vírus Rep fehérje motívumaihoz hasonló szakaszokat (Erker és mtsai, 1999; Mushawar és mtsai, 1999; Niagro és mtsai, 1998). Az argininben gazdag régió DNS-kötő aktivitása révén a vírus becsomagolódását, a Rep fehérjék pedig a vírus replikációját segítik. Jellemző az ORF1 szekvenciára három hipervariabilis régió, amelyek az N22 régión kívül esnek; ezekben a nukleotid különbség az egyes szekvenciák között a 90%-ot meghaladhatja, ami az immunválasz kikerülését segítheti (Jelcic és mtsai, 2004; Nishizawa és mtsai 1999).

A másik, az ORF1 mellett minden izolátumban megtalálható régió az ORF2 (nt 107-712 a TA278 prototípus izolátumban), amely körülbelül 202 aminosavat kódol. Több TTV típus ORF2 szekvenciája tartalmaz egy közbeiktatott ATG startkodont is, amely két rövidebb, egy 49 és egy 150 aminosav hosszúságú fehérjét eredményez (Erker és mtsai, 1999; Hijikata és mtsai, 1999). Az ORF2 szerepe még pontosan nem ismert.

A két fő ORF mellett több kisebb meglétét is feltételezik. Erker és munkatársai (1999) egy harmadik nyitott olvasási keretet írtak le (nt 2904-3074 a TA278 prototípus izolátumban), ami 57 aminosavat kódol. Kamahora és munkatársai (2000) COS1 sejteket transzfektáltak egyes genotípusú TTV genomot tartalmazó plazmiddal és három mRNS (messenger RNS) osztályt azonosítottak. A 3,0 kb hosszú mRNS osztály lefedi a teljes ORF1-et, amely a kapszid és Rep fehérjéket kódolja. Az 1,2 kb és az 1,0 kb hosszúságú mRNS frakció viszont olyan splicing helyeket is tartalmaz, ami az ORF2-t kapcsolja az ORF4-hez, illetve ORF5-höz és szabályozó fehérjéket, transzkripciós faktorokat kódol. Minden mRNS ugyanazt a cap (nt 98-103 a TA278 prototípus izolátumban) és poli(A) szekvenciát (nt 3073-3078 a TA278 prototípus izolátumban) használja. Okamoto és munkacsoportja (2000a) szintén ezt a három mRNS frakciót detektálta csontvelő sejtekben. Az előző munkacsoportéhoz hasonlóan két új ORF-et (ORF3 és ORF4) írtak le a vizsgált genomokban. A két csoport által meghatározott új ORF régiók hasonló elhelyezkedésűek és megközelítőleg megfelelnek egymásnak, bár hosszúságuk eltérő a különböző TTV genotípusokban. Jelcic és csoportja (2004) további transzfekciós kísérletekkel igazolta, hogy az egyszerű nukleotid polimorfizmusok a genomon belül eltérő mRNS-eket, így alternatív fehérjék expresszióját eredményezhetik; az ORF1-en belül bizonyos genotípusoknál több stop és start kodont találtak. Ezeknek a polimorfizmusoknak az immunválasz kikerülésében és a vírusfertőzés patogenezisében lehet szerepe. Erre más humán patogén vírusok között is találunk példát, hiszen a hepatitis C vírus (HCV) vagy humán immundeficiencia vírus esetében a heterogenitás szintén a szervezet védekezésének kikerülésében, a betegség progressziójában van jelentősége (McNearney és mtsai, 1992; Simmonds, 2004). Qiu és munkatársai (2005) transzfektált humán 293 sejtekben vizsgálták hatos genotípusú TT vírus transzkripcióját és megerősítették a három mRNS osztály megjelenését, valamint hat különböző fehérje termelését sikerült kimutatniuk.

A fent említett mRNS osztályok mellett később további, sejtvonalként is eltérő mRNS osztályokat detektáltak (Leppik és mtsai, 2007; Mueller és mtsai, 2008; de Villiers és mtsai, 2011). Új splicing helyeket, valamint új ORF-eket azonosítottak, ami vagy nukleotid szintű különbségeknek köszönhető vagy genomon belüli átrendeződések okozzák. Átrendeződött TT vírus genomi és szubgenomi szekvenciákat (172 bázis hosszúságtól) mutattak ki különböző sejtekben *in vitro* transzfekciós kísérletekben és *in vivo* terhes nők szérumában, akiknek a gyermekeiben később gyermekkori leukémiát diagnosztizáltak (Leppik és mtsai, 2007; Mueller és mtsai, 2008; de Villiers és mtsai, 2011).

Felvetődött a homológ rekombináció lehetősége különböző TTV genomok között. Egy átfogó filogenetikai tanulmányban a nem kódoló régióban lehetséges rekombinációs pontokat

találtak, amelyek rekombinációhoz vezethetnek mind azonos, mind eltérő genotípusba tartozó TT vírusok között (Worobey, 2000). Az ORF1 egy adott szakaszának filogenetikai vizsgálata is lehetséges rekombinációs eseményeket fedett fel (Manni és mtsai, 2002).

Hasonló, szubgenomi fragmenteket is eredményező rekombinációs mechanizmus a *Geminiviridae* család tagjai között ismert (Stanley, 2004). Felmerült a kérdés, hogy a TT vírusoknál a szubvirális komponenseknek a betegségek iniciálásában lehet-e szerepe, és hogy a genomon belüli rekombinációnak specifikus TT vírus típusokban kell-e történnie (Leppik és mtsai, 2007), de ezekre a kérdésekre még nem született válasz. A rekombinációs események ismerete, valamint a tény, hogy a vírus igen heterogén, és jellemző rá a többszörös fertőzés (Ball és mtsai, 1999; Okamoto és mtsai, 1999b, 2001), felvetette azt a kérdést is, hogy az eltérő genotípusba tartozó vírusok valóban egyedi vírusok, vagy (legalábbis egy részük) rekombinációnak köszönhetően kialakult vírus változatok (Leppik és mtsai, 2007).

A genetikai változatosság jelentősége még nem világos. Az eddigi adatok alapján úgy tűnik, hogy a különböző TTV genotípusok a sejtekben változatos fehérje termelést indukálhatnak, ami immunológiai és patogenitásbeli különbségeket idézhet elő a fertőzött sejt és a vírus genotípusától függően (Leppik és mtsai, 2007). A genetikai háttér ismerete, a fehérje expresszió és funkció vizsgálata az epidemiológiai vizsgálatokkal karöltve segítséget nyújthatnak a vírus igen vitatott patogén szerepének felderítésében.

A TTV kimutatása

A TTV *in vitro* tenyésztése nem megoldott. Desai és munkacsoportja (2005) egyes genotípusú TT vírust tartalmazó szérummal fertőzött többféle sejtvonalat. Máj eredetű sejtvonalban (Chang sejtvonal) morfológiai változásokat (összecsapzódás, granularis degeneráció) és virális mRNS jelenlétét, phytohemagglutininrel stimulált PBMC (perifériás vér mononuklearis sejtei) és Raji sejtek esetében alacsony szintű extracelluláris víruspartikulum kibocsátást detektáltak. Leppik és csoportja (2007) L428 sejteket (Hodgkin lymphoma sejtvonal) fertőzött linearizált vírusgenommal. Néhány nap múlva a vírusgenom recirkularizációját és a sejtek citoplazmájában vírusszerű partikulumok jelenlétét figyelték meg. Többben plazmidba klónozott teljes vagy részleges vírusgenommal transzfektáltak sejteket (Huh7 hepatocellularis carcinoma, COS1, HeLa sejtek) a vírus promoter és enhancer elemeinek, a szintetizált mRNS osztályok, fehérjék, valamint a sejtekben lezajló esetleges patológiás hatás meghatározására (Kamada és mtsai, 2004; Leppik és mtsai, 2007; Mueller és mtsai, 2008; Qiu és mtsai, 2005). de Villiers és munkacsoportja (2011) 293TT humán embrionális vesesejtvonalba transzfektált vírusgenom replikációját tapasztalta.

A vírus kimutatására szolgáló módszerek közül a legelterjedtebb a polimeráz láncreakció (PCR). Mivel a prototípus vírus genomjának N22 régiója állt a vizsgálatok középpontjában a vírus felfedezését követően, a legtöbb kutatócsoport erre a szakaszra illeszkedő primereket használt. Azonban ma már tudjuk, hogy ezek a primerek csak néhány, az egyes genocsoportba tartozó genotípus kimutatására alkalmasak, melyek a prototípushoz közel álló szekvenciák. Ezeket ORF1 primereknek is nevezik, és közéjük tartoznak az általánosan használt NG059, NG061 és NG063 seminested PCR primerek is, amelyek az 1-6 genotípusok megfelelő DNS szakaszát amplifikálják (Okamoto és mtsai, 1999b).

Ahhoz, hogy általános képet kaphassunk a TTV gyakoriságát illetően, a vírusgenom jól konzervált szakaszaira illeszkedő primerekre van szükség, melyek szekvenciája filogenetikailag távol eső típusok esetében sem tér el jelentősen. Erre alkalmasak például az NG132, NG133, NG134 és NG 147 UTR PCR nested primerek (Okamoto és mtsai, 1999b). Több csoport real-time PCR technikát is kifejlesztett, ami a víruskimutatáson kívül a vírusterhelés meghatározására is alkalmas (Koidl és mtsai, 2004; Maggi és mtsai, 2005, 2007; Okamoto és mtsai, 2001; Tokita és mtsai, 2002). A PCR-en kívül a vírus detektálására *in situ* hibridizációs technika is alkalmazható (Cheng és mtsai, 2000; Jiang és mtsai, 2000; Ohbayashi és mtsai, 2001; Rodríguez-Inigo és mtsai, 2000). A geno- és szubtypusok meghatározása szekvenálással, vagy restrikciós enzimekkel (restrikciós fragment hossz polimorfizmus) történhet (Hafez és mtsai, 2007; Maggi és mtsai, 1999; Okamoto és mtsai, 2001; Tanaka és mtsai, 1998, 2001).

A TTV szöveti előfordulása

Felfedezését követően elsősorban különböző májbetegségekben tanulmányozták intenzíven a TTV patogenitási szerepét, mivel poszttranszfúziós hepatitisben szenvedő beteg szérumból izolálták először (Nishizawa és mtsai, 1997). A szérumvizsgálatok során korán kiderült, hogy az egészséges populációban is igen magas a vírus előfordulási gyakorisága és az infekció életreszóló fertőzésként jelentkezik (Okamoto, 2009). A májban *in situ* módszerekkel kimutatták a vírust és replikatív formáit (Cheng és mtsai, 2000; Jiang és mtsai, 2000; Ohbayashi és mtsai, 2001; Rodríguez-Inigo és mtsai, 2000; Okamoto és mtsai, 2000b), a máj érintettsége miatt pedig a TTV az epében és székletben is megjelenhet, amely fecalis-oralis átvitelt tesz lehetővé (Nakagawa és mtsai, 2000; Okamoto és mtsai, 1998b; Ukita és mtsai, 1999). A vírus és replikatív intermediér formái a máj mellett a csontvelőben (Okamoto 2000a; Fanci és mtsai, 2004; Kikuchi és mtsai, 2000; Zhong és mtsai, 2002), PBMC-ben (Lopez- Alcorocho és mtsai, 2000; Maggi és mtsai, 2001; Zhong és mtsai, 2002) és

hemopoietikus őssejtekben is megjelenhetnek (Maggi és mtsai, 2010), ami a vérben lévő vírusok forrásaként szolgálhat. Kimutatták többek között tüdőben, lépben, hasnyálmirigyben, vesében, pajzsmirigyben, izmokban (Jelcic és mtsai, 2004; Okamoto 2001; Suzuki és mtsai, 2001), méhnyaki mintákban (Calcaterra és mtsai, 2001; Fornai és mtsai, 2001), nyálban, vizeletben, könnyben, ondóban (Chan és mtsai, 2001; Gallian és mtsai, 2000; Inami és mtsai, 2000; Matsubara és mtsai, 2000), illetve anyatejben, köldökszínórvérben és amnion folyadékban, ami a vertikális vírusátvitel lehetőségét is felvetette (Gerner és mtsai, 2000; Matsubara és mtsai, 2001).

A TTV vírusterhelés a szérumban 10^3 - 10^5 /mL nagyságrendű, a különböző szervekben, nyálban, epében a szérumhoz képest ennél 10-1000-szer nagyobb. Bár a használt detektálási módszerek és a vizsgált betegcsoportok igen eltérőek, a nagyságrendi arányok egymásnak megfelelnek a különböző tanulmányokban (Gallian és mtsai, 2000; Okamoto és mtsai, 1999b, 2001; Suzuki 2001; Zhong és mtsai, 2001a).

A TTV előfordulása májbetegségekben

Az elsőként kimutatott, egyes genotípusba tartozó TT vírust öt ismeretlen eredetű, poszttranszfúziós hepatitisben szenvedő betegből háromban azonosították, és összefüggésbe hozták a szérum emelkedett alanin-aminotranszferáz szintjével (Nishizawa és mtsai, 1997). Ugyanez a munkacsoport akut hepatitisben szenvedő betegből származó, szintén ebbe a genotípusba (1a) tartozó vírust oltott csimpánzokba. Az állatokban biokémiai és szövettani elváltozások jelentek meg (Tawara és mtsai, 2000). Tokita és munkacsoportja (2001a, 2001b, 2002) szignifikánsan alacsonyabb vérlemezke számot mért azokban a krónikus hepatitis C vírussal (HCV) fertőzött és nem-B-nem-C típusú hepatitisben szenvedő betegekben, akik egyes genocsoportú/genotípusú TTV-t hordoztak, mint az egyes genocsoportú/genotípusú TTV-t nem hordozókban. Összefüggést találtak a hepatocellularis carcinoma kimenetele és a magas TTV terhelés között, valamint a TTV prognosztikai szerepét feltételezték HCV okozta krónikus májbetegségben. Felvetették, hogy bizonyos TTV genotípusok, köztük az egyes genotípus képviselői befolyásolhatják a májsejtek gyulladásos és nekrotikus folyamatait nem alkohol okozta zsíros májbetegségben (Tokita és mtsai, 2001a, 2001b, 2002).

A négyes genocsoportba tartozó (SENV-D, SENV-H) vírusokat nagyobb arányban detektálták nem-A-nem-E típusú vírushepatitises betegekben (30%; 86/286), mint egészséges véradókban (3%; 3/97); azonban nincs arra bizonyíték, hogy ezek a vírusok hepatitist okoznak vagy súlyosbítják annak lefolyását (Umemura és mtsai, 2001a). Mivel a TTV a csontvelőben

is szaporodik, összefüggésbe hozták hepatitis-asszociált aplasticus anaemiával (Ishimura és mtsai, 2000; Kikuchi és mtsai, 2000; Miyamoto és mtsai, 2000).

Több munkacsoport vizsgálta májbetegségekkel kapcsolatban a TTV és más vírus együttes előfordulását. Zein és munkatársai (1999) nagyobb arányban találtak TTV fertőzést előrehaladott, HCV-vel asszociált dekompenzált cirrhosisban (39%; 11/28) és hepatocellularis carcinomában (56%; 9/16) szenvedőkben, mint krónikus hepatitises (7%; 2/29) és kompenzált májsugorban (12%; 2/17) szenvedő betegekben. Mások is felvetették a TTV szerepét HCV fertőzéshez társuló hepatocellularis carcinomában, illetve összefüggést találtak a TTV, hepatitis B vírus, a herpesvírusok előfordulása és hepatocellularis carcinoma között (Moriyama és mtsai, 2001; Pineau és mtsai, 2000). Kao és munkacsoportja (2003) nagyobb gyakorisággal mutatta ki a HCV 2a típusát SEN vírussal fertőzött egyéneknél (37%), mint TTV negatív HCV fertőzötteknél (16%).

Bár több tanulmány szól a TTV esetleges patogén szerepéről, eddig nem találtak bizonyítékot a TTV fertőzés, a májbetegségek kialakulása és progressziója közötti összefüggésre, illetve a koinfekciók jelentősége sem tisztázódott (Hafez és mtsai, 2007; Kato és mtsai, 1999; Moriyama és mtsai, 2003; Okamoto, 2009; Umemura és mtsai, 2001b).

A TTV előfordulása a légutakban és fej-nyaki régióban

A máj és vér vizsgálata mellett a légutakban is intenzíven tanulmányozták a TTV előfordulását és szerepét. Bando és munkatársai (2001; 2008) idiopathiás tüdőfibrosis esetében rosszabb túlélési arányt figyeltek meg TT vírussal fertőzött, mint a nem fertőzött betegcsoportban, valamint összefüggést találtak a TTV jelenléte, a vírusterhelés és a tüdőrák kialakulása között. Maggi és munkacsoportja (2003a) nagyobb TTV előfordulási gyakoriságot és vírusterhelést mért gyermekkori bronchopneumoniában, mint enyhébb akut légúti betegségben (orrváladékban 98%; (53/54) és 74% (34/46); vérplazmában 92% (57/62) és 79% (70/89)). Bronchopneumoniás gyermekekben a négyes genocsoportú TTV dominanciája volt jellemző. Asthmában, illetve hörgőtágulatban szenvedő gyermekekben magasabb TT vírusszint mellett rosszabb spirometrikus értékeket mértek. A TTV jelenléte a hörgőtágulat súlyosságával korrelált és csökkent légzésfunkcióval társult (Pifferi és mtsai, 2005, 2006). Felvetődött, hogy a vírus felborítja a lymphocytá egyensúlyt, így immunszuppresszív hatású, valamint hogy a légúti csillós hámsejtek fertőzése révén képes azok működését gátolni (Maggi és mtsai, 2003b; Pifferi és mtsai, 2008). A TTV szerepe azonban ezekben az esetekben sem tisztázott.

A TTV előfordulását nyálban több kutatócsoport is igazolta (Chan és mtsai, 2001; Gallian és mtsai, 2000; Inami és mtsai, 2000; Matsubara és mtsai, 2000). Mivel a vírus a nyálban 100-1000-szer magasabb arányban volt jelen, mint a szérumban, valószínűsítették szaporodását a szájüregi régióban (Deng és mtsai, 2000; Gallian és mtsai, 2000). A vírus jelenléte az epithelialis sejtekben bebizonyosodott; Rodríguez-Inigo és munkacsoportja (2001) a TTV általános előfordulását vizsgálta 20 oralis lichen planusban (13 hepatitises) és 6 leukoplakiában szenvedő beteg (mindegyik hepatitises) szájnyálkahártya biopszia és szérum mintájában. Az első betegcsoportban 17, míg a másodikban mind a hat beteg szérum és biopszia mintája TTV pozitív volt. *In situ* hibridizációval a szájüregi epithelialis sejtek citoplazmájában minden esetben kimutatták a vírust. A TTV fertőzött és nem fertőzött mintákban nem találtak különbséget az infiltráló lymphocyták számában; ez utóbbi sejtekben a TTV nem volt jelen. A hepatitis vírusokkal nem találtak összefüggést, bár meg kell jegyezni, hogy egészséges kontroll csoportot nem használtak.

Takata és munkatársai (2003) 192 szájüregi tumorban és 249 szájüregi cisztában szenvedő beteg szérumában vizsgálták a TTV jelenlétét az NG059/061/063 ORF1 specifikus primerekkel. A TTV pozitivitás hasonlóan alakult a két csoportban, összességében 31,1%; az előző csoporthoz (Rodríguez-Inigo és mtsai, 2001) hasonlóan ők sem találtak összefüggést a TTV jelenléte és a betegségek között. Rotundo és munkacsoportja (2004) 11 periodontitisben szenvedő és 10 egészséges személy nyál és fogíny mintájában vizsgálta a TTV prevalenciáját. Az előbbi csoport 100%-a, utóbbi 60%-a bizonyult TTV pozitívnak. Lehetséges kapcsolatot találtak a periodontitis, a vírus előfordulása és a vírusterhelés között, amiben több tényező szerepét feltételezték: a TTV a gyulladásos folyamatokban játszhat szerepet, illetve a gyulladás miatt infiltráló lymphocytákban szaporodó TTV okozhatja a magasabb vírus pozitivitást. Emellett a szájüregben lokális TTV termelést is valószínűsítették, mivel a vírusterhelés az összes mintában igen magas volt (Rotundo és mtsai, 2004).

A kutatók a felsorolt információk alapján a szájüreget behatolási kapuként, illetve annak nyálkahártyáját rezervoárként, a TTV-t patogenetikai kofaktorként tartják számon, bár a vizsgált minták száma a legtöbb esetben igen alacsony volt, nem a beteg területről származott (hanem szérumból), nem minden esetben állt rendelkezésre megfelelő kontroll csoport, valamint TTV genotípus/szubtípus eloszlást sem vizsgáltak.

A TTV előfordulása nőgyógyászati mintákban

A TTV jelenlétét méhnyaki mintákban is kimutatták (Calcaterra és mtsai, 2001; Fornai és mtsai, 2001). Calcaterra és munkacsoportja (2001) a TTV és HPV együttes előfordulását

vizsgálta, de nem talált összefüggést a TTV, valamint a magas és alacsony onkogén kockázatú HPV fertőzések között. Saláková és munkatársai (2009) 95 méhnyaki nyálkahártya elváltozásában szenvedő és 55 egészséges egyén exfoliált sejteiben, illetve összesen 97 szérumban is vizsgálták a TTV előfordulását az NG133/147 és NG132/134 nested primerpárokkal. A lézióból származó mintákban szignifikánsan magasabb volt a TTV pozitivitás a kontroll csoporthoz képest (74,7% és 52,7%), illetve a HPV pozitív mintákban szignifikánsan magasabb volt a TTV prevalenciája, mint a HPV negatívokban. Alacsony és magas kockázatú csoportra osztva a betegcsoportot jelentős különbséget nem találtak a TTV prevalencia tekintetében. Az exfoliált sejtekben 10-1000-szer magasabb volt a vírusterhelés, mint a szérumban, ami vírus replikációra utalhat a cervicalis régióban. Negyven mintában TTV csoport-specifikus PCR alapján a ggr1TTV volt a leggyakoribb, amelyet a hármas követett kis eltéréssel. A többszörös TTV fertőzés az összes minta tekintetében 86% volt.

A TTV előfordulása egyéb kórképekben

Maggi és csoportja (2003c) a TTV és *Helicobacter pylori* kapcsolatát vizsgálta gastritises betegek gyomor biopsziás és szérumban. A baktériummal fertőzött gyomorszövet mintákban egy nagyságrenddel magasabb volt a TTV vírusterhelés, mint a *Helicobacter* negatívokban. Szekvencia vizsgálat során a *Helicobacter* pozitív mintákban hármas genocsoportú, a negatívokban egyes genocsoportú vírusokat találtak.

Magas TTV prevalenciát mértek szisztémás lupus erythematosus betegekben (56,9%; (120/211) és 33,2% (66/199)) kérdéses azonban, hogy a vírusnak autoantitest generálásában lehet szerepe autoantigén peptid hasonlóság miatt, vagy az immunológiai diszfunkció miatt fogékonyabb a beteg a TTV infekcióra (Gergely és mtsai, 2005a). Felmerült a vírus patológiai szerepe hólyagos pemphigoidban, idiopathiás inflammatorikus myopathiában és rheumatoid arthritisben (Blazsek és mtsai, 2008; Gergely 2005b, 2006).

Mivel PBMC-ben és csontvelőben is kimutatták a TTV replikatív formáit (Zhong és mtsai, 2002), felmerült a vírus szerepe a különböző lymphomákban (Figuerido és mtsai, 2007; Garbuglia és mtsai, 2003; zur Hausen & de Villiers, 2009; Zhong és mtsai, 2001b). Zhong és munkatársai (2001b) magasabb pozitivitási arányt és vírusterhelést mértek plazmában (69% daganatos betegekben és 39% egészséges véradókban) és PBMC sejtekben (99% daganatos betegekben és 86% egészséges véradókban) non-Hodgkin lymphoma mellett egyéb daganatos megbetegedésekben is (mellrák, vastagbél daganat, hepatocellularis és nasopharyngealis carcinoma. Figueiredo és munkacsoportja (2007) fiatal felnőtt Hodgkin lymphomás

betegekben magas TTV (60%) és alacsony Epstein-Barr vírus (21%) pozitivitást detektált. Magas TTV prevalenciát mutattak ki Kaposi sarcomás betegek szérumban (87,5% (21/24) betegekben és 47% (32/68) kontroll személyekben), valamint ezeknél a betegeknél a lézióban és az ép bőrben igen (27,7%; 5/18), míg az egészséges egyének bőrén nem volt kimutatható vírus. Feltételezik, hogy immunszuppresszív hatása révén hat a humán herpesvírus 8 replikációjára és így szerepe lehet a betegség patogenezisében (Girard és mtsai, 2007).

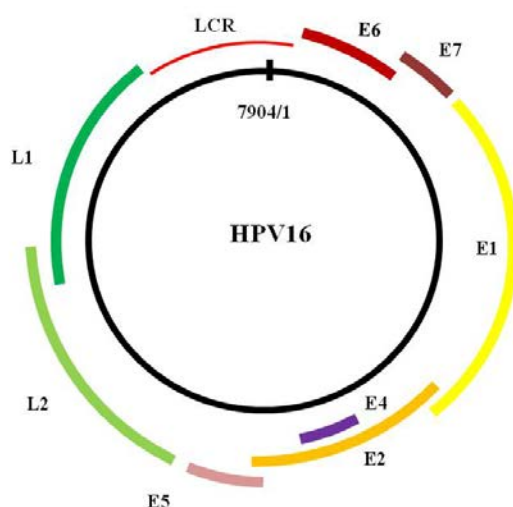
TTV vizsgálatok Magyarországon

Takács és munkacsoportja (2003) 228 hepatitiszes és 108 egészséges egyén szérumban vizsgálta az egyes genocsoportba tartozó TTV genotípusok előfordulását az általunk is használt ORF1 PCR módszerrel. 115 (50,4%) hepatitiszes és 20 (18,5%) egészséges egyén bizonyult pozitívnak. A megszekvenált minták többsége a kettes genotípushoz tartozott, nyolc esetben detektáltak többszörös fertőzést. Pár és munkatársai (2004) 110 HCV fertőzött és 108 egészséges személyben vizsgálták a TTV előfordulását ugyanezekkel a primerekkel. A HCV fertőzöttek 50,9%-a (56/110), az egészségesek 18,5%-a (20/108) volt TTV pozitív. Egy másik munkacsoport (Dencs és mtsai, 2009) kórházi dolgozóknak és kontroll személyeknek vizsgálta a hármas genocsoportú TT vírusok előfordulási gyakoriságát, ami az előbbi csoportban 70,3%, utóbbiban 77,5% volt.

Munkacsoportunk korábban két tanulmányt készített TT vírussal kapcsolatban. Az egyikben 92 vesetranszplantált és 66 egészséges személy PBMC sejtjeit vizsgáltuk (Szládek és mtsai, 2003). UTR PCR alapján a vesetranszplantáltak 100%-a (92/92), a kontroll személyek 95,5%-a (63/66), ORF1 PCR alapján a vesetranszplantáltak 57,6%-a (53/92), az egészséges személyek 19,7%-a (13/66) bizonyult TTV fertőzöttnek. A 12 megszekvenált TTV fele kettes genotípusba tartozott. A másik tanulmányban (Szládek és mtsai, 2005) 40 légúti papillomatosisos és laphámsejtes carcinomás beteg mintáit vizsgáltuk. UTR PCR alapján a légúti papillomatosisos betegek 80,0%-a, a malignusan transzformált papillomatosisos (MP) betegek 100%-a, a laryngealis laphámsejtes carcinomás (LSCC) betegek 88,0%-a volt TTV pozitív. N22 PCR alapján a légúti papillomatosisos betegek 20,0%-a, a malignusan transzformált papillomatosisos betegek 100%-a, a laphámsejtes gége carcinomás betegek 44,0%-a hordozott ggr1TTV-t. A TTV mellett a HPV és a ggr1TTV-HPV koinfekció prevalenciáját is vizsgáltuk. A vírusfertőzések előfordulása jelentősen magasabb volt azokban az LSCC betegekben, akikben tumor progresszió következett be, mint azokban, akikben tumor progresszió nem jelentkezett. A vírusfertőzések előfordulásának megfelelően a tumor progresszióban szenvedők tünetmentes túlélése szignifikánsan rövidebb volt.

Humán papillomavírusok

A humán papillomavírusok a *Papillomaviridae* család Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- és Nu-papillomavírus nemzetségbe tartozó, körülbelül 55 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, burok nélküli vírusok. A vírusgenom megközelítőleg 8 kilobázispár hosszúságú, kettősszalú, cirkuláris DNS molekula, amely korai (early, E) és késői (late, L) átíró szakszakokat (ORF-eket), valamint egy nem kódoló régiót (long control region, LCR) tartalmaz (Bernard és mtsai, 2010; Doorbar, 2006; Fauquet és mtsai, 2005). A vírus (HPV16) sematikus felépítése a 2. ábrán látható.



2. ábra. A HPV16 (humán papillomavírus 16) genomjának sematikus felépítése.

A korai ORF-ek fehérjéi a vírus életciklusának korai szakaszában jelennek meg. Ezeknek a vírus replikációban, transzkripcióban (E1, E2; E4; E5), a virionok összeépülésében és sejtől történő kiszabadulásában (E4), valamint a sejtek transzformálásában (E5, E6, E7) van szerepe. Az E5 transzmembrán fehérje a fertőzött sejtek membránjában elhelyezkedő növekedési faktor receptorokat aktiválja. Az E6 fehérje a p53 fehérjét köti és fokozza az ubiquitin-mediált degradációjukat, így gátolja a DNS javítási folyamatát, illetve irreverzibilis DNS károsodás esetén az apoptózist. A C-terminális domén (PDZ) gátolja a normál sejtadhéziót, így hozzájárul a metasztázisok kialakulásához. Az E7 fehérje elsődleges szerepe, hogy a pRb (retinoblastoma) fehérjével komplexet képez, így az E2F faktor szabadon transzaktiválja a sejtproliferációjában résztvevő egyéb faktorokat. Az E7 protein emellett más sejtproliferációs faktorokkal (hisztón-deacetilázok, AP1 transzkripciós komplex, ciklin-dependens kináz inhibitor p21 és p27) is kapcsolatba lép (Bellanger és mtsai, 2011; Doorbar,

2006; Dyson és mtsai, 1989; Faridi és mtsai, 2011; McIntosh és mtsai, 2010; Scheffner és mtsai, 1990; Venuti és mtsai, 2011).

Az L1 ORF a fő kapszid fehérjét, az L2 ORF a kisebb struktúrfehérjét kódolja, ami a vírus nukleinsav kapszidba csomagolódást segíti (Doorbar, 2006; Modis és mtsai, 2002). Az LCR a papillomavírus genom virális replikációt és transzkripciót szabályozó szakasza (Doorbar, 2006; Ottinger és mtsai, 2009).

A *Papillomaviridae* család jelenleg öt nemzetségébe sorolják a humán papillomavírusokat. Az Alphapapillomavirus nemzetség tagjai közé tartoznak a genitális traktust, általában a nyálkahártyát, illetve a bőrt fertőző vírusok; ez utóbbiak jellemzően nem daganatkeltőek. A Betapapillomavirus nemzetség tagjai bőrt fertőző típusok, és csökkent immunvédekezésű egyéneknél vagy a genetikai okokra visszavezethető epidermodysplasia verruciformis nevű betegségben szenvedőkben okozhatnak bőrelváltozásokat, bőrrákot. A Gamma-, Mu- és Nupapillomavirus tagjai bőrszemölcsöket okozhatnak (Doorbar és mtsai, 2006). Bár az ICTV faji besorolásig tagolja a papillomavírusokat, az ezekkel a vírusokkal foglalkozó kutatók a HPV-ket genotípusokra, ezen belül variánsokra és szubtípusokra osztják, így egy HPV fajba több típus is tartozhat. Jelenleg legalább 120 HPV típus ismert, amelyeket daganatkeltő képességük alapján alacsony és magas onkogén kockázatú csoportokba sorolnak (Bernard és mtsai, 2010; Doorbar, 2006; Fauquet és mtsai, 2005; Köhler és mtsai, 2011). A magas kockázatú (high risk) típusok közé tartozik például a populációban igen elterjedt HPV16 és 18, az alacsony kockázatúak (low risk) közé a HPV6 és 11 (Faridi és mtsai, 2011).

A HPV átvitele bőrfelületek érintkezésével, nemi úton, vertikálisan az újszülött szülőcsatornán való áthaladásakor történhet, a bőr és nyálkahártya mikrosérülésein keresztül. A vírus szaporodási ciklusa a hámsejtek differenciálódásával függ össze. A bőr alsó rétegébe jutott vírusok a sejt életciklusának előrehaladtával először a korai géneket írják át és megindul a vírus replikáció, majd átíródnak a struktúrfehérjék és az összeszerelődött vírusok a felső bőrrétegben lévő sejtekkel a külvilágba jutnak. Produktív vírus fertőzés esetén a már differenciálódásnak indult sejtek esetében is újra elindulhat a sejtciklus. (Doorbar, 2006, Faridi és mtsai, 2011).

A magas kockázatú vírusok genomja az E1/E2 ORF területén felnyílva a gazdasejt genomjába épülhet. Mivel a vírusgenom felnyílása az E2 fehérje funkcióvesztését eredményezi, megszűnik az E2 fehérje negatív kontrollja az E6/E7 ORF promótere fölött, ami E6 és E7 fehérjék megnövekedett termelésével jár. A virális onkoproteinek kontrollálatlan expressziója malignus transzformációt eredményezhet. (Bellanger és mtsai, 2011, Doorbar, 2006; Faridi és mtsai, 2011).

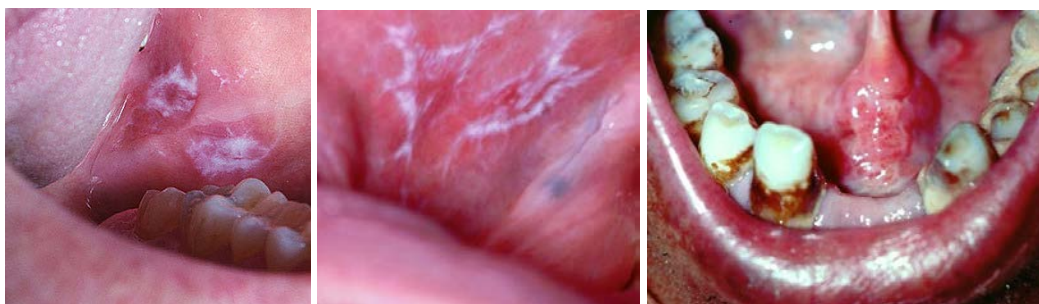
Az alacsony kockázatú vírusok genomja általában nem integrálódik a gazdasejt genomjába, így a termelődő E2 fehérje ki tudja fejteni szabályozó hatását az E6/E7 szakaszok promoterére. A transzformáló vírusfehérjék ebben az esetben is termelődnek, de a vírusfehérjék affinitása a tumorsuppresszor fehérjékhez kisebb, nem történnek drasztikus, malignus daganatok kialakulásához vezető genetikai és epigenetikai változások. Ezek a fertőzések elsősorban benignus elváltozásokat okoznak, sejtburjánzáshoz, szemölcsök kialakulásához vezetnek (Bellanger és mtsai, 2011, Doorbar, 2006).



3. ábra. Méhnyaki intraepithelialis lézió és méhnyakrák.

www.womenshealthsection.com; www.rightdiagnosis.com

A méhnyakrák világszerte vezető malignus elváltozás, amelyben a magas onkogén kockázatú HPV-ket az egyéb biológiai, kémiai és fizikai tényezők mellett közvetlen etiológiai tényezőként tartják számon, ugyanis az esetek legalább 90%-ában a HPV kimutatható. A HPV pozitív méhnyaki atípiás és méhnyakrákos esetek körülbelül 70%-ában a magas kockázatú HPV16 és 18 detektálható; emellett a HPV31, 33, 35, 45, 52 és 58 szintén gyakori típusok. A méhnyaki enyhe fokú rákmegelőző elváltozások (laphámsejtes intraepithelialis léziók) 50-70%-a, a súlyos fokú rákmegelőző elváltozások 70-90%-a HPV pozitív. A HPV prevalenciája az egészséges személyek méhnyaki mintáiban a 30%-ot is meghaladhatja (Clifford és mtsai, 2005; Faridi és mtsai, 2011; Smith és mtsai, 2007; Speich és mtsai, 2004; Tachezy és mtsai, 2011). Az alacsony kockázatú HPV típusok méhnyaki malignus daganatokban ritkán fordulnak elő, ezek elsősorban anogenitalis szemölcsöket és enyhe fokú intraepithelialis elváltozásokat okoznak. Az anogenitális szemölcsök (condyloma acuminatum) 80-90%-ában HPV6 és 11 mutatható ki (Tachezy és mtsai, 2011).



4. ábra. Oralis lichen planus, leukoplakia és laphámsejtes carcinoma.

www.dent.ucla.edu; www.doctorspiller.com; www.doctorspiller.com

A fej-nyaki régió laphámsejtes daganatainak - a szájüregi, oropharyngealis és gégetumorok -, valamint a premalignus elváltozásként is jellemzett szájüregi lichen planus és leukoplakia kialakulásában az ismert tényezők mellett (alkoholfogyasztás, dohányzás, rossz higiénés, táplálkozási, életmódbeli viszonyok, oralis lichen planus esetében az autoimmunitás) felmerült a HPV-k szerepe. A daganatok 20-100%-ában, a rákmegelőző elváltozások 20-30%-ában, míg egészséges kontroll személyek 0-10%-ában mutatták ki a vírust (a vizsgált régiótól, mintatípustól, detektáló módszertől függően). A HPV pozitív esetek 85-95%-ban a HPV16, kisebb arányban pedig alacsony kockázatú HPV-k (HPV6 és HPV11) is detektálhatóak (Pannone és mtsai, 2011; Syrjänen és mtsai, 2011). Alacsony kockázatú HPV-ket, főként HPV6-ot és HPV11-et nagy arányban mutattak ki benignus szájüregi és gége papillomatosisos, valamint gégetumoros betegekből. Juvenilis, recurrens légúti, oralis és genitális papillomatosishoz vezethet az újszülöttek fertőzése, ami a gyermek szülőcsatornán való áthaladásakor történhet az anya érintettsége miatt (Castro & Bussoliti Filho, 2006; Syrjänen, 2010). A szájüregi és az anogenitális régióban megjelenő HPV típusok eloszlása hasonló, ami a két régió sejttípusainak hasonlósága miatt lehetséges (Pannone és mtsai, 2011). A HPV fehérjéinek szerepe a tumorgenezis folyamatában méhnyaki sejtek és papillomák esetében jól modellezett, azonban a fej-nyaki régióban ezek a folyamatok és a HPV szerepe kevésbé ismertek.

Célkitűzések

Bár több betegségben feltételezik a TTV szerepét, döntő bizonyítékot a vírus direkt kóroki szerepére egy esetben sem találtak. Felmerült, hogy a HPV-hez hasonlóan bizonyos TTV genocsoportok, genotípusok, vagy szubtípusok patogén szereppel bírhatnak egyes betegségekben, vagy legalábbis szorosabban asszociáltak egy-egy szöveti típushoz (Maggi és mtsai, 2003a, 2003c, 2007; Okamoto és mtsai, 2001; Okamura és mtsai, 2000).

Munkacsoportunk hasonló következtetésre jutott egyes genocsoportú TTV kapcsán gégetumorok vizsgálatakor (Szládek és mtsai, 2005).

A fent említett adatok alapján a Ph.D. értekezés alapjául szolgáló tanulmányainkban az alábbi célokat tűztük ki:

- A gégetumor mellett más, HPV fertőzéssel feltételezhetően összefüggő daganat típusban, az adott régió rákmegelőző elváltozásaiban és kontroll csoportokban a TTV, illetve a ggr1TTV előfordulási gyakoriságának megállapítása.
- A vizsgált mintacsoportokban a ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakoriságának megállapítása és összehasonlítása.
- Daganatos betegekben a vírusok és vírus koinfekció túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata.
- A mintáinkban detektált ggr1TTV-k geno- és szubtípus meghatározása, azok előfordulásának összevetése a betegcsoportokban.
- A TTV geno- és szubtípusok földrajzi eloszlásának vizsgálata összevetve a szakirodalmi adatokkal.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegcsoportok

Tanulmányunkban 608 személy 904 mintáját vizsgáltuk. A szájüregi minták a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Fogorvostudományi Karának Arc-, Állcsont és Szájsebészeti, valamint Parodontológiai Tanszékeiről, a nőgyógyászati minták az Általános Orvostudományi Karának Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról származtak. Minden minta esetében rendelkezésre álltak a hisztopathológiai eredmények, a vizsgálatba bevont személyek beleegyező nyilatkozatai, valamint az intézményi etikai bizottsági engedély (száma: 2273-2004).

A szájüregi mintacsoport vizsgálatában 65 orális laphámsejtes carcinomában (OSCC) (51 férfi, 14 nő, 25-80 év, átlagéletkor 54,4 év), 44 orális leukoplakiában (OL) (14 férfi, 30 nő, 29-91 év, átlagéletkor 56,3 év) és 119 orális lichen planusban (OLP) (31 férfi, 88 nő, 23-79 év, átlagéletkor 55,0 év) szenvedő beteg anyagát vizsgáltuk. A szájüregi kontrollt 72 egészséges személy (19 férfi, 53 nő, 22-77 év, átlagéletkor 52,0 év) szájüregi exfoliált sejt mintája szolgáltatta. Az OSCC betegek esetében három minta állt rendelkezésre személyenként, egy kimetszett szöveti minta a tumorból, illetve exfoliált sejt minták az egészséges buccalis hámról és a nyelvről. Az OL és OLP betegeknél a lézióból és az egészséges nyálkahártya felszínéről vett exfoliált sejteket használtuk. Mintavétel előtt, a nyállal való kontamináció csökkentése érdekében a szájüreget kétszer kiöblítették fiziológiás sóoldattal.

A méhnyaki mintacsoportot 87 méhnyaki daganatos beteg (CC) (27-62 év, átlagéletkor 42,8 év) kimetszett tumoros szövetdarabja, 84 méhnyaki atípiában szenvedő beteg (ACM) (20-78 év, átlagéletkor 36,6 év) és 97 egészséges, tünetmentes személy (NCM) (18-62 év, átlagéletkor 38,6 év) exfoliált méhnyaki mintája alkotta.

A laryngealis mintacsoport laphámsejtes gégetumorban (LSCC) (n=25 férfi, 43-71 év, átlagéletkor 56,6 év), recurrens légúti papillomatosisban (RRP) (n=10, 8 férfi, 2 nő, 3-71 év, átlagéletkor 27,7 év) és malignizált gége papillomatosisban (MP) szenvedő betegek (n=5, 4 férfi, 1 nő, 43-66 év, átlagéletkor 55 év) kimetszett mintáiból állt. A laryngealis betegcsoportban a TTV és HPV kimutatására egy korábbi tanulmányban sor került (Szládek és mtsai, 2005). Jelen értekezésben a klinikai adatokat frissítettük és elvégeztük a TTV-k szekvencia analízisét. Az LSCC és malignizált gége papillomatosisban szenvedő betegek mintáit a TTV szekvencia vizsgálatok során összevonva, egy csoportban említjük laryngealis laphámsejtes carcinomaként (LSCC).

A tumoros betegcsoportok követési adatait a mintát szolgáltató egységek klinikai adatai alapján gyűjtöttük össze. Ezek az adatok mind a 65 OSCC és 25 LSCC beteg esetében elérhetőek voltak, míg a 87 CC beteg közül 63 esetben álltak rendelkezésre; a fennmaradó 24 CC beteg a diagnózis és műtét után többszöri megkeresésre sem jelentkezett a klinikán.

DNS izolálás

A tumor mintákat fagyasztott állapotban, steril dörzscsészében, kvarchomokkal homogenizáltuk, majd 1,5 ml TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) oldatban vettük fel. A mintákat ezt követően 30 percig -20°C -on fagyasztottuk, majd rázógépen rázatva (lassú fokozaton) kiolvasztottuk a sejtfeltárás hatékonyságának fokozására. A sejtszuspenziót a következő lépésben centrifugáltuk (13000 g, 15 perc, 4°C), majd 1 ml felülúszót új eppendorf-csőbe mértünk át. A homogenizátumot 100 μl kloroformmal összeráztuk és centrifugáltuk (12000g, 15 perc, 4°C). Az interfázisában lévő DNS-t 300 μl 96%-os etil-alkohollal kezeltük, és centrifugálást követően (2000 g, 5 perc, 4°C) az üledéket kétszer mostuk 0,1 M nátrium-citrát és 10%-os etanol keverékével (1-1 ml, legalább 30 perc mosási inkubációval; 2000 g, 5 perc, 4°C centrifugálási programmal). Ezt követően a DNS üledéket 75%-os etanollal mostuk, centrifugáltuk, majd szárítottuk. A DNS-t 300 μl 8 mM nátrium-hidroxid oldatban vettük fel, 0,1 M HEPES hozzáadásával a felülúszóban a pH-t 8,4-re állítottuk.

Az exfoliált sejteket tartalmazó citológiai kefe mintavevőket 1 ml PBS puffer (phosphate buffered saline) tartalmú csövekbe helyezték a kezelőorvosok a mintavételt követően. A laboratóriumban vortexelés után a mintavevő pálcát eltávolítottuk a pufferből. A pufferben maradt sejteket lecentrifugáltuk (400 g, 5 perc, 20°C), a sejtüledéket 150 μl TNE pufferben (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) szuszpendáltuk és 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe pipettáztuk. A TNE pufferben felvett sejteket 10 μl 10% SDS és 5 μl 10 mg/mL koncentrációjú proteináz K eleggyel emésztettük három órán át 50°C -on, majd 80 μl 5 M nátrium-klorid oldattal kezeltük, egy percig vortexeltük. Centrifugálás után (12000 g, 15 perc, 4°C) a felülúszóhoz 96%-os etil-alkoholt adtunk és -20°C -on 60 percig inkubáltuk, majd centrifugáltuk. Az üledéket 70%-os etanollal mostuk és újabb centrifugálást követően megszáritottuk. Az alkoholos oldat elpárolgása után 30 μl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) pufferben oldottuk vissza a DNS-t.

Polimeráz láncreakció

A PCR-ben használt primerek szekvenciáját és a PCR hőmérsékleti profilokat az 1. táblázat tartalmazza. A mintákból kinyert DNS minőségét minden esetben a humán β -globin gén 110 bp hosszúságú fragmentjének amplifikálásával ellenőriztük a PCO3 és PCO4 primerekkel. A PCR-t minden esetben - beleértve a HPV és TTV kimutatását is - 25 μ l reakció végtérfogatban végeztük az alábbi komponens térfogatokkal és koncentrációkkal: 100 μ M dNTP, 1-1 μ M primer, 2,5 μ l 10x GoTaq puffer, 1U GoTaq polimeráz (Promega, Madison, WI, USA). A β -globin és HPV-specifikus PCR végrehajtásához 2 μ l (0,1-0,3 μ g), a TTV-specifikus PCR-ek végrehajtásához 5 μ l minta DNS, vagy nested PCR esetében az első PCR kör amplifikátuma szolgált templátként. Minden PCR-t kétszer hajtottuk végre két független DNS izolálásból.

A felszaporított szakaszok elemzését agaróz gélelektroforézissel végeztük 0,05 μ g/ml etídium-bromid tartalmú 1,5%-os agaróz gélben, 60 percig elektroforetizálva 110 V feszültség mellett.

A HPV-k detektálása nested PCR-rel zajlott (Szládek és mtsai, 2005). Az első körben az MY09/MY11, a második körben GP5+/ GP6+ primerpárt használtuk. A HPV jelenlétét E7 ORF specifikus PCR-rel is ellenőriztük, amely a HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33 típusait amplifikálja (Evander & Wadell, 1991).

A TTV kimutatása két különböző nested PCR amplifikációval történt (Szládek és mtsai, 2005). Az UTR PCR a TTV nem kódoló régiójára illeszkedő primerpárokkal az összes TTV genotípus, míg az ORF1 PCR az ORF1 régióra illeszkedő primerekkel a ggr1TTV, azaz a TTV1 és TTV3 fajba tartozó vírusok kimutatására alkalmas. A nested UTR PCR során az első körben egy 142 bázis nagyságú szakaszt amplifikáltunk az NG133/NG147 primerekkel, a második körben egy 109 bázis hosszúságú szakaszt szaporítottunk fel az NG132/NG134 primerekkel. A seminested ORF1 PCR első körében 285 bázis hosszúságú szakaszt amplifikáltunk az NG059/NG063, második körében egy 270 bázis hosszú szakaszt szaporítottunk fel az NG061/NG063 primerekkel.

1. táblázat. A polimeráz láncreakcióban használt primerek szekvenciája és az alkalmazott hőmérsékleti profilok.

Primer neve, target	Primer szekvenciája	PCR hőmérsékleti profilja
PCO3, β -globin gén PCO4, β -globin gén	5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3' 5'-CAACTTCATCCACGTTACCC-3'	94°C 120 s 94°C 60 s 55°C 90 s 72°C 90 s 72°C 120 s } 30 ciklus
MY09, HPV MY11, HPV	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' 5'-GCMCAGGGWCATAAAYAATGG-3'	95°C 120 s 96°C 20 s 50°C 5 s 52°C 15 s 72°C 90 s 72°C 120 s } 40 ciklus
GP5+, HPV GP6+, HPV	5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3' 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'	95°C 120 s 94°C 60 s 48°C 90 s 72°C 90 s 72°C 120 s } 35 ciklus
NG133, TTV UTR NG147, TTV UTR	5'-GTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAG-3' 5'-GCCAGTCCCAGAGCCCGAATTGCC-3'	95°C 60 s 95°C 30 s 58°C 60 s 72°C 60 s 72°C 240 s } 30 ciklus
NG132, TTV UTR NG134, TTV UTR	5'-AGCCCGAATTGCCCTTGAC-3' 5'-AGTTTTCCACGCCCGTCCGCAC-3'	95°C 60 s 95°C 30 s 58°C 60 s 72°C 60 s 72°C 240 s } 25 ciklus
NG059, TTV ORF1 NG063, TTV ORF1 NG061, TTV ORF1	5'-ACAGACAGAGGAGAAGGCAACATG-3' 5'-CTGGCATTTTACCATTCCAAAGT-3' 5'-GGCAACATGYTRTGGATAGACTGG-3'	95°C 60 s 95°C 30 s 58°C 60 s 72°C 60 s 72°C 240 s } 1. körben 30, 2. körben 25 ciklus

HPV: humán papillomavírus; TTV: torque teno vírus; UTR: nem kódoló régió; ORF1: nyitott olvasási keret 1; M: A vagy C; R: A vagy G; W: A vagy T; Y: C vagy T.

Restrikciós fragment hossz polimorfizmus

A HPV genotipizálását a nested PCR első körének MY PCR termékeiből végeztük restrikciós fragment hossz polimorfizmus analízissel. Hat különböző restrikciós enzimmel és pontrendszer segítségével azonosítottuk a vírus típusát Kónya és munkacsoportjának tanulmánya alapján (Kónya és mtsai, 2000). Amennyiben az MY PCR termékei kevésnek bizonyultak, a nested PCR második körének GP PCR termékeit kezeltük restrikciós enzimekkel a HPV tipizálására (Borbély és mtsai, 2007).

Az eredmények statisztikai értékelése

Az PCR eredmények statisztikai összevetéséhez khi-négyzet próbát és Fisher-egzakt tesztet, a ggr1TTV, valamint a ggr1TTV-HPV koinfekció betegek túlélésére gyakorolt

hatásának felméréséhez Kaplan-Meier tesztet használtuk. Az elemzéseket az SPSS 15.0 for Windows statisztikai programmal végeztük. A konfidencia intervallum minden esetben 95% volt.

Szekvenálás és TTV törzsfa elemzés

Az ORF1 PCR pozitív minták amplimereit a gélelektroforézist követően az agaróz gélből QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. Amennyiben a kinyert amplimer mennyisége elegendő volt, azokat közvetlen szekvenálást követően elemeztük. A szekvenálásokat a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte ABI BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing kittel ABI 3100 Genetic Analyzer készüléken (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) az ORF1 PCR nested körének primereivel mindkét irányból. A szekvencia vizsgálatokat, a szekvencia illesztéseket és a vírustörzsfa elemzését CLC DNA Workbench 4.0 szoftver (CLC Bio, Aarhus, Denmark) segítségével hajtottuk végre. A törzsfák elkészítése „neighbour joining” módszerrel történt, a törzsfák validitását 1000 ismétlés alapján teszteltük. Minden sikeresen szekvenált szakasz egy közös, 187 bázis hosszú fragmentjét vetettük alá törzsfa analízisnek; a szekvenciák azon részét, ami nem állt minden minta esetében rendelkezésre, levágtuk. Azokat a szekvenciákat, illetve mintákat, amelyekben a szekvenálás alapján többszörös vírusfertőzés állt fenn, a további analízisből kizártuk.

Minden, egyszeresen TTV fertőzött mintából származó szekvenciát a BLAST kereső segítségével összehasonlítottunk a GenBank adatbázis szekvenciáival. A korábban elfogadott genocsoport/genotípus/szubtípus besorolás elvégzéséhez olyan ggr1TTV szekvenciákat töltöttük le az adatbankból, amelyek közel állnak saját szekvenciáinkhoz, amelyek besorolása ismert (egyes és kettes genotípus esetében a szubtípus is), valamint szekvenciája átfed az általunk vizsgált 187 bázis hosszú szakasszal. Amennyiben több ilyen szekvenciát találtunk alkalmasnak, a korábban leírt szekvenciát használtuk fel. A felhasznált referencia szekvenciák GenBank referencia számai: AF067975, AF212939, AB017767 (1a szubtípus); AB017769 (1b szubtípus); AF124007 (2' szubtípus); AB017770 (2a szubtípus); AF067974 (2b szubtípus); AF123996, AF212937 (2c szubtípus); AF123942 (3-as genotípus); AB017775 (4-es genotípus); AB017776 (5-ös genotípus); AB017777 (6-os genotípus). A genocsoport/genotípus/szubtípus besoroláshoz külcsoporthoz egy hármast genocsoportú szekvenciát használtunk, GenBank referencia száma: AY666122. A GenBank-ban fellelhető 44 magyar ggr1TTV részleges szekvenciát is letöltöttük a szubtípusok megállapítása és eredményeinkkel történő összevetés céljából; GenBank referencia számaik: AJ318994-

AJ319004, AJ344416-AJ344430, AJ510252-AJ510262, AF453572-AF453581. Ezek két különböző tanulmány szérumból kimutatott TT vírusok részleges szekvenciái (Szládek és mtsai, 2003, Takács és mtsai, 2003).

Mivel a TTV korábbi genocsoport/genotípus/szubtípus besorolása megváltozott, letöltöttük a jelenleg érvényben lévő Alphatorquevirus genus 29 fajának típussekvenciáját a GenBank adatbázisból és összevetettük genotípus/szubtípus referenciákkal, saját szekvenciáinkkal, illetve a többi magyar szekvenciával. A faji típus szekvenciák GenBank referencia számai: AB008394, AB049608, AY666122, AB041957, AF345523, AF435014, AF261761, AB054647, DQ187006, AB064607, AF345524, AB064605, AF345526, AB037926, AB028668, AB017613, AX025830, AX025718, AB025946, AB060594, AF348409, AX174942, AB049607, AB060597, AB041959, AB041958, AB064595, AB064598, AB038621. A 29 faj típus szekvenciáján kívül az adatbázisban más, új taxonómia szerint besorolt szekvenciát nem találtunk (az utolsó keresés dátuma 2011. szeptember). Az új taxonómia szerinti fajokba soroláshoz a Betatorquevirus genusba tartozó torque teno mini vírus típus szekvenciáját (GenBank referencia szám: NC014097) használtuk külcsoportként.

EREDMÉNYEK

A TTV előfordulási gyakorisága szájüregi mintákban

A TTV előfordulási gyakorisága a különböző szájüregi mintacsoportokban az UTR- és ORF1-specifikus PCR alapján a 2. táblázatban látható.

Szájüregi lézióból származó minták közül a TTV előfordulása UTR PCR alapján szignifikánsan magasabb volt OSCC betegekben, mint a többi szájüregi betegcsoportban ($p=0,002$, $p=0,001$ és $p=0,011$ a kontroll, OL és OLP csoporthoz képest). Egyéb összehasonlítás a léziók tekintetében nem járt szignifikáns különbséggel, a kontroll, OL és OLP csoportban a TTV gyakorisága hasonló. A betegcsoportok egészséges nyálkahártya felszínéről vett mintáiban a TTV előfordulása a kontroll csoporttól nem tért el jelentősen. A lézióból és az egészséges nyálkahártyákról vett mintákat betegcsoportonként összehasonlítva szignifikáns különbséget csak az OSCC betegek esetében találtunk ($p=0,003$).

ORF1 PCR alapján az OSCC és OLP betegek léziójában szignifikánsan magasabb volt a ggr1TTV előfordulási gyakorisága a kontroll csoporthoz képest ($p<0,001$ és $p=0,034$). Az OL és OLP léziók között a ggr1TTV prevalencia nem különbözött jelentősen, de mindkét esetben szignifikánsan alacsonyabb, mint OSCC-ben ($p=0,007$ és $p=0,01$). A ggr1TTV pozitívítási aránya az egészséges nyálkahártya felszínéről vett mintákban nem különbözött kiugróan a kontrollhoz és egymáshoz képest. A betegcsoportokon belül a lézióból és az egészséges nyálkahártyákról vett mintákat összehasonlítva szignifikáns különbséget csak az OSCC betegek esetében találunk ($p=0,036$).

HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció a szájüregi mintákban

A HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakorisága szájüregi mintákban a 2. táblázatban látható. A HPV prevalenciáját és genotipizálás eredményét szájüregi mintákban munkacsoportunk korábban megállapította (Szarka és mtsai, 2009). A HPV prevalencia minden betegcsoport lézióból származó mintáiban magasabb volt a kontroll csoporthoz képest ($p<0,001$ minden esetben), míg a lézióból származó mintákat egymással összevetve szignifikáns különbséget csak az OLP és OSCC csoportok között találunk ($p=0,047$). Az ép nyálkahártyáról vett minták HPV prevalenciája egymáshoz képest a lézióhoz hasonló mintázatot mutatott. A lézióból és egészséges nyálkahártyáról vett mintákat betegcsoportonként összevetve a léziókban minden esetben szignifikánsan magasabb a HPV előfordulása ($p<0,05$ minden összehasonlításban). A mintákban a magas kockázatú HPV genotípusok domináltak, elsősorban a HPV16 (Szarka és mtsai, 2009).

A kontroll csoportban ggr1TTV-HPV koinfekció nem fordult elő. A három szájüregi betegcsoport lézió mintái közül a koinfekció aránya csak OSCC esetében magasabb szignifikánsan a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,001$), OL és OLP esetében nem. A betegcsoportok egészséges nyálkahártyáról vett mintái és a kontroll csoport között nem volt különbség. Az OSCC betegek szöveti mintáiban szignifikánsan magasabb volt a koinfekció aránya a betegcsoport egészséges nyálkahártya mintáihoz képest ($p < 0,001$); OL és OLP esetében ilyen különbség nem állt fenn.

2. táblázat. A HPV, TTV, ggr1TTV és ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakorisága szájüregi mintákban.

	NOM (n=72)	OL (n=44)	OLP (n=119)	OSCC (n=65)
Prevalencia értékek lézióban				
HPV	-	40,9% (18/44)	32,8% (39/119)	47,7% (31/65)
TTV	-	54,5% (24/44)	53,8% (64/119)	78,5% (51/65)
ggr1TTV	-	4,5% (2/44)	10,1% (12/119)	24,6% (16/65)
ggr1TTV-HPV	-	4,5% (2/44)	6,7% (8/119)	12,3% (8/65)
Prevalencia adatok egészséges nyálkahártyában				
HPV	4,2% (3/72)	20,5% (9/44)	14,3% (17/119)	23,1% (15/65)
TTV	54,2% (39/72)	47,7% (21/44)	41,2% (49/119)	49,2% (32/65)
ggr1TTV	1,4% (1/72)	4,5% (2/44)	5,0% (6/119)	7,7% (5/65)
ggr1TTV-HPV	0,0% (0/72)	2,3% (1/44)	1,7% (2/119)	1,5% (1/65)

HPV: humán papillomavírus; TTV: torque teno vírus; ggr1TTV: egyes genocsoportú TTV; NOM: normál szájüregi nyálkahártya (kontroll csoport); OL: oralis leukoplakia; OLP: oralis lichen planus; OSCC: oralis laphámsejtes carcinoma

A TTV előfordulási gyakorisága méhnyaki mintákban

A TTV előfordulási gyakoriságát a méhnyaki mintákban UTR és ORF1 PCR alapján a 3. táblázat tartalmazza. UTR PCR alapján a TTV általános előfordulása szignifikánsan magasabb CC betegekben a kontrollhoz képest ($p = 0,018$), de a minták között semmilyen más összehasonlításban nem volt különbség.

A ggr1TTV előfordulási gyakorisága a kontroll csoportban alacsonyabb volt az ACM és CC mintákhoz képest, a különbség azonban nem szignifikáns. Az utóbbi két csoportban a ggr1TTV prevalenciája azonos volt.

HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció méhnyaki mintákban

A HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakoriságát méhnyaki mintákban a 3. táblázat tartalmazza. A HPV prevalenciája mind a CC, mind az ACM mintákban szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz képest, illetve a CC csoportban szignifikánsan magasabb az ACM csoporthoz képest is ($p < 0,001$ minden esetben).

A ggr1TTV-HPV koinfekció prevalenciája szignifikánsan magasabb a CC és ACM betegekben a kontrollhoz képest ($p < 0,001$ minden esetben), míg a két betegcsoport összehasonlítása jelentős különbséget nem mutatott.

3. táblázat. A HPV, TTV, ggr1TTV, ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakorisága méhnyaki mintákban.

	Kontroll csoport (n=97)	Méhnyaki atúpia (n=84)	Méhnyaki daganat (n=87)
HPV	27,8% (27/97)	66,7% (56/84)	95,4% (83/87)
TTV	78,4% (76/97)	83,3% (70/84)	90,8% (79/87)
ggr1TTV	20,6% (20/97)	29,8% (25/84)	29,9% (26/87)
ggr1TTV-HPV	3,1% (3/97)	20,2% (17/84)	29,9% (26/87)

HPV: humán papillomavírus; TTV: torque teno vírus; ggr1TTV: egyes genocsoportú TTV

A HPV típusok eloszlása mintacsoportonként a 4. táblázatban látható. Mindegyik csoportban a magas onkogén kockázatú típusok domináltak. A leggyakoribb típus a kontroll csoportban a HPV33, a másik két csoportban a HPV16 volt.

4. táblázat. A humán papillomavírus típusok eloszlása méhnyaki mintákban.

	Alacsony kockázatú HPV típusok									Magas kockázatú HPV típusok									nt	kf
	6	11	53	54	61	62	70	81	84	16	18	31	33	35	45	51	59	68		
NCM (27 beteg)	-	-	2	1	-	2	-	-	-	4	2	-	7	-	1	5	1	1	1	-
ACM (56 beteg)	2	2	2	-	1	-	1	1	2	22	-	3	2	1	-	2	-	-	17	2
CC (83 beteg)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	71	12	1	-	-	-	-	-	-	-	2

NCM: normál méhnyaki nyálkahártya; ACM: atípiás méhnyaki nyálkahártya; CC: méhnyaki carcinoma; nt: nem tipizálható minta; kf: kettős fertőzés

A TTV, ggr1TTV és ggr1TTV-HPV előfordulási gyakoriságának összevetése LSCC, OSCC és CC betegeken

A daganatos betegeken a vírusok előfordulási gyakoriságát az 5. táblázat tartalmazza. LSCC és OSCC betegeken a TTV és HPV prevalenciája jelentősen nem tért el, míg a ggr1TTV és a ggr1TTV-HPV koinfekció szignifikánsan magasabb arányú volt LSCC esetében. A gége- és méhnyaki tumoros minták összehasonlításakor statisztikai különbséget nem detektáltunk. Az OSCC és méhnyaki daganatos csoport összehasonlításakor a TTV általános előfordulási aránya szignifikánsan magasabb volt méhnyakrák esetében OSCC-hez képest, míg az egyes genocsoportú TTV előfordulási gyakorisága jelentősen nem különbözött. A ggr1TTV-HPV koinfekció méhnyakrákban szignifikánsan gyakoribb volt OSCC-hez képest. Ez azonban a magas HPV pozitivitási arálynak köszönhető a méhnyaki daganatokban, mivel a ggr1TTV fertőzött betegek mindegyike HPV fertőzött is.

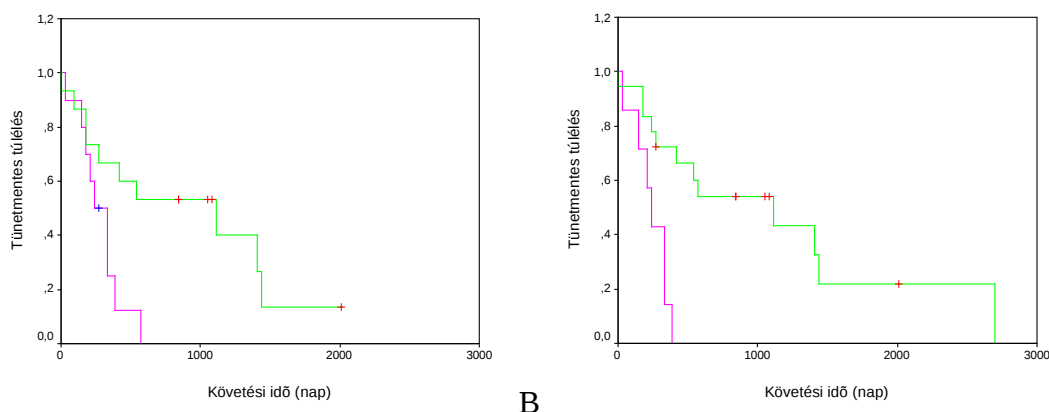
5. táblázat. TTV, ggr1TTV, ggr1TTV-HPV előfordulása a daganatos betegcsoportokban.

	LSCC (n=25)	OSCC (n=65)	CC (n=87)
TTV	88% (22/25)	78,5% (51/65)	90,8% (79/87)
ggr1TTV	44% (11/25)	24,6% (16/65)	29,9% (26/87)
ggr1TTV-HPV	32% (8/25)	12,3% (8/65)	29,9% (26/87)

TTV: torque teno vírus; ggr1TTV: egyes genocsoportú torque teno vírus; HPV: humán papillomavírus, LSCC: laryngealis laphámsejtes carcinoma; OSCC: orális laphámsejtes carcinoma; CC: méhnyaki carcinoma

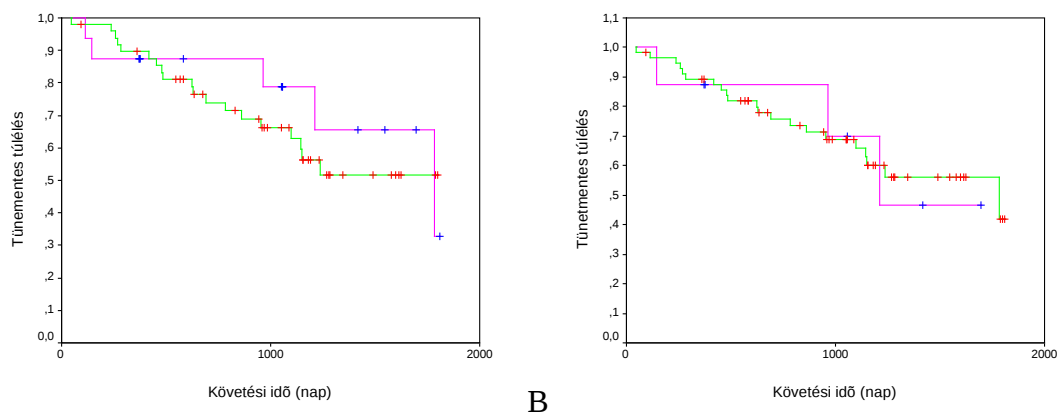
ggr1TTV és ggr1TTV-HPV koinfekció hatása a daganatos betegek túlélésére

Az LSCC betegek tünetmentes túlélését ggr1TTV fertőzés és ggr1TTV-HPV koinfekció esetében az 5. ábra mutatja. Az LSCC betegcsoportban a korábban közölt adatokat (Szládek és mtsai, 2005) frissítettük. A ggr1TTV-vel fertőzött és nem fertőzött LSCC betegek tünetmentes túlélési aránya és túlélési ideje szignifikánsan különbözött, a fertőzött betegek esetében mindkét tényező rosszabbul alakult [túlélési arány 9,1% (1/11 beteg) vs. 78,6% (11/14); átlagos túlélési idő 289,5 (190,9-388,2) nap vs. 1229,2 (659,6-1798,8) nap; $p=0,0052$]. A ggr1TTV-HPV koinfekció tovább csökkentette a túlélési arányt és túlélési időt azokhoz képest, akiknél együttes vírus előfordulás nem állt fenn [túlélési arány 0,0% (0/8) vs. 82,4% (14/17); átlagos túlélési idő 240,0 (148,4-331,6) vs. 1154,4 (638,8-1670,0) nap; $p=0,0017$].



5. ábra. Laryngealis laphámsejtes carcinomás betegek tünetmentes túlélése ggr1TTV fertőzés (A ábra) és ggr1TTV-HPV koinfekció (B ábra) esetében. A lila vonal az A ábrán ggr1TTV, a B ábrán a ggr1TTV-HPV vírussal fertőzött betegcsoport túlélését mutatja, a zöld vonal a ggr1TTV negatív (A ábra), és a koinfekcióban nem szenvedő betegek (B ábra) tünetmentes túlélését jelzi. ggr1TTV: egyes genocsoportú torque teno vírus; HPV: humán papillomavírus.

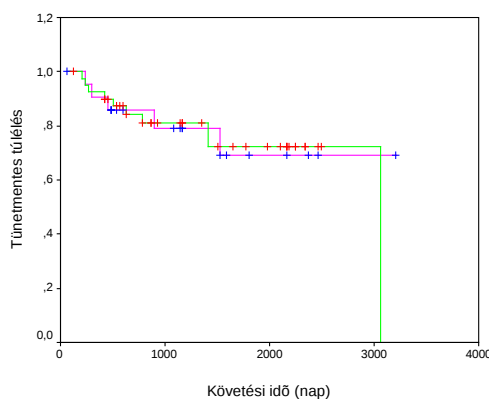
Az OSCC betegek tünetmentes túlélését ggr1TTV fertőzés és ggr1TTV-HPV koinfekció esetében a 6. ábra mutatja. A ggr1TTV fertőzés sem önmagában [túlélési arány 75,0% (12/16) vs. 71,4% (35/49); átlagos túlélési idő 1436,9 (1133,9-1739,9) nap vs. 1276,0 (1093,8-1458,1) nap; $p=0,59$], sem HPV fertőzéssel társulva [túlélési arány 62,5% (5/8) vs. 73,7% (42/57); átlagos túlélési idő 1262,2 (875,6-1648,9) nap vs. 1312,8 (1142,5-1483,1) nap; $p=0,88$] nem befolyásolta a betegek tünetmentes túlélését.



6. ábra. Oralis laphámsejtes carcinomás betegek tünetmentes túlélése ggr1TTV fertőzés (A ábra) és ggr1TTV-HPV koinfekció (B ábra) esetében. A lila vonal az A ábrán ggr1TTV, a B ábrán a ggr1TTV-HPV vírussal fertőzött betegcsoport túlélését mutatja, a zöld vonal a ggr1TTV negatív (A ábra), és a koinfekcióban nem szenvedő betegek (B ábra) tünetmentes túlélését jelzi. ggr1TTV: egyes genocsoportú torque teno vírus; HPV: humán papillomavírus.

A CC betegek tünetmentes túlélését ggr1TTV fertőzés és ggr1TTV-HPV koinfekció esetében az 7. ábra mutatja. A méhnyaki daganatos betegcsoportban 63 beteg követési adatait sikerült elemezni. A ggr1TTV pozitív és negatív betegek tünetmentes túlélési aránya között

nincs jelentős különbség [tünetmentes túlélés 77,3% (17/22) vs. 75,6% (31/41); átlagos túlélési idő 2480,1 (1930,6-3029,6) vs. 2419,9 (2037,4-2802,5) nap; $p=0,91$]. A magas HPV fertőzöttségi arány miatt (95,4%) minden ggr1TTV hordozó beteg HPV pozitív volt, így a koinfekció tünetmentes túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálatakor ugyancsak a fenti eredményeket kaptuk.



7. ábra. Méhnyaki daganatos betegek tünetmentes túlélése ggr1TTV és ggr1TTV-HPV fertőzés esetében. A lila vonal a ggr1TTV és ggr1TTV-HPV vírusokkal fertőzött betegcsoport túlélését mutatja, a zöld vonal a ggr1TTV és ggr1TTV-HPV negatív betegek tünetmentes túlélését jelzi. ggr1TTV: egyes genocsoportú torque teno vírus; HPV: humán papillomavírus.

A TTV-specifikus amplimerek szekvenálásának eredménye

A TTV szekvenciáját 73 beteg 83 mintájában sikerült megállapítani, ami összességében a ggr1TTV pozitív minták 59,7%-át jelenti. 17 beteg 18 mintája bizonyult többszörösen ggr1TTV fertőzöttnek, ezek közül az egyik beteg (OLP_172) egyszeresen fertőzött mintájában a TTV szubtípusa megállapítható volt (2b szubtípus). Az egyszeresen fertőzött mintából (57 beteg 65 mintája) származó szekvenciák egy közös 187 bázis hosszú szakaszát a GenBank adatbázisban rögzítettük (European Molecular Biology Laboratory, EMBL database; referenciaszámok: FN689730-FN689794).

A 29 TTV faj típusszekvenciáival való összevetés alapján minden meghatározott szekvenciánk az TTV1 fajba tartozik (8. ábra).

Saját mintáink TTV genotípus/szubtípus eloszlása az 6. táblázatban, a szekvenciáink rokonsági viszonyait bemutató vírus törzsfa a 9. ábrán látható. A kettes genotípusba tartozó szekvenciák, ezen belül a 2c (20 személy 21 mintája) és 2b (14 személy 16 mintája) szubtípusok voltak a leggyakoribbak, majd az egyes genotípusba tartozó szekvenciák (12 személy 12 szekvenciája 1b, 8 személy 10 szekvenciája 1a szubtípusú) következtek. Három személy három mintájának genetikai távolsága a 2b és 2c szubtípusoktól a genocsoport/genotípus/szubtípus besorolás szerint a genotípusokat elválasztó genetikai

távolság (0,3) értékéhez közelített. Ezek a szekvenciák a GenBank olyan kettes genotípusú szekvenciájához álltak közel, amelyet korábban betűvel nem jelöltek (GenBank referencia szám: AF124007), ezért tanulmányunkban ezeket a szekvenciákat 2' szubtípusként jelöltük a genotípus/szubtípus csoportok elkülöníthetősége érdekében. Három személy három mintája tartozott a hármas genotípusba, ezek genetikai távolsága a használt referenciától (GenBank referencia szám: AF123942) szintén nagy (0,21-0,23), ám ebben a genotípusban a szubtípusokra osztás eddig nem történt meg, így mi sem neveztünk meg ilyen kategóriákat.

6. táblázat. Torque teno vírus (TTV) genotípus/szubtípus eloszlás a fej-nyaki és méhnyaki mintacsoportokban.

	Szájüregi régió				Laryngealis régió		Méhnyaki régió			Összesen
	OSCC	OLP	OL	NOM	RRP	LSCC	NCM	ACM	CC	
Mintasza	195	238	88	72	11	32	97	84	87	904
Betegszá	65	119	44	72	10	30	97	84	87	608
ggr1TTV pozitív minták ^a	21(17)	18(14)	4(3)	1(1)	3(2)	21(19)	20(20)	25(25)	26(26)	139(127)
Nem meghatározott szekvenciák ^b	5(4)	6(6)	3(2)	1(1)	1(1)	9(9)	7(7)	13(13)	11(11)	56(54)
Szubtípus eloszlás										
Egyes genotípus	2(1)	4(4)	1(1)	-	-	3(2)	3(3)	2(2)	7(7)	22(20)
Szubtípus 1a	2(1)	-	-	-	-	2(1)	-	2(2)	4(4)	10(8)
Szubtípus 1b	-	4(4)	1(1)	-	-	1(1)	3(3)	-	3(3)	12(12)
Kettes genotípus	11(10)	4(4)	-	-	2(1)	5(4)	5(5)	6(6)	7(7)	40(37)
Szubtípus 2'	2(2)	-	-	-	-	1(1)	-	-	-	3(3)
Szubtípus 2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Szubtípus 2b	3(2)	2(2)	-	-	2(1)	-	3(3)	3(3)	3(3)	16(14)
Szubtípus 2c	6(6)	2(2)	-	-	-	4(3)	2(2)	3(3)	4(4)	21(20)
Hármas genotípus	1(1)	-	-	-	-	-	-	2(2)	-	3(3)
Többszörös fertőzés ^c	2(2)	4(3)	-	-	-	4(4)	5(5)	2(2)	1(1)	18(17)
Összes szekvenálás	16(13) ^d	12(8) ^e	1(1)	-	2(1)	12(10)	13(13)	12(12)	15(15)	83(73) ^{d,e}

OSCC: szájüregi laphámsejtes carcinoma; OLP: oralis lichen planus; OL: oralis leukoplakia; NOM: normál szájüregi nyálkahártya; RRP: visszatérő légúti papillomatosis; LSCC: gége carcinoma; NCM: normál méhnyaki nyálkahártya; ACM: atípiás méhnyaki nyálkahártya; CC: méhnyaki carcinoma; ggr1TTV: egyes genocsoportú torque teno vírus. A mintaszámhoz tartozó betegszá zárójelben látható a mintaszám mögött.

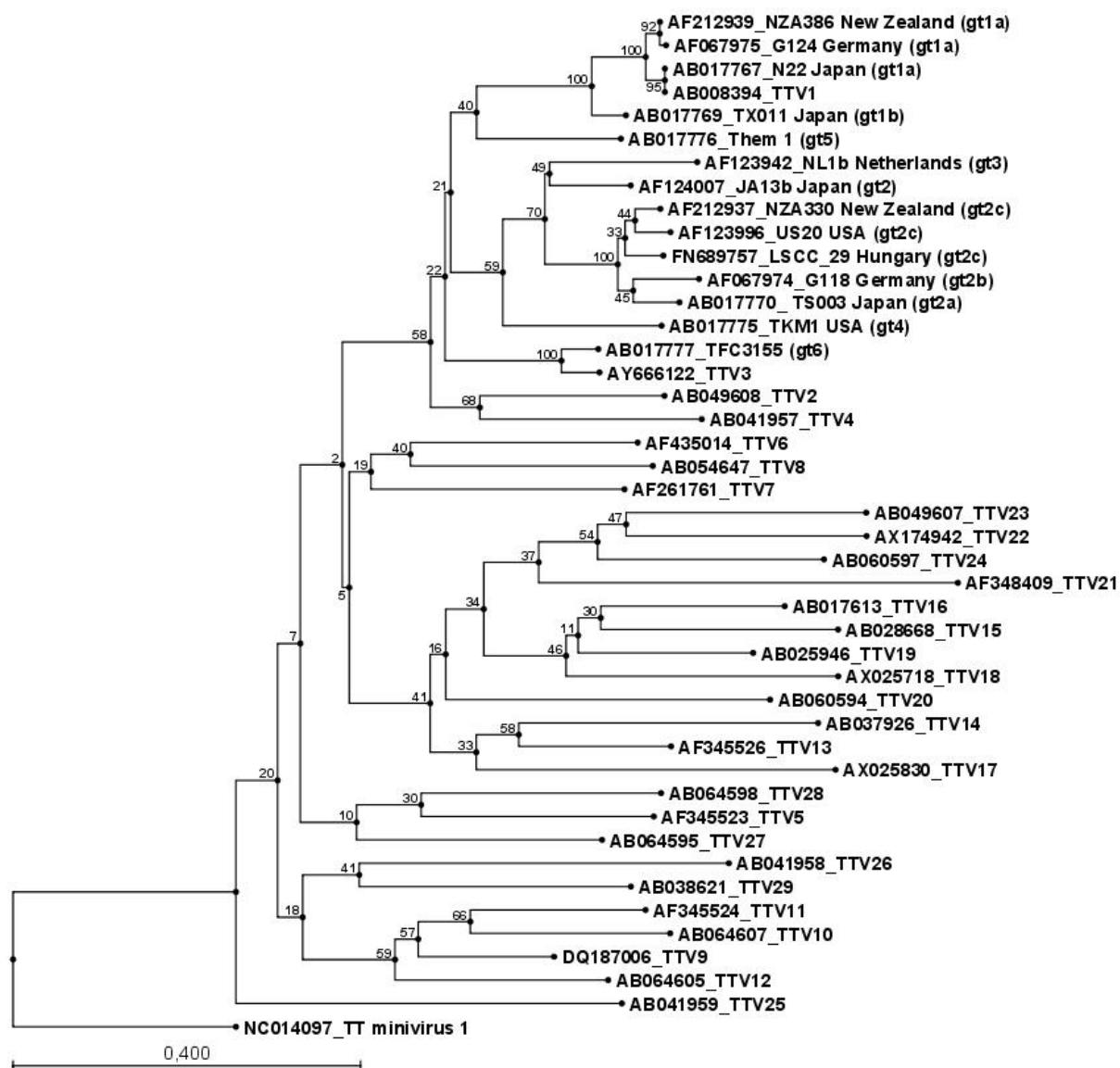
^a Tartalmazza azoknak a betegeknek a számát is szájüregi mintáknál, akinek csak az egészséges nyálkahártyája volt ggr1TTV pozitív.

^b ggr1TTV pozitív minták, amelyek szekvenálása ismétlés után sem sikerült (kevés amplimer).

^c Többszörösen, különböző szubtípusú TTV-vel fertőzött minták, amelyeknél az amplimerek szekvenálásával a szubtípusok nem elkülöníthetők.

^d Egy beteg (OSCC_20) két szekvenált mintája két különböző szubtípussal volt fertőzött (2c és 2').

^e Két beteg esetében (OLP_169 és OLP170) a két-két szekvenált minta különböző genotípusokkal volt fertőzött (OLP_169 esetében 1b és 2b, OLP_170 esetében 1b és 2c), egy betegnél pedig (OLP_172) az egyik minta 2b szubtípussal, a másik többszörösen fertőzött.



8. ábra. A torque teno vírus (TTV) fajok típus szekvenciáinak, a genotípus/szubtípus referenciák és saját mintáink vírus törzsfája részleges ORF1 szekvencia összehasonlítás alapján.

Nyolc beteg esetében volt lehetőségünk két különböző minta TTV szekvenciáját megállapítani (6. táblázat). Öt betegnél, akiknek több ORF1 amplimerjét szekvenáltuk, ugyanazt a szubtípust, míg három betegnél két különböző szubtípusú TTV-t detektáltunk a két mintában. Egy LSCC beteg egy időben, két külön területről vett két mintája (LSCC_46_A és LSCC_46_B) 1a, egy másik LSCC beteg két különböző időpontban (két év különbséggel) vett két mintája (LSCC_10 és LSCC_29) 2c, illetve egy légúti papillomatosissban szenvedő beteg két különböző időpontban (kilenc hónap különbséggel) vett mintája (RRP_41 és RRP_56) 2b szubtípusú TTV-t hordozott. Egy OSCC beteg két, egészséges nyálkahártyáról (szájüregből és nyelvről) vett mintája (OSCC_5_lin and OSCC_5_buc) 1a, egy másik beteg tumorból és egészséges nyálkahártyáról vett mintája (OSCC_62_tum and OSCC_62_buc) 2b

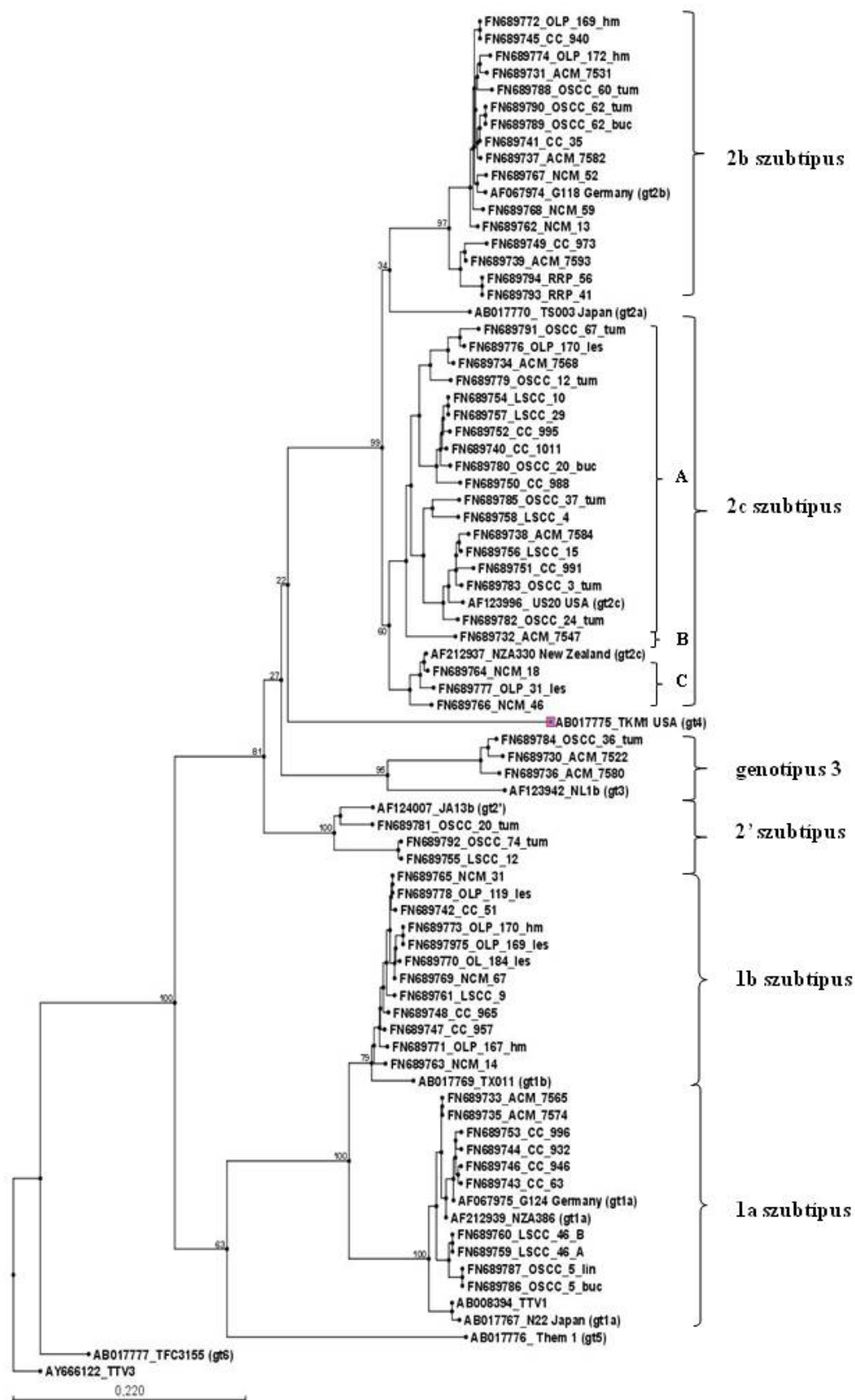
szubtípussal volt fertőzött. Egy OLP beteg léziójából (OLP_170_les) 2c, egészséges nyálkahártyájából (OLP_170_hm) 1b, egy másik OLP beteg léziójából (OLP_169_les) 1b, egészséges nyálkahártyájából (OLP_169_hm) 2b szubtípusú TTV-t azonosítottunk. Egy OSCC beteg tumorszövetében (OSCC_20_tum) 2', az egészséges szájüregi mintájában (OSCC_20_buc) 2c szubtípusú TTV volt jelen.

7. táblázat. A génbankban fellelhető egyes genocsoportú magyar, szérumból származó torque teno vírus szekvenciák genotípus/szubtípus eloszlása.

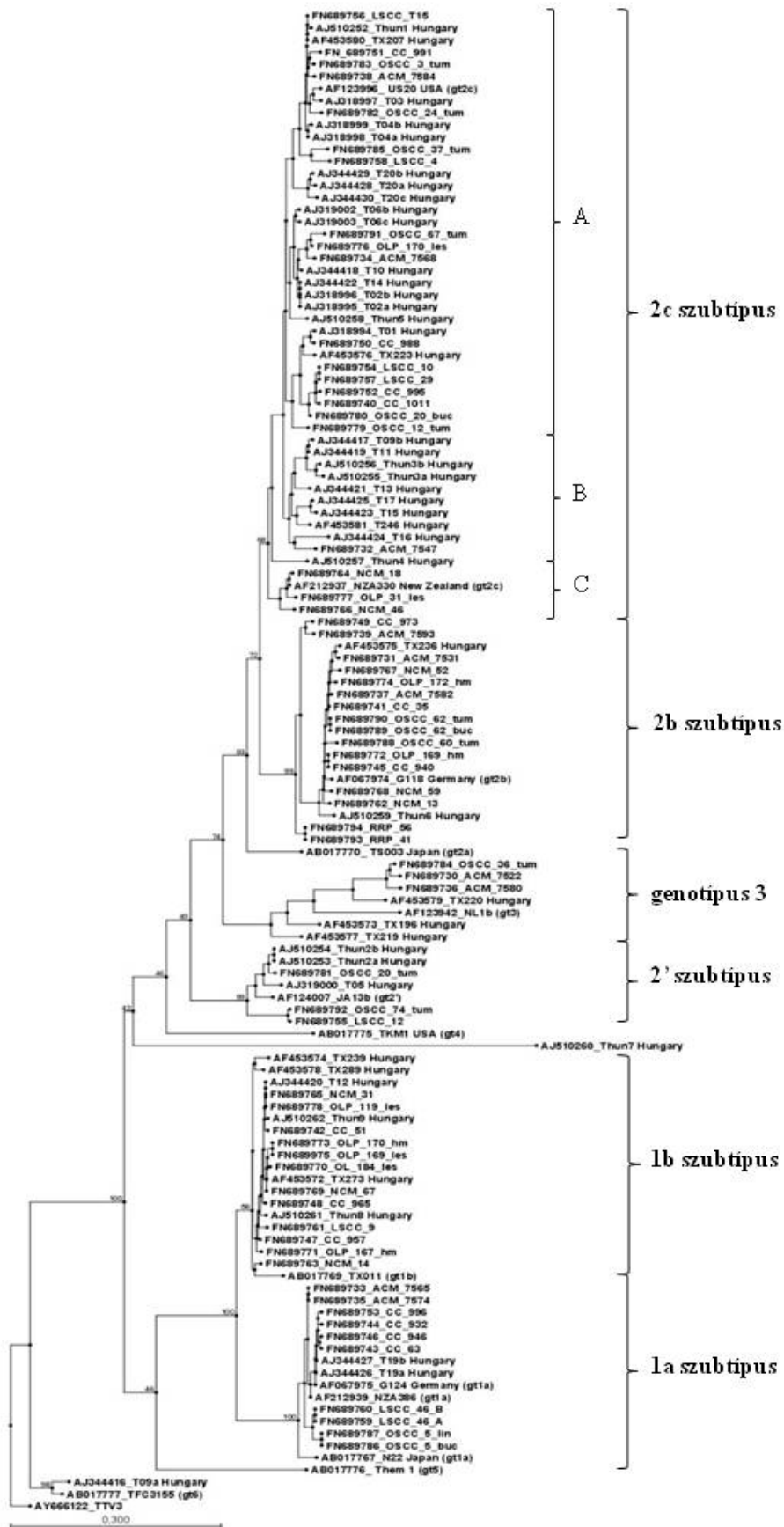
	Egészséges személyek	Hepatitiszes betegek	Vesetranszplantáltak	Összesen
Egyes genotípus	2(2)	3(2)	3(3)	8(7)
Szubtípus 1a	-	2(1)	-	2(1)
Szubtípus 1b	2(2)	1(1)	3(3)	6(6)
Kettes genotípus	8(6)	20(15)	4(4)	32(25)
Szubtípus 2'	2(1)	1(1)	-	3(2)
Szubtípus 2a	-	-	-	-
Szubtípus 2b	1(1)	-	1(1)	2(2)
Szubtípus 2c	5(4)	19(14)	3(3)	27(21)
Hármas genotípus	-	-	3(3)	3(3)
Hatos genotípus	-	1(1)	-	1(1)
Összesen	10(8)	24(17) ^a	10(10)	44(35) ^a

^aEgy hepatitiszes beteg (T09) szérumában két különböző genotípusú torque teno vírust mutattak ki (2c és 6), így összességében 34 beteg 44 mintája került tanulmányunkba.

A jelen tanulmány keretein belül szekvenált mintákon kívül a génbankban elérhető magyar ggr1TTV szekvenciák tipizálását is elvégeztük (10. ábra, 7. táblázat). A 44 szérum minta között a 2c szubtípus erős dominanciája figyelhető meg, az összes minta 61,4%-a, a kettes genotípusú TTV-k 95%-a tartozik ebbe a szubtípusba. A hepatitiszes betegek szérumában a legmagasabb a 2c szubtípus aránya (79,2%), 2b szubtípus ebben csoportban nem fordult elő. A 2b szubtípus alacsony számban fordult elő egészséges véradókban és a vesetranszplantáltakban is; a 2c szubtípus aránya ezekben a csoportokban is magas, 50,0% és 30,0%. Egyes genotípusú TTV a hepatitiszes betegekben volt jelen legkisebb arányban. A három hármas genotípusú TTV vesetranszplantáltak szérumából származik. Egy kettősen fertőzött hepatitiszes beteg mintájában a 2c szubtípus mellett hatos genotípusú TTV fordult elő, amely genotípus az ICTV javaslata (2009b) szerint, ORF1 szekvenciákon alapuló vírustörzsfa elemzés alapján a TTV3 fajba tartozik. Az általunk vizsgált mintákban, beleértve a 44 magyar ggr1TTV szekvenciát, négyes és ötös genotípusú TTV nem fordult elő.



9. ábra. A jelen tanulmány keretein belül szekvenált torque teno vírus (TTV) izolátumok törzsfája részleges ORF1 (nyitott olvasási keret 1) szekvenciák alapján.



10. ábra. Az adatbázisban fellelhető magyar, egyes genocsoportú torque teno vírus (TTV) szekvenciák törzsfa elemzése részleges ORF1 (nyitott olvasási keret 1) szekvenciák alapján.

A TTV szekvenciák genetikai diverzitása

A genetikai távolság saját mintáink tekintetében egy szubtípus/genotípus kategórián belül 0,00 és 0,13 között alakult. Az egyes genotípus 1a és 1b szubtípus csoportjain belül a genetikai távolság 0,00-0,03, a hármas genotípuson belül 0,02-0,04. A kettes genotípus három szubtípus csoportja igen diverz képet mutatott, a genetikai távolság 0,00-0,13 közötti érték, amely a 2c szubtípusú szekvenciák között a legnagyobb. A BLAST keresés szerint legközelebbi, ismert genotípusú/szubtípusú rokon szekvenciáktól, azaz a használt referencia szekvenciáktól a genetikai távolság az 1a és 1b csoportban 0,01-0,06, a kettes genotípus szubtípusain belül 0,01-0,11, a hármas genotípus esetében 0,21-0,23 közötti érték.

Az összes magyar minta tekintetében a legváltozatosabb a 2c szubtípus volt, a legnagyobb genetikai távolság 0,15 a szubtípus két genetikailag legtávolabbi mintája között. A 2c szubtípuson belül a 42 személy 48 TTV szekvencia három csoportot alkotott (cluster A, B, C; egy csoporton belül a genetikai távolság $\leq 0,10$), csoportonként 34, 10 és 4 szekvenciával, melyek közül 17, 1 és 3 a saját mintáinkból, a többi más magyar tanulmányokból származott (9. és 10. ábra) (Szládek és mtsai, 2003; Takács és mtsai, 2003). Mindhárom csoport különböző mintatípusokból származó szekvenciákból állt, azonban a B csoport 9 szérumból és csak 1 méhnyaki atípiából származó szekvenciát tartalmazott, az A csoportban pedig a saját minták nagy része (15/17) daganatos minta volt. A 2' szubtípus és hármas genotípus esetében is nagy a genetikai diverzitás, ám ezeken belül clusterekről a kis mintaszám miatt nem beszélhetünk. A hármas genotípusban egy OSCC és ACM mintából származó szekvencia állt közel egymáshoz, míg a szérumból származó minták genetikai értelemben ezektől távolabb estek. A felhasznált hármas genotípusú referencia szekvencia (GenBank referencia szám: AF123942) és a magyar szekvenciák között a genetikai távolság nagy, 0,21-0,28 közötti érték.

MEGBESZÉLÉS

A torque teno vírus felfedezése óta eltelt tizenöt évben számos munkacsoport vizsgálta különböző kórképekben a vírus szerepét, ám patogén tulajdonsága eddig nem bizonyosodott be (Okamoto, 2009). A humán papillomavírusok daganatkeltő hatásáról a méhnyaki és fejnyaki régióban azonban számtalan adat szól (Faridi és mtsai, 2011; Pannone és mtsai, 2011).

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmánya szerint a ggr1TTV és HPV szignifikánsan magasabb arányban fordult elő progresszív gégetumorban (malignizálódott vagy recidív) szenvedő betegek szövetmintáiban a nem progresszív tumoros betegek mintáihoz képest, a két vírus koinfekciója pedig kedvezőtlen hatással volt progresszív tumorok esetében a betegek túlélésére, ami a vírusok lehetséges kokarcinogén szerepét sugallja (Szládek és mtsai, 2005). A megfigyelés felvetette azt a kérdést, hogy más, HPV-vel összefüggésbe hozható daganat típus esetében lehet-e szerepe a ggr1TTV-nek, illetve a két vírus koinfekciójának, így tanulmányunkat kiterjesztettük a szájüregi és méhnyaki régió különböző elváltozásaira is (OSCC, OLP, OL, ACM, CC).

A TTV igen elterjedt az egészséges populációban, bár az irodalmi adatok összehasonlítása nehéz, mivel a detektáláshoz használt PCR primerek eltérő szakaszokat sokszoroznak fel, különböző az érzékenységük és specificitásuk. Az általunk is használt primerpárokat alkalmazó tanulmányokból összegyűjtött adatok alapján a ggr1TTV gyakorisága egészséges személyek, véradók szérumában Ázsiában 30%, Európában 16,3%, Magyarországon 19,3%. Az UTR primerekkel vizsgálva a TTV általános prevalenciája Ázsiát tekintve Japánban 97%, de Indiában csak 45,3%, Európát tekintve Olaszországban 87,5%, Csehországban 51,3%, Magyarországon 95% a TTV pozitív szérumok aránya (Al-Mozaini és mtsai, 2006; Asim és mtsai, 2010; Biagini és mtsai, 2006; Dai és mtsai, 2001; Devalle & Niel, 2004; Erensoy és mtsai, 2002; Forns és mtsai, 1999; Gallian és mtsai, 2000; Höhne és mtsai, 1998; Ikeda és mtsai, 1999; Kato és mtsai, 1999; Katsoulidou és mtsai, 2001; Krekulova és mtsai, 2001; Maggi és mtsai, 1999, 2003a, 2003c, 2005, 2007; Mushahwar és mtsai, 1999; Nakano és mtsai, 1999; Pár és mtsai, 2004; Parreira és mtsai, 2004; Saláková és mtsai, 2004; Takács és mtsai, 2003; Tanaka és mtsai, 2000b; Zehender és mtsai, 2001; Zhong és mtsai, 2001a). A fejnyaki és méhnyaki kontroll csoportjainkban a TTV prevalenciája igen változatos, a szájüregi kontroll csoportban a ggr1TTV gyakorisága 1,4%, méhnyaki normál mintákban 20,6%; a TTV általános előfordulása a szájüregi kontrollban 54,2%, a méhnyaki normál mintákban 78,4%. A fejnyaki csoportokban alacsonyabb, a méhnyaki mintákban a szérumhoz hasonló a TTV előfordulási aránya, bár az adatok nehezen összehasonlíthatóak a

minták, ezáltal az eltérő vírustermelő környezet és az alkalmazott módszerek különbségei miatt. A miénkkel ténylegesen összevethető fej-nyaki adatok a szakirodalomból hiányoznak. Saláková és csoportja (2009) az NG133/147 és NG132/134 nested primereket használta méhnyaki atípiás és egészséges kontroll minták TTV pozitivitásának detektálására. A normál minták 52,7%-a, az atípiás minták 74,7%-a volt TTV pozitív, ami az általunk kapott értékeknél (78,4% és 83,3%) alacsonyabb.

Méhnyaki mintáinkban a HPV előfordulási gyakorisága megfelel az irodalom alapján vártak (Clifford és mtsai, 2005; Faridi és mtsai, 2011; Smith és mtsai, 2007; Speich és mtsai, 2004; Tachezy és mtsai, 2011). A TTV általános előfordulása méhnyaki daganatos mintákban szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, míg a ggr1TTV előfordulása mindhárom méhnyaki csoportban hasonlóan alakult (a kontroll csoportban valamivel alacsonyabb a betegcsoportokhoz képest, de a különbség nem szignifikáns). A fej-nyaki régióban, az LSCC és OSCC betegekben a ggr1TTV aránya szignifikánsan magasabb volt a többi fej-nyaki betegcsoporthoz és kontrollhoz képest. Ezek szerint a ggr1TTV jelenléte a fej-nyaki régió elváltozásaival összefüggésben állhat, ezzel szemben a méhnyaki léziókkal valószínűleg nem; az általános TTV pozitivitásban mért különbségekből eredően a cervicalis régió és más TTV genocsoportok/genotípusok között azonban lehetséges kapcsolat. A méhnyaki csoportokban a TTV és ggr1TTV előfordulása is magasabb volt a szájüregi csoportokhoz képest. A magas TTV pozitivitás ebben a régióban arra is utalhat, hogy a méhnyaki nyálkahártya kedvezőbb környezeti feltételeket biztosít a TTV szaporodásához, mint a szájüreg nyálkahártyája. A méhnyaki daganatos minták esetében fontos megjegyezni, hogy a magas HPV pozitivitás miatt minden ggr1TTV pozitív minta HPV pozitív is. A ggr1TTV-HPV koinfekció arányát elsősorban ez határozza meg, és mivel a ggr1TTV pozitivitás a három méhnyaki csoportban nem tér el jelentősen, a ggr1TTV-HPV koinfekció jelentősége ebben a régióban nem valószínű. Mivel a ggr1TTV gyakorisága hasonló, és a TTV általános előfordulási gyakorisága mutatott különbséget a méhnyaki csoportok között, a kettes, hármas, négyes és ötös genocsoportok előfordulási arányát lenne érdemes esetleg tovább vizsgálni.

Több, szájüregi elváltozásokban szenvedő betegcsoportban is vizsgáltuk a TTV, a ggr1TTV és HPV előfordulási gyakoriságát. Szájüregi laphámsejtes carcinómában szenvedő betegekben a TTV, ggr1TTV, HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a szájüregi kontroll csoporthoz, illetve a betegek ép nyálkahártyájáról vett mintáiban tapasztaltnál képest. Ez a HPV mellett a ggr1TTV esetleges patogén szerepét is felveti ebben a csoportban. Összevetve a jelen értekezés és az LSCC

betegekkel foglalkozó korábbi tanulmányunk (Szládek et al., 2005) eredményeit, a HPV előfordulási gyakorisága OSCC és LSCC betegekben azonos (47,7% és 48%), a TTV, ggr1TTV és a ggr1TTV-HPV aránya azonban az OSCC betegcsoportban alacsonyabb az LSCC betegekéhez képest (OSCC esetében 78,5%, 24,6%, 12,3%, LSCC esetében 88%, 44%, 32%). Bár a HPV prevalenciája azonos a két csoportban, az alacsony kockázatú HPV fertőzések aránya LSCC betegek mintáiban meghaladja a magas kockázatú típusok arányát; OSCC esetében 12,9%, LSCC esetében 66,7% az alacsony kockázatú HPV típusok aránya. A recurrens légúti és malignizált légúti papillomatosisos betegekben a vártan megfelelően az alacsony kockázatú HPV típusok jellemzőek (100% és 50%). Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok (elsősorban HPV6 és HPV11) jelenléte gégetumorokban és papillomatosisban is ismert, bár LSCC betegek esetében ez az arány kiugróan magas a szakirodalmi adatokkal összevetve, ugyanis a magas kockázatú HPV-k, elsősorban a HPV16, ezekben a tumorokban is a leggyakoribb típus (Pannone és mtsai, 2011, Torrente és mtsai, 2011).

LSCC betegek esetében a progresszív tumorban szenvedő (metasztázisos vagy recidív) és a nem progresszív tumorban szenvedő betegek mintái külön csoportra bontva különbséget mutattak a vírusok előfordulási aránya és a túlélés tekintetében. A TTV, ggr1TTV, HPV és a koinfekció aránya is jóval magasabb volt a progresszív tumorban szenvedőkben; koinfekció csak ebben a csoportban fordult elő. Felvetődött, hogy ggr1TTV az LSCC progressziójában jut esetleg szerephez (Szládek és mtsai, 2005). Az OSCC és CC betegcsoportban a vírusfertőzések és a betegség progressziója között adataink alapján nem állt fenn összefüggés.

Az általunk vizsgált két, szájüregi premalignus lézióknak tekintett betegség közül a ggr1TTV aránya magasabb az autoimmunitáson alapuló OLP esetében a mechanikai irritáció miatt kialakuló OL-hez képest, míg a TTV és a ggr1TTV-HPV koinfekció aránya a két csoportban közel azonos. Rodríguez-Inigo és munkacsoportja (2001) az OLP és a TTV kapcsolatát vizsgálta. A TTV prevalenciája igen magas volt (85%), a vírus jelenlétét az epithelialis sejtekben immunhisztokémiai módszerekkel is kimutatták. Rotundo és munkacsoportja (2004) szignifikánsan nagyobb TTV pozitivitást detektált periodontitises betegek gyulladásos ínszövetében, mint egészséges egyéneknél. Lehetséges, hogy szájüregi régióban a ggr1TTV jelenléte az immunológiai változásokkal és a daganatos szövetek jelenlétével, nem pedig a karcinogenezis folyamatával áll összefüggésben.

A szájüregi betegcsoportok egészséges nyálkahártyából izolált általános TTV és ggr1TTV aránya nem tért el számottevően a szájüregi kontroll csoportban detektálttól. A TTV jelenléte a HPV-hez hasonlóan (Szarka és mtsai, 2009) a lézióra jellemző, ami szintén a ggr1TTV és a szájüregi elváltozások közötti összefüggésre utalhat.

A TTV jelenléte mononukleáris sejtekben ismert (Lopez-Alcorocho és mtsai, 2000; Maggi és mtsai, 2001; Zhong és mtsai, 2002). Esetünkben a szájüregi léziós minták tekintetében a ggr1TTV aránya magasabb OLP-ben a kontroll és OL mintákhoz képest, valamint méhnyaki mintákban az exfoliált sejteket tartalmazó mintákban a TTV aránya hasonló a daganatos szövetben mérthez. Amennyiben a mononukleáris sejtektől függene csak a TTV jelenléte, akkor a tumoros szövetekben a lymphocytá infiltráció miatt magasabb TTV arány lenne várható más léziós és a kontroll csoporthoz képest. Lehetséges, legalábbis részben, hogy a TTV előfordulása a daganatos szövetekben a szövetbe szűrődő mononukleáris sejteknek köszönhető, de nem magyarázza például OLP, NCM és ACM esetében a TTV előfordulási mintázatát, illetve LSCC esetében a rossz túlélési arányt. A TTV jelenléte a szájüreg epithelialis sejtjeiben és nyálban ismert (Chan és mtsai, 2001; Gallian és mtsai, 2000; Inami és mtsai, 2000; Matsubara és mtsai, 2000; Rodríguez-Inigo és mtsai, 2001), az epithelialis sejtek szolgálhatnak tehát a TTV forrásaként a fej-nyaki régióban.

Több tanulmány feltételezi a TTV geno- és szubtípusok esetleges szöveti preferenciáját (Maggi és mtsai, 2003a, 2003c, 2007; Okamoto és mtsai, 2001; Okamura és mtsai, 2000). Maggi és munkatársai (2003a) bronchopneumoniában szenvedő gyermekek orrváladékában magas TTV terhelést mértek, illetve egy négyes genocsoportba tartozó TTV-t (21-es genotípusú) mutattak ki leggyakrabban, ami más betegcsoportokban nem fordult jellemzően elő. Arra következtettek, hogy a TTV befolyásolhatja más faktorok által kiváltott betegségek súlyosságát, illetve hogy a detektált genotípus a bronchopneumoniával összefügghet. Sokan vizsgálták a TTV, mint koinfekciós ágens előfordulását, ami más patogén ágens hatását erősítheti. Így például gastritisben hármass genocsoportba tartozó TTV és *Helicobacter pylori* (Maggi és mtsai, 2003c), lymphomákban ggr1TTV és Epstein-Barr vírus (Garbuglia 2003), májbetegségekben ggr1TTV/TTV és HCV (Kao és mtsai, 2003; Moriyama 2001; Tokita 2001a, 2002; Zein és mtsai, 1999), illetve TTV, hepatitis B vírus és herpesvírus (Pineau 2000) koinfekció szerepe merült fel. Tényleges bizonyítékot a vírusok egymásra gyakorolt hatására még nem sikerült találni. Tekintetbe véve a fent említett adatokat elképzelhető, hogy a perzisztens TTV fertőzés (akár egyes genocsoportokra vagy genotípusokra vonatkozóan) és a vírus fokozott replikációja immunológiai változások és fennálló betegségek következménye, és bár önmagában nem okoz betegséget, azok progressziójában esetleg potencírozó hatást fejthet ki.

A különböző TTV-k szöveti és betegség preferenciájának különbségeit a vírusgenom szerkezeti és génexpressziós különbségeivel lehet magyarázni, ami a vírus patogenitására és a szervezet immunitására is hatással lehet. Több tanulmány foglalkozott a vírusok genetikai

változatosságával, a mutációk, intra- és intergenomi rekombinációk hatásával (Jelicic és mtsai, 2004, Leppik és mtsai, 2007), ami többek között az immunrendszer kikerülését segítheti. Egyes tanulmányok szerint a TTV ORF2 proteinje az NF- κ B útvonal gátlása által gátolhatja a gyulladásos választ (Zheng és mtsai, 2007), az interferon termelést és az interferonokhoz kapcsolódó génexpressziót. A csökkent interferon termelés és a gyulladásos válasz segítheti a HPV-t a nem produktív, perzisztens fertőzés létrehozásában, ami virális karcinogenezishez vezethet. Ilyen események magyarázhatják OSCC, LSCC és malignizált gége papillomatosisos betegcsoportokban a ggr1TTV-HPV koinfekció magasabb arányát szemben a benignus gége papillomatosisban tapasztalattal, illetve LSCC esetében a koinfekcióban szenvedők rosszabb túlélését (Szládek és mtsai, 2005).

A patogenetikai potenciállal is összefüggő genetikai eltérések más, a humán populációt fertőző vírusoknál is előfordulnak. A HPV-k genotípusai, ezen belül például a HPV16 intratípusos változatai eltérő daganatkeltő potenciállal bírnak (Yamada és mtsai, 1997). A HCV különböző genotípusainak patogén potenciálja és a genotípus eloszlás geográfiai különbségei szintén ismertek (Busek & Oliveira, 2003, Waheed és mtsai, 2009), ami az Epstein-Barr vírusra szintén jellemző. (Chang és mtsai, 2009; Kis és mtsai, 2009).

Mivel a vírus patogenitása a vírusok eltérő genomi szerkezetével összefüggésben állhat az eltérő génexpresszós mintázatnak köszönhetően, illetve különböző TTV genocsoportok, geno- és szubtípusok esetében felmerült a különböző kórképekkel való asszociáció lehetősége, megvizsgáltuk a TTV fajok, geno- és szubtípusok eloszlási mintázatát saját, és más magyarországi szekvenciák között a részleges ORF1 szekvenciák összehasonlításával. A korábbi genocsoport/genotípus/szubtípus besorolás alapján egyes genocsoportba tartozó TTV-k a jelenleg érvényben lévő taxonómia szerint a TTV1 (1-5 genotípus) és TTV3 (hatos genotípus) fajba tartoznak, amelyeket ezidáig alacsonyabb taxonómiai csoportokra nem bontottak. A szakirodalomban eddig az új faji besorolást nem használták, így az irodalmi adatokkal való összehasonlítás miatt a vírusok geno- és szubtípusok szerinti azonosítását is elvégeztük. Amennyiben tényleges összefüggés áll fenn a TTV geno- és szubtípusai, valamint az okozott betegségek között, a TTV1 fajon belüli diverzitásának vizsgálata és a korábbi genocsoport/genotípus/szubtípus osztályozás illesztése az új taxonómiai rendszerbe előrelépést jelenthet a vírus megismerésében. Adataink alapján a genotípus-szubtípus faj alatti kategorizálás adaptációja a TTV1 fajon belül könnyen megoldható. Ez segítheti az összehasonlítást a korábban leírt szekvencia és prevalencia adatok, valamint az új taxonómiai rendszer között. Tudomásunk szerint a jelen tanulmány

megírásához használt 2011-ben megjelent közleményünk az első, amelyik a korábbi és a jelenlegi taxonómiai kategóriákat összeveti.

Az összes adatbázisban fellelhető magyar ggr1TTV szekvenciát szubtípus/genotípus rendszerbe sorolva, anatómiai régiók alapján csoportosítva a fej-nyaki és a szérumban a mintázat hasonló, míg a méhnyaki szekvenciáké ezektől különböző. Az 1a szubtípus a fej-nyaki mintákban és a szérumban alacsonyabb számban fordul elő, mint a méhnyaki mintákban. A fej-nyaki régióban ez a szubtípus csak daganatos mintákban, szérumban pedig egy hepatitiszes egyénben volt jelen. Az 1b szubtípus az 1a-nál nagyobb arányú fej-nyaki és szérumban, míg a méhnyaki régióban az 1a és 1b szubtípusok ugyanakkora számban fordultak elő. Minden régióban a kettes genotípusú TTV volt a leggyakoribb. A 2b és 2c szubtípus aránya ugyanakkora cervicális mintákban, míg a 2c domináns a fej-nyaki és szérumban, illetve a 2' szekvenciák is csak ez utóbbi régiókban fordultak elő. A 44 szérumból származó szekvencia közül 32-ben (72,7%) kettes genotípusú TTV volt kimutatható, amiből 27 (61,4%) a 2c szubtípusba tartozik, a 27 2c szubtípusú izolátumból pedig 19 hepatitiszes betegekből származik. A különböző betegcsoportokban vizsgálva a geno- és szubtípusok eloszlását, a 2c szubtípus kiugró aránya hepatitiszesekben szembetűnő bármilyen más összehasonlítás mellett; a hepatitiszes minták 79,2%-a hordozta ezt a szubtípust. Ez a magas arány felveti annak lehetőségét, hogy a szérumban TTV forrásaként szolgáló sejtek esetleg ezzel a szubtípussal mutatnak szorosabb kapcsolatot, illetve hogy ez a szubtípus befolyásolhatja a hepatitis kialakulását vagy lefolyását, bár a feltételezések bizonyításához további vizsgálatok szükségesek.

A geno- és szubtípus mintázat vizsgálata és összehasonlítása az anatómiai régiók, illetve betegcsoportok között igen nehéz és összetett. A méhnyaki minták esetében az egész anatómiai régiót tekintve a szubtípusok eloszlása egyenletes, az 1a és 1b, illetve a 2b és 2c szubtípusok egyenlő arányban voltak jelen. Az egyes betegcsoportokat tekintve azonban eloszlási különbségek vannak. A kontroll csoportban 1a, az atípiás citológiájú csoportban 1b szubtípus nem fordult elő. Ebből a példából látszik, hogy egy csoport kiemelése a többivel szemben, például a szérumban használata referenciaként más anatómiai régióval történő összehasonlításban félrevezethető lehet az anatómiai régiók és betegség csoportok eloszlási mintázatának komplexitása miatt. Összehasonlításainkat nehezítette, hogy a különböző betegcsoportokban változó számú beteganyag állt rendelkezésre, néhány esetben alacsony mintaszámmal, ami általános probléma más TT vírussal foglalkozó tanulmányokban is. A mintavételezés is nehézségekbe ütközik sok esetben. Etikai okokból a minták közvetlenül nem felhasználhatóak, a léziós mintáknak szövettani vizsgálaton kell átesniük, a paraffinba

ágyazott minták DNS kihozatala alacsony, és nem elégséges minden esetben a vizsgálatok elvégzéséhez, egészséges személyeknél pedig invazív mintavételi eljárást nem lehet alkalmazni. Az LSCC és CC betegek esetében gyűjtött, egészséges nyálkahártyáról vett exfoliált sejtek az OSSC betegek mintáihoz hasonlóan hasznos információkat nyújtanának, ám ezekben az esetekben a terület anatómiai felépítése miatt nehéz kizárni a malignus területről származó epithelialis sejtek mintába kerülését. Prevalencia, genotípus és szubtípus eloszlási eredményeink összevetését a szakirodalmi adatokkal nehezíti, hogy a különböző munkacsoportok különböző eredetű mintákat, detektálási módszereket alkalmaznak és különböző genomszakaszok szekvenciáját közlik. A TTV általános vagy genocsoport szintű eloszlására, vagy a genotípus/szubtípus eloszlás meghatározására szekvenálással rengeteg primerpár létezik, amelyek érzékenysége és specifitása különböző. Így az irodalmi adatok (mind a prevalencia, mind a taxonómiai csoportok) összevetése egymással nehéz és nagy körütekintést igényel. A TTV esetében a nagy genomi diverzitás miatt ez a probléma különösen igaz, mivel minden genocsoport, illetve a különböző genocsoportba tartozó genotípusok esetében más szakasz amplifikálása és genetikai vizsgálata szükséges a pontos tipizáláshoz.

A szakirodalomból hiányoznak azok a közlemények is, amelyek nagyszámú egészséges személyben vizsgálják a ggr1TTV geno- és szubtípus eloszlását. Akad olyan közlemény, amelyik érdeklődésének középpontjában az egészséges véradók szérumában a TTV genocsoportok előfordulási gyakoriságának megállapítása állt, de azon belül a genotípus/szubtípus eloszlást nem vizsgálták és a mintaszám itt is viszonylag alacsony (Biagini és mtsai, 2006). Olyan tanulmány, ami nagyszámú mintában, megfelelő kontroll csoportokkal vizsgálja a betegcsoportokban a TTV geno- és szubtípus eloszlását, szintén alig található a közlemények között. A legtöbb tanulmány beteg- és kontroll csoportokban vizsgálta a TTV általános előfordulását, vagy kisebb mintaszámmal ORF1 PCR alapján a genotípus/szubtípus eloszlást (lásd alább). Azok a tanulmányok, amelyek genocsoport szintű eloszlást vizsgáltak, a ggr1TTV dominanciáját tapasztalták. A többszörösen, különböző genocsoportokkal fertőzött minták aránya magas, általában meghaladja az 50%-ot, és az egyes genocsoport mellett a hármas jelenléte általános (Biagini és mtsai, 2006; Devalle & Niel, 2004; Maggi és mtsai, 2003a, 2003c, 2005, 2007). Saját tanulmányunkban 73 ggr1TTV-vel fertőzött betegből 17-ben detektáltunk többszörös infekciót. Ennek aránya azonban valószínűleg magasabb lenne, ha a vizsgálatot az összes ismert genocsoportra/genotípusra kiterjesztenénk; a magas UTR PCR pozitivitási adatok esetünkben is arra utalnak, hogy a nem egyes genocsoportba tartozó genotípusok is magas arányban fordulnak elő.

Az elvégzett ggr1TTV törzsfa analízis alapján az egyes genotípus kategóriákon belül a genetikai diverzitás igen eltérő volt. Érdekes, hogy a ritkábban előforduló 2' szubtípus és hármas genotípus esetében az egyes szekvenciák eltérése megközelíti, illetve meghaladja a szubtípus szintű eltérés (0,15) határértékét, felvetve ezzel további szubtípusok létezését. Ennek különös jelentősége lehet a hármas genotípus esetén, ahol eddig szubtípusokat nem különítettek el. Az újabb szubtípusok létezésének megerősítésére azonban több szekvenciát vizsgáló átfogó tanulmány lenne szükséges; ráadásul eddigi genetikai és epidemiológiai ismereteink a hármas genotípusú TT vírusokról nem indokolják a csoport taxonómiai értelemben vett további bontását.

Számos kelet- és dél-ázsiai tanulmány közölte az egyes genotípus dominanciáját más TTV genotípusokkal szemben (Asim és mtsai, 2010; Dai és mtsai, 2001; Ikeda és mtsai, 1999; Kato és mtsai, 1999; Nakano és mtsai, 1999; Tanaka és mtsai, 2000b; Zhong és mtsai, 2001a). Ezek a tanulmányok a miénkhez hasonló szekvenciaszámmal dolgoztak; főleg a betegségek, és a TTV geno-, és szubtípusok közötti kapcsolatot vizsgálták, a földrajzi egységen belüli eloszlásra nem terjedt ki a vizsgálat. Bár minden területen az egyes genotípus a leggyakoribb, a szubtípus eloszlás ezen belül változatos: Kínában 1b (Zhong és mtsai, 2001a), Tajvanon (Dai és mtsai, 2001) és Indiában 1a (Asim és mtsai, 2010), Japánban változó, 1a és 1b dominanciával (Ikeda és mtsai, 1999; Kato és mtsai, 1999; Tanaka és mtsai, 2000b).

Más földrészekén és országokban sokszor csak a genotípusok vizsgálatára terjedt ki az analízis (Biagini és mtsai, 2006; Devalle & Niel, 2004; Maggi és mtsai, 2003a, 2003c, 2005, 2007), és csak kevés nagyobb számú szekvenciát feldolgozó, szubtípusokat is azonosító közlemény látott napvilágot (Gallian és mtsai, 2000; Maggi és mtsai, 1999; Mushahwar és mtsai, 1999; Saláková és mtsai, 2004). A miénkhez hasonló szubtípus eloszlást közöltek szérum mintákban, hasonló adatmennyiséggel egy cseh tanulmányban, ahol hozzánk hasonlóan az NG primereket használták (Saláková és mtsai, 2004). A 2c szubtípus magasabb arányát detektálták kisebb szekvenciaszám mellett Németországban (Höhne és mtsai, 1998), Törökországban (Erensoy és mtsai, 2002), Görögországban (Katsoulidou és mtsai, 2001), Szaúd-Arábiában (Al-Mozaini és mtsai, 2006), Portugáliában (Parreira és mtsai, 2004). Szintén a kettes genotípusú TTV dominanciáját írták le egy másik közleményben Csehországban (Krekulova és mtsai, 2001), Olaszországban (Zehender és mtsai, 2001), Spanyolországban (Forns és mtsai, 1999). Az európai adatoktól eltérő módon egy olasz tanulmányban az 1b szubtípus dominanciája volt kimutatható random választott, rutin virológiai vizsgálatra érkező szérumokban. A közleményből azonban nem derül ki, milyen háttérrel rendelkező betegek szekvenciáját tették közzé; az adatok alapján nem zárható ki egy

specifikus vírusfertőzéssel való összefüggés (Maggi és mtsai, 1999). Amerikából csak kevés adat származik. Az Amerikai Egyesült Államokban a kettes (2b, 2c szubtípus), majd az egyes genotípus (1a és 1b szubtípus) a leggyakoribb (Mushahwar és mtsai, 1999). Brazíliában az egyes genocsoport, ezen belül az egyes genotípus (1b, 1a szubtípus) és kettes genocsoport is jellemző (de Castro Amarante és mtsai, 2007; Devalle & Niel, 2004; Yokosuka és mtsai, 2000). Gallian és munkatársai (2000) az adatbázisból letöltött szekvenciák összevetésével, geográfiai egységekben vizsgálták a TTV eloszlását. Eszerint Ázsiában a legnagyobb az egyes genotípusú TTV aránya, de Európán kívül minden kontinensen domináns; Európában az egyes és kettes genotípus előfordulási aránya hasonló. A két fő genotípus mellett kisebb arányban a hármas genotípus is jelen van minden kontinensen.

Bár a kutatók által feldolgozott minták túlnyomó többsége - beleértve a fent említett tanulmányokat - szérumból származik, saját eredményeink az irodalmi adatok közé illesztve arra utalnak, hogy más vírusokhoz hasonló geográfiai különbségek TTV esetében is fennállhatnak. Úgy tűnik, hogy az 1a és 1b típusok leginkább a Távol-Keleten, a 2b és 2c típusok Európában dominálnak, bár mindegyik szubtípus mindegyik helyen jelen van, bizonyos esetekben akár nagyobb számban is. Érdekes, hogy a 2a szubtípus az európai mintákból gyakorlatilag teljesen hiányzik. A kettes mellett ritkább genotípusok is nagyobb számban fordultak elő néhány területen: a hármas genotípus Görögországban (Katsoulidou és mtsai, 2001), a négyes genotípus Spanyolországban (Forns és mtsai, 1999) és Portugáliában (Parreira és mtsai, 2004). A hármas genotípus, ha nem is kiemelkedő számban, de a magyar minták között is előfordult, egy OSCC, két ACM, illetve (a tíz vesetranszplantált személyből) három szérum mintában kimutatható volt.

A genetikai távolságok a szekvenciák közti páros összehasonlításokban változatosan alakultak, illetve az egyes betegségcsoportok mintáit fertőző TTV típusok több szubtípus csoportban jelen voltak. Gallian és munkatársai (2000) több száz, különböző országból származó szekvenciát vetettek össze egymással, és hasonló képet találtak a különböző genotípusokon belül, azaz minden ország minden genotípus csoportban képviselte magát. Érdekes azonban, hogy adott földrajzi területen egy szubtípuson belül a genetikai diverzitás alacsony volt. A magyar szekvenciák tekintetében az egyes genotípus szubtípusain belül nem voltak a minták között elkülönült clusterok. A kettes és hármas genotípusban a mintázat azonban igen heterogén, a genetikai távolságok nagyok két szekvencia között. A 2c szubtípus kategóriában (ahová a legtöbb magyar szekvencia tartozik) elkülönítettünk három clustert, amelyekben belül a genetikai távolság kisebb, mint 0,10. Az A clusterben saját mintáink tekintetében a daganatos mintákból származó szekvenciák voltak többségben (15/17), a B

clusterben pedig jellemző a szérumból származó szekvenciák jelenléte. Összevetve a cseh (Saláková és mtsai, 2004) és a hazai szekvenciákat, a genotípus/szubtípus eloszlási mintázat hasonló, jelentős különbségek, eltérő clusterek a taxonómiai egységeken belül nem voltak.

Új eredményeink röviden a következők:

- A TTV, ggr1TTV, ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulása szignifikánsan magasabb volt OSCC betegekben a többi szájüregi csoporthoz képest, valamint a ggr1TTV előfordulása magasabb OLP betegekben a kontroll csoporthoz képest. Az immunológiai változások, a daganatos szövetek jelenléte, vagy a karcinogenezis folyamata segítheti a vírus replikációját, és a vírus hozzájárulhat a betegségek kialakulásához és/vagy progressziójához ggr1TTV esetében.
- A TTV általános előfordulása a méhnyakrákban szenvedő betegekben szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, míg a ggr1TTV gyakorisága a három méhnyaki csoportban hasonlóan alakult, ami az egyes genocsoporttól eltérő víruscsoport szerepére utalhat.
- A TTV és ggr1TTV előfordulási gyakorisága a méhnyaki csoportokban magasabb volt a szájüregi csoportokhoz képest. Ez a mintázat a HPV előfordulására is igaz. A méhnyaki régió kedvező környezetet biztosít a TTV és HPV szaporodásához.
- OSCC és CC betegekben a ggr1TTV és ggr1TTV-HPV koinfekció nincs hatással a betegek tünetmentes túlélésére, szemben az LSCC betegekkal.
- Vírustörzsfa elemzés alapján az általunk vizsgált TTV szekvenciák a jelenleg érvényben lévő taxonómia szerint TTV1 fajba tartoznak. Az új taxonómiai besorolást tudomásunk szerint elsőként alkalmaztuk TTV esetében.
- A korábban elfogadott genocsoport/genotípus/szubtípus besorolás szerint mintáinkban a kettes genotípus, ezen belül a 2c szubtípus dominált, hasonlóan más európai tanulmányhoz. A genetikai diverzitás a kettes genotípuson belül nagyobb az egyes genotípushoz képest.
- A prevalencia és filogenetikai adatok ismeretében szájüregi és méhnyaki csoportjainkban a TTV, ggr1TTV és HPV jelenléte és a detektált vírus típusok között semmilyen összefüggés nem áll fenn.
- Az adatbázisból letöltött 44 magyar ggr1TTV szekvencia törzsfa elemzését is elvégeztük; a 2c szubtípus dominanciája szintén felismerhető, ami hepatitiszes betegekben a legszembetűnőbb.

Összefoglalva, az egyes genocsoportú (újabb besorolás szerint a TTV1 és 3 fajba tartozó) TTV-nek szerepe lehet a fej-nyaki régió tumorainak és/vagy premalignus

elváltozásainak kialakulásában és/vagy progressziójában önmagában, vagy HPV-vel koinfekcióban. A TTV szerepének megítéléséhez szükséges lehet az egyes geno- és szubtypusok meghatározása, így szerepük külön-külön vizsgálendő. Adataink arra is felhívják a figyelmet, hogy az egyes szubtypusok eloszlása valóban eltérő lehet a különböző szervekben és szövetekben, illetve a földrajzi és/vagy rasszhoz kötődő különbségek alapvetően befolyásolhatják a genotípus-szubtypus eloszlást a populációban; így a patogén szerep megítéléséhez a különböző populációkban és szövetekben tapasztalható genetikai diverzitás felmérése elengedhetetlen.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányban magasabb egyes genocsoportú TTV (ggr1TTV), humán papillomavírus (HPV) és ggr1TTV-HPV koinfekció arányt, és a vírusfertőzésekhez kapcsolatan rosszabb tünetmentes túlélést mutatott ki progresszív laryngealis laphámsejtes carcinomában szenvedő betegekben a nem progresszív tumorban szenvedőkhöz képest, ami arra utalhat, hogy a vírus, ha nem is oka a betegség kialakulásának, de súlyosbíthatja annak lefolyását. Jelen tanulmányunkban meghatároztuk a szájüregi és méhnyaki régiókból vett daganatos szöveti (oralis laphámsejtes carcinoma, méhnyaki carcinoma), exfoliált léziós (oralis leukoplakia, lichen planus, méhnyaki atípiá) és kontroll mintákban (szájüreg esetében a betegek ép nyálkahártya, illetve egészséges személyek mintái) a TTV általános, és a korábban egyes genocsoportba (ma TTV1 és 3 fajba) tartozó TTV-k előfordulási gyakoriságát, illetve a ggr1TTV szekvenciák genotípus/szubtípus eloszlását.

Eredményeink szerint az egyes genocsoportba tartozó vírusok számára a fej-nyaki régióban az immunológiai változások, a daganatos szövetek jelenléte, vagy a karcinogenezis folyamata segítheti a vírusok replikációját, és a vírusok hozzájárulhatnak a betegségek kialakulásához és/vagy progressziójához. A TTV általános előfordulása a méhnyakrákban szenvedő betegekben szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportokhoz képest, míg a ggr1TTV gyakorisága a három csoportban hasonlóan alakult, ami az egyes genocsoporttól eltérő vírusok szerepére utalhat. A TTV és ggr1TTV előfordulási gyakorisága a méhnyaki csoportokban magasabb volt a szájüregi csoportokhoz képest, hasonlóan a HPV-hez, ami arra utal, hogy a méhnyaki régió kedvező környezetet biztosít a vírusok szaporodásához.

Mivel több csoport összefüggést feltételez bizonyos TTV genocsoportok, genotípusok, szubtípusok, és bizonyos betegségek között, valamint a különböző TTV genotípusok különböző expressziós mintázattal rendelkeznek, a saját és az adatbázisban fellelhető magyar ggr1TTV szekvenciákat is törzsfa analízisnek vetettük alá és összehasonlítottuk a szakirodalmi adatokkal. Magyarországon a többi európai országhoz hasonlóan a kettes genotípusú TTV a leggyakoribb, ezen belül is a 2c szubtípus, ami a szérumból származó mintákban jellemző leginkább. A jelenleg érvényben lévő TTV taxonómia szerint szekvenciáink a TTV1 fajba tartoznak. A fajokon belül további felosztás, alacsonyabb taxonómiai kategória jelenleg nincs definiálva; a további tagolás azonban szükséges lehet, mivel a különböző geno- és szubtípusok különböző patogenetikai potenciállal rendelkezhetnek. A korábbi genotípus/szubtípus felosztás a leggyakoribb genotípusokat illetően átültethető lehet a jelenlegi faji kategóriába TTV1 esetében.

SUMMARY

An earlier study of our working group demonstrated that genogroup 1 torque teno virus (ggr1TTV) and coinfection with human papillomavirus (HPV) was associated with poorer survival in laryngeal carcinoma patients with progressing disease compared to patients without tumour progression. This suggests that the virus, if not a causative agent, may influence unfavourably the disease course. Present study determined the general prevalence of TTV, ggr1TTV (presently species TTV1 and TTV3) HPV (in cervical samples) and ggr1TTV-HPV coinfection as well as genotype and subtype distribution of genogroup 1 TTV sequences in samples from the oral cavity and from the region of the uterine cervix. Tumour tissue samples (oral squamous cell cancer, cervical cancer) and exfoliated cells from precancerous lesions (oral lichen planus, oral leukoplakia and cervical atypia) were collected together with exfoliated cells from apparently healthy mucosa of patients and from the control patients.

ggr1TTV was found to be associated with tumours and oral lichen planus in the head and neck region. The immunological alterations, the presence of the tumour tissue or the process of carcinogenesis support replication of the virus and genogroup 1 TTV may contribute to initiation or progression of the diseases. TTV prevalence was significantly higher in cervical cancer patients than in control samples, while prevalence of ggr1TTV was comparable in the three cervical groups, which may suggest a role of a TTV genogroup distinct from genogroup 1. Frequency of TTV as well as ggr1 TTV was higher in cervical than in head and neck samples and HPV showed a similar distribution, which may indicate that this region is ideal environment for replication of these viruses.

Several authors postulated association between certain TTV genogroups, genotypes or subtypes and certain diseases, and these may be explained by differences in gene expression patterns of different TTV genotypes. ggr1TTV sequences were determined from our positive samples and compared to Hungarian sequences available in the GenBank as well as to other published sequences. In Hungary, similarly to European data, subtype 2c TTV is the most prevalent, typically in serum samples. According to the novel, recently accepted TTV taxonomy, all sequences determined belong to species TTV1. Intraspecific classification is presently undefined, however, as shown for different genotypes, subgroups may differ in pathogenetic potential. The earlier classification of genotypes and subtypes may be directly applicable for intraspecific classification of the TTV1 species.

IRODALOMJEGYZÉK

Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Al-Mozaini MA, Al-Ahdal MN, Kessie G, Dela Cruz DM, Rezeig MA, Al-Shammary FJ. Molecular epidemiology and genotyping of TT virus isolated from Saudi blood donors and hepatitis patients. *Ann Saudi Med.* 2006;26:444-9.
2. Asim M, Singla R, Gupta RK, Kar P. Clinical & molecular characterization of human TT virus in different liver diseases. *Indian J Med Res.* 2010;131:545-54.
3. Ball JK, Curran R, Berridge S, Grabowska AM, Jameson CL, Thomson BJ, Irving WL, Sharp PM. TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol.* 1999;80:1759-68.
4. Bando M, Ohno S, Oshikawa K, Takahashi M, Okamoto H, Sugiyama Y. Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2001;95:935-42.
5. Bando M, Takahashi M, Ohno S, Hosono T, Hironaka M, Okamoto H, Sugiyama Y. Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer. *Respirology.* 2008;13:263-9.
6. Bellanger S, Tan CL, Xue YZ, Teissier S, Thierry F. Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res.* 2011;1:373-389.
7. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401:70-9.
8. Biagini P, Gallian P, Cantaloube JF, Attoui H, de Micco P, de Lamballerie X. Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. *J Med Virol.* 2006;78:298-304.
9. Biagini P. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009a;331:21-33.
10. Biagini P. on behalf of the Circoviridae-Anellovirus Study Group: Taxonomic proposal to the ICTV Executive Committee. 2009b.
11. Blazsek A, Sillo P, Ishii N, Gergely P Jr, Poor G, Preisz K, Hashimoto T, Medvecz M, Kárpáti S. Searching for foreign antigens as possible triggering factors of autoimmunity: Torque Teno virus DNA prevalence is elevated in sera of patients with bullous pemphigoid. *Exp Dermatol.* 2008;17:446-54.

12. Borbély AA, Murvai M, Szarka K, Kónya J, Gergely L, Hernádi Z, Veress G. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 2007;60:303-6.
13. Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genet Mol Res*. 2003;2:117-23.
14. Calcaterra S, Zaniratti MS, Serraino D, Peroni M, Abbate I, Cappiello G, Piselli P, Pavia C, Rezza G, Ippolito G, Capobianchi MR. Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. *J Hum Virol*. 2001;4:343-5.
15. Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72:272-82.
16. de Castro Amarante MF, Kashima S, Covas DT. TT virus (TTV) genotyping in blood donors and multiple transfused patients in Brazil. *Virus Genes*. 2007;35:503-9.
17. Chan PK, Chik KW, Li CK, Tang NL, Ming MS, Cheung JL, Ng KC, Yuen PM, Cheng AF. Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. *J Viral Hepat*. 2001;8:304-9.
18. Chang CM, Yu KJ, Mbulaiteye SM, Hildesheim A, Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res*. 2009;143:209-21.
19. Cheng J, Hada T, Liu W, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Amuro Y, Kubota A, Higashino K. Investigation of TTV by in situ hybridization in patients with chronic hepatitis. *Hepatol Res*. 2000;18:43-53.
20. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:1157-64.
21. Dai CY, Yu ML, Chuang WL, Wang CS, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chang WY. The molecular epidemiology and clinical significance of TT virus (TTV) infection in healthy blood donors from southern Taiwan. *Transfus Apher Sci*. 2001;24:9-15.
22. Dencs A, Hettmann A, Szomor KN, Kis Z, Takács M. Prevalence and genotyping of group 3 torque teno viruses detected in health care workers in Hungary. *Virus Genes*. 2009;39:39-45.
23. Deng X, Terunuma H, Handema R, Sakamoto M, Kitamura T, Ito M, Akahane Y. Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J Med Virol*. 2000;62:531-7.

24. Desai M, Pal R, Deshmukh R, Banker D. Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *J Med Virol.* 2005;77:136-43.
25. Devalle S, Niel C. Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. *J Med Virol.* 2004;72(1):166-73.
26. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci.* 2006;110:525-41.
27. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989;243:934-7.
28. Erensoy S, Sayiner AA, Türkoğlu S, Canatan D, Akarca US, Sertöz R, Ozacar T, Batur Y, Badur S, Bilgiç A. TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection.* 2002;30(5):299-302.
29. Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML, Mushahwar IK. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J Gen Virol.* 1999;80:1743-50.
30. Evander M, Wadell G. A general primer pair for amplification and detection of genital human papillomavirus types. *J Virol Methods.* 1991;31:239-50.
31. Fanci R, De Santis R, Zakrzewska K, Paci C, Azzi A. Presence of TT virus DNA in bone marrow cells from hematologic patients. *New Microbiol.* 2004;27:113-7.
32. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J.* 2011;8:269.
33. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy. The Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier; 2005. Family Papillomaviridae. pp. 239–255.
34. Figueiredo CP, Franz-Vasconcelos HC, Giunta G, Mazzuco TL, Caon T, Fernandes AL, Simões CM, Antunes VL, Niel C, Barardi CR. Detection of Torque teno virus in Epstein-Barr virus positive and negative lymph nodes of patients with Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007;48:731-5.
35. Fornai C, Maggi F, Vatteroni ML, Pistello M, Bendinelli M. High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like minivirus in cervical swabs. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2022-4.
36. Forns X, Hegerich P, Darnell A, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *J Med Virol.* 1999;59:313-7.

37. Gallian P, Biagini P, Zhong S, Touinssi M, Yeo W, Cantaloube JF, Attoui H, de Micco P, Johnson PJ, de Lamballerie X. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J Clin Virol.* 2000;17:43-9.
38. Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, Pignoloni P, Pulsoni A, Sourdís J, Pescarmona E, Vitolo D, Mandelli F. Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003;16:109-18.
39. Gergely P Jr, Pullmann R, Stancato C, Otvos L Jr, Koncz A, Blazsek A, Poor G, Brown KE, Phillips PE, Perl A. Increased prevalence of transfusion-transmitted virus and cross-reactivity with immunodominant epitopes of the HRES-1/p28 endogenous retroviral autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2005a;116:124-34.
40. Gergely P Jr, Blazsek A, Dankó K, Ponyi A, Poór G. Detection of TT virus in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann N Y Acad Sci.* 2005b;1050:304-13.
41. Gergely P Jr, Perl A, Poór G. Possible pathogenic nature of the recently discovered TT virus: does it play a role in autoimmune rheumatic diseases? *Autoimmun Rev.* 2006;6:5-9.
42. Gerner P, Oettinger R, Gerner W, Falbrede J, Wirth S. Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:1074-7.
43. Girard C, Ottomani L, Ducos J, Dereure O, Carles MJ, Guillot B. High Prevalence of Torque teno (TT) virus in classical Kaposi's sarcoma. *Acta Derm Venereol.* 2007;87:14-7.
44. Hafez MM, Shaarawy SM, Hassan AA, Salim RF, Abd El Salam FM, Ali AE. Prevalence of transfusion transmitted virus (TTV) genotypes among HCC patients in Qalubia governorate. *Virol J.* 2007;4:135.
45. zur Hausen H, de Villiers EM. TT viruses: oncogenic or tumor-suppressive properties? *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;331:109-16.
46. Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology.* 1999;260:17-22.
47. Hühne M, Berg T, Müller AR, Schreier E. Detection of sequences of TT virus, a novel DNA virus, in German patients. *J Gen Virol.* 1998;79:2761-4.
48. Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol.* 1999;30:205-12.

49. Inami T, Konomi N, Arakawa Y, Abe K. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2407-8.
50. Ishimura M, Ohga S, Ichiyama M, Kusuhara K, Takada H, Hara T, Takahashi M, Okamoto H. Hepatitis-associated aplastic anemia during a primary infection of genotype 1a torque teno virus. *Intern Med.* 2000;39:1068-70.
51. Jelcic I, Hotz-Wagenblatt A, Hunziker A, zur Hausen H, de Villiers EM. Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol.* 2004;78:7498-507.
52. Jiang XJ, Luo KX, He HT. Intrahepatic transfusion-transmitted virus detected by in situ hybridization in patients with liver diseases. *J Viral Hepat.* 2000;7:292-6.
53. Kamada K, Kamahora T, Kabat P, Hino S. Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology.* 2004;321:341-8.
54. Kamahora T, Hino S, Miyata H. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Virol.* 2000;74:9980-6.
55. Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. SEN virus infection in patients with chronic hepatitis C: preferential coinfection with hepatitis C genotype 2a and no effect on response to therapy with interferon plus ribavirin. *J Infect Dis.* 2003;187:307-10.
56. Kato T, Mizokami M, Orito E, Nakano T, Tanaka Y, Ueda R, Hirashima N, Iijima Y, Kato T, Sugauchi F, Mukaide M, Shimamatsu K, Kage M, Kojiro M. High prevalence of TT virus infection in Japanese patients with liver diseases and in blood donors. *J Hepatol.* 1999;31:221-7.
57. Katsoulidou A, Paraskevis D, Anastassopoulou CG, Chrysosou SE, Sypsa V, Boletis J, Malliori M, Karafoulidou A, Tassopoulos NC, Hatzakis A. Prevalence and genotypic distribution of TT virus in Athens, Greece. *J Med Virol.* 2001;65:423-9.
58. Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, Fukushi S, Mishiro S. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol.* 2000;61:165-70.
59. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press. 2011.
60. Kis A, Fehér E, Gáll T, Tar I, Boda R, Tóth ED, Méhes G, Gergely L, Szarka K. Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population. *Eur J Oral Sci.* 2009;117:536-40.

61. Koidl C, Michael B, Berg J, Stöcher M, Mühlbauer G, Grisold AJ, Marth E, Kessler HH. Detection of transfusion transmitted virus DNA by real-time PCR. *J Clin Virol.* 2004;29:277-81.
62. Kónya J, Veress G, Juhász A, Szarka K, Sápy T, Hernádi Z, Gergely L. Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. *J Clin Microbiol.* 2000;38:408-11.
63. Köhler A, Gottschling M, Manning K, Lehmann MD, Schulz E, Krüger-Corcoran D, Stockfleth E, Nindl I. Genomic characterization of ten novel cutaneous human papillomaviruses from keratotic lesions of immunosuppressed patients. *J Gen Virol.* 2011;92:1585-94.
64. Krekulova L, Rehak V, Killoran P, Madrigal N, Riley LW. Genotypic distribution of TT virus (TTV) in a Czech population: evidence for sexual transmission of the virus. *J Clin Virol.* 2001;23:31-41.
65. Lemey P, Salemi M, Bassit L, Vandamme AM. Phylogenetic classification of TT virus groups based on the N22 region is unreliable. *Virus Res.* 2002;85:47-59.
66. Leppik L, Gunst K, Lehtinen M, Dillner J, Streker K, de Villiers EM. In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. *J Virol.* 2007;81:9346-56.
67. López-Alcorocho JM, Mariscal LF, de Lucas S, Rodríguez-Iñigo E, Casqueiro M, Castillo I, Bartolomé J, Herrero M, Manzano ML, Pardo M, Carreño V. Presence of TTV DNA in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis. *J Viral Hepat.* 2000;7:440-7.
68. Maggi F, Fornai C, Morrica A, Casula F, Vatteroni ML, Marchi S, Ciccorossi P, Riente L, Pistello M, Bendinelli M. High prevalence of TT virus viremia in Italian patients, regardless of age, clinical diagnosis, and previous interferon treatment. *J Infect Dis.* 1999;180:838-42.
69. Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, Marchi S, Ricchiuti A, Pistello M, Bendinelli M. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol.* 2001;64:190-4.
70. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol.* 2003a;77:2418-25.
71. Maggi F, Pifferi M, Tempestini E, Fornai C, Lanini L, Andreoli E, Vatteroni M, Presciuttini S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M. TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases. *J Virol.* 2003b;77:9081-3.

72. Maggi F, Marchi S, Fornai C, Tempestini E, Andreoli E, Lanini L, Vatteroni ML, Bellini M, De Bortoli N, Costa F, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Relationship of TT virus and *Helicobacter pylori* infections in gastric tissues of patients with gastritis. *J Med Virol.* 2003c;71:160-5.
73. Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Fornai C, Vatteroni M, Pistello M, Presciuttini S, Bendinelli M. Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4807-10.
74. Maggi F, Andreoli E, Riente L, Meschi S, Rocchi J, Delle Sedie A, Vatteroni ML, Ceccherini-Nelli L, Specter S, Bendinelli M. Torquetenovirus in patients with arthritis. *Rheumatology.* 2007;46:885-886.
75. Maggi F, Focosi D, Albani M, Lanini L, Vatteroni ML, Petrini M, Ceccherini-Nelli L, Pistello M, Bendinelli M. Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. *J Virol.* 2010;84:6891-3.
76. Manni F, Rotola A, Caselli E, Bertorelle G, Di Luca D. Detecting recombination in TT virus: a phylogenetic approach. *J Mol Evol.* 2002;55:563-72.
77. Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Yano M, Akbar SM, Torisu M, Onji M. Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology.* 2000;43:16-9.
78. Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Kihana T, Yano M, Mori T, Onji M. Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatol Res.* 2001;21:280-287.
79. McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J. E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci.* 2010 Aug 15;123:2810-22.
80. McNearney T, Hornickova Z, Markham R, Birdwell A, Arens M, Saah A, Ratner L. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:10247-51.
81. Miyamoto M, Takahashi H, Sakata I, Adachi Y. Hepatitis-associated aplastic anemia and transfusion-transmitted virus infection. *Intern Med.* 2000;39:1068-70.
82. Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol.* 1999;73:3582-6.
83. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 2002;21:4754-62.
84. Moriyama M, Matsumura H, Shimizu T, Shioda A, Kaneko M, Miyazawa K, Miyata H, Tanaka N, Uchida T, Arakawa Y. Histopathologic impact of TT virus

infection on the liver of type C chronic hepatitis and liver cirrhosis in Japan. *J Med Virol.* 2001;64:74-81.

85. Moriyama M, Longren W, Zi-Yi Z, Oshiro S, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, Nakai K, Yamagami H, Kaneko M, Shioda A, Ichijima S, Iwaguchi K, Iwasaki H, Tanaka N, Arakawa Y. TT virus infection does not affect the clinical profiles of patients with hepatitis B and C in Yanbian City, China. *Intervirology.* 2003;46:214-21.
86. Mueller B, Maerz A, Doberstein K, Finsterbusch T, Mankertz A. Gene expression of the human Torque Teno Virus isolate P/1C1. *Virology.* 2008;381:36-45.
87. Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Dexai SM. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3177-82.
88. Nakagawa N, Ikoma J, Ishihara T, Yasui-Kawamura N, Fujita N, Iwasa M, Kaito M, Watanabe S, Adachi Y. Biliary excretion of TT virus (TTV). *J Med Virol.* 2000;61:462-7.
89. Nakano T, Park YM, Mizokami M, Choi JY, Orito E, Ohno T, Kato T, Kondo Y, Tanaka Y, Kato H, Kato T, Kim BS. TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Korea. *J Hepatol.* 1999;30:389-93.
90. Niagro FD, Forsthoefel AN, Lawther RP, Kamalanathan L, Ritchie BW, Latimer KS, Lukert PD. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol.* 1998;143:1723-44.
91. Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, Lorenzo FR, Shimosegawa T, Okamoto H. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J Gen Virol.* 2007;88:1939-44.
92. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241:92-7.
93. Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T, Sugai Y, Konishi K, Akahane Y, Ukita M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol.* 1999;73:9604-8.
94. Ohbayashi H, Tanaka Y, Ohoka S, Chinzei R, Kakinuma S, Goto M, Watanabe M, Marumo F, Sato C. TT virus is shown in the liver by in situ hybridization with a PCR-generated probe from the serum TTV-DNA. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16:424-8.

95. Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology Research*. 1998a;10:1-16.
96. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol*. 1998b;56:128-32.
97. Okamoto H, Kato N, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 1999a;57:252-8.
98. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology*. 1999b;259:428-36.
99. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Sugai Y, Sai T, Tanaka T, Tsuda F. Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000a;270:657-62.
100. Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, Kishimoto J, Hoshi Y, Mizuo H, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *J Virol*. 2000b;74:5161-7.
101. Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F, Yoshikawa A. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology*. 2001;288:358-68.
102. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;331:1-20.
103. Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X, Hayashi A, Ishiko H, Kobayashi K. Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J Med Virol*. 2000;62:104-8.
104. Ottinger M, Smith JA, Schweiger MR, Robbins D, Powell ML, You J, Howley PM. Cell-type specific transcriptional activities among different papillomavirus long control regions and their regulation by E2. *Virology*. 2009;395:161-71.
105. Pannone G, Santoro A, Papagerakis S, Lo Muzio L, De Rosa G, Bufo P. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agent Cancer*. 2011;6:4.
106. Pár A, Takács M, Brojnás J, Berencsi G, Paál M, Horányi M, Miseta A, Hegedüs G, Mózsik G, Hunyady B. Co-infections with hepatitis G and TT virus in patients with chronic hepatitis C in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2004;51:437-47.

107. Parreira R, Venenno T, Piedade J, Prieto E, Exposto F, Esteves A. Prevalence and partial characterization of genotypes of the human TT virus infecting Portuguese individuals. *Acta Trop*. 2004;91:197-203.
108. Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol*. 2002;147:21-41.
109. Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Marco ED, Fornai C, Vatteroni ML, Pistello M, Ragazzo V, Macchia P, Boner A, Bendinelli M. Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *J Infect Dis*. 2005;192:1141-8.
110. Pifferi M, Maggi F, Caramella D, De Marco E, Andreoli E, Meschi S, Macchia P, Bendinelli M, Boner AL. High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:804-8.
111. Pifferi M, Maggi F, Di Cristofano C, Cangiotti AM, Nelli LC, Bevilacqua G, Macchia P, Bendinelli M, Boner AL. Torquetenovirus infection and ciliary dysmotility in children with recurrent pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:413-8.
112. Pineau P, Meddeb M, Raselli R, Qin LX, Terris B, Tang ZY, Tiollais P, Mazzaferro V, Dejean A. Effect of TT virus infection on hepatocellular carcinoma development: results of an Euro-Asian survey. *J Infect Dis*. 2000;181:1138-42.
113. Qiu J, Kakkola L, Cheng F, Ye C, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Pintel DJ. Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone. *J Virol*. 2005;79:6505-10.
114. Rodríguez-Iñigo E, Casqueiro M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, López-Alcorocho JM, Herrero M, Manzarbeitia F, Oliva H, Carreño V. Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am J Pathol*. 2000;156:1227-34.
115. Rodríguez-Iñigo E, Arrieta JJ, Casqueiro M, Bartolomé J, López-Alcorocho JM, Ortiz-Movilla N, Manzarbeitia F, Pardo M, Carreño V. TT virus detection in oral lichen planus lesions. *J Med Virol*. 2001;64:183-9.
116. Rotundo R, Maggi F, Nieri M, Muzzi L, Bendinelli M, Prato GP. TT virus infection of periodontal tissues: a controlled clinical and laboratory pilot study. *J Periodontol*. 2004;75:1216-20.
117. Saláková M, Nemecek V, König J, Tachezy R. Age-specific prevalence, transmission and phylogeny of TT virus in the Czech Republic. *BMC Infect Dis*. 2004;4:56.

118. Saláková M, Nemecek V, Tachezy R. TTV and HPV co-infection in cervical smears of patients with cervical lesions. *BMC Infect Dis.* 2009;9:118.
119. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63:1129-36.
120. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol.* 2004;85:3173-88.
121. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007;121:621-32.
122. Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area. *J Med Microbiol.* 2004;53:125-8.
123. Stanley J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Vet Microbiol.* 2004;98:121-9.
124. Suzuki F, Chayama K, Tsubota A, Akuta N, Someya T, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Pathogenic significance and organic virus levels in patients infected with TT virus. *Intervirology.* 2001;44:291-7.
125. Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li TC, Matsuura Y, Mishihiro S, Miyamura T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J Virol.* 2004;78:10820-4.
126. Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS.* 2010;118:494-509.
127. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 2011;17:58-72.
128. Szarka K, Tar I, Fehér E, Gáll T, Kis A, Tóth ED, Boda R, Márton I, Gergely L. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:314-8.
129. Szládek G, Juhász A, Asztalos L, Szöke K, Murvai M, Szarka K, Veress G, Gergely L, Kónya J. Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients. *Arch Virol.* 2003;148:841-51.
130. Szládek G, Juhász A, Kardos G, Szöke K, Major T, Sziklai I, Tar I, Márton I, Kónya J, Gergely L, Szarka K. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol.* 2005;58:402-5.

131. Tachezy R, Smahelova J, Salakova M, Arbyn M, Rob L, Skapa P, Jirasek T, Hamsikova E. Human papillomavirus genotype distribution in Czech women and men with diseases etiologically linked to HPV. *PLoS One*. 2011;6:e21913.
132. Takács M, Balog K, Tóth G, Balogh Z, Szomor KN, Brojnás J, Rusvai E, Minárovits J, Berencsi G. TT virus in Hungary: sequence heterogeneity and mixed infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;35:153-7.
133. Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, Mishiro S. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol*. 2000;145:979-93.
134. Takata Y, Kurokawa H, Fukuda J. Transfusion transmitted virus (TTV) in dental patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003;32:184-7.
135. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Nakano T, Kato T, Kato H, Mukaide M, Park YM, Kim BS, Ueda R. New genotypes of TT virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *FEBS Lett*. 1998;437:201-6.
136. Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Nakano T, Hayashi K, Kato T, Mukaide M, Iida S, Mizokami M. Identification of a novel 23kDa protein encoded by putative open reading frame 2 of TT virus (TTV) genotype 1 different from the other genotypes. *Arch Virol*. 2000a;145:1385-98.
137. Tanaka Y, Hayashi J, Ariyama I, Furusyo N, Etoh Y, Kashiwagi S. Seroepidemiology of TT virus infection and relationship between genotype and liver damage. *Dig Dis Sci*. 2000b;45:2214-20.
138. Tanaka T, Kuroda K, Kobayashi M, Sato K. Detection and typing of TT virus DNA genotype by the PCR-RFLP method. *Mol Cell Probes*. 2001;15:195-200.
139. Tawara A, Akahane Y, Takahashi M, Nishizawa T, Ishikawa T, Okamoto H. Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278:470-6.
140. Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Hebisawa A, Takahashi M, Okamoto H. Influence of TT virus on the histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2001a;19:197-211.
141. Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H. Influence of TT virus infection on the thrombocytopenia of patients with chronic liver disease. *Hepatol Res*. 2001b;20:288-300.
142. Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H. High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Med Virol*. 2002;67:501-9.

143. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, Olofsson J, Ferlito A. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck*. 2011;33:581-6.
144. Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis*. 1999;179:1245-8.
145. Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY, Shih JW, Donahue P, Primi D, Alter HJ. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology*. 2001a;33:1303-11.
146. Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Yeo AE, Shih JW, Orii K, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K. Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *J Infect Dis*. 2001b;184:1246-51.
147. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*. 2011;10:140.
148. de Villiers EM, Borkosky SS, Kimmel R, Gunst K, Fei JW. The diversity of torque teno viruses: in vitro replication leads to the formation of additional replication-competent subviral molecules. *J Virol*. 2011;85:7284-95.
149. Waheed Y, Shafi T, Safi SZ, Qadri I. Hepatitis C virus in Pakistan: a systematic review of prevalence, genotypes and risk factors. *World J Gastroenterol*. 2009;15:5647-53.
150. Worobey M. Extensive homologous recombination among widely divergent TT viruses. *J Virol*. 2000;74:7666-70.
151. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997;71:2463-72.
152. Yokosuka O, Ikeuchi T, Kanda T, Kawai S, Imazeki F, Saisho H, Mazzalli M, Filho GA, Nishimura NF, Soares EC. The prevalence of TT virus infection in renal transplant recipients in Brazil. *Transplantation*. 2000;70:1194-7.
153. Zehender G, Manzin A, De Maddalena C, Colasante C, Solforosi L, Corsi F, Bianchi-Bosisio A, Girotto M, Schirru I, Russo U, Galli M, Clementi M. Molecular epidemiology of TT virus in Italy and phylogenesis of viral isolates from subjects at different risk for parenteral exposure. *J Med Virol*. 2001;63:76-84.
154. Zein NN, Arslan M, Li H, Charlton MR, Gross JB Jr, Poterucha JJ, Therneau TM, Kolbert CP, Persing DH. Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:3020-7.

155. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, Kong L, Wang W, Zeng Y, Ye L, Wu Z, She Y, Zhou X. Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkappaB kinases. *J Virol.* 2007;81:11917-24.
156. Zhong S, Yeo W, Lin CK, Lin XR, Tang MW, Johnson PJ. Quantitative and genotypic analysis of TT virus infection in Chinese blood donors. *Transfusion.* 2001a;41:1001-7.
157. Zhong S, Yeo W, Tang MW, Lin XR, Mo F, Ho WM, Hui P, Johnson PJ. Gross elevation of TT virus genome load in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2001b;945:84-92.
158. Zhong S, Yeo W, Tang M, Liu C, Lin XR, Ho WM, Hui P, Johnson PJ. Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *J Med Virol.* 2002;66:428-34.



Iktatószám: DEENKÉTK /100/2012.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Fehér Enikő

Neptun kód: GQ6MU6

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fehér, E.**, Kardos, G., Gáll, T., Kis, A., Gergely, L., Szarka, K.: Comparison of diversity of torque teno virus 1 in different mucosal tissues and disorders.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58 (4), 319-337, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.58.2011.4.8>
IF:0.625 (2010)
2. **Fehér, E.**, Gáll, T., Murvai, M., Kis, A., Boda, R., Sápy, T., Tar, I., Gergely, L., Szarka, K.: Investigation of the occurrence of torque tenovirus in malignant and potentially malignant disorders associated with human papillomavirus.
J. Med. Virol. 81 (11), 1975-1981, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21627>
IF:2.47



További Közlemények

3. Gáll, T., Kis, A., **Fehér, E.**, Gergely, L., Szarka, K.: Virological failure of intralesional cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis is not associated with genetic or epigenetic changes of HPV11: Complete genome comparison of sequential isolates.
Antiviral Res. 92 (2), 356-358, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.09.007>
IF:4.439 (2010)
4. Kis, A., **Fehér, E.**, Gáll, T., Tar, I., Boda, R., D. Tóth, E., Méhes, G., Gergely, L., Szarka, K.: Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population.
Eur. J. Oral. Sci. 117 (5), 536-540, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00660.x>
IF:1.956
5. Szarka, K., Tar, I., **Fehér, E.**, Gáll, T., Kis, A., D. Tóth, E., Boda, R., Márton, I., Gergely, L.: Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential.
Oral Microbiol. Immunol. 24 (4), 314-318, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00516.x>
IF:2.336
6. Szalmás, A., Bánáti, F., Koroknai, A., László, B., **Fehér, E.**, Salamon, D., Gergely, L., Minárovits, J., Kónya, J.: Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in cervical cancer cells.
Eur. J. Cancer. 44 (7), 1030-1038, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.02.046>
IF:4.475
7. **Fehér, E.**, Szalmás, A.: Prevalence of Chlamydia trachomatis and Oncogenic Human Papillomavirus Types in Cytologic Atypia of the Uterine Cervix.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 53 (4), 479-487, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.53.2006.4.5>



Összesített impakt faktor: 16.301

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.095

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.03.29



TÁRGYSZAVAK

Magyar nyelvű tárgyszavak:

torque teno vírus; humán papillomavírus; orális laphámsejtes carcinoma; oralis lichen planus;
oralis leukoplakia; méhnyakrák; méhnyaki atípiá

Angol nyelvű tárgyszavak:

torque teno virus; human papillomavirus; oral squamous cell carcinoma; oral lichen planus;
oral leukoplakia; cervical carcinoma; cervical atypia

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Szarka Krisztina egyetemi adjunktusnak, hogy kiváló szakmai vezetése alatt végezhettem tudományos tevékenységemet.

Köszönöm dr. Kónya József egyetemi docensnek és Gergely Lajos professzor úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet jelenlegi és korábbi vezetőjének, hogy lehetővé tették számomra az intézetben való munkavégzést.

Továbbá szeretném megköszönni a minták és klinikai adatok szolgáltatását a Fogorvostudományi Kar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti, valamint Parodontológiai Tanszék, a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, és a Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika munkatársainak.

Köszönöm kollégáimnak, dr. Kardos Gábornak, Kis Andreának, Gáll Tamásnak és az Orvosi Mikrobiológiai Intézet valamennyi dolgozójának az önzetlen segítségét.

FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye