

**A TT VÍRUS (TTV) ELŐFORDULÁSI GYAKORISÁGA ÉS A FERTŐZÉS
PATOLÓGIAI JELENTŐSÉGE**

Egyetemi (Ph.D.) doktori értekezés

Szládek Györgyi

Debreceni Egyetem, Általános Orvosi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2004

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
Irodalmi áttekintés	5
1. A Torque Tenovirus (TTV)	5
Felfedezés, a virion fizikai tulajdonságai	5
Genomi szerveződés	5
A fertőzés céldejtjei, a TTV replikáció színhelye	7
TTV taxonómia	7
A TTV epidemiológiája	9
Patogenitás	10
A TTV kimutatására használt módszerek	12
2. A humán papillomavírus (HPV) és szerepe daganatos megbetegedésekben	13
Célkitűzések	14
Anyagok és módszerek	15
1. Vizsgálati csoportok, klinikai minták, DNS izolálás	15
2. Virális DNS kimutatása polimeráz láncreakcióval	15
3. Vesetranszplantált betegekben detektált TTV variánsok összehasonlítása	16
4. Statisztikai módszerek	17
Eredmények és következtetések	18
TT vírus vesetranszplantált betegekben	18
Következtetések I.	23
TTV és HPV előfordulás gégetumoros betegekben	25
Következtetés II.	29
Az eredmények összefoglalása	31
Köszönetnyilvánítás	32
Irodalomjegyzék	33
Közlemények	43
1. Az értekezésben felhasznált közlemények	43
2. Egyéb közlemények	43
3. Konferencia prezentációk	44

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

as	aminosav
CAP	mRNS CAP régió
CMV	cytomegalovírus
EBV	Epstein-Barr vírus
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay / enzim-kapcsolt immunoabszorbens assay
GC	GC gazdag régió a TTV genomban
HBV	Hepatits B vírus
HCV	Hepatits C vírus
HIV	humán immundeficiencia vírus
HPV	humán papillomavírus
HVR	hipervariábilis régió
kb	kilobázis
nt	nukleotid
ORF	open reading frame / nyitott olvasási keret
PA	poli-A hely
PBMC	peripheral mononuclear cell / perifériális mononukleáris sejt
SSCP	single strand conformation polymorphism / egyszálú konformáció polimorfizmus analízis
TATA	TATA boks
TTV	Transfusion Transmitted vírus / Torque Tenovirus
UTR	untranslated region / nem kódoló szakasz

BEVEZETÉS

A TT vírust (TTV) japán kutatók izolálták elsőként, 1997-ben. A TTV kis méretű vírus, a virion burok nélküli és cirkuláris, negatív polarítású DNS-t tartalmaz. A genom 3,9 kilobázis (kb) hosszúságú, több teljes genomszekvencia ismert. A leírt teljes- és részszekvenciák alapján jelenleg a TTV izolátumokat öt genocsoportba, ezen belül további szekvencia homológia alapján több mint harminc genotípusba sorolják.

A TTV világszerte igen elterjedt, kóroki szerepének kiderítésére felfedezése óta intenzív kutatások folynak, több kórkép – májbetegségek, légúti megbetegedések – esetében vizsgálták a TTV fertőzés szerepét, de mindeddig nem sikerült egyértelműen bizonyítani kóroki szerepét egyetlen kórkép esetében sem. Felmerült az a lehetőség is, hogy az egyes genotípusoknak, genocsoportoknak eltérő a patogenitásuk, illetve, hogy a TTV más kórokozókkal együtt, társfertőzőként játszik szerepet egyes betegségek kialakulásában.

A szervtranszplantáción átesett betegek az átültetést követő immunszuppresszív terápia miatt fogékonyabbak a fertőzésekkel szemben és a bejutott kórokozókat nehezebben eliminálja a szervezetük. A TTV-ről is ismert, hogy szív-, máj-, csontvelő-, illetve veseátültetésen átesett betegek körében nagyobb a prevalenciája, mint az egészséges populációban. Kutatásaink során vesetranszplantált betegek vérmintáiban (plazma és PBMC minták) határoztuk meg a TTV előfordulási gyakoriságát és nyomonkövetve a betegek további TTV állapotát, a vírusfertőzés tartósságát is megvizsgáltuk.

A gége daganatos megbetegedései igen gyakoriak a kelet-európai lakosság körében. A betegség kialakulásához vezető körülmények nem teljesen tisztázottak, kémiai ágensek (alkohol, dohánytermékek) mellett felvetődött a humán papillomavírus (HPV) mint kiváltó tényező szerepe is. Mivel a TTV kimutatható a nyálban és a fej-nyaki régió egyes szerveiben is, így szerepe lehet ezen területek kórfolyamataiban is. Kísérleteink során meghatároztuk a TTV előfordulását a gége tumoros megbetegedéseiben szenvedő betegek szövetmintáiban, illetve, nyomonkövetve a betegeket, megfigyeltük a fertőzöttség kórlefoyasra gyakorolt hatását, különös tekintettel a HPV-vel is fertőzött esetekre.

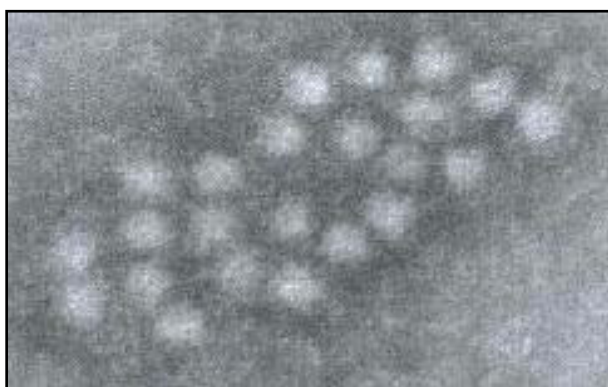
IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A Torque Tenovirus (TTV)

Felfedezés, a virion fizikai tulajdonságai

1997-ben japán kutatók reprezentációs differencia-analízis segítségével egy új DNS vírust izoláltak olyan, posztranszfúziós hepatitiszben szenvedő betegből, akinek véréből semmilyen addig ismert hepatitisz vírus nem volt kimutatható. Az új vírus a beteg nevének kezdőbetűi alapján a TT vírus (TTV) nevet kapta (47). Később - mivel feltételezték, hogy a vírus elsősorban vérrel és vérkészítményekkel terjed - a Transfusion Transmitted Virus név használata is elterjedt az irodalomban. A legújabb elnevezés – Torque Tenovirus – pedig a vírusgenom alakjára utal (torques = nyaklánc, tennis/teno = vékony) (58).

A felfedezést követően, az intenzív kutatásnak köszönhetően, a TTV-ről hamarosan ismertté vált, hogy burok nélküli vírus, a virionok átmérője 30-32 nm, cézium-kloridos (CsCl) gradiens centrifugálás során mért sűrűségük 1,31-1,35 g/cm³. Amint az elektromikroszkóppal készült képeken látszik, a vírus a szérumban különböző méretű aggregátumok formájában van jelen. Az aggregátumokhoz humán immunglobulinok (IgG) kapcsolódnak (1. ábra) (17, 51).



1. ábra: TTV elektromikroszkópos kép
Aggregálódott, 30-32 nm átmérőjű TTV-asszociált partikulumok humán szérumban (18)

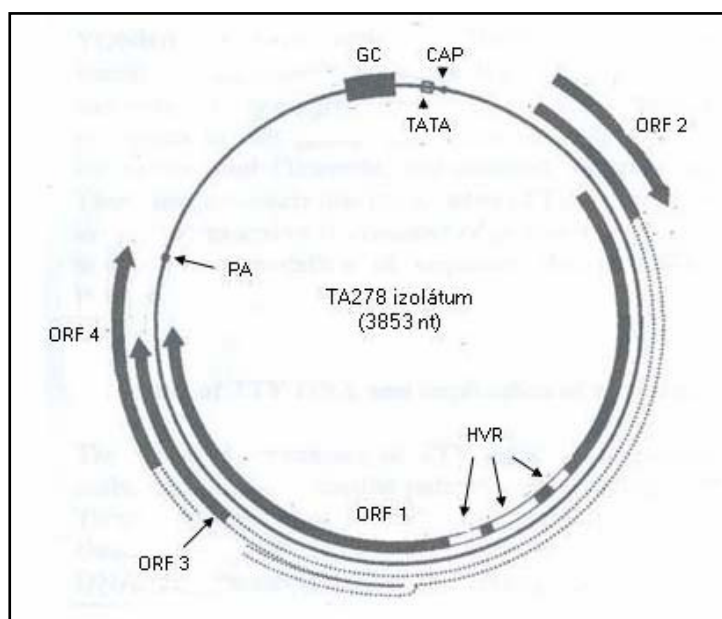
Genomi szerveződés

A TTV genomja megközelítőleg 3,9 kilobázis (kb) hosszúságú cirkuláris, egyszálú, negatív polaritású DNS. A genom négy, részben átfedő nyitott olvasási keretet (open reading

frame, ORF) és egy, a vírusgenom mintegy egyharmadát kitevő konzervatív, nem kódoló szakaszt (untranslated region, UTR) tartalmaz (2. ábra) (58). A leghosszabb ORF, az ORF1 a prototípus TTV (TA278) szekvenciában az 589.-2898. nukleotidok között helyezkedik el, ez kódolja a kapszid proteint és a TTV Rep proteinjét. Középső részében három, egyenként 22, 47 és 33 aminosavat kódoló hipervariábilis régió (HVR) található(48). Az ORF2 a 353-as nukleotidtól a 712-ig terjed. A további két ORF távoli splicing helyek összekapcsolódásával (353-711 és 2374-2872 nt, illetve a 353-711 és 2567-3074 nt) keletkezik, melyek egyenként 286, illetve 289 aminosavat kódolnak (22).

2. ábra: A TTV genom felépítése

ORF	open reading frame
HVR	hipervariábilis régió
PA	poli-A hely
TATA	TATA boksza
CAP	mRNS CAP régió
GC	GC gazdag régió



In vitro kísérletekben, COS1 sejtekben, egy, a TTV teljes genomját tartalmazó plazmidról három, egyenként 3,0kb 1,2kb illetve 1,0kb hosszúságú érett messenger RNS íródott át, melyeknek közös az 5' és 3'-vége és alternatív splicing-gal keletkeznek. A messenger RNS-ek átíródása egy közös belső promoterről kezdődik (TATA-boksza: ATATAA), amely a 81.-86. nukleotidok között helyezkedik el. Mindegyik mRNS kapcsolódik a 2999.-3008. nukleotidok között elhelyezkedő poli-A kódoló hellyel, amely közvetlenül a 2980.-2985. nukleotidok közötti poli-A jel (AATAAA) után következik a genomban (22). *In vivo*, fertőzött egyének csontvelő sejtjeiben is kimutattak hasonló méretű (2,9kb, 1,2kb ill. 1,0kb) érett messenger RNS-eket (55).

Az 1,2kb hosszúságú UTR-ben, - amely a 3075.-3853. és 1.-352. nukleotidok között helyezkedik el - található a TTV enhancer és promoter régiója, továbbá lehetséges növekedési faktor-kötőhelyeket is tartalmaz, 3' végén pedig egy kb 120 nukleotid hosszúságú guaninban és citozinban gazdag régió (GC gazdag régió, 2. ábra) található (41), amely harmadlagos szerkezetet vehet fel. Az UTR tehát a vírusreplikáció és transzkripció szabályozásában játszik

szerepet. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy az UTR nukleotid-szekvenciája az eddig leírt összes TTV genotípus esetében igen konzervatív (21, 58).

A fertőzés célsejtjei, a TTV replikáció helyszíne

A TTV fertőzés célsejtjei és a TTV replikáció szervezeten belüli pontos helye jelenleg még nem ismert. A TTV előfordulási gyakoriságát általában vérminták vizsgálatával határozzák meg. A vírus a vérben nem egyenletesen oszlik meg a szérum és a sejttes elemek (52, 60), illetve az egyes vérsejt-típusok között sem. Takahashi és mtsai eltérő mennyiségben találtak TTV-t az egyes leukocita típusokban, a legmagasabb TTV-titert a granulocitákban detektálták (81). TTV DNS-t más emberi szövetekben és testnedvekben, például a májban, a tüdőben a csontvelőben illetve az epében és a nyálban is sikerült kimutatni (20, 59, 68, 89, 95).

Okamoto és mtsai duplaszálú cirkuláris TTV szekvenciákat – replikációs intermediereket – detektáltak májsejtben, ami arra utal, hogy a máj a vírusreplikáció egyik lehetséges színtere (57). Csontvelő sejtben pedig TTV mRNS-eket mutattak ki, ami aktív vírusreplikációra utal a csontvelőben is. (24, 55). *In vitro* megfertőzött, majd stimulált PBMC sejtben szintén detektáltak replikatív intermedier TTV DNS-t és mRNS-t (33, 38).

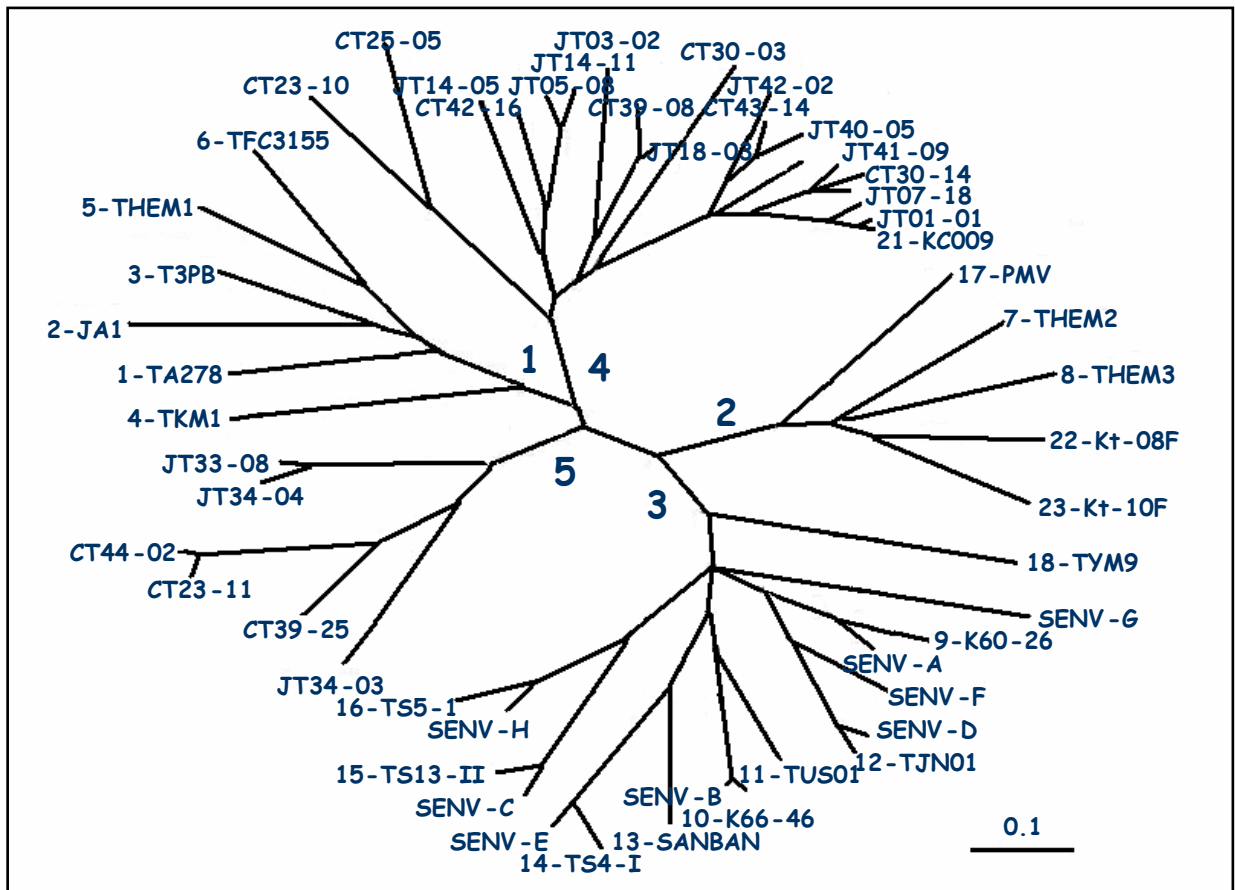
TTV taxonómia

A TTV-t a genomot alkotó egyszálú DNS alapján kezdetben a *Parvoviridae* családba sorolták, de hamarosan kiderült, hogy a genom cirkuláris és negatív polaritású. Ezen tulajdonságai alapján a TTV a *Circoviridae* családba tartozó vírusokkal mutat rokonságot. Ebbe a családba olyan állati kórokozók tartoznak, mint a csirke anaemia vírus (CAV), a sertés cirkovírus (PCV) vagy a papagájok csőr- és toll-megbetegedését okozó vírus (BFDV). Egyedi jellemzői, mérete és szekvencia diverzitása nemrég felvetődött a TTV új genusba (*Anellovirus*) történő sorolása (17). A TTV családba tartozó szekvenciákat főemlősökből és más állatokból is kimutattak már (29, 83).

A TTV prototípus izolátuma (TA278) 3852 nukleotidot (nt) tartalmaz, de ettől eltérő, - 3787-3853nt - hosszúságú teljes szekvenciák is ismertek (8, 54, 90). A TTV genotípusok száma folyamatosan nő, mivel az újabb izolátumok gyakran igen nagy különbséget mutatnak a már ismert szekvenciákhoz képest. Ezt a nagy genetikai divergenciát Manni és mtsai - filogenetikai elemzések alapján - gyakori rekombinációval magyarázzák (37). Az elektronikus

adatbázisokban (GenBank) rendelkezésre álló részleges és teljes szekvenciák összehasonlítása alapján az eddigi TTV izolátumokat öt genocsoportba sorolják és ezeken belül - további szekvencia homológia alapján - eddig több mint harminc genotípust írtak le (64). Az egyes genotípusokba tartozó izolátumok nukleotid szekvenciája között 30%-nál nagyobb eltérés tapasztalható. A csoportosítást elsősorban az ORF1 ún. N22 régiójának szekvenciái alapján végzik, nem minden genotípus esetében áll rendelkezésre teljes genomi szekvencia. Néhány genotípust további altípusokra osztanak, úgymint 1a és 1b illetve 2a és 2b. Az 1. genocsoport prototípusa az első TTV izolátum (TA278, 1. genotípus) és a 2.-6. genotípusok tartoznak még ide. A 2. genocsoport prototípusa az 2000-ben Hallett és mtsai által felfedezett PMV, melyet - a TTV felfedezéséhez hasonlóan - akut non A-G hepatitiszes betegből izoláltak és a beteg monogramja (PM) után nevezték el (11). A PMV-n (17. genotípus) kívül a 2. genocsoportba sorolják még a 7., 8., 22. és 23. genotípusokat. A 3. genocsoportba sorolják az 1999-ben felfedezett SEN vírust (SENV) melynek eddig kilenc genotípusát írták le (SENV-A – SENV-I). Szekvencia elemzések alapján kiderült, hogy hat típus (SENV-A, -B, -C, -D, -E illetve -H) nagyfokú hasonlóságot mutat már leírt TTV genotípusokkal (rendre: 9, 10, 15, 12, 14 illetve 16) a SENV-F és -G izolátumokat pedig a TTV 19-es és 20-as genotípusaként sorolták be (26, 58, 82). Az 1999-ben Hijikata és mtsai által felfedezett és SANBAN-nak (japánul harmadikat jelent) elnevezett vírust szintén a 3. genocsoportba sorolják, a TTV 13. genotípusaként (15). Ezeken kívül ide tartozik még a TUSO1 izolátum által képviselt 11. és a TYM9 izolátum által képviselt 18. genotípus is. A 4. genocsoportba a Takahashi és mtsai által 2000-ben leírt és YONBAN-nak (japánul 'negyedik') elnevezett izolátum (21. genotípus) tartozik (79, 91). Peng és mtsai 2002-ben detektáltak TTV fertőzött gyermekek mintáiban olyan TTV izolátumokat, melyek az addig ismert szekvenciáktól oly nagy mértékben tértek el, hogy ez indokoltá tette egy ötödik genocsoport létrehozását (64).

Takahashi és mtsai 2000-ben a népes TTV családdhoz sokban hasonlító, de jelentősen kisebb genommal rendelkező vírust azonosítottak, mely a TTV like minivirus (TLMV) nevet kapta. A TLMV genomja - a TTV-hez hasonlóan - cirkuláris, negatív polaritású, egyszálú DNS. Az ismert teljes genomi szekvenciák 2850-2950 kb hosszúságúak és a TTV-hez hasonlóan nagy genetikai variabilitást mutatnak. A TLMV is igen elterjedt és sok humán mintából (vér, nyál, széklet, stb.) kimutatható, terjedési módja és patológiai jelentősége még nem ismert (80).



3. ábra: Filogenetikai fa TTV izolátumok nukleotid szekvenciájának 'neighbour joining' módszerrel történő összehasonlítása alapján. A TTV öt genocsoportja és az egyes genotípusokat reprezentáló néhány izolátum. (Peng és mtsai, 2002 (64) nyomán)

A TTV epidemiológiája

A TTV világszerte elterjedt vírus, Ázsia, Észak- és Dél-Amerika, Európa, Afrika, városi és vidéki populációiban egyaránt előfordul. Az életkor előrehaladtával szignifikánsan megnő a vírus előfordulási aránya (69). Az epidemiológiai eredmények jelentős szórást mutatnak - 2% - 75%-os fertőzöttség a normál populációban (3) -, mivel a prevalencia adatok nagyban függenek az adott kutatásban használt detektálási módszerektől.

A TTV fertőzésről kezdetben azt feltételezték, hogy kizárólag vérátömlesztés útján történik, Simmonds és mtsai véradók körében 1,9%-ban találtak TTV fertőzöttséget és az általuk megvizsgált vérkészítmények (VIII- és IX faktor koncentrátumok) több mint fele is TTV pozitív volt (76). A vérkészítményekkel történő terjedést támasztják alá a Toyoda és mtsai által végzett megfigyelések is, melyek szerint a TTV genotípus gyakran változik a

többszörösen transzfundált hemofiliás betegekben, míg ritkán tapasztalható genotípus változás krónikus hepatitis C-fertőzöttekben és egészséges vizsgálati alanyokban (87). Parenterális fertőzés szempontjából kockázati csoportokba tartozó egyének - HIV-1 pozitív intravénás-drog használók, homoszexuális férfiak, haemodializált betegek, thalasszémiás betegek - körében szintén magas a TTV előfordulási aránya (98).

Az a tény, hogy az egészséges populációban is világszerte magas a TTV előfordulási aránya (12, 45,76, 92), amellel szól, hogy a vér útján történő terjedés nem lehet kizárólagos a TTV esetében. TTV DNS-t nagy mennyiségben találtak TTV-fertőzött emberek esetében nyálban (7), epében (44, 89) és székletben (50) is, így valószínű, hogy a fertőzés non-parenterálisan is terjedhet. Maggi és mtsai akut légzőszervi betegségekben szenvedő gyermekeket vizsgáltak és arra a következtetésre jutottak, hogy a TTV pozitívitás forrása cseppfertőzés is lehet (35). Anya-újszülött vérminta-párokat vizsgáló kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a TTV transzplacentális vagy perinatális átvitele is lehet a fertőzés forrása fiatal gyermekek esetében (27, 70).

A megváltozott immunállapot - így a szervátültetést követő immunszuppresszív terápia is - szerepet játszhat a TTV fertőzés kialakulásában (42, 85). Szív- (94), máj- (73), csontvelő- (23) illetve veseátültetésen (96) átesett betegek esetében végzett tanulmányok szerint ezen csoportokban szignifikánsan magasabb az 1. genocsoportba tartozó TTV előfordulási aránya, mint egészségesek körében. Vesebetegeknél a megemelkedett TTV előfordulási arány már az átültetést megelőzően, a haemodialízis időszakában megfigyelhető (9, 31), ami a TTV nozokomiális terjedését valószínűsíti.

Az irodalomban gyakran leírnak kevert fertőzéseket, amikor egyazon időben a TTV több genotípusa is kimutatható egy betegben (1, 9, 46, 53, 78, 93). A keresztmetszeti vizsgálatok eredményei felvetik a kérdést, vajon a megfigyelt magas előfordulási arány egy vagy néhány TTV variáns által okozott tartós fertőzés eredménye, vagy egymást követő, de átmeneti jellegű fertőzések okozzák?

Patogenitás

A vírus kóroki szerepe, a számos ezt célzó kutatás ellenére, a mai napig nem tisztázott. Lehetséges, hogy az egyes TTV genotípusoknak vagy genocsoportoknak eltérő a kórokozó képessége illetve, hogy a TTV fertőzés önmagában nem okoz tüneteket, de elősegítheti más kórokozók által okozott betegségek kifejlődését.

Hepatitisz

Mivel a TTV-t először ismeretlen eredetű májgyulladásban szenvedő betegekből izolálták, kezdetben a kutatások is a TTV hepatitiszt indukáló szerepét próbálták igazolni, de az ezirányú vizsgálatok egymásnak ellentmondó eredményeket adtak. A TTV gyakran hasonló arányban fordul elő ismeretlen eredetű hepatitiszes betegeknél és a kontroll csoportokban (2, 61, 74, 97, 99), a vértranszfúzió során TTV-vel fertőződött betegeknél nem tapasztaltak korrelációt a TTV fertőzés és hepatitisz kialakulása között (49), és a kísérletesen megfertőzött majmoknál sem volt megfigyelhető semmilyen májkárosodás (32, 43). Mindezek a TTV májkárosító szerepe ellen szólnak. Elképzelhető azonban, hogy a TTV-nek csak egyes genotípusai hepatopatogének, vagy a patogenitás függ a vírustitertől és a gazdaszervezetben jelenlevő társfertőző ágensektől (2).

Több tanulmány foglalkozott azzal a kérdéssel, hogy a TTV jelenléte befolyásolja-e más hepatitisz vírussal, például a Hepatitis C-vel (HCV) fertőzött betegek esetében a betegség kimenetelét, de nem sikerült egyértelmű összefüggést kimutatni a kettős fertőzés és a kórlefolyás között (6, 14, 63, 84, 99).

Egyéb megbetegedések

A TTV képes áthatolni a placentán és már nagyon fiatal gyermekekben is kimutatható (70), így felmerült a lehetőség, hogy egyes gyermekkori betegségek kialakulásában szerepet játszhat a TTV fertőzés. Shiramizu és mtsai akut gyermekkori lymphoblasztos leukémiában (ALL) szenvedő betegek esetében vizsgálták a TTV előfordulását csontvelő és PBMC mintákban, de nem találtak összefüggést a TTV állapot és az ALL kialakulása között (75).

Akut gyermekkori légzőszervi megbetegedések eseteket vizsgálati eredményeiből az a következtetés volt levonható, hogy - bár a TTV titer a súlyosabb kórlefolyású esetekben szignifikánsan magasabb volt, mint a kevésbé súlyosakban – mégsem igazolható, hogy a TTV kiváltó ok lenne a légzőszervi megbetegedések esetében, valószínűbb, hogy a vírus a más fertőző ágensek által kiváltott betegség súlyosságát fokozza (35, 36).

Gasztritisz esetében több kutatócsoport vizsgálta a TTV mint társfertőző mikroba szerepét (34, 86). Maggi és mtsai *Helicobacter pylori*-fertőzött betegek gyomorszövet-mintáiban igen magas TTV titert találtak és a vírustiter jól korrelált a betegség súlyosságával. A gyomorszövetekből elsősorban 3. és 4.gencsoportba tartozó TTV volt kimutatható (34).

Garbuglia és mtsai különböző lymphoma típusok esetében vizsgálták a TTV jelenlétét és az Epstein-Barr vírussal (EBV) együttes fertőzés a betegség kifejlődésére gyakorolt esetleges hatásait. A PCR-s és *in situ* hibridizációs eredmények alapján a TTV jelenlétének szerepe lehet egyes lymphoproliferatív betegségek kialakulásában (10).

A TTV kimutatására használt módszerek

Polimeráz láncreakció

A TTV kimutatására a legelterjedtebb módszer a polimeráz láncreakció (PCR). Az egyes PCR-en alapuló kimutatási módok eltérő érzékenysége miatt az irodalomban szereplő epidemiológiai adatok széles skálán mozognak. A konzervatív UTR-hez tervezett primerek minden TTV genotípust érzékelnek, míg az ORF szekvenciákon alapuló primerek az ebben a régióban tapasztalható nagy genetikai diverzitás miatt csak egyes meghatározott TTV csoportok kimutatására alkalmasak. A már ismert TTV izolátumok szekvenciájának elemzésével genocsoport- vagy genotípus-specifikus primerek tervezhetők (11). Koidl és mtsai 2004-ben leírtak egy real-time PCR módszert, amely megkönnyítheti és hatékonyabbá teheti a rutin TTV diagnosztikát (25).

***In situ* hibridizáció**

Spanyol kutatók 2000-ben fejlesztettek ki egy *in situ* hibridizációs módszert, amellyel paraffinba ágyazott májbiopsziás mintákban detektálták a TTV-t az ORF1-re specifikus PCR terméket használva hibridizációs próbaként. Az *in situ* hibridizáció a TTV-t a hepatociták citoplazmájában és magjában jelezte. A fertőzött sejtek elszórta helyezkedtek el a metszetben, és nem mutattak patológias elváltozásokat (67).

Szerológiai módszerek

Tsuda és mtsai fertőzött egyénből izolált TTV partikulumokat használtak immunprecipitációs módszerükben, amelynek segítségével TTV-elleni antitesteket mutattak ki véradok és non A-G hepatitiszes betegek szérumából. Eredményeik lezajlott TTV fertőzést és a vírus eliminálódását jelezték több esetben (88).

Ott és mtsai immunblot módszert alkalmaztak, amely az ORF 1 régióból kialakított rekombináns proteint használ antigénként, és amellyel nagy arányban (98%) találtak TTV-elleni antitesteket az általuk vizsgált hepatitiszes illetve egészséges emberek szérumában (62).

Biológiai vizsgálatok

Ezidáig nem sikerült olyan sejtvonalat előállítani, amelyben a TTV replikálna. Kompetens TTV DNS-sel történő transzfekció mRNS átírodást indukál ugyan a fertőzött

sejttenyészetekben, de DNS replikáció nem történik (22). Így a TTV-biológia sok kérdése, pl. sejtropizmus, a replikáció és a transzkripció szabályozása nehezen vizsgálható. Duplaszálú TTV DNS - replikációs intermedier - jelenlétét kimutatták csontvelő- ill. májsejtekben (55, 57).

Kísérleti körülmények között sikerült *Rhesus* majmokat humán TT vírussal fertőzni. Az orálisan vagy parenterálisan fertőzött állatok 4-10 nap után viaemiássá váltak, a TTV kimutatható volt a májban, az epében és a székletben is, de a fertőzés semmilyen patológiás hatást nem váltott ki náluk (32).

2. A humán papillomavírus (HPV) és szerepe egyes daganatos megbetegedésekben

A HPV a *Papillomaviridae* családba tartozik, kisméretű, burok nélküli vírus, genomja megközelítőleg 8 kb hosszú, duplaszálú, cirkuláris DNS. A HPV-nek több mint 100 genotípusa ismert, minden típusa epitheliotrop. A legtöbb HPV fertőzés legfeljebb benignus proliferációt okoz a hámszövetben, de ismertek malignus elváltozást okozó genotípusok is, amelyeket elsősorban cervix carcinomában, egyéb anogenitális tumorokban illetve gégedaganatokban mutattak ki. A fertőzés célsejtjei alapján két csoportot különböztetnek meg. A cutan típusba tartoznak például a közönséges szemölcsöt (*verruca vulgaris*) okozó típusok. A másik csoportba a nyálkahártyákat fertőző típusokat sorolják. A több mint 40 típus, amely elsősorban az anogenitális régiót fertőzi, további két csoportra osztható: megkülönböztetnek úgynevezett alacsony kockázatú (low risk) és magas kockázatú (high risk) típusokat. Az előbbieket gyakrabban izolálják benignus léziókból, az utóbbiakat pedig az anogenitális régió különböző tumoraiból (13).

Az világszerte igen gyakran előforduló gégetumrok a kelet-európai régióban kiemelkedően magas arányban vannak jelen (4). A kialakulásukhoz vezető körülmények nem teljesen tisztázottak, a kémiai ágensek – alkohol, dohánytermékek – közismerten kedvezőtlen hatása mellett felmerült a HPV egyes genotípusainak lehetséges kóroki szerepe is (40, 72), mivel a virális DNS gyakran kimutatható a tumorszövetekből (13, 77). A HPV szakirodalom azonban nem egyöntetű annak megítélését illetően, hogy a vírus jelenléte a gége nyálkahártyájában milyen hatással van a tumor-progresszióra. Amíg egyes tanulmányok szerint a HPV fertőzés önmagában nincs hatással a betegség kimenetelére (28, 65), vagy a HPV pozitív tumorok prognózisa jobb (66), más kutatók szerint a HPV-fertőzött tumorok rosszabb kimenetelűek, mint azok amelyekből nem mutatható ki a vírus (5).

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen a TTV előfordulási aránya vesetranszplantált betegek körében az egészséges populációhoz viszonyítva?

A TTV perzisztens fertőzést okoz-e vesetranszplantált betegekben?

A tartósan TTV-fertőzött betegekben a vírus azonos variánsa detektálható-e hosszú időn keresztül?

2. Milyen a TTV előfordulási aránya a fej-nyak régió tumoros megbetegedésében szenvedő betegek körében?

Milyen hatása van a TTV-nek HPV-vel történő koinfekció esetén a tumoros megbetegedés kimenetelére?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Vizsgálati csoportok, klinikai minták.

A virális fertőzöttséget és annak esetleges hatását az alábbi betegcsoportokon vizsgáltuk.

a) TTV fertőzöttség és virális perzisztencia vesetranszplantáción átesett betegekben.

A TTV fertőzöttséget 92 vesetranszplantált beteg esetében vizsgáltuk. A vesetranszplantációt követő időszakból származó – rutin CMV vizsgálat céljára levett - heparinos vérmintákból perifériális leukocitákat izoláltunk, ezen sejtekből vontuk ki a DNS-t a PCR-es vizsgálatokhoz. A betegek illetve a beültetett szervek HBV, HCV és CMV státuszáról és az átültetést követő terápiában alkalmazott gyógyszerekről is voltak adataink. A TTV fertőzés perzisztenciájának megállapítására 31 beteg esetében nyomonkövetést végeztünk, a követés 113-372 napos tartama alatt az egyes betegektől 2-6 különálló, egymást követő időszakból származó vérminta érkezett. Kontrollként 66 egészséges egyén vérmintáit használtuk.

b) TTV és HPV fertőzöttség a fej-nyaki régió tumoros megbetegedésében szenvedő betegekben.

40 beteg műtét során eltávolított szöveteiből, a tumor centrális részéből származó sejtekből izolált DNS mintákban PCR módszerrel mutattuk ki a virális DNS-t. A 40 beteg közül 25 gégekarzinómában, tíz rekurrens gége-papillomatózisban, öt pedig malignizálódott papillómában szenvedett. A betegekben talált virális prevalencia adatokat összehasonlítottuk 40 egészséges egyén - cytobrush segítségével gyűjtött - szájúregi exfoliált sejtjeiből származó DNS minták PCR eredményeivel.

2. DNS izolálás, virális DNS kimutatása polimeráz láncreakcióval (PCR).

A mintákból a DNS-t proteinázos emésztést követően fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú elegyével nyertük ki.

a) TTV kimutatása

A virális DNS jelenlétét az izolált DNS mintákban két egymástól független PCR módszerrel mutattuk ki. Az egyik módszer során nested PCR-ben a TTV genom konzervatív

UTR régiójához tervezett primereket (NG147-NG133/NG132-NG134) használtunk (UTR-PCR). Ez a módszer az eddig ismert összes TTV genotípus kimutatására alkalmas. A másik esetben seminested PCR során a TTV genom ORF1 N22-es régiójához tervezett primereket (NG059-NG063/NG061-NG063) alkalmaztunk (ORF-PCR). Ez utóbbi módszer csak az egyes genocsoportba tartozó TTV genotípusok kimutatására alkalmas (53).

A TTV kimutatására használt PCR módszerek érzékenységének meghatározása.

Pozitív reakciókból nyert és kitisztított PCR termékeket PinPoint® Xa2 plazmidvektorba (Promega) klónoztunk be. A PCR reakcióelegybe ismert mennyiségű plazmid kópiát tartalmazó minta sorozathígítását vittük be mintaként, ennek segítségével határoztuk meg a két módszer érzékenységét. Az UTR-PCR érzékenysége két nagyságrenddel nagyobbak bizonyult, mint az ORF-PCR érzékenysége.

b) HPV kimutatása

A gégetumoros szövetekből a HPV-DNS-t a mukotrop HPV típusok kimutatására alkalmas konszenzus nested MY/GP-PCR segítségével mutattuk ki az MY09-MY11/GP5-GP6 primereket használva (30).

3. Vesetranszplantált betegekben detektált TTV variánsok összehasonlítása.

Az izolátumok genotípusának meghatározása

a) Egyszálú konformációs polimorfizmus analízis (SSCP).

TTV pozitív betegek esetében az ORF- és UTR-PCR-ek második köréből származó termékeket SSCP analízisnek vetettük alá. A minták két perces 72°C-on történő denaturálását 5%-os poliakrilamid gélen történő elektroforézis követte. Az eredményt ezüst-nitrát festéssel tettük láthatóvá (19). Az SSCP igen érzékeny elektroforetikus módszer, már egyetlen nukleotid eltérés esetén is eltérő futási mintázat alakul ki. Az egyes vizsgálati mintáknál kialakuló különböző SSCP mintázat eltérő TTV variánsok jelenlétére utal.

b) Automata szekvenálás

A nyomonkövetett TTV pozitív betegek esetében az ORF-PCR nested köréből származó 271 bázis hosszúságú termékeket - Microcon YM-100-as oszlopon történő tisztítást követően - BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit felhasználásával, követve a felhasználási

leírást. A mintákat az NGO61 (sense) és NGO63 (antisense) primereket alkalmazva mindkét irányban megszekvenáltuk. A nukleotid szekvenciákat ABI Prism 310 automata szekvenáló készülék segítségével olvastuk le.

c) TTV genotípus megállapítása

Az automata szekvenálás során kapott nukleotid szekvenciákat a GenBank adatbázisban található referencia szekvenciákhoz hasonlítva állapítottuk meg a detektált TTV variánsok genotípusát. A nukleotid szekvenciák alapján megállapítottuk az adott genomi szakaszról átíródó polipeptid valószínű aminosav sorrendjét és az így kapott aminosav szekvenciákon is elvégeztük az összehasonlító elemzést. A szekvenciák analízise során kapott homológia mátrix alapján 'neighbor-joining' módszerrel (71) filogenetikai fát hoztunk létre a vizsgált izolátumok rokonsági fokának szemléltetésére. Az nukleotid és aminosav-szekvenciák elemzését a DNAMAN szoftver segítségével végeztük.

4. Statisztikai módszerek

A vesetranszplantált betegek és egészséges véradók adatait (nem és kor szerinti megoszlás, TTV prevalencia) Yates-korrigált χ^2 próba segítségével hasonlítottuk össze. Fisher's exact tesztet alkalmaztunk abban az esetben, ha a kontingencia-táblázat valamely cellája kevesebb mint 5 elemet tartalmazott. A median értékeket Mann-Whitney féle non-parametrikus teszttel hasonlítottuk össze.

A TTV nukleotid szekvenciák alapján létrehozott filogenetikai fa elágazásait ezer mintára számolt bootstrap analízissel igazoltuk a DNAMAN szoftver segítségével.

A gégepapillomás, gégetumoros betegek tumorszövet-mintái, illetve az egészséges egyének szájnyálkahártya-mintái esetében a TTV és HPV előfordulási adatokat Fisher's exact teszt segítségével elemeztük. A gégetumoros betegek esetében a tumormentes túlélés vizsgálatát Kaplan-Meier teszttel végeztük.

A statisztikai elemzéseket az SPSS szoftver (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

I. TT vírus vesetranszplantált betegekben

TTV prevalencia

Munkánk során 92 vesetranszplantált beteg és 66 egészséges véradó perifériális limfocita mintáiban vizsgáltuk a TTV DNS jelenlétét UTR- és ORF-PCR segítségével. Az UTR-PCR, amely gyakorlatilag minden TTV genotípus érzékelésére képes módszer, 100%-os (92/92) pozitivitást mutatott a vesetranszplantáltakban (median kor: 38,5 év), az egészséges kontroll csoportban (median kor: 38,2 év) pedig 95%-os (63/66) volt a fertőzöttség. Az ORF-PCR-rel vesetranszplantáltakban 58%-ban (53/92), véradókban 20%-ban (13/66) volt kimutatható 1 genocsoportba tartozó TTV ($p_{\chi^2} < 0,00001$). Az 1. genocsoportba tartozó TTV-pozitív illetve TTV-negatív betegek csoportja között nem volt szignifikáns különbség a transzplantáció idején betöltött életkor (38,9 szemben 39,6 év); nemek szerinti megoszlás (férfi/nő arány: 1,65 szemben 1,78; $p_{\chi^2} = 0,96$) és a transzplantációt követően a vizsgálatig eltelt idő (median: 26 szemben 33 hónap; $p = 0,33$) tekintetében.

Nyomonkövetéses vizsgálatok

Harmincegy vesetranszplantált beteg 2-6 egymást követő mintájában vizsgáltuk az 1 genocsoportba tartozó TTV jelenlétét a seminested ORF-PCR módszerrel. A median követési idő 230 nap volt (min. 97, max. 372 nap). A nyomonkövetett csoport statisztikailag nem különbözött a nem követett betegek csoportjától a transzplantáció idején betöltött életkor (42,7 szemben 38,5 év); nemek szerinti megoszlás (férfi/nő arány: 1,58 szemben 1,77; $p_{\chi^2} = 0,98$), az 1 genocsoportba tartozó TTV fertőzöttség (14/31 szemben 39/61; $p_{\chi^2} = 0,52$) valamint a transzplantáció és a TTV kimutatás között eltelt időtartam (median: 20 szemben 30 hónap; $p = 0,72$) tekintetében. A követés időtartama alatt két esetben olyan betegeknek, akiknek első mintái TTV pozitívak voltak, a követés 182. illetve 210. napján vett mintái TTV negatívnak bizonyultak, míg három beteg esetében, akiknek első mintáiból nem volt kimutatható TTV DNS, a követés 28. , 182. illetve 307. napján vett minták TTV pozitívak voltak. A nyomonkövetett betegek többségének TTV állapota a követés időtartama alatt konzisztens volt, 12 tartósan pozitív, míg 14 tartósan TTV negatív volt. (1. táblázat)

1. táblázat A nyomonkövetett vesetranszplantált betegek adatai és TTV állapota
1/a Állandó TTV állapotú betegek

betegek	kor*	nem (f/n)	minta-szám	követés (nap)	TTV állapot	TTV genotípus	szekvencia homológia	aminosav változás
tx196	17	f	3	113	+	3	223/223	
tx200	43	n	3	342	+	2	222/223	V ₂₆ →I
tx207	43	f	6	363	+	2	223/223	
tx219	24	n	3	219	+	3	223/223	
tx220	47	f	2	182	+	3	223/223	
tx223	46	f	3	158	+	2	222/223	K ₆₃ →N
tx226	44	f	3	340	+	2	222/223	D ₉ →Y
tx236	40	f	6	321	+	2	223/223	
tx239	45	f	3	202	+	1	221/222	-
tx246	22	f	3	281	+	2	223/223	
tx273	36	n	3	230	+	1	222/222	
tx289	17	f	3	173	+	1	222/222	
tx194	50	n	3	273	-			
tx198	28	f	3	246	-			
tx201	28	f	3	265	-			
tx203	59	n	3	210	-			
tx205	63	f	3	367	-			
tx206	45	f	2	308	-			
tx209	48	n	2	229	-			
tx211	39	f	3	372	-			
tx221	30	f	5	244	-			
tx224	45	n	4	337	-			
tx253	39	n	2	190	-			
tx258	26	f	2	121	-			
tx267	33	f	2	238	-			
tx309	43	n	2	125	-			

1/b. Megváltozott TTV állapotú betegek.

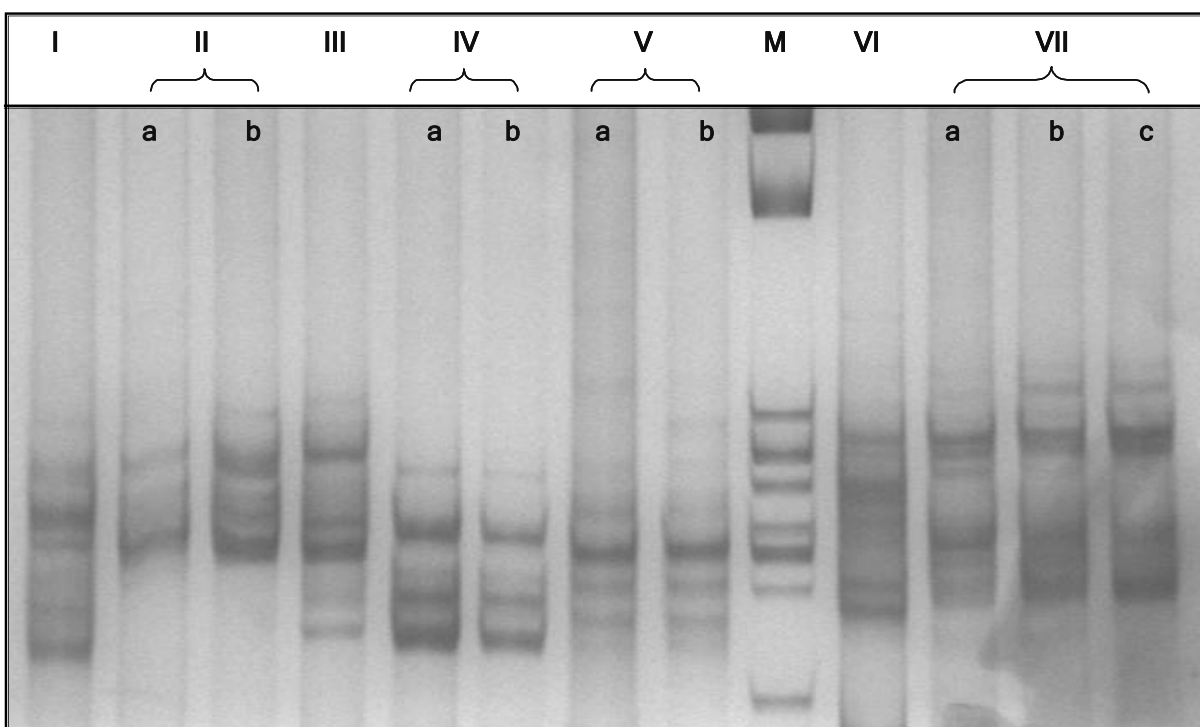
beteg	kor*	nem (f/n)	minta-szám	követés (nap)	TTV állapot a követés idején (nap)							
tx53	52	n	3	205	+	(0)	-	(182)	-	(205)		
tx238	43	n	3	307	-	(0)	-	(117)	+	(307)		
tx243	31	f	3	97	-	(0)	-	(28)	+	(97)		
tx271	47	f	3	118	-	(0)	-	(35)	+	(118)		
tx281	33	n	4	230	+	(0)	+	(48)	-	(210)	-	(230)

*életkor a transzplantáció idején

Vesetranszplantáltakban előforduló TTV variánsok.

a) Az egyszálú konformáció polimorfizmus analízis (SSCP) eredménye

Tartósan TTV pozitív betegek egymást követő 2-3 mintájából származó UTR illetve ORF-PCR termékeket vizsgáltunk meg egyszálú konformáció analízissel (SSCP). Az SSCP mintázatok több sávból álltak, jelezve az első, illetve a nested PCR kör termékeinek jelenlétét. Az UTR-PCR termékek SSCP mintázata egységes volt a vizsgált betegeknél, ami megfelel az UTR régió konzervatív jellegének. Ezzel szemben az ORF-PCR SSCP mintázata, a régió magas variabilitásának megfelelően nagy különbségeket mutatott a vizsgált betegek között, de az egyes betegek különböző időpontokból származó mintái egységes mintázatot mutattak, jelezve egyedi TTV variánsok tartós jelenlétét a nyomonkövetés ideje alatt. (4. ábra)



4.ábra TTV pozitív PCR termékek SSCP analízise hét beteg (I.-VII.) egymást követő időpontokban vett (a, b, c) perifériális leukocita mintáiból. Az SSCP futási mintázata azt mutatja, hogy egyazon beteg különböző időpontokban vett mintáiban a TTV ugyanazon variánsa található, és az egyes betegeknél a vírus más-más variánsa van jelen. (M: Φ X molekulásúly-marker)

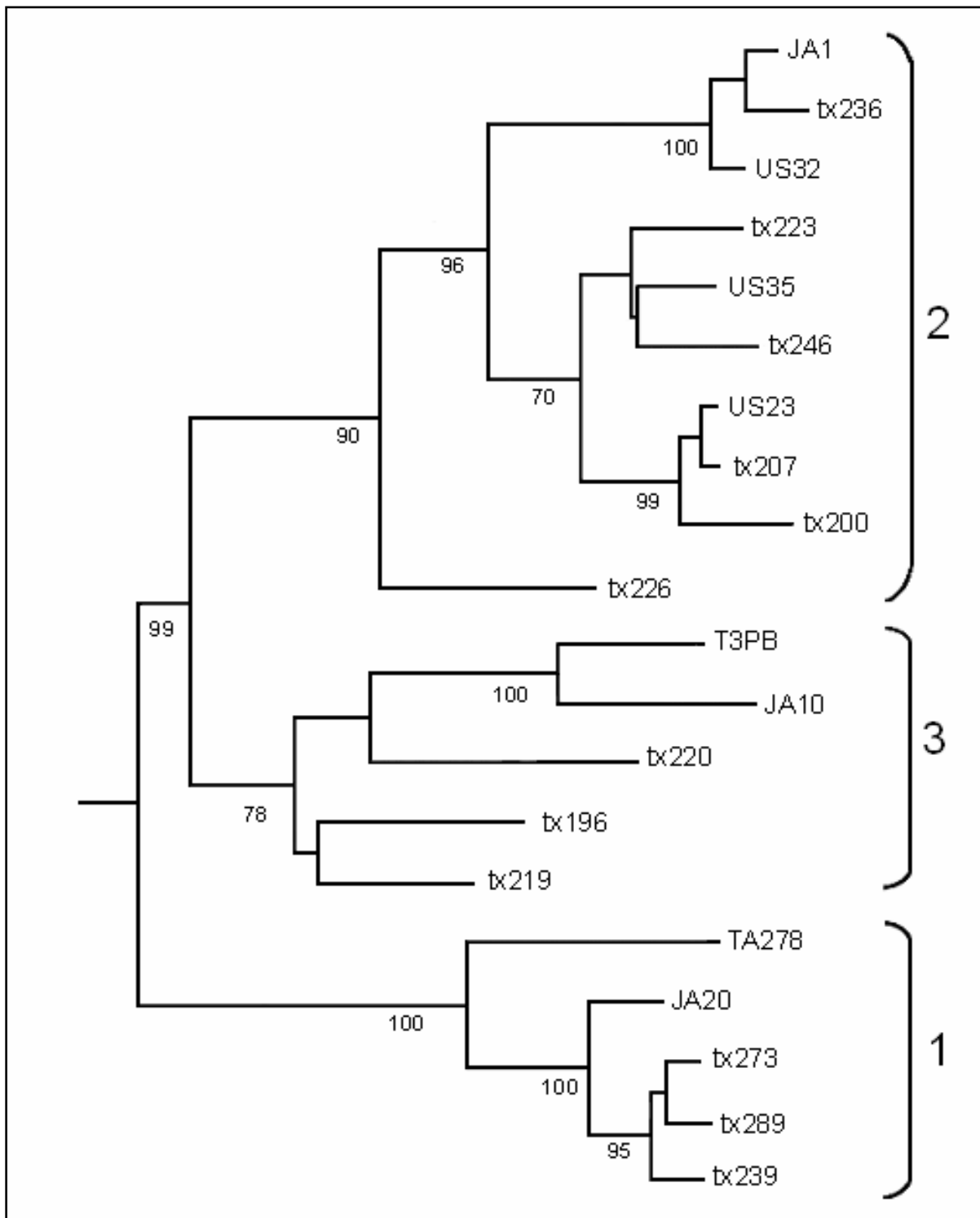
b) Nukleotid-szekvenálási eredmények

A 12 tartósan TTV (ORF-PCR) pozitív beteg minden mintájának (egy-egy beteg esetében 2-6, 113-363 nap különbséggel gyűjtött minta) második körös PCR termékeit

megszekvenáltuk. A szekvenciaadatok megerősítették, hogy a 12 tartósan fertőzött betegben egy TTV variáns volt jelen a nyomkövetés teljes időtartama alatt. A követés összesített időtartama 2924 nap volt, ez alatt négy nukleotid változás történt, négy különböző betegben. A nukleotid szekvenciákat a primer szekvenciák kihagyásával 74 aminosav hosszúságú peptid szekvenciákká fordítottuk le. A transláció minden esetben egyetlen leolvasási keretben volt lehetséges, amely az NGO61-es primert követő első nukleotidot használta a következő kodon első nukleotidjaként. Az előbbieken említett négy nukleotid változás három esetben eredményezett aminosav változást a 9., 26., illetve 63. pozícióban, a negyedik esetben csendes mutáció alakult ki a követés során (1. táblázat).

c) Szekvencia elemzés, a genotípus meghatározása

A 12 tartósan TTV pozitív beteg mintáiból nyert DNS szekvenciákat összehasonlítottuk a GenBank adatbázisban található teljes vagy majdnem teljes szekvenciák hasonló szakaszaival. A szekvencia elemzés alapján filogenetikai fát építettünk fel 'neighbor-joining' módszer segítségével. 1, 2, illetve 3 genotípusú TTV-t lehetett azonosítani 3, 6 illetve 3 beteg esetében. (5. ábra) A lefordított aminosav szekvenciák alapján is összeállított filogenetikai fa hasonló megoszlást mutatott, bár a kiszámított homológia mátrix az aminosavak szintjén valamivel alacsonyabb homológiát mutatott, mint nukleotid szinten.



5. ábra Filogenetikai fa a nyomonkövetett 12 vesetranszplantált betegből (tx196, tx200, tx207, tx219, tx220, tx223, tx226, tx236, tx239, tx246, tx273, tx289) származó TTV izolátumok nukleotid-szekvenciájának és a GenBank adatbázisból származó referencia TTV szekvenciák (JA1, JA10, JA20, TA278, T3PB, US23, US32, US35) genetikai analízise alapján. A filogenetikai fa a DNAMAN szoftver segítségével készült. Az ábra jobb oldalán arab számok (1, 2, és 3) jelzik az egyes genotípusokat. Az elágazásoknál feltüntetett számok az ezer mintára számolt bootsrap analízis értékeit jelzik.

Következtetések I.

Az irodalomból ismert adatokat (23, 73, 94, 96), melyek szerint a TTV 1. genocsoportba tartozó típusai nagyobb gyakorisággal fordulnak elő a transzplantáción átesett betegek körében, mint az egészséges populációban, a mi eredményeink is megerősítik. A felhasznált 1. genocsoportra specifikus PCR módszer a TTV genom egy polimorf régióját (N22) szaporítja fel, így lehetőség volt a fertőzést okozó variánsok vizsgálatára. A tartósan TTV pozitív betegek egymást követő mintáiban detektált TTV variánsok összehasonlítására két egymástól független módszert használtunk, SSCP-t és a PCR termékek szekvenálását. Ezen módszerek eredményei azt bizonyították, hogy a vesetranszplantált betegekben a TTV azonos, az 1., 2. illetve 3. genotípusba tartozó variánsa okozott tartós fertőzést.

Ezen tanulmányban a TTV-t leukocitákból mutattuk ki. Mivel a vírus nem egyenletesen oszlik meg az egyes vérkompartmentek között (56), megvizsgáltuk a legalább egy mintájában TTV pozitív 17 nyomonkövetett beteg közül 16 esetében plazma mintájukat is. UTR-PCR-rel 15 plazma volt TTV pozitív (94%), míg az ORF-PCR 12 plazma esetében volt pozitív. Az UTR-PCR érzékenysége két nagyságrenddel nagyobb volt mint az ORF-PCR-é, amint azt más szerzők is leírták korábban (17). Ennek megfelelően az ORF-PCR esetében tapasztalt különbség a leukocita illetve plazma- minták között, valószínűleg az eltérő vírusrészegységnek az eredménye, mint ahogy azt már az irodalomban leírták (81).

Vesetranszplantált betegekben, mind SSCP-vel mind a PCR termékek szekvenálásával egy domináns TTV variáns jelenlétét lehetett igazolni. A hosszútávú követéses vizsgálatok felfedték, hogy a betegek többségének állandó volt, míg néhányuknak megváltozott a TTV-állapota. A három TTV pozitívvá vált beteg egyike sem kapott a követés időtartama alatt vért vagy vérkészítményt, ami egy új fertőzés eredete lehetett volna. A TTV-állapot megváltozása kiegyensúlyozottan történt, közel azonos számú beteg vált TTV pozitívvá, mint amennyi esetében eltűnt a vírus, vagy a kimutathatósági határ alá csökkent a mennyisége, ami azt mutatja, hogy az egyetlen időpontban és mintából történő víruskimutatás megbízható eredményeket biztosít a TTV előfordulási gyakoriságának megállapítására.

A betegek TTV-állapota sem a transzplantációs korról, sem az operációt követő időszakban kapott kezeléssel, sem más vírusfertőzések – Cytomegalovírus (CMV) vagy Hepatitis-B vírus (HBV) - esetleges jelenlétével nem mutatott összefüggést. A CMV szeropozitivitás – függetlenül a TTV állapottól - gyakori volt a transzplantáció idején (>80%). A CMV antigenémia teszttel kimutatható CMV reaktiválódás szintén független volt a TTV jelenlététől. HBV fertőzöttség kis számban fordult elő a nyomonkövetett betegek csoportjában, a négy HBsAg pozitív beteg közül egy volt 1. genocsoportba tartozó TTV-pozitív. A vizsgált betegek egyike sem volt HIV-vel fertőzött. A fentieket figyelembe véve

megállapítható, hogy a transzplantációt követő időszakban alkalmazott kezelés nem volt hatással a betegek TTV állapotára. A haemodializált betegekben megfigyelt magas TTV pozitivitás (9, 39, 49) és az általunk kimutatott tartós TTV fertőzés azt sugallja, hogy a fertőzés már a haemodialízis során megtörténik és tartósan fennmarad a veseátültetést követően is.

A nyomonkövetéses vizsgálat felfedte, hogy az 1. genocsoportba tartozó TTV-vel történő tartós fertőzöttség gyakori jelenség vesetranszplantált betegek körében. Ez a tény az ellen a lehetőség ellen szól, hogy a TTV magas előfordulási gyakorisága ismételt újrafertőzésekkel származna, mivel egy új fertőzés - figyelembe véve a TTV izolátumok nagy heterogenitását – valószínűleg egy másik, eltérő nukleotid-szekvenciájú variáns megjelenését okozná, illetve egyes variánsok elterjednének a betegcsoporton belül. Az általunk vizsgált betegekben viszont egy-egy TTV variáns jelenlétét lehetett kimutatni a követés teljes időtartama alatt és az egyes betegekből izolálható variánsok egymáshoz képest rendszerint igen nagy szekvencia eltérést mutattak (3-42%).

Az N22 régió a TTV genom egy igen variábilis része, mely a virion felszínén kifejeződő humorális epitopokat kódolhat, mutációt azonban alig lehetett detektálni ezen területen. A gazdaszervezet immunrendszerének hatása oka lehet az újabb TTV variánsok és genotípusok kialakulásának, ez a hatás valószínűleg leginkább a genom hipervariábilis régióit érinti. A gyógyszeres immunszuppresszió hozzájárulhat ahhoz, hogy az egyes TTV variánsok hosszú ideig perzisztálnak vesetranszplantált betegekben.

II. TTV és HPV előfordulás gégetumoros betegekben

Egészséges egyének.

A 40 egészséges egyéntől 'cytobrush'-segítségével gyűjtött szájnyalvósejt-sejtekből származó DNS minták összehasonlítási alapként szolgáltak a gégenyalvósejt-tumoraiban tapasztalt vírusállapothoz.

Rekurrens papillomatozisos betegek.

A tíz betegből sebészi úton eltávolított gégepapillómák a HPV fertőzés jellegzetes szöveti tüneteit mutatták.

Malignizálódott papillomatozisos betegek.

Mind az öt beteg esetében a kiindulási diagnózis diszpláziát mutató papillomatozisos volt, amely később malignus transzformációba fordult. Az alacsony esetszám miatt ezen betegcsoport esetében nem végeztünk statisztikai analízist.

Gége laphámsejtes carcinomájában szenvedő betegek.

A betegeket két csoportra osztottuk a kórlefolyás alapján. Az egyik csoportba azon 14 beteg került, akiknél a primer tumor kimetszése után nem jelentkezett recidíva vagy metasztázis, a másik csoportban – tumorprogressziós csoport - ezen események valamelyike megfigyelhető volt a nyomonkövetés során.

A vizsgálati csoportokban tapasztalt TTV, HPV prevalencia és a kettősen fertőzött esetek számszerű eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze. A 3. táblázat tartalmazza a vizsgálati csoportokban tapasztalt prevalencia adatok statisztikai összehasonlításának eredményeit.

Az UTR-PCR-rel detektálható TTV pozitivitás minden esetben igen magas volt, a vizsgálati csoportok között e tekintetben nem volt statisztikai különbség, így a statisztikai analízis és a további elemzések során az 1. genocsoportba tartozó TTV pozitivitásra koncentráltunk.

2. táblázat: A különböző vizsgálati csoportok virológiai állapota.

Vizsgálati csoportok	TTV pozitív (UTR-PCR)	TTV pozitív (ORF-PCR)	HPV pozitív	TTV -HPV kettős fert.
egészségesek (N=40)	29 (72.5%)	2 (5%)	10 (25%)	1 (2.5%)
gégepapillomatozisos betegek (N=10)	8 (80%)	2 (20%)	10 (100%)	2 (20%)
malign. papillomatozisos betegek (N=5)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)
laphámsejtes carcinomás betegek (N=25)	22 (88%)	11 (44%)	12 (48%)	8 (32%)
progresszió mentes (N=14)	11 (78.6%)	3 (21.4%)	3 (21.4%)	0 (0%)
tumorprogressziós (N=11)	11 (100%)	8 (72.7%)	9 (81.8%)	8 (72.7%)

3. táblázat A vizsgálati csoportokban tapasztalt vírus-prevalencia statisztikai elemzése

	gége-papillomatozisos	laphámsejtes carcinoma	progresszió-mentes carcinoma	tumor-progressziós carcinoma
HPV prevalencia				
egészséges populáció	p<0.001	ns*	ns*	p=0.001
gége-papillomatozisos betegek		p=0.005	p<0.001	ns*
tumorprogresszió-mentes carcinoma				p=0.005
1. genocsoportba tartozó TTV prevalencia				
egészséges populáció	ns*	p<0.0001	ns*	p<0.0001
gége-papillomatozisos		ns*	ns*	p=0.03
tumorprogresszió-mentes carcinoma				p=0.017
HPV és 1. genocsoportba tartozó TTV együttes prevalenciája				
egészséges populáció	ns*	p=0.001	ns*	p<0.0001
gége-papillomatozisos		ns*	ns*	p=0.043
tumorprogresszió-mentes carcinoma				p<0.001

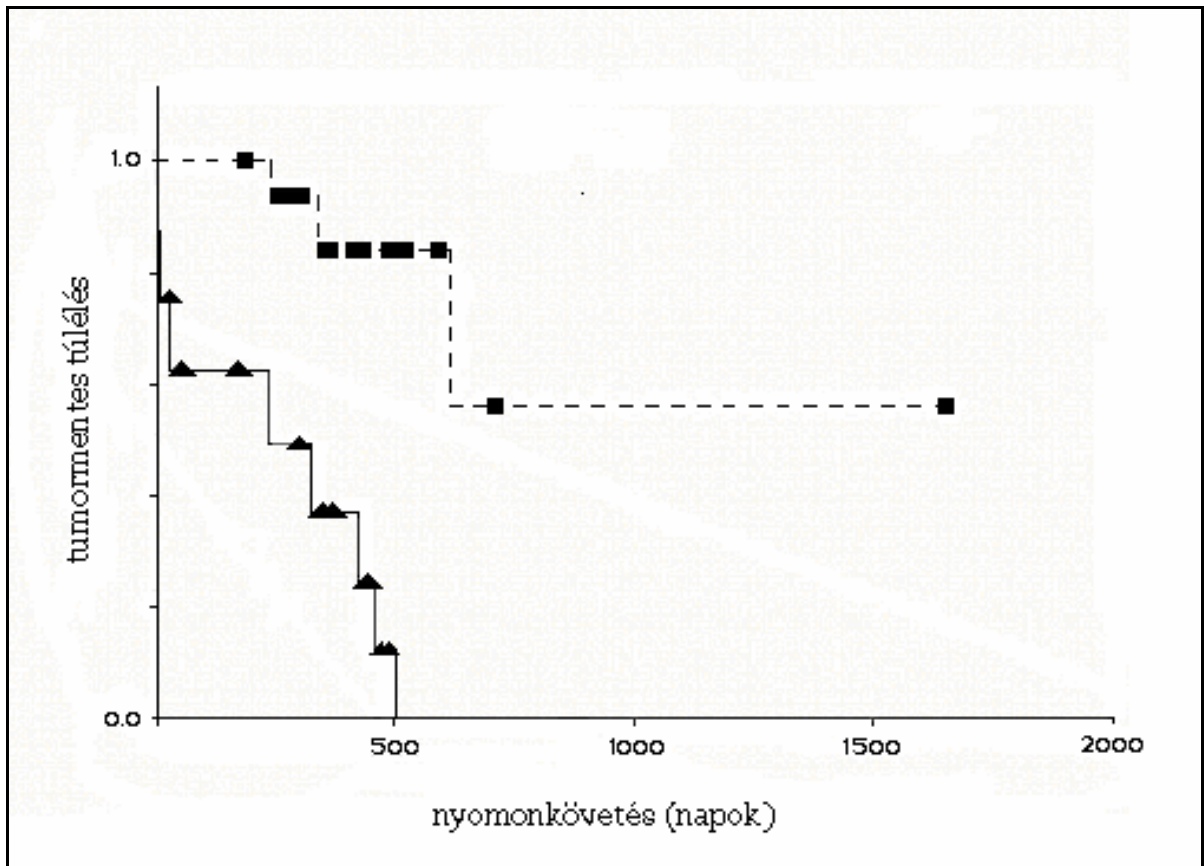
*nem szignifikáns

TTV (1. genocsoport) és HPV kettős fertőzés hatása a progressziómentes túlélésre

Virológiai állapotukat figyelembe véve összehasonlítottuk a 25 gégetumoros egyén betegségének kimenetelét. A kettős fertőzöttség aránya szignifikánsan magasabb volt a tumorprogressziós betegek körében, mint a progresszió mentes betegek esetében.

Összehasonlítottuk a TTV és HPV mentes (40%; 10/25), a csak az egyik vírussal fertőzött (28%; 7/25) illetve a mindkét vírust hordozó betegek (32%, 8/25) tumormentes túlélését. A vírusmentes betegek és a csak TTV- vagy csak HPV-fertőzött betegek tumormentes túlélése nem különbözött szignifikánsan (Kaplan-Meier $p=0,9571$), viszont a koinfekciós betegek tumormentes túlélése szignifikánsan rosszabb volt összevetve a fent említett két csoportéval (Kaplan-Meier $p=0,0017$; $p=0,0023$). Ezek alapján a csak az egyik vírussal fertőzött és a vírusmentes betegekből egy összevont csoportot képeztünk (68%; 17/25) és így hasonlítottuk össze tumormentes túlélésüket a kettősen fertőzött (32%; 8/25) betegekével. Mind a nyolc kettősen fertőzött beteg esetében tapasztalható volt tumorprogresszió, míg a többi beteg esetében csak 17,6%-ban (3/17) fordult elő metasztázis vagy recidíva.

Amint az a 6. ábrán látható, a kettősen fertőzött betegek progressziómentes túlélése szignifikánsan rosszabb volt mint a csak az egyik vírussal fertőzött illetve vírusmentes betegek csoportja esetében ($p<0,0001$).



6. ábra Gége laphámsejtes carcinomájában szenvedő betegek progressziómentes túlélése a nyomonkövetés idejének függvényében. Az ábrán a folyamatos vonallal összekötött háromszögek a TTV-vel és HPV-vel egyaránt fertőzött betegeket, a szaggatott vonallal összekötött négyzetek pedig a csak az egyik vírussal fertőzött és a vírusmentes betegeket jelzik.

Következtetés II.

A gége tumoros megbetegedései igen gyakoriak Magyarországon és nagyon magas a betegség mortalitása is. Ezen kórképek etiológiája még nem tisztázott a HPV fertőzés tumorra gyakorolt hatásának megítélése a szakirodalomban nem egységes.

Az 1997-ben felfedezett TTV kóroki szerepét ezidáig - a számos erre irányuló vizsgálat ellenére - egyetlen betegség esetében sem sikerült bizonyítani. TTV DNS-t száj- és gégenyálkahártyából és a nyálból is kimutattak (7), ami azt sugallja, hogy a vírusnak szerepe lehet ezen területek egyes megbetegedéseiben.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a TTV és a HPV fertőzés lehetséges szerepét gégetumороk esetében. Az össz-TTV (1.-5. genocsoport) előfordulási gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a vizsgálati csoportokban és jól korrelált az általunk korábban, egészséges véradók PBMC mintáiból kimutatható értékkel (95%).

Vizsgálataink legfontosabb eredményei a következők voltak: azon tumoros betegeknél, akiknél a műtét utáni időszakban komplikáció lépett föl - tumorrecidiva vagy metasztázis alakult ki -, szignifikánsan nagyobb volt az 1. genocsoportba tartozó TTV előfordulása (72,7%), mint a többi vizsgálati csoportban (5%-21,4%). A gége laphámsejtes carcinomájában szenvedő betegek között szignifikánsan rosszabb volt a TTV-vel és HPV-vel egyaránt fertőzöttek komplikáció mentes túlélése.

A kapott eredmények mögött a következő magyarázatok állhatnak:

a) Az 1. genocsoportba tartozó TTV könnyebben fertőzi meg a gégenyálkahártya bizonyos sejtjeit vagy HPV-fertőzött szöveteit.

Mivel az egészséges szájnyálkahártyában (5%), a papillomatosisos betegek esetében (20%), illetve a progressziómentes carcinomás betegeknél tapasztalt (21,4%) prevalencia nem tért el szignifikánsan a hasonló földrajzi területen egészséges véradók vérében detektált TTV pozitivitástól (18,5%-20%) (78), nem valószínű, hogy a tumorprogresszió átesett carcinomás betegek esetében tapasztalt magas TTV-prevalencia a vírus szöveti preferenciájával lenne magyarázható. A TTV-nek a HPV-fertőzött szövetek iránti esetleges preferenciájának ellentmond a 100%-ban HPV-fertőzött papillomás betegeknél tapasztalt alacsony TTV prevalencia.

b) Az 1. genocsoportba tartozó TTV esetleg preferenciát mutat a megváltozott proliferációjú sejtek iránt.

Ezt a lehetőséget az a tény teszi valószínűtlenné, hogy összevetve az egészséges nyálkahártyából származó mintákkal, sem a papillomatosisos betegek, sem a

tumorprogresszió-mentes carcinómások esetében nem tapasztaltunk megemelkedett TTV-prevalenciát, holott mindkét esetben jelen vannak abnormális proliferációjú sejtek.

c) Az 1. genocsoportba tartozó TTV és a HPV eddig ismeretlen módon történő interakciója eredményezi a tumorprogressziót.

Eredményeink alapján ez a magyarázat a legvalószínűbb. A vizsgálati csoportok közül csak a tumorprogresszió-áttesett carcinomás betegek esetében tapasztaltunk kiemelkedően magas koinfekciós arányt. Szintén ezt a lehetőséget támaszja alá a malignus transzformáció-áttesett papillomatosisok esetében tapasztalt magas koinfekciós arány.

A feltételezett együttműködés hátterében számos folyamat állhat. A TTV-ről leírták, hogy immunmodulatív hatása lehet (2), így a TTV fertőzés lokálisan meggyengítve az immunválaszt, megakadályozhatja a HPV fertőzött sejtek eliminációját. A két vírus együttes jelenléte megváltoztathatja a sejtmetabolizmust, módosulhat a HPV integráció, megváltozhatnak az antigén-prezentáló útvonalak, megnőhet a proto-onkogének és/vagy a sejtes/virális anti-apoptotikus fehérjék expressziója.

Összefoglalva, eredményeink azt sugallják, hogy az 1. genocsoportba tartozó TTV és HPV együttes jelenléte a szövetekben elősegíti a tumorprogressziót laphámsejtes gégecarcinoma esetében.

Ezen következtetéseket nagyobb számú mintán elvégzett vizsgálatokkal lehetne megerősíteni, illetve érdekes lenne a két vírus pontos szöveti lokalizációját is meghatározni az interakció természetének pontosabb megértése érdekében.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- I. A TT vírus 1. genocsoportba tartozó variánsai szignifikánsan nagyobb arányban fordulnak elő vesetranszplantáción átesett betegek vérében, mint a hasonló korú és nemi összetételű egészséges populációban ($p_{\chi^2} < 0,00001$). Az össz-TTV (1.-5. genocsoport) előfordulási aránya viszont nem különbözik szignifikánsan a két csoport esetében.
- II. Vesetranszplantált betegek esetében az 1. genocsoportba tartozó TT vírussal való fertőzöttség tartós, a vírus eliminálódása illetve új fertőzés megjelenése ritka esemény. A tartós fertőzést egy-egy beteg esetében a vírus azonos variánsa okozza, míg az egyes betegekből izolált TTV variánsok nukleotidszekvenciája egymástól nagy mértékben különbözik.
- III. A gége különböző tumoros megbetegedéseiben szenvedő betegek tumorszöveteiben tapasztalt össz-TTV-fertőzöttség (1.-5. genocsoport) nem tért el szignifikánsan az egészséges egyének szájnyálkahártyájában tapasztalt fertőzöttségtől. A gége laphámsejtes carcinomájában szenvedő betegek esetében, ha a tumoros szövetekben az 1. genocsoportba tartozó TTV-fertőzés HPV fertőzéssel társul, szignifikánsan rosszabb a betegek tumprprogresszió-mentes túlélése, mint a csak az egyik vírussal fertőzött, illetve a vírusmentes betegek esetében ($p < 0,0001$).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Gergely Lajos professzor úrnak, hogy az általa vezetett intézetben, az ő kiváló szakmai vezetése alatt készíthettem el ezen dolgozatot.

Köszönöm kollégáimnak, különösen Kónya Józsefnek és Szarka Krisztinának, valamint Juhász Attilának, Kardos Gábornak, Murvai Melindának, Szőke Krisztinának és az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársának a munkám során nyújtott szakmai segítséget, a hasznos tanácsokat és a kellemes munkahelyi légkört. Köszönöm munkacsoportunk technikusainak, Kissné Deák Andreának, Kissné Geréby Viktóriának, Rácz Péternének és Márton Józsefnek munkám során nyújtott segítségüket.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Asztalos László adjunktusnak (Debreceni Egyetem, 1. számú Sebészeti Klinika) és Major Tamás klinikai orvosnak (Debreceni Egyetem, Fül- Orr- Gégészeti és Fej- Nyaksebészeti Klinika) a klinikai mintákért és a minták klinikai paramétereinek hozzáférhetővé tételéért.

IRODALOMJEGYZÉK

- 1) Ball J, Curran R, Berridge S, Grabowska AM, Jameson C, Thomson BJ, Irving WL, Sharp PM. (1999) TT virus sequence heterogeneity *in vivo*: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol* 80: 1759-1768.
- 2) Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. (2001) Molecular properties, biology, and clinical implication of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* 14: 98-113.
- 3) Biagini P. (2004) Human circoviruses. *Veterinary Microbiology* 98: 95-101.
- 4) Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. (2002) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 38: 99-166.
- 5) Clayman GI, Stewart MG, Weber RS, El-Naggar A, Grimm E. (1994) Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120: 743-748.
- 6) Dai C, Yu M, Lin Z, Chen S, Hsieh M, Lee L, Hou N, Hsieh M, Wang L, Tsai J, Chuang W, Chang W. (2003) Clinical significance of TT virus (TTV) infection in chronic hepatitis C patients with high dose interferon-alpha therapy in Taiwan: re-evaluated by using new set of TTV primers. *Hepatol Res* 27: 95-100.
- 7) Deng X, Terunuma H, Handema R, Sakamoto M, Kitamura t, Ito M, Akahane Y. (2000) Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible route and replication site of TT virus. *J Med Virol* 62: 531-537.
- 8) Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML, Mushahwar IK. (1999) Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J Gen Virol* 80: 1743-1750.
- 9) Forns X, Hegerich P, Darnell A, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. (1999) 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* 59: 313-317.
- 10) Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, Pignolini P, Pulsoni A, Sourdis J, Pescarmona E, Vitolo D, Mandelli F. (2003) 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* 16: 109-118.
- 11) Hallett RL., Clewley JP., Bobet F., McKiernan PJ., Teo CG. (2000) Characterization of a highly divergent TT virus genome. *J Gen Virol* 81: 2272-2279.

- 12) Handa A, Dickstein B, Young NS, Brown KE. (2000) Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion* 40: 245-251.
- 13) zur Hausen H. (1996) Papillomavirus infection – a major cause of human cancers. *Biochem Biophys Acta* 1288: F55-F78.
- 14) He Z, Hui Z, Wang X, Song S, Dong Q, Yan J, Buehring GC, Luo G. (2003) Retrospective analysis of non-A-E hepatitis: possible role of hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol* 69: 59-65.
- 15) Hijikata M., Takahashi K., Mishiro S. (1999) Complete circular genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 260: 17-22.
- 16) Hijikata M, Iwata K, Ohta I, Nakao K, Matsumoto M, Matsumoto H, Kanai K, Baba K, Samokhvalov EI, Mishiro S. (1999) Genotypes of TT virus (TTV) compared between liver disease patients and healthy individuals using a new PCR system capable of differentiating 1a and 1b types from others. *Arch Virol* 144: 2345-2354.
- 17) Hino S (2002) TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol* 12: 151-158.
- 18) Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, Tanaka T, Nishizawa T, Okamoto H. (2000) Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 718-724.
- 19) Juhász A, Remenyik É, Szarka K, Veress G, Hunyadi J, Gergely L (1998) Consistent polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism pattern of human herpesvirus-8 in the course of classical Kaposi's sarcoma assumes its clonal origin. *J Med Virol* 54: 300-304.
- 20) Kakkola L, Kaipio N, Hokynar K, Puolakkainen P, Mattila PS, Kokkola A, Partio FK, Eis-Hübinger AM, Söderlund Venermo M, Hedman K. (2004) Genoprevalence in human tissues of TT-virus genotype 6. *Arch Virol* 149: 1095-1106.
- 21) Kamada K, Kamahora T, Kabat P, Hino S. (2004) Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* 321: 341-348.
- 22) Kamahora T, Hino S, Miyata H. (2000) Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Virol* 74: 9980-9986.
- 23) Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K, Yuji K, Ogawa S, Honda H, Mitani K, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H. (1999) TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood* 93: 2485-2490.

- 24) Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, Fukushi S, Mishiro S. (2000) Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol* 61: 165-170.
- 25) Koidl C, Michael B, Berg J, Stöcher M, Mühlbauer G, Grisold AJ, Marth E, Kessler HH. (2004) Detection of transfusion transmitted virus DNA by real-time PCR. *J Clin Virol* 29: 277-281.
- 26) Kojima H, Kaita KDE, Zhang M, Giulivi A, Minuk GY. (2003) Genomic analysis of a recently identified virus (SEN virus) and genotypes D and H by polymerase chain reaction. *Antiviral Res* 60: 27-33.
- 27) Komatsu H, Inui A, Sogo T, Kuroda K, Tanaka T, Fujisawa T. (2004) TTV infection in children born to mothers infected with TTV but not with HBV, HCV, or HIV. *J Med Virol* 74: 499-506.
- 28) Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Mäkitie A, Bäck L, Kontio R, Suuronen R, Lindquist C, Auvinen E, Molun A, Quint WG, Vaheiri A, Aaltonen LM. (2003) Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 107: 401-406.
- 29) Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. (1999) Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol* 80: 2115-2120.
- 30) Lindeberg H, Krogdahl A. (1999) Laryngeal cancer and human papillomavirus: HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas. *Cancer Letters* 146: 9-13.
- 31) Lopez-Alcoroncho JM, Barril G, Ortiz-Movilla N, Traver JA, Bartolome J, Sanz P, Selgas R, Carreño V. (2001) Prevalence of hepatitis B, hepatitis C, GB virus C / hepatitis G and TT viruses in predialysis and hemodialysis patients. *J Med Virol* 63: 103-107.
- 32) Luo K, Liang W, He H, Yang S, Wang Y, Xiao H, Liu D, Zhang L. (2000) Experimental infection of nonenveloped DNA virus (TTV) in *Rhesus* monkey. *J Med Virol* 61: 159-164.
- 33) Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, Marchi S, Ricchiuti A, Pistello M, Bendinelli M (2001) TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol* 64: 190-194.
- 34) 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. (2003) Relationship of TT virus and *Helicobacter pylori* infection in gastric tissues of patients with gastritis. *J Med Virol* 71: 160-165.

- 35) Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, March S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M. (2003) TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol* 77: 2418-2425.
- 36) Maggi F, Pifferi M, Tempestini E, Lanini L, De Marco E, Fornai C, Andreoli E, Presciuttini S, Vatteroni ML, Pistello M, Ragazzo V, Macchia P, Pietrobelli A, Boner A, Bendinelli M. (2004) Correlation between Torque Tenovirus infection and serum levels of eosinophil cationic protein in children hospitalized for acute respiratory diseases. *J Infect Dis* 190: 971-974.
- 37) Manni F, Rotola A, Caselli E, Bertorelle G, Di Luca D. (2002) Detecting recombination in TT virus: a phylogenetic approach. *J Molec Evol* 55: 563-572.
- 38) Mariscal LF, López-Alchoroncho JM, Rodriguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, de Lucas S, Bartolomé J, Carreño V. (2002) TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 301: 121-129.
- 39) Martinez NM, Garcia F, Garcia-Valdecasas J, Bernal C, Garcia Jr F, Lopez I, Alvarez M, Piedrola G, Maroto MC (2000) Prevalence and viral persistence of TT virus in patients on hemodialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 878-880.
- 40) McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. (1998) Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 20: 250-265.
- 41) Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, Kamahora T, Shirakii K, Hino S. (1999) 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* 73: 3582-3586.
- 42) Moen EM, Sagedal S, BjoroK, Degré M, Opstad PK, Grinde B. (2003) Effect of immune modulation on TT virus (TTV) and TTV-like-mini-virus (TLMV) viremia. *J Med Virol* 70: 177-182.
- 43) Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Dexai SM (1999) Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3177-3182.
- 44) Nakagawa N, Ikoma J, Ishihara T, Yasui-Kawamura N, Fujita N, Iwasa M, Kaito M, Watanabe S, Adachi Y. (2000) Biliary excretion of TT virus (TTV). *J Med Virol* 61: 462-467.

- 45) Niel C, de Olivera JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M, Viazov S. (1999) High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol* 57: 259-263.
- 46) Niel C, Saback FL, Lampe E. (2000) Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J Clin Microbiol* 38: 1926-1930.
- 47) Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1997) A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 92-97.
- 48) Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T, Sugai Y, Konishi K, Akahane Y, Ukita M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999) Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* 73: 9604-9608.
- 49) Oguchi T, Tanaka E, Orii K, Kobayashi M, Hora K, Kiyosawa K (1999) Transmission of and liver injury by TT virus in patients on maintenance hemodialysis. *J Gastroenterol* 34: 234-240.
- 50) Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. (1998) Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 56: 128-132.
- 51) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1998) Molecular cloning and characterisation of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 10: 1-16.
- 52) Okamoto H, Kato N, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999) Distinct genotypes of nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 57: 252-258.
- 53) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999) Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 259: 428-436.
- 54) Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, Takahashi M, Fukuda M, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999) The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01) Comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology* 259: 437-448.

- 55) Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Kishimoto J, Sai T, Sugai Y. (2000) TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 700-707.
- 56) Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. (2000) Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 74: 10236-10239.
- 57) Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, Kishimoto J, Hoshi Y, Mizuo H, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. (2000) Circular double stranded forms of TT virus DNA in the liver. *J Virol* 74: 5161-5167.
- 58) Okamoto H, Mayumi M. (2001) TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations. *J Gastroenterol* 36: 519-529.
- 59) Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F, Yoshikawa A (2001) Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* 288: 358-368.
- 60) Okamura A, Yoshioka M, Kubota M, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K. (1999) Detection of a novel DNA virus (TTV) sequences in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 58: 174-177.
- 61) Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X, Hayashi A, Ishiko H, Kobayashi K. (2000) Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J Med virol* 62: 104-108.
- 62) Ott C, Duret L, Chemin I, Treppe C, Mandrand B, Komurian-Pradel F. (2000) Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J Gen Virol* 81: 2949-2958.
- 63) Pár A, Takács M, Brojnás J, Berencsi G, Paál M, Horányi M, Miseta A, Hegedűs G, Mózsik G, Hunyady B. (2004) Viral co-infections in hepatitis C virus (HCV) infection. *Orv Hetil* 145: 987-992.
- 64) Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H (2002) Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol* 147: 21-41.
- 65) Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. (1999) Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tracts. *Cancer* 85:1903-1909.

- 66) Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. (2002) Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 8: 3187-92.
- 67) Rodriguez-Iñigo E, Casqueiro M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, López-Alchoroncho JM, Herrero M, Manzarbeitia F, Oliva H, Carreño V. (2000) Detection of TT virus DNA in liver biopsies by *in situ* hybridisation. *Am J Pathol* 156: 1227-1234.
- 68) Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW, Roggendorf M (1999) Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol* 13: 181-184.
- 69) Saback FL, Gomes SA, de Paula VS, da Silva RRS, Lewis-Ximenez LL, Niel C. (1999) Age-specific prevalence and transmission of TT virus. *J Med Virol* 59: 318-322.
- 70) Saback FL, Gomes SA, Niel C. (2002) High frequency of mixed TT virus infections in healthy adults and children detected by a simplified heteroduplex mobility assay. *J Virol Methods* 101: 117-125.
- 71) Saitou N, Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- 72) Sanderson RJ, Ironside JAD. (2002) Squamous cell carcinomas of the head and neck. *B M J* 325: 822-827.
- 73) Shang D, Lin YH, Rigopoulou I, Chen B, Alexander GJ, Allain JP. (2000) Detection of TT virus DNA in patients with liver disease and recipients of liver transplant. *J Med Virol* 61: 455-461.
- 74) Shibata M, Morizane T, Baba T, Inoue K, Sekiyama K, Yoshida M, Mitamura K (2000) TT virus infection in patients with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 95: 3602-3606.
- 75) Shiramizu B, Qiugi Y, Nigije H, Yanagihara R, Nerurkar VR. (2002) Investigation of TT virus in the etiology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 19: 543-551.
- 76) Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J, Jarvis LM. (1998) Detection of a novel DNA virus (TT virus) in blood and blood products. *Lancet* 352: 191-195.
- 77) Snijders P, van den Brule A, Meijer C, Walboomers J. (1995) HPV and cancer of the aerodigestive tract. *Papillomavirus Rep* 6:157-162.

- 78) 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. (2003) FEMS Immun Med Microbiol 35: 153-157.
- 79) Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov JI, Mishiro S. (2000) Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-Like Mini Virus. Intervirology 43: 119-123.
- 80) Takahashi K., Iwasa Y., Hijikata M., Mishiro S. (2000) Identification of a new human DNA virus (TTV-like minivirus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. Arch Virol 145: 979-993.
- 81) Takahashi M, Asabe S, Gotanda Y, Kishimoto J, Tsuda F, Okamoto H (2002) TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. Biochem Biophys Res Commun 290: 242-248.
- 82) Tanaka Y, Primi D, Wang RYH, Umemura T, Yeo AET, Mizokami M, Alter HJ, Shib JW. (2001) Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. J Infect Dis 183: 359-367.
- 83) Thom K, Morrison C, Lewis JCM, Simmonds P. (2003) Distribution of TT virus (TTV), TTV-like minivirus, and related viruses in humans and nonhuman primates. Virology 306: 324-333.
- 84) Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H. (2002) 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 67: 501-509.
- 85) Touissini M, Gallian P, Biagini P, Attoui H, Vialettes B, Berland Y, Tamalet C, Dhiver C, Ravaux I, De Micco P, De Lamballerie X. (2001) TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. J Clin Virol 21: 135-141.
- 86) Toyoda H, Nomura C, Watanabe M, Takahama K, Hobara R, Yokozaki S, Fukuda Y, Nakano H. (2000) Investigation of the association between infection with *Helicobacter pylori* and with TT virus, a novel DNA virus, in patients with gastroduodenal ulcer or ulcer scar. Eur J Gastroenterol Hepatol 12: 1289-1293.
- 87) Toyoda H, Fukuda Y, Nakama I, Katano Y, Yokozaki S, Hayashi K, Ito Y, Suzuki K, Nakano H, Saito H, Takamatsu J. (2001) TT virus genotype changes frequently in multiply transfused patients with hemophilia but rarely in patients with chronic hepatitis C and in healthy subjects. Transfusion 41: 1130-1135.

- 88) Tsuda F, Okamoto H, Ukita M, Tanaka T, Akahane Y, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999) Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* 77: 199-206.
- 89) Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999) Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* 179: 1245-1248.
- 90) Ukita M, Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. (2000) The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJNO1 and TJNO2) remotely related to the original TTV isolates. *Arch Virol* 145: 1543-1559.
- 91) Vasconcelos HCF, Gomes SA, Cataldo M, Niel C. (2003) Prevalence and genetic diversity of TT virus genotype 21 (YONBAN virus) in Brazil. *Arch Virol* 148: 517-529.
- 92) Werno AM, Wang Z, Schroeder BA, Woodfield G, Croxson MC. (2000) Prevalence and phylogenetic characterisation of TT-virus in the blood donor population of Auckland, New Zealand. *J Med Virol* 62: 109-114.
- 93) White PA, Li Z, Zhai X, Marinos G, Rawlinson WD. (2000) Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis (HMA). *Virology* 271: 382-389.
- 94) Wolff C, Diekmann A, Boomgaarden M, Korner MM, Kleesiek K. (2000) Viremia and excretion of TT virus in immunosuppressed heart transplant recipients and in immunocompetent individuals. *Transplantation* 69: 351-356.
- 95) Yan J, Chen L, Lou Y, Zhong X. (2002) Investigation of HGV and TTV infection in sera and saliva from non-hepatitis patients with oral diseases. *World J Gastroenterol* 8: 857-862.
- 96) Yokosuka O, Ikeuchi T, Kanda T, Kawai S, Imazeki F, Saisho H, Mazzalli M, Filho GA, Nishimura NF, Soares EC. (2000) The prevalence of TT virus infection in renal transplant recipients in Brazil. *Transplantation* 70: 1194-1197.
- 97) Yusufu Y, Mochida S, Matsui A, Okamoto H, Fujiwara K. (2001) TT virus infection in cases of fulminant hepatic failure-evaluation by clonality based on amino acid sequence of hypervariable regions. *Hepatol Res* 21: 85-86.
- 98) Zehender G, Manzin A, De Maddalena C, Colasante C, Solfrosi L, Corsi F, Bianchi-Bosisio A, Girotto M, Schirru I, Russo U, Galli M, Clementi M. (2001) Molecular epidemiology of TT virus in Italy and phylogenesis of viral isolates from subjects at different risk for parenteral exposure. *J Med Virol* 63: 76-84.

- 99) Zhao SS, Zhao JF, Gao CM, Wang SM. (2003) Transfusion-transmitted virus co-infection in other types of hepatitis and its genotypes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2: 90-93.

KÖZLEMÉNYEK

1. Az értekezésben felhasznált közlemények:

- I. Szládek Gy, Juhász A, Asztalos L, Szőke K, Murvai M, Szarka K, Veress Gy, Gergely L, Kónya J.
Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients. (2003)
Arch Virol 148: 841-851.
IF: 1.876
- II. Szládek Gy, Juhász A, Kardos G, Szőke 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.
Journal of Clinical Pathology (közlés alatt)
IF: 2,966

2 Egyéb közlemények

Szőke K, Szládek Gy, Szarka K, Juhász A, Veress Gy, Gergely L, Kónya J.
Human cytomegalovirus load in the peripheral blood determined by quantitative competitive polymerase chain reaction. (2001)
Acta Microbiol Immunol Hung 48: 313-321.
IF: -

Szőke K, Sáy T, Krasznai Z, Hernádi Z, Szládek Gy, Veress Gy, Dillner J, Gergely L, Kónya J.
Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities. (2003)
J Med Virol 71: 585-592.
IF: 2.371

Szőke K, Szalmás A, Szládek Gy, Veress Gy, Gergely L, Tóth FD, Kónya J
IL-10 promoter nt -1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix. (2004)
J Interferon Cytokine Res 24: 245-251.
IF: 2,120

Szalai E, Gerlei Zs, Szlávik J, Szládek Gy, Patel R, Hunyadi J, Gregely L, Juhász A.
Prevalence of human herpesvirus-8 infection in HIV positive patients with and without
Kaposi's sarcoma in Hungary. (2004)
FEMS Immunol Med Microbiol (közlés alatt)
IF: 1,789

3. Konferencia prezentációk

Szládek Gy, Kónya J, Juhász A, Szarka K, Gergely L.
A TT vírus (TTV) előfordulása vesetranszplantált betegekben
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2000. VIII. 24-26., Keszthely

Szládek Gy, Kónya J, Szőke K, Gergely L.
TT vírus (TTV) genotípusok perzisztenciájának vizsgálata vesetranszplantált betegek
nyomonkövetésével
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2001. X. 10-12, Balatonfüred

Szládek Gy, Kónya J, Szőke K, Gergely L.
Rekombináns antigén előállítás a TTV-ORF 1 N22-régiójának szekvenciája alapján
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2002. X. 9-11., Balatonfüred

Szládek Gy, Kónya J, Szőke K, Gergely L.
Preparation of recombinant antigene from the ORF1 region of the TT virus (TTV) genome
14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2003. X. 9-11.,
Balatonfüred

Szládek Gy, Juhász A, Kardos G, Major T, Tar I, Gergely L, Szarka K.
A TT vírus (TTV) koinfekció fokozhatja a Humán Papillomavírus (HPV) onkogén hatását
gégetumorokban.
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2004. X. 6.-9., Keszthely