

B 3775

**A HEPATITIS C, G ÉS ENTEROVÍRUSOK VIZSGÁLATA TERHES,
ÚJSZÜLÖTT, GYERMEK ÉS FELNŐTT POPULÁCIÓKBAN**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Müller Zsófia



**Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika,
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet,
Szegedi Tudományegyetem, Szeged**

2002

Bevezetés

A molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek szerepe az orvosbiológiai kutatásban talán sehol nem olyan kifejezett, mint a virológiában. A humán virális fertőzések vonatkozásában, a hepatitis C vírus (HCV), a hepatitis G vírus (HGV) és az enterovírusok direkt kimutatása főleg molekuláris biológiai diagnosztikai módszereken alapul. Ezek a vírusok az egész világon komoly problémát jelentenek: évente több millió ember fertőződik meg. A HCV fertőzés sok esetben enyhe vagy nem specifikus tünetekkel jelentkezik, majd krónikus hepatitis alakulhat ki. A HGV kórokozó szerepe nem bizonyított, és az enterovírus fertőzések kevesebb, mint 1%-ban jelentkezik konkrét megbetegedés, mind gyermekek, mind felnőttek esetében (meningitis, pleurodynia, peri- or myocarditis, conjunctivitis, kéz-láb-száj betegség, petyhüdt bénulás, stb.). Megváltozott immunstátuszú egyének esetén, mint terhes nők és gyermekek, még bonyolultabb a fertőződés megállapítása. A korrekt diagnózis felállításához szükség van a molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek alkalmazására.

Célkitűzések

1. Hepatitis C vírus

Célunk volt:

- a HCV fertőzés előfordulásának vizsgálata egészségesek (véradók és terhes nők) és rizikó csoportba tartozók (egészségügyi dolgozók és a véradók anti-HCV szűrését megelőzően vér- és vérkészítmény kezelésben részesült gyermekek) között,
- az enzim immunoassay (EIA) és a reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR) módszerek alkalmasságának vizsgálata a HCV fertőzés kimutatására,

- a dél-magyarországi krónikus hepatitis C vírussal fertőzött betegek genotípusának meghatározása automatizált 5'NC nukleotid szekvencia és filogenetikai analízissel,
- adataink randomizált számú délkelet-ausztriai krónikus hepatitis C vírussal fertőzött betegek adataival történő összehasonlítása.

2. Hepatitis G vírus

- Célunk volt az anti-E2 prevalenciájának meghatározása egészségesek és rizikó csoportba tartozók (krónikus HCV-fertőzöttek és egészségügyi dolgozók) körében.

3. Enterovírusok

Célunk volt:

- egy kvalitatív molekuláris biológiai diagnosztikai módszer kidolgozása, mely automatizált RNS extrakción és real-time PCR módszeren alapul
- a klinikai minták detektálási limit meghatározása utáni vizsgálata,
- a kvalitatív „in-house” módszer érzékenységének meghatározása.

Vizsgált személyek és módszerek

A dél-magyarországi régióban 1992 és 2001 között véradókat és krónikus hepatitis C vírusfertőzésben szenvedő betegeket, 1995 és 1997 között a véradók anti-HCV szűrését megelőzően vér- és vérképzőanyag kezelésben részesült gyermekeket, 1999 és 2000 között egészségügyi dolgozókat, 1999 és 2001 között terhes nőket, újszülötteket és gyermekeket vizsgáltunk második és harmadik generációs EIA (Abbott AxSYM HCV EIA 2.0, 3.0), RT-PCR és automatizált szekvencia, és filogenetikai analízis segítségével. A HGV szerokonverziót anti-E2 HGV ELISA teszttel vizsgáltuk. A szérummintákból a HCV RNS kvalitatív kimutatását Amplicor HCV Test 2.0 illetve Cobas Amplicor HCV Test 2.0 (Roche Molecular Systems,

Pleasanton, California, USA) használatával végeztük. A genotípus meghatározást automatizált TruGene HCV 5'NC Genotyping Kit (Visible Genetics, Toronto, Ontario) segítségével végeztük. A liquorból történő enterovírus kimutatásra két módszert hasonlítottunk össze: automatizált RNS extrakciót követő real-time PCR módszert és a kvalitatív „in-house” PCR-t. Az újonnan kifejlesztett molekuláris biológiai módszerhez az RNS extrakciót Total Nucleic Acid Isolation Kit-tel (Roche) végeztük automatizált MagNA Pure készüléken. A real-time PCR LightCycler készüléken történt.

Fontosabb új eredmények és gyakorlati következtetések

1. A vizsgált 45 719 véradó közül, 195 (0,42%) bizonyult konfirmáltan HCV fertőzöttnek. Azon véradók között, akik anamnézisében több mint három terhesség, vagy műtéti beavatkozás, transzfúzió, tetoválás, füllyukasztás szerepelt, szignifikánsan nagyobb esély mutatkozott a HCV fertőzésre. Régióinkban a konfirmáltan HCV fertőzött véradók előfordulási arányát viszonylag alacsonynak találtuk; a HCV átvitel főleg nozokomiális úton történt.

500 terhes nő közül 5-nek (1%) a szérum mintájában mutattunk ki HCV ellenanyagot, és közülük 3-nak (0,6%) a mintájában HCV RNS kimutatható. A terhes nők HCV szűrése mindaddig nem ajánlott, míg az elektív császármetszés hatásossága és hatékonysága a perinatális HCV átvitelben megerősítést nem nyer. A vizsgált 120 gyermek közül, akik a véradók HCV szűrését megelőzően vér- és vérkészítmény kezelésben részesültek 2 (1,7%) esetben detektáltunk konfirmált HCV fertőzést. A kontroll gyermekpopulációban (50) HCV fertőzés nem volt kimutatható. A vizsgált 2 051 egészségügyi dolgozó közül 11 (0,53%) esetben konfirmált ellenanyag pozitívítás, 10 esetben RT-PCR pozitívítás volt észlelhető, de 3 további esetben bizonytalan szerokonverzió mellett HCV RNS volt kimutatható. Mivel a vizsgált dél-magyarországi véradó, terhes nő, és egészségügyi dolgozó populációkban a HCV antitest prevalenciája alacsony volt, kevés gyermek fertőződött HCV-vel a véradók

HCV szűrését megelőzően vér- és vérkészítmény kezelésben részesült gyermekek közül.

A vizsgált 20 esetben csak az 1-es típusú HCV fordult elő, 1b szubtypus dominanciával. Eredményeinket összehasonlítva 20 Délkelet-Ausztriából származó genotípus eredményekkel, ahol 15 beteg 1-es genotípussal, 5 beteg 3-as vagy 2-es genotípussal fertőződött, kitűnik, hogy az 1-es genotípus a domináló mindkét régióban. Ezt a genotípust jellemzi a legrosszabb prognózis és az előnytelen reagálás az antivirális terápiára, bár az új terápiákban alkalmazott pegilált interferon és ribavirin kombinációja 44-69% tartós vírusmentességet is eredményezhet, még a 1b genotípus esetén is (44%).

Munkánk során a HCV RNS-t csak 8.9%-ban lehetett detektálni a határeset pozitív (S/CO: 0,8-1,5) mintákból, míg a konfirmáltan ellenanyag pozitív minták esetén ez 85%. A HCV fertőzés diagnózisát soha ne alapozzuk egy pozitív anti-HCV eredményre.

2. Az egészséges kontroll populációban 26,3% fordult elő HGV átvészelttség. Eredményeinket nemzetközi irodalomban talált adatokkal összehasonlítva, ez magas aránynak tűnik. Az anti-E2 pozitív vizsgált személyek anamnézisében transzfúzió és műtéti beavatkozás szerepelt. HGV fertőzés még magasabb arányban fordult elő HCV (50-62,5%), illetve hepatitis B vírus (HBV) fertőzött betegek (30%) között, habár bizonyíték mely a HGV szerepét egy konkrét betegségben bizonyítaná, hiányzik.

3. Két enterovírus törzs, a coxsackievírus B4 és echovírus 7, tízszeres hígítási sorozatát vizsgálva automatizált RNS feltárás és real-time PCR segítségével a detektálási limit 0,1 TCID₅₀ (50% „tissue culture infective dose”)-nak bizonyult. A Third European Union Concerted Action Enterovirus Proficiency Panel mintáit vizsgálva automatizált RNS feltárás és real-time PCR-rel LightCycler-en valamint „in-house” PCR módszerrel, az eredmények mindkét módszer esetén megfelelőnek

bizonyultak. Az összes vizsgált 109 liquor minta közül 23 (21%) ismételten pozitív eredményt adott mindkét módszerrel, és 82 negatívnak bizonyult. Az enterovírus RNS gyors kimutatását teszi lehetővé az új molekuláris biológiai módszer, melynek érzékenysége is megfelelő.

Végső következtetések

1. A krónikus HCV prevalenciája alacsony Dél-magyarországon és a transzfúzió által közvetített fertőzés lehetősége csaknem teljesen kizárható napjainkban. A nukleinsav amplifikációs módszerek bevezetése vagy az újonnan kifejlesztett antigén kimutatási eljárás alkalmazása tovább csökkenthetné a HCV vér- és vérkészítmények útján történő átvitelét. Régiónkra a HCV 1 genotípus túlsúlya jellemző. Erre a genotípusra jellemző a legrosszabb prognózis és a kedvezőtlen válasz az antivirális terápiára, bár az újonnan kifejlesztett antivirális gyógyszerekkel nagyobb arányú hosszú távú virológiai választ lehet elérni krónikus C hepatitis esetén. A nagymértékben automatizált szekvenáló módszer alkalmas nagy rutin diagnosztikai laboratóriumokban történő alkalmazásra. Az új rutin diagnosztikai módszerek alkalmasak terápiás döntések elősegítésére és a betegek nyomon követésére.

2. A HGV anti-E2 prevalenciája rizikó csoportba tartozók (krónikus HCV-fertőzöttek és egészségügyi dolgozók) között magasnak tűnik, habár a vírus kóroki szerepe még nem tisztázott.

3. Automatizált RNS extrakción és real-time PCR módszeren alapuló kvalitatív molekuláris biológiai módszer került kifejlesztésre MagNA Pure és LightCycler készülékek segítségével. A készülékek együttes alkalmazásával lehetőség nyílt gyors enterovírus kimutatási eljárás alkalmazására rutin diagnosztikai laboratóriumokban, amely lehetővé teszi a betegellátás során a kórházi bentfekvés idő lerövidítését és a szükségtelen antibiotikum és antivirális terápia kivédését.

Közlemények az értekezés témaköréből

Müller Z., Deák J., Horányi M., Szekeres É., Nagy I., Ozsvár Z., Nagy E., Lonovics J., Gál G. The detection of hepatitis C virus in South Hungary. *J Clin Virol* 2001; 20: 81-83.

IF: 1.744

Müller Z., Deák J., Szekeres É., Berecki Cs., Nagy E., Túri S. A hepatitis C vírusfertőzés kimutatása gyermekkorban. *Gyermekgyógyászat* 2001; 52: 266-270. (in Hungarian)

Müller Z., Deák J., Ross RS., Nagy E., Kovacs L., Kessler HH. Hepatitis C virus genotypes in Hungarian and Austrian patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol* 2002 (in press)

IF: 1,744

Rabenau HF., Clarici A., Mühlbauer G., Berger A., Vince A., Muller Z., Daghofer E., Santner BI., Marth E., Kessler HH. Rapid detection of enterovirus infection by automated RNA extraction and real-time fluorescence PCR. *J Clin Virol* 2002 (in press)

IF: 1.744

Müller Z., Deák J., Nagy E. Hepatitis G vírus – patogén vagy endosymbionta? *Klinikai Mikrobiológia és Infektológia* (in Hungarian) (in press)

Deák J., Ujhelyi E., Tarján V., Szekeres É., Gál Gy., Brojnás J., Müller Zs., Lázár A., Weszelovszky E., Nagy K., Megyeri I., Tóth É., Nagy E. HIV és hepatitis vírusok szűrővizsgálatok eredménye a Szegedi Tudományegyetem Általános

Orvostudományi karán dolgozók körében. Klinikai Mikrobiológia és Infektológia (in Hungarian) (in press)

Idézhető abstractok

Deák J., Ujhelyi E., Müller Zs., Tarján V., Brojnás J., Lázár A., Megyeri I., Tóth É., Nagy K., Nagy E. Determination of HIV and HCV antibodies and HBsAg in serum samples from medical university staff. J Clin Virol 2000; 18: 211-212. (abstract)
IF: 1.744

Müller Zs., Szekeres É., Deák J., Nagy I., Ozsvár Zs., Nagy E., Lonovics J. Mi a teendő határérték közeli hepatitis C vírus antitest eredmények esetén? Klinikai Mikrobiológia és Infektológia. 2001; 8: S19 (abstract)

Müller Zs., Deák J., Szekeres É., Nagy E., Gaál Gy., Ozsvár Zs., Rózsa M., Menyhárt É.: A hepatitis C vírus fertőzés retrospektív vizsgálata gyermekekben.
Magyar Gyermekorvosok Társasága és a Magyar Gasztroenterológiai Társaság Gyermekgasztroenterológiai Szekciójának XVII. Tudományos Ülése 2000. Szeged (abstract)

Müller Zs. Hepatitis C vírus kimutatás gyermekek és terhesek körében. STE PhD Tudományos Napok 2000. Budapest (abstract)

Müller Zs., Kessler HH, Deák J., Ross JS, Nagy I., Ozsvár Zs., Nagy E., Kovács L. Genomic characterization of Hungarian and Austrian HCV isolates by a new assay based on sequencing the 5' non translated region. 9th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, The Netherlands 2001. CD (abstract)

