

I.

Short communication

The detection of hepatitis C virus in South Hungary

Zsófia Müller ^{a,*}, Judith Deák ^a, Margit Horányi ^b, Éva Szekeres ^c,
István Nagy ^d, Zsófia Ozsvár ^d, Elisabeth Nagy ^a, János Lonovics ^d,
György Gál ^c

^a Department of Clinical Microbiology, University of Szeged, Somogyi B. tér 1., H-6725 Szeged, Hungary

^b Viral Nucleic Acid Laboratory, National Institute of Haematology and Immunology, Bánk bán u. 6., H-1519 Budapest, Hungary

^c Regional Blood Transfusion Centre, Pécsi u. 4/b, H-6725 Szeged, Hungary

^d Department of Internal Medicine, University of Szeged, Korányi fasor 8., H-6725 Szeged, Hungary

Abstract

Background: More than 100 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) worldwide. The prevalence of HCV infection varies from country to country and the natural history of hepatitis C infection is not well understood. **Objectives:** The prevalence of anti-HCV positive blood donors in South Hungary was determined. Potential risk factors of HCV transmission were investigated and compared to anti-HCV-negative blood donors. Furthermore, the rate of anti-HCV positivity in children who had received one or more blood transfusions prior to the implementation of anti-HCV blood donor screening was evaluated. **Study design:** A total of 45 719 blood donors and 120 children were tested for the presence of anti-HCV antibodies by second- and third-generation enzyme immunoassays. Positive results were confirmed by a recombinant immunoblot assay. Data on potential sources of HCV transmission were obtained by interviews. **Results:** Among blood donors, the rate of confirmed HCV antibody-positives was 0.4% (195 of 45 719 donors). Previous surgery, transfusion, more than three pregnancies, and tattoos were significantly correlated with confirmed anti-HCV positivity. Two of 120 children (1.7%) were confirmed anti-HCV positives. In both of them, serum HCV RNA could be detected. **Conclusions:** The prevalence of anti-HCV positive blood donors in South Hungary is low. Nosocomial infections and tattooing were found to be the most important risk factors for transmission of HCV. Because of the low prevalence of anti-HCV positive blood donors, only a small number of children, who received blood transfusions prior to the implementation of anti-HCV blood donor screening, are infected with HCV. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: HCV infection; HCV transmission; South Hungary; Anti-HCV positivity; HCV PCR

* Corresponding author. Tel.: +36-62-545-399; fax: +36-62-545-712.

E-mail address: zsomu@freemail.hu (Z. Müller).

More than 100 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) worldwide. The prevalence of HCV infection varies from country to country and the natural history of hepatitis C infection is not well understood.

Although 70–80% of HCV-infected persons become chronic carriers, most have relatively mild disease with slow progression. Chronic hepatitis C, however, is one of the major causes of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Twenty percent of patients with chronic hepatitis C develop liver cirrhosis and 10% hepatocellular carcinoma (Liang et al., 2000).

The aim of this study was to determine the prevalence of anti-HCV positives among blood donors in South Hungary. Potential sources of HCV transmission were evaluated and compared to anti-HCV negative blood donors. Furthermore, children who received blood transfusions prior to implementation of anti-HCV blood donor screening were tested on anti-HCV positivity.

A total of 45 719 blood donors were examined for the presence of anti-HCV antibodies from 1992 onwards. The median age of the blood donors was 35 years (range, 19–74 years). All confirmed anti-HCV positives were interviewed for potential risk factors of HCV transmission. Data were compared with those obtained from a randomized number of anti-HCV negatives. Furthermore, a total of 120 children who had received one or more blood transfusions prior to implementation of anti-HCV blood donor screening were tested on anti-HCV positivity.

Within 3 h of blood draw, blood collection tubes were centrifuged and aliquots were prepared and were either tested immediately or frozen at -80°C until testing. All sera were screened by either second- or third-generation enzyme immunoassays (Abbott AxSYM EIA 2.0 or 3.0). Confirmation of positive results was done by either second- or third-generation recombinant immunoblot assay (Ortho RIBA 2.0 or 3.0). For detection of HCV RNA in serum, either the Amplicor HCV Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) or the Cobas Amplicor HCV Test (Roche) was used.

For statistical analysis, the two-sided Fisher's exact test was used. A finding of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Of 45 719 blood donors, 195 (0.4%) were confirmed anti-HCV positives. The female/male ratio was 65/130. All 195 confirmed anti-HCV-positive blood donors and 390 randomized anti-negative

blood donors were interviewed for potential risk factors of HCV infection. In 408 patients, one or more risk factors could be identified, whereas in 179 patients, no risk factors were found (Table 1). Comparison of potential risk factors revealed that those who had undergone surgery, transfusion, and/or more than three pregnancies had a significantly higher risk of acquiring hepatitis C virus infection. Patients with one or more tattoos were at a five times higher risk to acquire HCV infection. Because of low numbers, no statistical calculation was possible with regard to intravenous drug abusers, health care workers, and patients who had undergone acupuncture. Patients with multiple risk factors had a four times higher risk to acquire HCV infection compared to those without risk factors.

Of 120 children who had received blood transfusions prior to the implementation of anti-HCV blood donor screening, two were found to be confirmed anti-HCV-positives.

HCV PCR was performed in 47 of the anti-HCV-positive blood donors. In 40 of them (85%), serum HCV RNA was detected. In the remaining seven blood donors (15%), HCV PCR gave a negative result. Both of the two confirmed anti-HCV-positive children were found to be positive for serum HCV RNA.

In this study, a relatively low prevalence of confirmed anti-HCV positive blood donors was found in South Hungary. Transmission of HCV occurred mainly by the nosocomial route. Other risk factors such as tattooing or intravenous drug use, however, must be taken into consideration. The percentage of anti-HCV antibodies in intravenous drug abusers was recently shown to be 24% in Hungary (Osztrógonác et al., 2000). Furthermore, health care workers seem to be at greater risk of acquiring HCV infection (Mihály et al., 1999). Because of the low prevalence of anti-HCV-positive blood donors, only a very small number of children, who had received blood transfusions prior to implementation of anti-HCV blood donor screening, were infected with HCV.

In future studies, molecular testing should routinely be implemented for confirmation of anti-HCV positivity. Furthermore, genotyping would provide additional epidemiological data. In a re-

Table 1
Comparison of risk factors in anti-HCV positive and anti-HCV negative blood donors

Risk factor	Confirmed anti-HCV positive (<i>n</i> = 195)			Anti-HCV negative (<i>n</i> = 390)			<i>P</i>	Odds ratio
	M ^a (<i>n</i> = 130)	F ^a (<i>n</i> = 65)	Total (%)	M (<i>n</i> = 220)	F (<i>n</i> = 170)	Total (%)		
Surgery	61	57	118 (60.5)	54	84	138 (35.4)	<0.0001	2.798
Transfusion	50	28	78 (40.0)	41	42	83 (21.3)	<0.0001	2.466
Insertion of earrings	9	64	73 (37.4)	4	150	154 (39.5)	0.654*	
Tattoo	39	3	42 (21.5)	18	2	20 (5.1)	<0.0001	5.078
Number of pregnancies > 3	0	19	19 (9.7)	0	18	18 (4.6)	0.001	3.488
Acupuncture	4	5	9 (4.6)	4	9	13 (3.3)		
Health care worker	3	5	8 (4.1)	4	6	10 (2.6)		
Intravenous drug abuse	2	0	2 (1.0)	0	0	0		
Multiple risk factors	105	64	169(86.7)**	84	153	237 (60.7)		
No risk factors	25	1	26(13.3)	136	17	153(39.2)		

^a Abbreviations: F, female; M, male.

* *P* < 0.05 in subgroup of females.

** *P* < 0.0001 compared to patients without risk factors.

cent study, HCV subtype 1b was shown to be the predominant subtype in Hungary (Naoumov, 1999). All in all, prevalence of chronic HCV is low in Hungary and transmission by blood transfusion can almost be ruled out in South Hungary nowadays.

Acknowledgements

I would like to thank Professor H. Kessler for stimulating discussion. This study was partly supported by grant OTKA T 023685.

References

- Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000;132:296–305.
- Osztrogonác H, Gerevich J, Horváth G, Tolvaj G, Dávid K. Examination of the prevalence of chronic viral hepatitis infections in drug users. *Orvosi Hetilap* 2000;141:715–8.
- Mihály I, Lukacs A, Rédei E, Telegdy L, Ibranyi E, Rókusz L. Percutaneous exposure and viral infections in hospital personnel involved directly in health care. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1999;46:426.
- Naoumov NV. Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. *J Hepatol* 1999;31:84–7.

II.

A hepatitis C vírusfertőzés kimutatása gyermekkorban

Müller Zsófia dr.,¹ Deák Judit dr.,¹ Szekeres Éva,³ Bereczki Csaba dr.,² Nagy Erzsébet dr.¹ és Túri Sándor dr.²

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet¹
(intézetvezető: Nagy Erzsébet dr.),
Gyermekgyógyászati Klinika² (intézetvezető: Túri Sándor dr.),
Szegedi Tudományegyetem, Szegedi Regionális Vérellátó Központ³
(intézetvezető: Gál György dr.),
Országos Vérellátó Szolgálat

Összefoglalás

A hepatitis C vírusfertőzés viszonylag ritka gyermekek között. Keveset tudunk a betegség gyermekkori lefolyásáról és a terápia hatékonyságáról. Gyermekkorban a fertőzés főleg két úton terjed: vér vagy vérkészítmények adásával és vertikális úton, a terhesség során, a vírushordozó anyától. 120 gyermek, akik a rendszeres hepatitis C vírus (HCV) ellenanyagszűrést közvetlenül megelőző időszakban vér- vagy vérkészítménykezelésben részesültek, és 500 terhes nő esetében vizsgáltuk a HCV fertőzés előfordulását, és adatainkat összehasonlítottuk egy kontrollgyermekcsoport és a véradók adataival. 2 gyermek (1,7%) és 5 terhes nő (1%) esetében tudtunk anti-HCV ellenanyagot kimutatni a kontrollgyermekcsoporttal 0 (0%) és a véradókkal 192 (0,4%) szemben. A 2 (1,7%) ellenanyag pozitív gyermek és 3 (0,6%) ellenanyag pozitív terhes, valamint a konfirmáltan anti-HCV pozitív véradók 85%-ának (155) vére tartalmazott HCV RNS-t. A vírushordozók mindegyike 1b genotípusba volt sorolható. Nem tapasztaltunk anyáról újszülöttre történő vírusátvitelt. A vírushordozó gyermekek további vizsgálata szükséges a fertőzés gyermekkori lefolyásának megfigyeléséhez.

Bevezetés

A hepatitis C vírusfertőzés a gyermekpopulációban viszonylag ritka (0,05–0,4%) a felnőttkori európai fertőzöttséggel összehasonlítva (0,5–2%)⁽¹³⁾ Magyarázatot adhat erre, hogy az effektívebb átvitel, mint a transzfúzió, haemodialízis, tetoválás, piercing, tűszúrásos baleset, intravénás droghasználat ritkábban vagy nem fordul elő gyermekkorban. A véradók hepatitis C vírus (HCV) ellenanyagszűrését megelőzően a transzmisszió főleg paranterális úton történt, majd a transzfúzióval összefüggésben hozható HCV fertőzések száma 0,45%-ról 0,001%-ra csökkent egy véregységre számolva.⁽¹¹⁾ 1992 után a vertikális átvitel került előtérbe, mivel ellentétben a HIV-vírussal, nem áll rendelkezésünkre olyan módszer, mellyel az átvitelt megakadályozhatnánk, gyakoriságát csökkenthetnénk. Anyáról újszülöttre terjedő fertőzés csak az esetek 6–7,8%-ban figyelhető meg.^(3, 14) A vírusfertőzés klinikai diagnózisának felállítása sokszor nehézségekbe ütközik. Az esetek többségében az anamnézis, a tünetek, a fizikális vizsgálat

Kulcsszavak:

hepatitis C, transzfúzió, vertikális transzmisszió, RT-PCR, genotípus

Rövidítések:

HCV = hepatitis C vírus, RT-PCR = reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció, INF = interferon, RB = ribavirin

Gyermekgyógyászat 2001. 3.



Dr. Müller Zsófia
Szeged,
Somogyi Béla tér 1.

6725



nem ad támpontot, és a májfunkciós paraméterek értéke intermittáló lehet. A megbetegedés akut szakaszában a betegek 20–40%-a, a krónikus stádiumban 60–80%-a anti-HCV pozitív. Immunszuprimált betegeknél a fertőzés szerológiai jele sok esetben nem mutatható ki. A ma már standardizált, kis kópiaszámot kimutató RT-PCR módszer segítségével a vérmintából kimutatható és mérhető a keringő nukleinsav az ún. ablak periódusban, a fertőzést követő 1–2 hónapban is. A betegség gyermekkori lefolyása és a terápiára adott válasz a kis esetszám és a rövid követési idő miatt kevésbé ismert.⁽¹²⁾ Befolyásolja a pathogenezt a fertőződés módja, az inokulum nagysága, az immunstátusz, az életkor, a genotípus, a vírusreplikáció, az esetleges hepatitis A, B vagy HIV koinfekció és az alkoholfogyasztás. Az interferon- α terápiát eddig nyolc szerző alkalmazta alacsony számú beteganyagban, 2 évnél idősebb, súlyos, egyéb betegségekben is szenvedő gyermekek esetében 3–5 MU/m² dózisban 6–12 hónapig, 3-szor hetente. A kezelt betegek 0–45%-ában tartós remissziót értek el.⁽¹²⁾ Egy esetben alkalmaztak interferon- α -2a és ribavirin kombinációt, mely effektív és biztonságos terápiának bizonyult.⁽⁸⁾ Ennek ellenére az IFN, valamint az IFN/RB terápia rutinszerű alkalmazása gyermekekben kellő tapasztalat hiányában nem ajánlott. Kevésbé ismert, hogy a HCV fertőzés aetiológiai szerepet játszhat olyan extrahepatikus kórképeknél, mint B-sejtes non-Hodgkin-lymphoma,⁽⁵⁾ kevert cryoglobulinaemia, membranoproliferatív glomerulonephritis és még számos egyéb kórkép.⁽⁹⁾ A véradók anti-HCV ellenanyagszűrését Magyarországon 1992-ben vezették be. Jelen tanulmányunk során megvizsgáltuk az 1992 előtt újszülöttkorban vér- és vérkészítmény-kezelésben részesült gyermekek hepatitis C vírusfertőzésének gyakoriságát. Vizsgáltuk a vertikális transzmisszió lehetőségét, és adatainkat összehasonlítottuk a szegedi véradásra jelentkezők és egy kontroll-gyermekecsoport adataival.

Beteganyag és módszer

120, újszülöttkorban vér- ill. vérkészítmény-terápiában részesült gyermek (fiú/lány: 59/61, életkor: 7 (5–10)). 500 terhes nő (életkor: 26 (17–38)) anti-HCV GPT szűrővizsgálatát végeztük el. A kontrollcsoportban 50 azonos életkorú és nemű (fiú/lány: 22/28, életkor: 7 (5–10)), hepatitis C vírus szempontjából rizikócsoportba nem tartozó gyermek anti-HCV és GPT vizsgálatát végeztük el. Az újszülöttkorban vér-, vérkészítmény-kezelésben részesült gyermekek szüleit levéllel kerestük fel, amelyben tájékoztattuk őket a tervezett utánvizsgálat céljáról és módjáról. Az esetleges anyai vírusátvitel kizárására a kiszűrt gyermekek édesanyjánál is megtörténtek a szűrővizsgálatok. Minden esetben anamnézist vettünk fel és fizikális vizsgálatot végeztünk. Az anti-HCV kimutatása másod- és harmadgenerációs EIA-teszttel (ABBOTT) történt. Reaktív minták esetén a mérést megismételtük, és elvégeztük az RT-PCR-t (Roche COBAS AMPLICOR HCV 2.0). A PCR-t gátló anyagok okozta fals negatív eredmények kizárása érdekében az Amplicor-teszt internális kontrollját alkalmaztuk. A vírustiter meghatározását bDNS technikával (CHIRON, Quantiplex), valamint a genotípus-meghatározást az 5' vég automatizált szekvenciaanalízisével (Visible Genetics, Trugene HCV Genotyping Kit) végeztük. A vizsgálatokat 1996-tól folyamatosan végeztük.

Eredmények

A véradók szűrését megelőzően vér- és vérkészítmény-kezelésben részesült gyermekek közül két esetben (1,7%) találtunk HCV ellenanyagot, ők egyben HCV PCR pozitívak is, és 1b genotípust hordoznak, és enyhén perzisztálóan emelkedett a májfunkciójuk (átlag GPT: 79,5 U/l). A bDNS vizsgálattal egy gyermekben nem, egy gyermeknél 0,644 MEQ/ml vírustitert tudtunk kimutatni. A gyermekeket 7 éves kortól követjük. A szűrt terhespopulációban 5 esetben (1%) mutattunk ki ellenanyagot és 3 (0,6%) esetben HCV RNS-t, májfunkciójuk egy esetben enyhe

eltérést mutatott (1. táblázat). Összesen 7 esetben vizsgáltuk a fertőzés átvitelét újszülöttekre, a szűrt terhespopuláción kívül még két esetet figyeltünk meg. A kezdeti anyai ellenanyag-pozitivitás után sem ellenanyagot, sem RNS-t nem tudtunk kimutatni. Három gyermeket 2 éves koráig, két gyermeket 1 éves koráig, két

gyermeket 0,7 éves koráig követtünk. A véradók (férfi/nő: 15240/30479, életkor: 34 (19–67) között 195 esetben (0,4%) konfirmáltunk ellenanyag-pozitivitást. A konfirmáltan pozitív véradók közül 85%-ban mutattunk ki HCV RNS-t. A kiszűrt betegeket hepatológiai gondozásra irányítottuk.

1. TÁBLÁZAT

A hepatitis C vírusfertőzés jellemzői az általunk vizsgált populációkban

	N	Anti-HCV pozitív páciensek átlag ALT eredménye (U/l)	Anti-HCV pozitív (%)	HCV PCR pozitív (%)	Genotípus
Véradók	45 719	54	192 (0,4)	155 (0,34)	–
Szűrt gyermekek	120	79,5	2 (1,6)	2 (1.60)	1b
Terhesek	500	45	5 (1,0)	3 (0.60)	1b
HCV pozitív anyától született gyermekek	7	15	7→0*	0	–

* születéskor a gyermekek anti-HCV pozitív vérmintái az anyai ellenanyagoknak tudható be.

Megbeszélés

Szeged és környékén a véradók adatai alapján alacsonynak mondhatjuk a hepatitis C vírusfertőzés prevalenciáját. Azonban a nem szelektált terhespopulációban már magasabb arányban figyelhetjük meg a HCV fertőzés arányát. Bár a vér- és vérkészítmény-kezelésben részesült gyermekek között már többszörös gyakoriságú fertőződést figyeltünk meg a véradók adataihoz viszonyítva, a kiszámú beteganyagból messzemenő következtetést nem lehet levonni, azonban hasonló populációt vizsgáló tanulmányok szintén magasabb százalékban regisztráltak vírusfertőzötteket.^(6, 15) Az Egyesült Államokban a véradók anti-HCV szűrését megelőző időszakban vértanszfúziót kapott egyének ellenanyag szűrővizsgálata javasolt a megnövekedett kockázat miatt⁽⁴⁾ (2. táblázat).

A HCV fertőzés prevalenciája nem szelektált terhespopulációban megfelel az európai, japán adatoknak, azonban a terhesek rutinszerű ellenanyagszűrése nem javasolt.⁽¹⁴⁾ Az irodalmi adatok szerint a betegség enyhe lefolyású gyermekekben, azonban azokban az esetekben, amikor nagy mennyiségű vírus került a szervezetbe, vagy több esetben több genotípussal fertőződnek, súlyos májelváltozások alakulhatnak ki.⁽²⁾ Az általunk vizsgált összes esetben 1b genotípust detektáltunk. Ed-digi vizsgálatok alapján ez a genotípus kedvezőtlen módon befolyásolja a betegség lefolyását és a terápiára adott választ.⁽¹⁶⁾ A vírus hordozók további vizsgálata szükséges a fertőzés gyermekkori lefolyásának megfigyelésére. Az EASL Nemzetközi Hepatitis C Konszenzus Konferencia ajánlása szerint a terhesség HCV-fertőzött anyáknál nem kontraindikált, az átvitel gyakorisága függ a vírus vérkoncentrációjától, azonban egyéb tényezők

2. TÁBLÁZAT

A hepatitis C vírusfertőzés fokozott rizikójú csoportjai gyermekkorban

Rizikócsoport	HCV-fertőzöttek aránya	Irodalmi hivatkozás
1992 előtt vér és vérkészítmény haemophilia és thalassaemia újszülötkorban egyéb okból rosszindulatú daganatból gyógyultak	80% 2,5% 6,6%	Schwimmer et al, 2000. Grasselly et al, 1997. Strickland et al, 2000.
1992 előtt nyitott szív műtéten átesettek	14,6%	Vogt et al, 1999.
1992 előtt máj- és szívtranszplantáció	4–7%	Davison et al, 1998.
haemodialízis	1–54%	Pereira et al, 1997.
vírushordozó anyától született újszülött	6–7,8%	Tajiri et al, 2001.

szerepe, mint genotípus, hüvelyi vagy császármetszéssel történő szülés, nem bizonyított. A szoptatás nem kontraindikált. nem HIV-fertőzött anyáknál nem tapasztaltak szoptatás útján átvitt fertőzést, bár az anyatej alkalmazhat vírust kis mennyiségben. A fertőzött gyermekek járhatnak közösségbe. Fontos a HCV-fertőzöttek hepatitis A és hepatitis B vakcinációja, mivel a koinfekció súlyosbíthatja a prognózist. Hasonló okból a hepatotoxicus drogok kerülésére is hívjuk fel a figyelmet. Sérülés esetén a sebet fedjük, valamint a serdülők figyelmét hívjuk fel a szexuális átvitel lehetőségére.⁽⁷⁾

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondunk *prof. Harald Kesslernek* (Molecular Diagnostics Laboratory, Hygiene Institute, KF-University, Graz) a genotipizáló vizsgálatok elvégzéséhez nyújtott segítségével, *dr. Horányi Margitnak* (OHII Vírusnukleinsav Laboratórium) a bDNS vizsgálatokért, és az SZTE Klinikai Kémiai Intézetnek a májfunkciós vizsgálatok elvégzéséért. A munka a TÉT Alapítvány A-26/99. számú projekt segítségével jött létre.

Detection of Hepatitis C Virus Infection in Childhood

Müller, Zsófia et al.

(Dept. for Clinical Microbiology of Univ. Med. School Szeged)

SUMMARY

Although hepatitis C virus infection is relative infrequent among children, not enough knowledge is yet available as consensus of the natural history, the clinical outcome and the efficacy of the therapy of the disease in childhood. 120 children who received blood or blood products at least once shortly after delivery and 500 pregnant women were studied and compared with a control child group and blood donors from the same area. 2 (1,7%) of the 120 children and 5 (1%) of the

pregnant women had HCV antibodies as compared with 0 (0%) in the control child group and 192 (0,4%) among the blood donors from the same area. The serum of 2 (1,7%) of the 120 children and 3 (0,6%) of the 500 women and 155 (85%) of the blood donors contained HVC RNA. In all the HCV infected patients the 1b genotype was found. Despite the presence of the maternal antibody in the first year of childhood, none of the 5 children's sera contained HCV RNA up to now. Children who were at risk of receiving HCV infection, should be screened for HCV antibody.

Key words:

hepatitis C, transfusion, vertical transmission, RT-PCR, genotype

IRODALOM

1. Azzari, C., Resti, M., Bortolotti F: Serum levels of hepatitis C virus RNA in infants and children with chronic hepatitis C. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 29, 314–7, 1999.
2. Badizadegan, K., Jonas, M. M., Ott, M. J. et al: Histopathology of the liver in children with chronic hepatitis C viral infection. *Hepatology* 28, 1416–23, 1998.
3. Bortolotti, F., Resti, M., Giacchino, R. et al: Hepatitis C virus infection and related liver disease in children of mothers with antibodies to the virus. *J. Pediatr.* 130, 990–3, 1997.
4. Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics. Hepatitis C virus infection. *Pediatrics* 101, 481–5, 1998.
5. Gasztanyi B., Pár A., Szomor Á. et al: A hepatitis C vírusinfekció és B-sejtes non-Hodgkin-lymphoma. *Orvosi Hetilap* 141, 2649–2651, 2000.
6. Grasselly M., Csákváry V., Schneider F. et al: Újszülötkorban vércserében és többszörös transzfúzióban részesült gyermekek hepatitis C vírus seroconverziójának gyakorisága. *Gyermekegyógyászat* 6, 666–669, 1997.
7. Jonas, M. M.: Hepatitis C infection in children. *N. Engl. J. Med.* 341, 912–3, 1999.
8. Lackner, H., Moser, A., Deutsch, J., Kessler, H. H. et al: Interferon- α and ribavirin in treating children and young adults with chronic hepatitis C after malignancy. *Pediatrics* 106, 53–60, 2000.
9. Mibály I., Rédei E., Ibrányi E. et al: Perinatal transmission of hepatitis C virus. *Acta Microbiol. Hung.* 46, 426–427, 1999.
10. Recommendation for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) HCV-related chronic disease. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 47 (RR-19), 1998.
11. Schreiber, G. B., Busch, M. P., Kleinman, S. H.: The risk for transfusion-transmitted viral infections. *N. Engl. J. Med.* 334, 1685–90, 1996.
12. Schwimmer, J. B., Balistereri, W. F.: Transmission, natural history, and treatment of hepatitis C virus infection in the pediatric population. *Semin. Liver Dis.* 20, 37–46, 2000.
13. Sokal, E. M., Bortolotti, F.: Update on prevention and treatment of viral hepatitis in children. *Curr. Opin. In Pediatrics* 11, 384–389, 1999.
14. Tajiri, H., Miyoshi, Y., Funada, S., Etani, Y. et al: Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20, 10–14, 2001.
15. Vogt, M., Lang, T., Frösner, G. et al: Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N. Engl. J. Med.* 341, 866–70, 1999.
16. Zein, N. N.: Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microb. Rev.* 13, 223–235, 2000.

Értesítés

A MAGYAR KLINIKAI NEUROGENETIKAI TÁRSASÁG IV. SYMPOSIUMA
(nemzetközi részvétellel)

Szombathelyen kerül megrendezésre, 2001. november 8–10-én.

Témái: neuromuscularis kórképek genetikai diagnosztikája, metabolikus encephalopathiák, neurodegeneratív betegségek, a cerebrovascularis kórképek genetikája, szabad előadások, a symposium első napjának délelőtti továbbképző kurzus.

Jelentkezés 2001. május 30-ig.

Bővebb információ: dr. Garzuly Ferenc, Markusovszky Kórház neurológiai osztály, 9700 Markusovszky u. 3.

Tel.: 94/515-515 Fax: 94/515-687, garzuly@mail.matav.hu

III.

**Rapid Detection of Enterovirus Infection by Automated RNA
Extraction and Real-Time Fluorescence PCR**

HOLGER F. RABENAU,^{1*} ALEXANDRA CLARICI,² GERHARD
MÜHLBAUER,³ ANNEMARIE BERGER,¹ ADRIANA VINCE,⁴
SZOFIA MULLER,⁵ ELISABETH DAGHOFER,² BRIGITTE I.
SANTNER,² EGON MARTH,² AND HARALD H. KESSLER²

*Institute of Medical Virology, JWG-University Frankfurt, D-60596
Frankfurt am Main, Germany¹; Molecular Diagnostics Laboratory,
Institute of Hygiene, KF-University Graz, A-8010 Graz, Austria²;
Roche Diagnostics GmbH, Vienna, Austria³; University Hospital of
Infectious Diseases, CRO-41000 Zagreb, Croatia⁴; and Department
of Clinical Microbiology, University of Szeged, Hungary⁵*

*Corresponding author. Mailing address:

Phone: ++49 69 6301 5312

Fax: ++49 69 6301 83061

E-mail: Rabenau@em.uni-frankfurt.de

ABSTRACT

Background: Molecular detection has been shown to be superior to tissue culture for the detection of enteroviruses in cerebrospinal fluid (CSF) specimens.

Objectives: In this study, a qualitative molecular assay based on automated RNA extraction with the MagNA Pure LC and real-time PCR on the LightCycler (LC) instrument was evaluated and compared with an in-house molecular assay.

Study design: A total of 109 CSF specimens were investigated for the comparative study. The detection limit of the new molecular assay was determined with 10-fold dilutions of two enterovirus strains and with the Third European Union Concerted Action Enterovirus Proficiency Panel.

Results: With the enterovirus strains, the detection limit of the LC assay was found to be 0.1 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose). When samples of the Third European Union Concerted Action Enterovirus Proficiency Panel were tested, both molecular assays gave identical results to the expected results, which were based upon the results of three reference laboratories using a total of four different molecular methods before distribution of the panel. When clinical specimens were tested, there was a correlation between the LC assay and the in-house assay in 105 of 109 cerebrospinal fluids.

Conclusions: The new molecular assay allows rapid detection of enterovirus RNA in CSF. It was found to be laborsaving and showed sufficient sensitivity.

Keywords: Enterovirus, PCR, Real-Time Fluorescence PCR

Introduction

Laboratory diagnosis of enterovirus meningitis has concentrated on isolation of virus from cerebrospinal fluid (CSF). Attempts to isolate enteroviruses, however, are laborious, time-consuming, and frequently unsuccessful (Chonmaitree et al., 1982; Rothbart, 1991; Rothbart and Romero, 1995). Molecular assays for detection of enteroviruses have been introduced and shown to be quicker and more sensitive than cell culture methods (Andreoletti et al., 1998; Gorgievski-Hrisoho et al., 1998; Kessler et al., 1997; Pozo et al., 1998; Searle et al., 1997). However, conventional in-house molecular assays based on reverse transcription-polymerase chain reaction require special equipment and staff and are not suitable for a high-throughput routine diagnostic laboratory. Furthermore, they lack standardization. Therefore, a more standardized and easier-to-handle molecular assay, the AMPLICOR Enterovirus Test, has been introduced and shown to be suitable for the routine diagnostic laboratory (Carroll et al., 2000; Kessler et al., 2000). This assay, however, has recently been taken from the market.

The MagNA Pure LC (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), a fully automated specimen preparation instrument, and the LightCycler (LC) instrument (Roche), which allows high-speed thermal cycling and online real-time fluorescence monitoring, have recently been introduced (Kessler et al., 2001; Wittwer et al., 1997). Combined employment of these instruments allows establishment of rapid molecular assays for detection of pathogens in the routine diagnostic laboratory.

In the present study, a qualitative molecular assay based on automated RNA extraction on the MagNA Pure LC instrument and real-time PCR with the LC system was evaluated. After

determination of the detection limit, clinical specimens were investigated. Results were compared with those of a qualitative in-house PCR assay.

MATERIALS AND METHODS

Study design. In the first step, two enterovirus strains, coxsackievirus B4 (VR-184) and echovirus 7 (VR-37) from the American Type Culture Collection (Rockville, Md.) were used for determination of the detection limit of the qualitative molecular assay based on automated RNA extraction and real-time PCR. Enterovirus RNA was extracted from tenfold dilutions of viral stocks ranging from 1000 to 0.01 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose). Experiments were repeated five times on different days.

In the second step, the Third European Union Concerted Action Enterovirus Proficiency Panel, which contained different concentrations of coxsackievirus A9, Coxsackievirus B5, echovirus 6, echovirus 11, and enterovirus 71, was used (Table 1). Samples were blind tested by both, the new qualitative molecular assay based on automated RNA extraction and real-time PCR and the in-house molecular assay.

In the third step, a total of 109 cerebrospinal fluid (CSF) specimens were investigated in a comparative study. CSF specimens had been collected from patients who were admitted to the University Hospitals in Frankfurt am Main (Germany), Zagreb (Croatia), Szeged (Hungary), and Graz (Austria). All specimens had been obtained prior to the start of therapy. Immediately after lumbar puncture, aliquots were prepared and frozen at -70°C . Aliquots were sent for blind investigation with the new molecular assay to the Institute of Hygiene, Graz, Austria and for blind investigation with the in-house molecular assay to the Institute of Medical Virology, Frankfurt am Main, Germany. Each sample was tested twice with the new molecular assay. With the in-house molecular assay, each positive result was confirmed by a second PCR run.

RNA extraction. For the new molecular assay, enterovirus RNA was extracted with the Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) on the automated MagNA Pure LC instrument. The extraction protocol “Total Nucleic Acids Serum, Plasma, Blood” was employed. A specimen volume of 200 µl was used. An elution volume of 100 µl, and a dilution volume of 0 µl was chosen. Other details, such as reagent volumes and number of reaction tips needed for the run, were automatically calculated by the software. The MagNA Pure LC automatically performed all remaining steps of the procedure with specially designed nuclease-free, disposable reaction tips. These reaction tips did not only transfer the samples, but also served as reaction vials for the procedure. Within the tips, nucleic acids were bound to magnetic beads, washed free of impurities, and finally eluted from the magnetic beads into a cooled sample cartridge. During the run, used reaction tips were automatically discarded into an attached, autoclavable waste bag.

After completion of DNA extraction, the MagNA Pure LC Cooling Block, which included the sample carousel with the adequate amount of LC capillaries, and the reaction vessel including the master mix were placed into the postelution area. After start of the postelution protocol, which had been programmed prior to the start of the first run, the MagNA Pure LC automatically pipetted 16 µl of the master mix and 4 µl of the processed sample into each of the LC capillaries.

For the in-house molecular assay, enterovirus RNA was isolated from 200 µl of CSF with the commercially available QIAamp HCV Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s recommendations.

Primer design. For the semi-nested real-time PCR assay, oligonucleotides deduced from the highly conserved 5′-non-coding

region of the enterovirus genome were used. The outer primers, which were identical to those used for the former AMPLICOR Enterovirus Test, allowed amplification of a 149-bp fragment; the final fragment, obtained after completion of the second round, had a length of 85 bp. The TaqMan probe (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) was labeled with 6FAM at the 5' end and with TAMRA at the 3' end. The primer and probe sequences and characteristics are shown in Table 2.

For the in-house PCR assay, oligonucleotides were derived from the highly conserved 5'-non-coding region as reported earlier (Chapman et al., 1990; Severini et al., 1993). The product, obtained after single-round PCR, had a length of 287 bp.

Real-time PCR on the LC instrument. The real-time PCR was performed on the specially designed LC instrument. Evaluation of the different assay formats has been described in detail elsewhere (Kessler, 2001). In this study, first-round LC-PCR was performed with the LightCycler RNA Master Hybridization Probes kit (Mn^{2+} final concentration, 5.5 mM; primer final concentration, 0.5 μM each). Sixteen microliters of master mix and 4 μl of RNA template were automatically pipetted into each glass capillary by the MagNA Pure LC. Sealed capillaries were centrifuged in a microcentrifuge and placed into the LC rotor. Reverse transcription was done for 20 min at 61°C. After denaturation for 2 min at 95°C, 60 LC-PCR cycles were run. After this, another denaturation was done for 5 s at 95°C. For the 10-s annealing, a touch-down profile (70° to 62°C; step size, 0.2°C per cycle) was employed. Elongation was done for 10 s at 72°C. After the first-round LC-PCR, capillaries were opened and the reaction mixes were centrifuged into 1.5-ml tubes. After this, 980 μl of bidistilled water were added into each tube. For the second round,

2 µl of this dilution were added to 18 µl of LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes kit (Mg^{2+} final concentration, 4 mM; primer final concentration, 0.5 µM each). After denaturation for 10 min at 95°C, 30 LC-PCR cycles were run. After this, another denaturation was done for 5 s at 95°C. For the 10-s annealing, another touch-down profile (65° to 60°C; step size, 0.2°C per cycle) was employed. Elongation was done for 10 s at 72°C.

In-house RT-PCR and detection of amplification products.

Enterovirus RNA was eluted with 50 µl preheated (95° C) water and 20 µl were taken for reverse transcription and amplification using the Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions (primer final concentration, 0.5 µM each). Reverse transcription (RT) was carried out at 50° C for 30 min. After stopping the reaction at 95° C for 15 min, amplification of cDNA was carried out in the same tube. Amplification involved 35 cycles on a Perkin-Elmer 9600 thermocycler. Thirty-five PCR cycles consisting of 30 s at 94° C, 30 s at 50° C, and 30 s at 72° C were run. After the final cycle, the tubes were incubated for an additional 5 min at 72° C. Each amplification run contained three negative controls and one positive control. Amplification products were analyzed by gel electrophoresis on a 2% agarose gel. All positive results were confirmed by a complete second run.

RESULTS

When tenfold dilutions of two enterovirus strains, coxsackievirus B4 and echovirus 7, were tested by automated RNA extraction and real-time PCR on the LC instrument, the detection limit was found to be 0.1 TCID₅₀ (Fig. 1). With the dilution containing 0.01 TCID₅₀, the new molecular assay produced negative results.

When samples from the Third European Union Concerted Action Enterovirus Proficiency Panel were tested with automated RNA extraction and real-time PCR on the LC instrument and with the in-house assay, both molecular assays gave identical results to the expected results, which were based upon the results of three reference laboratories using a total of four different molecular methods before distribution of the panel. For coxsackievirus A9, 1 TCID₅₀ (vial 3) and 0.1 TCID₅₀ (vial 2) could consistently be detected, whereas 0.01 TCID₅₀ (vial 1) were not detected at all. Both, the only sample containing coxsackievirus B5 (100 TCID₅₀; vial 7) and the only one containing echovirus 6 (10000 TCID₅₀; vial 5) were found positive. For Echovirus 11, 10000 TCID₅₀ (vial 9), 100 TCID₅₀ (vial 11), and 10 TCID₅₀ (vial 6) tested positive repeatedly. The only sample containing enterovirus 71 (10 TCID₅₀; vial 8) was consistently found positive.

From a total of 109 CSF specimens, 23 (21%) were repeatedly found to be positive by automated RNA extraction and real-time PCR on the LC instrument and by the in-house PCR assay and 82 were found to be negative by both molecular assays (Fig. 2). Four samples yielded discrepant results: three of them were positive with the in-house assay and negative with the real-time assay, and the remaining was positive with the real-time PCR assay and negative

with the in-house PCR assay (Table 3). Upon repetition, all samples were repeatedly tested with the same results.

The molecular assay based on automated RNA extraction and real-time PCR on the LC instrument proved to be quick and laborsaving. The whole procedure could be finished within 4 h. Automated RNA isolation with the MagNA Pure LC could be completed within 105 min for extraction of 32 samples. This included a 15-min set-up of the MagNA Pure LC. The time required for the postelution protocol was 20 min. After centrifugation, the combined cycling and detection procedures took another 115 min including 15 min for centrifugation and pipetting between the two rounds. No contamination was observed during the whole study. The in-house PCR assay took about 4 h. One hour was required for DNA extraction, 2 h were required for PCR, and another hour was required for detection by gel electrophoresis.

DISCUSSION

In the present study, a new molecular assay based on automated DNA extraction with the MagNA Pure LC and real-time PCR on the LC instrument was evaluated and compared to a conventional in-house PCR assay. Compared with the in-house assay, the detection limit of the new molecular assay was found to be similar indicating that both extraction methods may result in similar amounts of enterovirus RNA.

In this study, discrepant results may have emerged from amplification failures of enterovirus serotypes, contamination problems, and nonspecific amplification products. Primer and probe sets most frequently used for detection of enteroviruses from clinical specimens are those reported by Chapman and coworkers and Rotbart et al. (Chapman et al., 1990; Rotbart, 1990; Rotbart et al., 1994). For the new molecular assay, primers with minor modifications to those first described by Rotbart were employed. Primers and probes identical to or with minor modifications to those first described by Rotbart were found to be truly panreactive with human enteroviruses (Halonen et al., 1995; Kessler et al., 1997; Zoll et al., 1992). These primers only failed to amplify echoviruses 22 and 23, which have been reported to be genetically distinct picornaviruses and are rarely isolated in CSF (Auvinen and Hyypiä, 1990; Coller et al., 1990; Oberste et al., 1998; Strikas et al., 1986). Specific PCR products were not detected when testing a variety of non-enterovirus meningitis pathogens; however, amplification products were detected from RNA extracts of five rhinovirus serotypes (Kessler et al., 1997). Cross-reactivity between rhinoviruses and enteroviruses is produced by sequence homology between these two picornavirus groups. This cross-reactivity,

however, is of minor importance when testing CSF specimens, as there are no published reports of isolation of rhinovirus from CSF specimens. This would, however, have an important impact on testing of nasal or pharyngeal swabs. For the in-house PCR assay, primers with minor modifications to those first described by Chapman et al. were employed. These primers have also been shown to be panreactive with human enteroviruses and to fail to amplify echoviruses 22 and 23 (Chapman et al., 1990).

It has been demonstrated that the probability of false-positive results because of contamination increases in relation to the number of hands-on manipulations involved in sample processing (Clewley, 1989; Kwok and Higuchi, 1989). The new molecular assay included RNA extraction with the MagNA Pure LC, a fully automated nucleic acids extraction instrument. This instrument has recently been shown to be reliable and did not produce contamination during a study on automated extraction of herpes simplex DNA (Kessler, 2001). The remaining weakness in the design of the new molecular assay that could lead to false-positives may be pipetting steps between the first-round PCR and the second-round PCR. In the future, this step may be avoided by a two-round PCR on the LC using a single closed capillary to exclude the possibility of amplification product carry-over (Berg et al., 2001).

Detection formats of the LC technology include general detection of double stranded DNA (SYBR® Green technology), which corresponds to gel electrophoresis of in-house assays, and specific detection of the target sequence by using a TaqMan probe or hybridization probes (Landt, 2001). Probes prevent false-positive results due to nonspecific amplification products and guarantee

specificity of results. Therefore, probes should always be employed for molecular assays in the routine-diagnostic laboratory.

Time for testing 32 samples was similar with both molecular assays. If less than 8 specimens are extracted, the extraction kit used for the in-house molecular assay will be the quicker method. It must, however, been taken into consideration that the hands-on time for extraction is only 15 min when using the MagNA Pure LC. When compared with the in-house assay, a 50% increase of cost was observed with the LC assay.

In summary, the new molecular assay based on extraction with the MagNA Pure LC and real-time PCR on the LC instrument proved to be suitable for the routine diagnostic laboratory. Compared to a conventional in-house assay, it was found to be less labor-intensive and easy to use. Because of the lower number of manipulations, there may be a lower probability of getting false-positive results that are due to contamination.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Peter Hufnagl for providing sequences for seminested PCR and TaqMan probe. We gratefully acknowledge Michael Bozic, Evelyn Stelzl, and Marhild Kortenbusch-Brauner for technical assistance.

REFERENCES

1. Andreoletti L, Blassel-Damman N, Dewilde A, Vallee L, Cremer R, Hober D, Wattré P. Comparison of use of cerebrospinal fluid, serum, and throat swab specimens in diagnosis of enteroviral acute neurological infection by a rapid RNA detection PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998;36,589-591.
2. Auvinen P, Hyypiä T. ECHO viruses include genetically distinct serotypes. *J Gen Virol* 1990;71,2133-2139.
3. Berg J, Nagl V, Mühlbauer G, Stekel H. Single-tube two-round polymerase chain reaction using the LightCycler instrument. *J Clin Virol* 2001;20,71-75.
4. Carroll KC, Taggart B, Robinson J, Byington C, Hillyard D. Evaluation of the Roche AMPLICOR enterovirus PCR assay in the diagnosis of enteroviral central nervous system infections. *J Clin Virol* 2000;19,149-156.
5. Chapman NM, Tracy S, Gauntt CJ, Fortmueller U. Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J Clin Microbiol* 1990;28,843-850.
6. Chonmaitree T, Menegus MA, Powell KR. The clinical relevance of CSF viral culture. A two-year experience with aseptic meningitis in Rochester, New York. *JAMA* 1982;247,1843-1847.
7. Clewley JP. The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. *J Virol Methods* 1989;25,179-188.
8. Coller BG, Chapman NM, Beck MA, Pallansch MA, Gauntt CJ, Tracy SM. Echovirus 22 is an atypical enterovirus. *J Virol* 1990;64,2692-2701.
9. Gorgievski-Hrisoho M, Schumacher JD, Vilimonovic N, Germann D, Matter L. Detection of enteroviruses by RT-PCR in cerebrospinal fluid

during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. J Clin Microbiol 1998;36,2408-2412.

10. Halonen P, Rocha E, Hierholzer J, Holloway B, Hyypiä T, Hurskainen P, Pallansch M. Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. J Clin Microbiol 1995;33,648-653.
11. Kessler HH, Santner B, Rabenau HF, Berger A, Vince A, Lewinski C, Weber B, Pierer K, Stuenkel D, Marth E, Doerr HW. Rapid diagnosis of enterovirus infection by a new one-step reverse transcription-PCR assay. J Clin Microbiol 1997;35,976-977.



12. Kessler HH. Qualitative detection of herpes simplex virus DNA on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer CT and Nakagawara K, editors. Rapid cycle real-time PCR – methods and applications. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2001;331-340
13. Kessler HH, Mühlbauer G, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, Marth E. Fully automated Nucleic acid extraction: MagNA Pure LC. Clinical Chemistry 2001;47,1124-1126.
14. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature (London) 1989;339,237-238.
15. Landt O. Selection of hybridization probe sequences for use with the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer CT and Nakagawara K, editors. Rapid cycle real-time PCR – methods and applications. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2001;35-41.
16. Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. Virus Res 1998;56,217-223.
17. Pozo F, Casas I, Tenorio A, Trallero G, Echevarria JE. Evaluation of a commercially available reverse transcription-PCR assay for diagnosis of enteroviral infection in archival and prospectively collected cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol 1998;36,1741-1745.
18. Rotbart HA. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol 1990;28,438-442.
19. Rotbart HA. Nucleic acid detection systems for enteroviruses. Clin Microbiol Reviews 1991;4,156-168.
20. Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, Lewinsky C, Murphy N, Keyser EF, Spadoro J, Kao SY, Loeffelholz M. Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. J Clin Microbiol 1994;32,2590-2592.

21. Rotbart HA, Romero JR. Laboratory diagnosis of enteroviral infections. In: Rotbart H, editor. Human enterovirus infections. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1995;401-410.
22. Searle K, Dirmeier D, Metzger C, Enders G. A semi-automated PCR-ELISA as an alternative to virus isolation in cell culture for the routine diagnosis of EV infection. Clin Lab 1997;43,659-664.
23. Severini GM, Mestroni L, Falaschi A, Camerini F, Giacca G. Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. J Clin Microbiol 1993;31,1345-1349.
24. Strikas RA, Anderson LJ, Parker RA. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970-1983. J Infect Dis 1986;153,346-351.
25. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 1997;22,176-181.
26. Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. J Clin Microbiol 1992;30,160-165.

TABLE 1. Third European Union Concerted Action Enterovirus Proficiency Panel

Vial number	Virus	Dilution ^a	Expected result ^b
1	Coxsackievirus	10 ⁻⁸	negative
2	A9	10 ⁻⁷	positive
3	Coxsackievirus	10 ⁻⁶	positive
4	A9		negative
5	Coxsackievirus	10 ⁻⁴	positive
6	A9	10 ⁻⁶	positive
7	None	10 ⁻⁵	positive
8	Echovirus 6	10 ⁻⁵	positive
9	Echovirus 11	10 ⁻³	positive
10	Coxsackievirus		negative
11	B5	10 ⁻⁵	positive
	Enterovirus 71		
	Echovirus 11		
	None		
	Echovirus 11		

^a Dilution of original stock; TCID₅₀/ml of original virus stock; coxsackievirus A9, 3.6 x 10⁶; coxsackievirus B5, 3.2 x 10⁷; echovirus 6, 2.0 x 10⁸; echovirus 11, 2.5 x 10⁷; enterovirus 71, 5.6 x 10⁶.

^b Expected results are based upon the results of three reference laboratories using a total of four different molecular methods before distribution of the panel.

TABLE 2. Oligonucleotides used for the new molecular assay

Assay step and primer (sequence) or product	Positions amplified ^a	Length (nucleotide s)	G+C content (%)	Melting temp (°C)
Initial PCR				
Primers				
Forward (5'-CCCCTGAATGCGGCTAATCC)	455-474	20	60.0	61.7
Reverse (5'-CAATTGTCACCATAAGCAGCCA)	582-603	22	45.5	58.8
Product	455-603	149		
Seminested PCR				
Primers				
Forward (5'-GTAACGGGCAACTCTGCAGC)	517-536	20	60.0	60.2
Reverse (5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA)	582-601	20	45.0	55.2
Product	517-601	85		
TaqMan probe (5'-6FAM-CACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC-TAMRA)	537-562	26	55.6	69.0

^aGenBank accession number: AF231765 (Coxsackievirus B3 strain PD, complete genome).

TABLE 3: Discrepant results

Patient no.	Age (yr)/sex ^a	In-house PCR assay (R) ^b	Real-time PCR (R) ^b	Enterovirus Serology ^c	Final diagnosis
1	6/M	N	P (P)	ND	Aseptic meningitis
2	6/M	P (P)	N (N)	ND	Aseptic meningitis
3	7/M	P (P)	N (N)	IgG P; IgM N	Aseptic meningitis
4	30/M	P (P)	N (N)	ND	Aseptic meningitis

^a F, female; M, male.

^b R, repeat result; N, negative; P, positive.

^c ND, not done; N, negative; P, positive; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M.

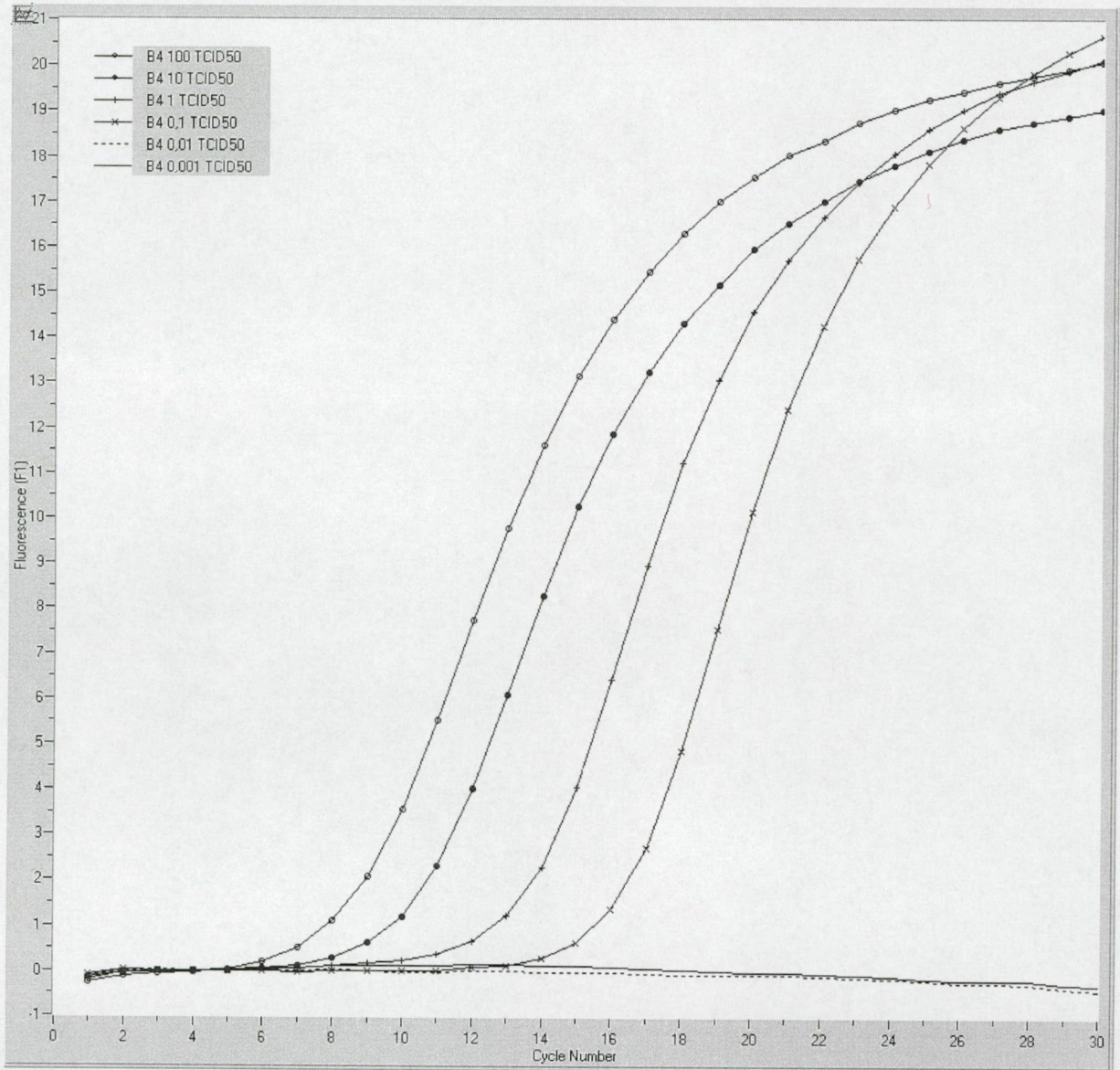


FIG. 1. LC PCR results of tenfold dilutions of coxsackievirus B4.

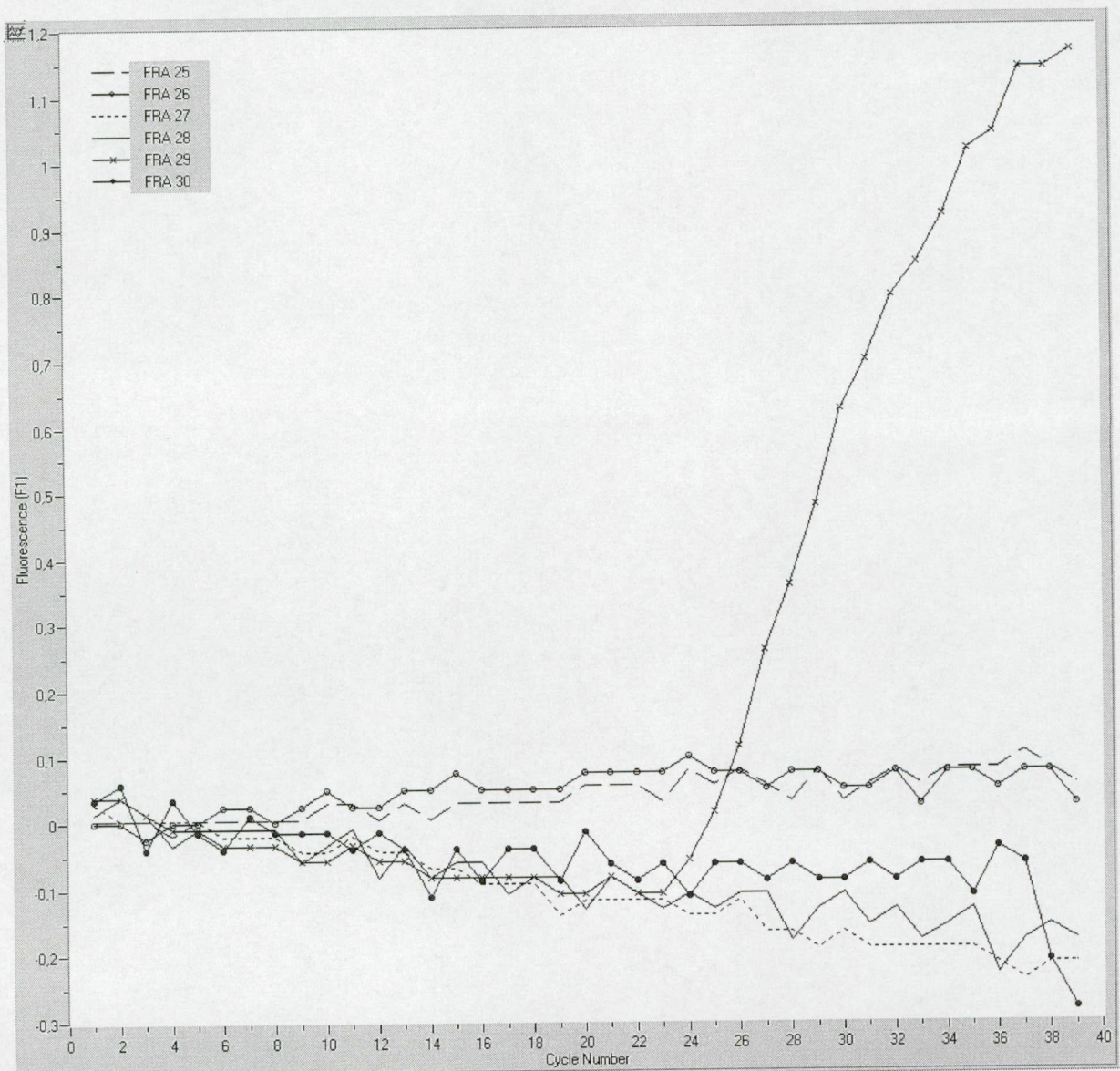


FIG. 2A

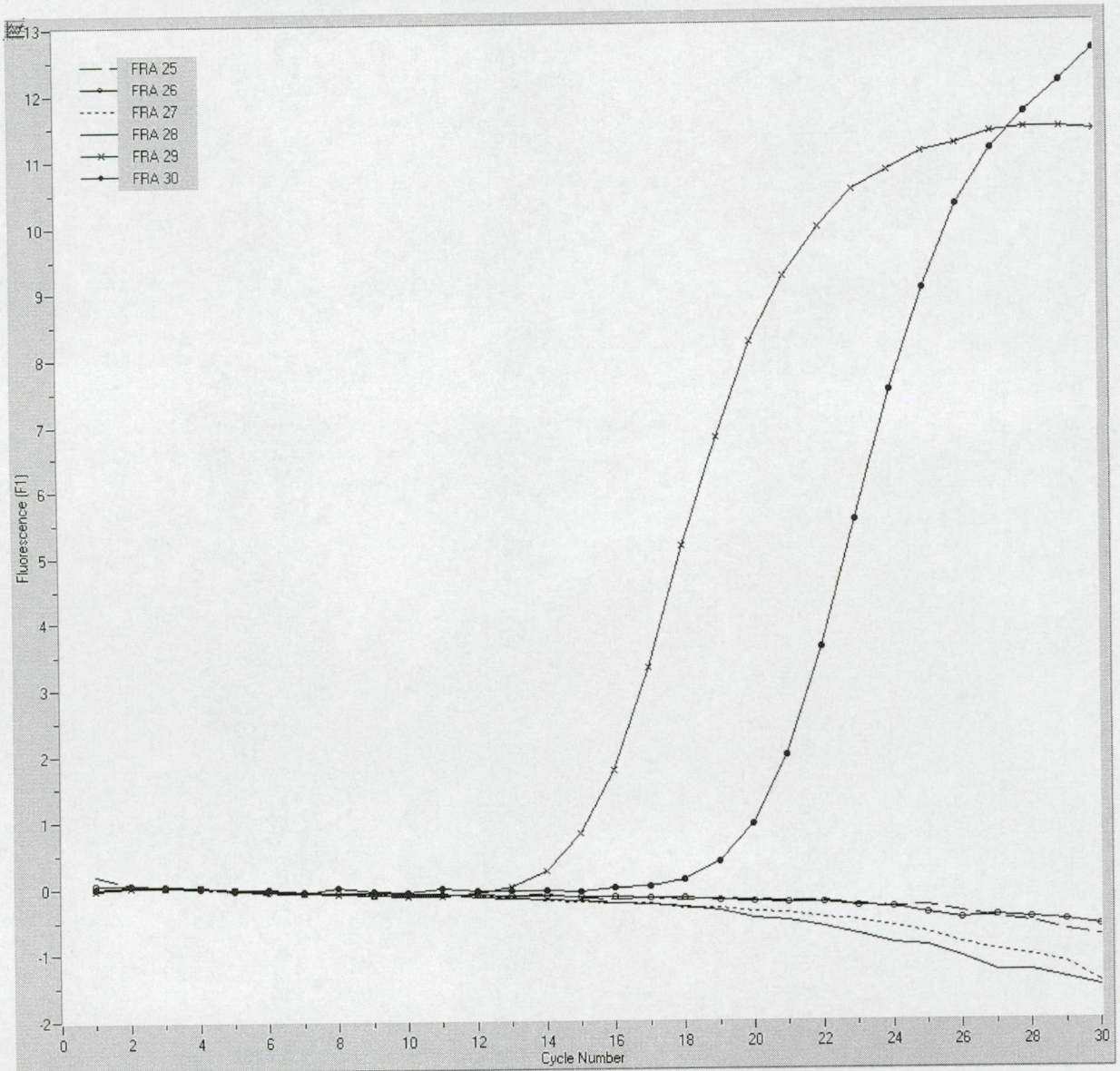


FIG. 2 B

FIG. 2. LC PCR of clinical samples. A, results after first-round PCR. B, results after seminested PCR.

IV.

Hepatitis G vírus – pathogén vagy endosymbionta?

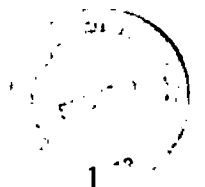
Müller Zsófia, dr., Deák Judit, dr., Nagy Erzsébet, dr.

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Általános Orvostudományi Kar,
Szegedi Tudományegyetem

Rövidítések: HGV: hepatitis G vírus, HCV: hepatitis C vírus, HBV: hepatitis B vírus, RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

Összefoglalás

A hepatitis G vírus, melyet GB vírus C-nek is neveznek, az egész világon előfordul, azonban a klinikai jelentősége még nem meghatározott. A vírus parenterálisan átvihető, gyakran hepatitis C és hepatitis B vírussal együtt fordul elő. Számos ismeretlen körülmény mellett a pathogenitása megkérdőjelezhető, azonban gyakori előfordulását leírták fulmináns hepatitisben is. Közleményünkben a vírus szerkezetét, epidemiológiai sajátosságait, kimutatási lehetőségeit, a különböző kórképekben feltételezett szerepét és a terápiás eredményeket ismertetjük. Dél-kelet Magyarországon a HGV E2 ellenanyag prevalenciáját vizsgáltuk chronicus C vírus hepatitisben szenvedők között; az ellenanyag előfordulási aránya 56%, és HCV antitesttel nem rendelkező egészséges kontroll csoportban; a prevalencia 26,3% volt.



Müller Zs., Deák J., Nagy E.: Hepatitis G virus - pathogen or endosymbiont?

Summary

Hepatitis G virus (HGV), also called GB virus C, can be found worldwide, but the clinical significance of this virus is still unclear. HGV is a parenterally transmissible positive single-stranded RNA virus, a member of the *Flaviviridae*, and is closely related to hepatitis C virus. Coinfection with other blood-borne viruses such as hepatitis B and hepatitis C is common. Although there are several unknown features in the pathogenesis, the virus can rarely be detected in fulminant hepatitis. In this review the structure of HGV as well as the epidemiology and the diagnosis of hepatitis G virus are described together with the role of HGV in different diseases and the therapeutic possibilities. In South-East Hungary the prevalence of anti-HGV antibodies was found to be 56% among patients with chronic C hepatitis, and 26,3% among anti-HCV negatives.

Bevezetés

A GB vírus C-t (GBV-C) 1995-ben izolálták egy eredetileg acut hepatitisben szenvedő betegből és a hepatitis G vírust (HGV) egy hepatitis C vírus okozta chronicus hepatitisben szenvedő betegből^(19, 30). A két vírus valószínűleg ugyanazon vírus közeli variánsai, mivel közöttük 86%-os nukleotid, és 95%-os aminosav homológiát mutattak ki. A vírus nevezéktana még nem megoldott, jelen dolgozatban a hepatitis G vírus elnevezést használjuk.

A közösségben szerzett hepatitisek 20%-a, a feltehetően vírus-okozta chronicus májbetegségek 10%-a, a posttransfúziós hepatitisek 1-2%-a nem

tulajdoníthatók az eddig ismert hepatitis (A, B, C, D és E hepatitis vírus) vagy egyéb (Epstein-Barr, CMV) vírusoknak⁽²⁾. A vírus felfedezése felvetette a lehetőséget, hogy megtalálták azt a kórokozót, mely ezekért az esetekért felelős.

Hepatitis G vírus

Történeti áttekintés

30 évvel ezelőtt egy hepatitist okozó virális ágenszt találtak egy akut hepatitisben szenvedő sebész mintájából, majd főemlősökbe passzálták. Az ágenszt a beteg kezdőbetűi után GB vírusnak nevezték el. A génszekvencia analízis segítségével három RNS szekvenciát (GBV-A, GBV-B, GBV-C) azonosítottak a mintákból. A GBV-A és a GBV-C szekvenciák phylogenetikai analízise nagyfokú homológiát mutatott⁽¹⁹⁾.

Ugyanebben az évben Linnen és mtsai új hepatitis vírusok után kutatva azonosították egy chronicus hepatitisben szenvedő beteg szérumából a HGV szekvenciáját. A vírus szintén rokonságot mutatott a flavivírusokkal. Később 95%-os aminosav homológiát mutattak ki a HGV és a GBV-C vírus között.

Szerkezeti felépítés

A hepatitis G vírus pozitív, egyszálú RNS vírus, kb. 9400 bázispár hosszúságú genommal, a *Flaviviridae* család tagja. A hepatitis C vírushoz (HCV) hasonlóan 5' nem transzlálódó régiót (UTR), majd egy hosszú open reading frame-et tartalmaz (1. kép). A termelődő fehérjék strukturális (E1, E2) és nem strukturális proteinekből (NS2, NS3, NS4, NS5) állnak. Core vagy nucleocapsid protein gént eddig nem tudtak azonosítani. Mivel a törzsek

aminosav szekvencia analízise kisfokú eltérést mutat, 4 csoportba (1, 2, 3, 4) és 2 alcsoportba (2a, 2b) sorolták⁽³²⁾. Az 1. csoportot Nyugat-Afrikában, a 2. csoportot Észak-Afrikában, Európában, Indiában detektálták, a 3. csoportot Ázsiában, a 4. csoportot Délkelet-Ázsiában azonosították.

A HGV infekció diagnosztikája:

Az akut fertőzés diagnosztikája szerológiai módszer hiányában jelenleg a virális RNS kimutatásán alapul és RT-PCR módszerrel történik vérmintából. A primereket általában az 5', 3' végen található konzervált régiókból választják. „Nested” PCR módszert alkalmazva külső és belső primerek segítségével a módszer szenzitivitása fokozható. A virális RNS jelenléte perzisztens fertőzésre utal.

A lezajlott fertőzés esetén megjelenő E2 fehérje ellen termelődött ellenanyagok kimutatására ELISA módszer áll rendelkezésre. Az ellenanyagok megjelenésével egyidőben ritkán lehet HGV RNS-t kimutatni. Valószínű, hogy az ellenanyag megjelenése összefügg a HGV clearance-el, így jelenléte lezajlott fertőzésre utal. Az anti-E2 antitest alkalmas a populáció átfertőzöttségének vizsgálatára.

Epidemiológia

A hepatitis G vírus az egész világon elterjedt, azonban prevalenciája különböző. A vírus sok hasonlóságot mutat a hepatitis C vírussal, így a transmissio módjában is (2. táblázat). Magas a prevalencia haemodializált betegek között (6,2-26%)^(14, 21, 27, 38), transfúzió átesettek között, intravénás

droghasználók között (33-75%) ^(7, 24, 28). Ezek az adatok valószínűsítik, hogy a vírus parenterálisan átvihető, azonban leírtak szexuális, vertikális, családon belüli átvitelt^(6, 39). A világ számos országában vizsgálták a HCV RNS és az anti-E2 prevalenciáját véradók között (1. táblázat), előfordulásuk nagy különbségeket mutatott (14,6- 0,8%). A véradók adatai általában egy szelektált populáció eloszlását mutatják, nem az átlaglakosságét.

Non-A, non-E posttranszfúziós hepatitis esetén 19-40%-ában detektáltak HGV RNS-t, azonban non-A, non-E sporadikus hepatitisek esetében csak 0-9%-ban. Vizsgálták a HGV RNS jelenlétét egyéb akut hepatitisek esetében. Alter és mtsai akut hepatitis A vírus fertőzés esetén 25%-ban mutattak ki HGV RNS-t, ellenben Nakatsuji és mtsai-val, akik nem tudtak kimutatni hasonló betegcsoportban HGV fertőzést^(2, 24).

Acut hepatitis B és C fertőzés esetén 10-32%-os volt a HGV prevalencia, amely jóval magasabb az átlag populációban mértnél. Non-A, non-C fulmináns hepatitis esetén az adatok ellentmondóak. A prevalencia az 12%-tól a 50%-ig terjed^(12,36). A legtöbb HGV RNS okozta fulmináns májelégtelenségről plasmapheresis után számoltak be.

Különböző kutatócsoportok chronicus hepatitisek esetén vizsgálták a HGV RNS jelenlétét. Összefüggéseket non-A, non-C chronicus hepatitis, májcirrrosis, hepatocelluláris carcinoma (0-35% HGV RNS pozitív esetek aránya), hepatitis B vírus okozta chronicus hepatitis, májcirrrosis, hepatocelluláris carcinoma és HbsAg hordozók esetében (0-12%-os HGV RNS előfordulási arány), hepatitis C

vírus okozta chronicus hepatitis, májcirrhosis és hepatocelluláris carcinoma esetén (5-39%-os volt a HGV PCR pozitívás) (3. táblázat)

Clinicopathologiai jellemzők

Acut hepatitis

Számos szerző vizsgálta az acut hepatitisben szenvedők klinikai adatait. Összehasonlítva a HGV fertőzést a HCV-HGV koinfekcióval, valamint a HCV fertőzéssel acut hepatitis esetén, azt találták, hogy vértranszfúzió utáni hepatitis G vírus fertőzés után nem fejlődött ki sárgaság és az átlag ALT szint is alacsonyabb volt. Hepatitis G vírus fertőzés esetén a tipikus klinikai lefolyás: az ALT szint emelkedés a HGV RNS szintjével van összefüggésben, majd az anti-E2 ellenanyagok megjelenésével és a HGV RNS eltűnésével normalizálódik (2. kép). Alter és mtsai quantitatív PCR-rel vizsgálták a HGV RNS mennyiségét. Nem találtak szignifikáns különbséget a HGV fertőzés, HGV+HCV fertőzés és HCV fertőzés esetén a vírus mennyiségében. Bár számos esetben vizsgálták a HGV szerepét acut hepatitisben, a bizonyítékok nem elégségesek, további vizsgálatok szükségesek.

Chronicus májbetegségek

A hepatitis G vírus perzisztens fertőzést is okozhat, bár nem tartalmaz hipervariábilis régiót, mint a HCV, hogy annak segítségével kibújjon az immunválasz elől ⁽²⁵⁾. Tanaka és mtsai csak HGV okozta chronicus hepatitisben szenvedő 3 beteget vizsgáltak. A histológiai diagnózis enyhe chronicus hepatitiszt jelzett kis fokú fibrózissal és gyulladással. Kobayashi és mtsai is szignifikánsan

alacsonyabb periportális gyulladás és hisztológiai aktivitási indexet állapítottak meg chronicus HGV fertőzés esetén összehasonlítva a chronicus hepatitis C vírus fertőzéssel.

A chronicus HCV infekció esetén kb. 15%-ban figyeltek meg HGV koinfekciót. Tanaka és mtsai figyelték meg először, hogy a HGV infekció nem súlyosbítja a chronicus hepatitis C vírus fertőzés biokémiai és hisztológiai paramétereit. Vizsgálták a HGV fertőzés interferonra (IFN) adott válaszát és a hepatitis G vírus fertőzés hatását a chronicus hepatitis C vírus fertőzésben szenvedők IFN terápiára adott válaszát^(2,37,20). Több szerző egybehangzó állítása szerint a HGV fertőzés érzékeny interferon terápiára, mely azonban csak néhány betegnél bizonyult tartós hatásúnak. A HCV fertőzés IFN-ra adott válaszát nem befolyásolta a HGV fertőzés jelenléte.

A HGV fertőzés hosszútávú lefolyása

Három szerző vizsgálta a hepatitis G vírus fertőzés lefolyását 7-16 éven át. A hepatitis G vírus hosszútávú követése szerint a vizsgált esetekben a HGV RNS clearance 1 hónap és 7 év között következett be, mellyel egyidőben az anti-E2 megjelent. Egyik esetben sem figyelték meg a hepatocelluláris carcinoma kifejlődését^(2, 21, 37).

A HGV hepatocarcinogenesis

Az eddig megjelent tanulmányok szerint a HGV fertőzés jelenléte nem növeli a carcinoma kialakulásának esélyét, sőt chronicus HBV ill. HCV fertőzöttekben sem növeli a tumor kialakulásának kockázatát^(4, 12).

A HGV fertőzés szerepe egyéb kórképekben

Brown és mtsai vizsgálták a hepatitis G vírus szerepét aplasticus anaemiában hepatitisszel és anélkül. A HGV RNS az aplasztikus anaemiában szenvedők között 26%-ban, a sokszoros transfúzión átesett kontroll csoportban 23%-ban fordult elő. Megállapították, hogy a HGV nem aetiológiai faktora az aplasticus anaemiának⁽⁵⁾.

Autoimmun hepatitisek esetében a HGV alacsony prevalenciája valószínűsíti, hogy nem játszik fontos szerepet ezen betegségekben sem⁽¹⁰⁾.

Beteganyag

Összesen 150 esetben végeztük el a HGV ellenanyag vizsgálatot. Kontroll csoportként 76 HBsAg, HCV és HIV ellenanyaggal nem rendelkező egészségügyi dolgozót választottunk, akik invazív beavatkozást nem végeztek (nő/férfi: 45/25, átlagéletkor: 47 év).

Meghatároztuk a HGV ellenanyag jelenlétét két HCV fertőzésen átesett, 6 HCV hordozó és 10 HBsAg hordozó egészségügyi dolgozónál, továbbá 48 chronicus hepatitis C vírus fertőzésben szenvedő betegnél, akik a vizsgálat után IFN terápiában részesültek (nő/férfi: 20/28, átlagéletkor: 46,5 év).

Módszer

A Hepatológia Ambulancián minden betegnél részletes anamnézis felvétel és fizikális vizsgálat történt. A hepatitis B vírus kimutatására az Ortho HBsAg ELISA 3. generációs tesztet, vagy az Abbott AxSYM HBsAg (V2) tesztet használtunk. Verifikálásra az Organon Hepanostica Uniform HBsAg 2.0 tesztet

és Organon Hepanostica Uniform HBsAg 2.0 confirmáló tesztet használtuk. Reaktív minták esetén egyéb hepatitis B vírus markerek detektálását is elvégeztük: Organon Hepanostica Uniform anti-HBc IgM, anti-HBc IgG, anti-HBe, HBeAg ELISA teszt.

A hepatitis D vírus és hepatitis E vírus ellenanyag kimutatása kizárólag HBsAg hordozók mintáiból Organon Hepanostica Uniform anti-HDV, anti-HEV ELISA teszt segítségével történt.

A HCV ellenanyag meghatározást Ortho HCV 3.0 ELISA módszerrel végeztük. Reaktív minták esetén megismételtük az ellenanyag meghatározást Abbott Axsym, ill. IMx HCV 3.0 vagy RIBA 3.0 konfirmációs vizsgálatokkal. Bármely módszerrel hepatitis C vírus ellenanyag reaktív vagy határeset minta esetén a HCV RNS-t a Roche Amplicor HCV 2.0 PCR vizsgálattal határoztuk meg.

A HGV ellenanyag detektálását RD System anti-GBV-C kit-tel végeztük. A vizsgálati módszereket a gyártó által előírt módon alkalmaztuk.

Eredmények és következtetés

Vizsgálataink eredményét az 4. táblázatban foglaltuk össze. Magyarországon Takács és mtsai vizsgálták 255 egészséges személy esetében a HGV ellenanyag jelenlétét. Kontroll csoportjukban hasonló arányban (27,8%) találtak ellenanyaggal rendelkező személyeket, mint saját kontroll csoportunkban (26,3%). Ez a nemzetközi adatokkal összehasonlítva magas prevalenciát jelent az átlaglakosság körében. Chronicus hepatitis C vírus

fertőzésben szenvedők között meglepően magas arányban találtunk HGV ellenanyagot (56%). A chronicus hepatitis C vírus esetén a HGV RNS jelenlétét vizsgáló szerzők szerint a HGV RNS a fertőzés jelzője, az E2 fehérje ellen termelődött ellenanyag jelenléte lezajlott fertőzésre utal (3. táblázat). A vizsgált személyek 81%-ának anamnézisében vértransfusio, műtét fordult elő az 1992-t megelőző években, amikor a véradók anti-HCV szűrését még nem vezették be. Bár a vírus parenterálisan átvihető, a magas előfordulási aránya még más terjedési lehetőségeket is feltételez.

Azok között a hepatitis C vírus fertőzött egészségügyi dolgozók között, akik HCV RNS-sel rendelkeztek, hasonlóan magas (50%) arányban detektáltunk HGV ellenanyagot, mint a chronicus hepatitis C vírus szenvedők között.

A HBV fertőzött személyek széruma 30%-ban HGV ellenanyagot is tartalmazott. Úgy tűnik, hogy nincs olyan szoros kapcsolat a HBV és HGV fertőzés között, mint a HCV és a HGV között.

A HGV által okozott fertőzés enyhe tünetekkel jár. Felvetődik a kérdés, hogy valójában hepatitis vírussal állunk-e szemben? Úgy tűnik, hogy a vírus hepatotrop, de nem okoz minden esetben hepatitist⁽²³⁾. 1997 óta újabb vírusokat fedeztek fel, melyek hepatitist okozhatnak. Ezek a TT vírus (TTV), a SANBAN vírus, a TTV- szerű minivírus (TLMV), a SEN vírus (SENV), és a Sentinel vírus (SNTV). További kutatások szükségesek ezen vírusok pathogenitásának megítélésére⁽²³⁾.

Irodalom

1. Alter, H.J., Bradley, D.W.: Non-A, non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (non-ABC) *Semin. Liv. Dis.* 1995, 15, 110-120.
2. Alter, M.J., Gallagher, M., Morris, T.T. et al: Acute non-A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G infection. *N. Engl. J. Med.* 1997, 336, 741-746.
3. Alter, H.J., Nakatsuji, Y., Melpolder, J. et al: The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N. Engl. J. Med.* 1997, 336, 747-754.
4. Brechot, C., Jaffedo, F., Lagorce, D., et al: Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: Results of a European concerted action. *J Hepatol* 1998, 29, 173-183.
5. Brown, K.E., Wong, S., Buu, M. et al: High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus in healthy persons in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J. Infect. Dis.* 1997, 175, 450-453.
6. Chen, M., Fischler, B., Hultgren, C. et al: Analysis of GB virus C markers in families over three generations. *J. Clin Microbiol.* 1999, 37, 4153-4155.
7. Dawson, G.J., Schluader, G.G., Pilot-Matias, T.J.: Prevalence studies of GB virus C infection using reverse transcriptase chain reaction. *J. Med. Virol.* 1996, 50, 97-103.
8. Dille, B.J., Surowy, T.K., Gutierrez, R.A. et al: An ELISA for detection of antibodies to the E2 protein of GB virus C. *J. Infect. Dis.* 1996, 225, 293-299.
9. Fiordalisi, G., Zanella, I., Mantero, G., et al: High prevalence of GB virus-C infection in a group of Italian patients with hepatitis of unknown etiology. *J. Inf. Dis.* 1996, 174, 181-183.
10. Heringlake, S., Osterkamp, S., Trautwein, C. et al: *Lancet* 1996, 348, 1626-1629.
11. Hwang, S.J., Lu, R.H., Chan, C.Y. et al: The role of hepatitis G virus infection in patients with acute posttransfusion hepatitis in Taiwan. *Gastroenterology* 1997, 112, 1260-1264.
12. Kanda, T., Yokosuka, O., Ehata, T, et al: Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology* 1997, 25, 1261-1265.
13. Kanda T, Yokosuka O, Imazaki F. et al: GB virus-C RNA in Japanese patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *J. Hepatol.* 1997, 27, 464-469.
14. Kinoshita, T., Miyake, K., Nakao, H.: Molecular investigation of GB virus C infection in haemophiliacs in Japan. *J. Infect. Dis.* 1997, 175, 454-457.
15. Kiyosawa, K., Tanaka, E.: GB virus C/hepatitis G virus. *Intervirology* 1999, 42, 185-195.
16. Kobayashi, M., Chayama, K., Fukuda, M. et al: Biochemical and histological features of hepatitis G virus infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1998, 13, 767-772.
17. Konomi N., Miyoshi C, Zerain C., et al: Epidemiology of hepatitis B, C, E and G virus infection and molecular analysis of hepatitis G virus isolates in Bolivia. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37 (10), 3291-3295.
18. Lightfoot, K., Skelton, M., Kew, M.C.: Does hepatitis GB virus C infection cause hepatocellular carcinoma in black Africans? *Hepatology* 1997, 26, 740-742.
19. Linnen, J, Wages, J. Jr., Zhang-Keck, Z.Y. et al: Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion transmissible agent. *Science* 1996, 271, 505-508.
20. Martinot M, Marcellin P, Boyer N: Influence of hepatitis G virus infection on severity of liver disease and response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* 1997, 126, 874-881.

21. Masuko, K., Mitsui, T., Iwano, K. et al: Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance haemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334, 1485-1490.
22. Mphahlele, M.J., Lau, G.K.K., Carman, W.F.: HGV: The identification, biology and prevalence of an orphan virus. *Liver.* 1998, 18, 143-155.
23. Mushahwar, I.K.: Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J. Med.. Vir.* 2000, 62, 399-404.
24. Nakatsuji, Y., Shih, J.W.K., Tanaka, E. et al: Prevalence and disease association of hepatitis G virus infection in Japan. *J. Viral. Hepatitis* 1996, 3, 307-316.
25. Nordbo, S.A., Krokstad, S., Winge, P. et al: Prevalence of GB virus C (also called hepatitis G virus) markers in Norwegian blood donors. *J. Clin. Microbiol..* 2000, 38, 2584-2590.
26. Orii, K., Tanaka, E., Rokuhara, A. et al: Persistent infection mechanism of GB virus C/ hepatitis G virus differs from that of hepatitis C virus. *Intervirology.* 2000, 43, 139-145.
27. Pérez-Gracia, T., Galán, F., Girón-Gonzalez, J.A. et al: Detection of hepatitis G virus (HGV) RNA and antibodies to the HGV envelope protein E2 in a cohort of hemodialysis patients. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 4277-4279.
28. Pilot-Matias, T.J., Carrick, R.J., Coleman, P.F., Leary, T.P. et al: Expression of the GB virus C E2 glycoprotein using the Semliki Forest virus vector system and its utility as a serologic marker. *Virology.* 1996, 225, 282-292.
29. Rengsakulrach, B., Ong-Aj-Yooth, Thairasert, T.: High prevalence of hepatitis G viraemia among kidney transplant patients in Thailand. *J. Med. Virol.* 1997, 53, 162-166.
30. Simons, J.N., Leary, T.P., Dawson, G.J., et al: Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat. Med.* 1995, 1, 564-569.
31. Simon, J.N., Desai, S.M., Schutz, D.E et al: Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implication for genome organization. *J. Virol.* 1996, 70, 6126-6135.
32. Smith, D.B., Cuceanu, N., Davidson, F.: Discrimination of hepatitis G virus/GBV-C geographical variants by analysis of the 5 non-coding region. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 1533-1542.
33. Tacke, M., Kiyosawa, K., Stark, K: Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* 1997, 349, 218-320.
34. Takács, M., Rusvai, E., Brojnás, J. et al: Prevalence of TTV and HGV in Hungary. Meeting of Hungarian Society for Microbiology 2000.
35. Tameda, Y., Kosaka, Y., Tagawa, S., et al: Infection with GB virus C (GBV-C) in patients with fulminant hepatitis. *J. Hepatol.* 1996, 25, 842-847.
36. Tanaka, E., Kiyosawa, K., Shimoda, K. et al: Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J. Viral. Hep.* 1998, 5, 153-159.
37. Tanaka, E., Alter, H.J., Nakatsuji, Y. et al: Effect of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* 1996, 125, 740-743.
38. Tanaka, E., Tacke, M., Kobayashi, M. et al: Past and present hepatitis G virus infection in areas where hepatitis C is highly endemic and those where it is not endemic. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 110-114.
39. Yeo, A., Matsumoto, A., Shih, J. et al: Prevalence of hepatitis G virus in patients with hemophilia and their steady female sexual partners. *Sex. Trans. Dis.* 2000, 27, 178-182.

40. Yoshiba, M., Okamoto, H., Mishiro, S.: Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown etiology. *Lancet*. 1995, 346, 1131-1132.
41. Zhang, X.H., Shinzawa, H., Shao, L., Takahashi, T.: Detection of hepatitis G virus RNA in patients with hepatitis B, hepatitis C, and non-A-E hepatitis by RT-PCR using multiple primer sets. *J. Med. Virol.* 1997, 52, 385-390.
42. Wang, J.T., Tasi, F.C., Lee, C.Z.: A prospective study of transfusion-transmitted GB virus C infection: Similar frequency but different clinical presentation compared with hepatitis C virus.
43. Wang, H.L., Jin, D.Y.: Prevalence and genotype of hepatitis G virus in Chinese professional blood donors and hepatitis patients. *J. Infect. Dis.* 1997, 175, 1229-1233
44. Wang, Y., Chen, H.S., Fan, M.H.: Infection with GB virus C and hepatitis C virus in haemodialysis and blood donors in Beijing. *J. Med. Virol.* 1997, 52, 26-30.
45. Wu, R.R., Mizokami, M., Cao, K.: GB virus C/ hepatitis G virus infection in South China. *J. Infect. Dis.* 1997, 175, 168-171.

1. táblázat: A HGV RNS és az anti-E2 ellenanyag prevalenciája

egészségesekben és véradóknál egyes országokban

Ország	HGV markerek előfordulása %	Irodalmi hivatkozás
Japán	6	36
USA	0,8-1,7	7, 19
Kína	0,7-2	41-44
Thaiföld	4,3	11
Vietnam	5,7	5
Németország	4,7	16
Dél-Afrika	14,2	17
Norvégia	7,5	25
Bolívia	14,6	17
Magyarország	26,3	*

*saját adat

2. táblázat A HGV RNS és anti-E2 ellenanyag előfordulása magas rizikó csoportokban

Csoport	HGV RNS	Anti-E2
	%	%
Intravénás droghasználók	4-38	41-85
Fizetett véradók	5-26	33-34
Haemodializált betegek	11	8

3. táblázat A HGV RNS előfordulása chronicus hepatitis esetén

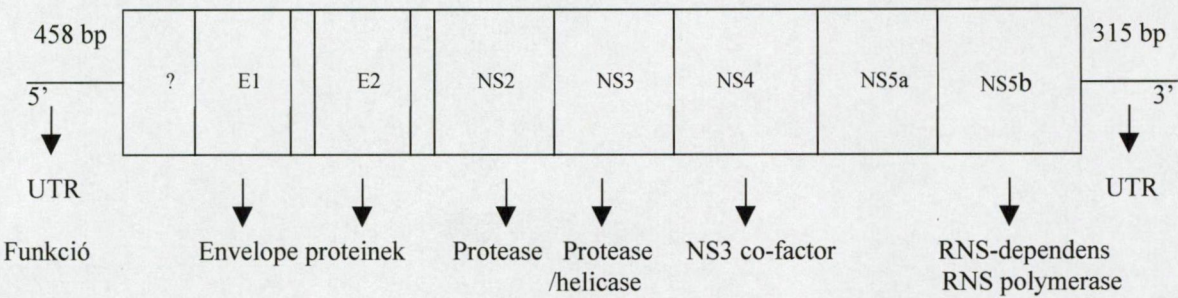
Kategóriák	HGV RNS előfordulás %
Non-A non-C	
Chronicus hepatitis	6-35
Májcirrhosis	10
Hepatocelluláris cc	0-14
Hepatitis B	
HBsAg hordozó	10
Chronicus hepatitis	0-10
Májcirrhosis	18
Hepatocelluláris cc	4-15
Hepatitis C	
Chronicus hepatitis	5-39
Májcirrhosis	12
Hepatocelluláris carcinoma	10-11

4. táblázat A HGV anti-E2 ellenanyag előfordulása magas kockázatú és kontroll csoportokban Magyarországon

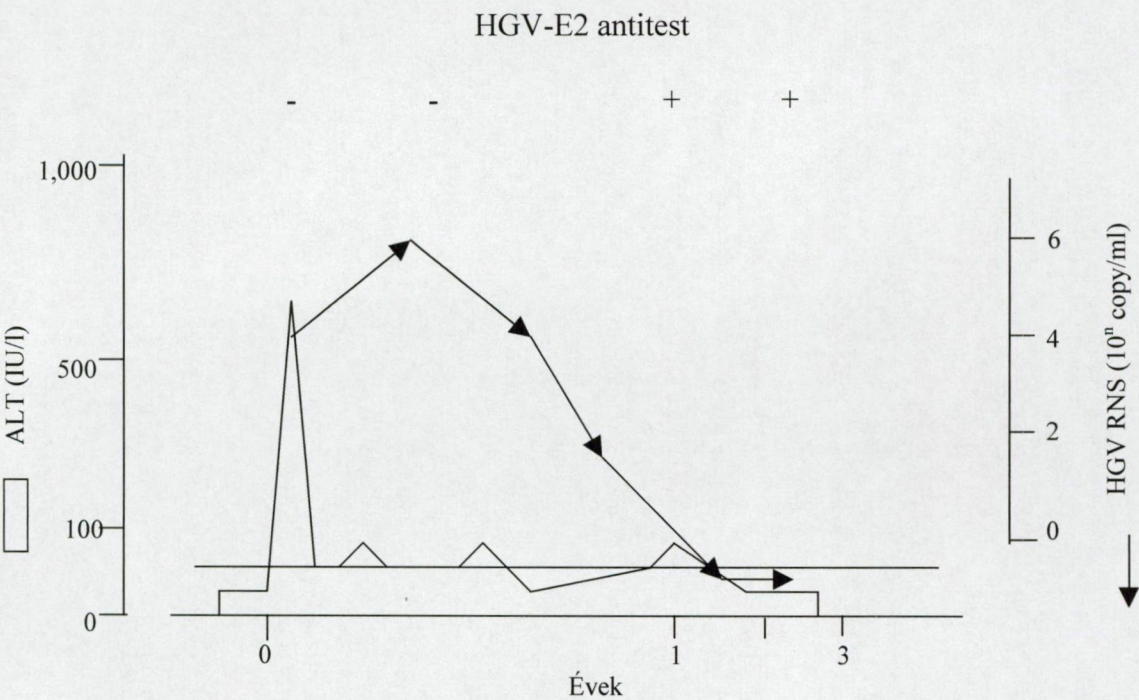
Csoportok	n	HBsAg	Anti-HCV	HCV PCR	Anti-HGV
Kontroll csoport	76	0	0	0	19 (26,3%)
Chr. HCV hepatitis	48	0	48	48	27 (56%)
HCV poz eü.dolg.	8	0	8	6	5 (62,5%)
HCV PCR poz. eü dolg	6	0	6	6	3 (50%)
HBV hordozó eü. dolg.	10	10	0	0	3 (30%)

*nem ismert

1. kép A hepatitis G vírus genom szerkezete



2. kép Hepatitis G vírus fertőzés lefolyása



Egy 45 éves férfi betegnél, aki akut hepatitisben szenvedett transzfúzió után. Az emelkedett serum ALT normalizálódott a HGV RNS eltűnésével és az anti-E2 megjelenésével

V.

Hepatitis C virus genotypes in Hungarian and Austrian patients with chronic hepatitis C

Zsófia Müller ^{a,*}, Judith Deák ^a, R. Stefan Ross ^b, Elisabeth Nagy ^a, László Kovács ^c,
Harald H. Kessler ^d

^a Department of Clinical Microbiology, University of Szeged, Somogyi B. tér 1, H-6725 Szeged, Hungary, ^b Institute of Virology, Essen University Hospital, Hufelandstr. 55, 45122 Essen, Germany, ^c Department of Obstetrics and Gynecology, University of Szeged, Semmelweis u. 1, H-6725 Szeged, Hungary, and ^d Molecular Diagnostics Laboratory, Institute Hygiene, KF-University Graz, Universitaetplatz 4, A-8010 Graz, Austria

* Corresponding author. Tel.: +36-62-545-712; fax: +36-62-545-712; e-mail: zsomu@freemail.hu

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) genotypes are relevant to epidemiological questions, vaccine development, and clinical management of chronic HCV infection. Aim of this study was to determine HCV genotypes of South Hungarian and Southeast Austrian patients with chronic hepatitis C. Results were obtained by the largely automated TruGene HCV 5'NC Genotyping Kit (Visible Genetics, Toronto, Ontario) and by phylogenetic analysis. All of the 20 Hungarian patients and 15 out of 20 Austrian patients were infected with genotype 1. The remaining Austrian patients were infected with genotypes 3 or 2. With the commercially available assay, it was not possible to determine the HCV subtype in a total of 3 patients. The TruGene HCV 5'NC Genotyping assay for determination of HCV genotypes proved to be useful for a high-throughput routine diagnostic laboratory.

Keywords: HCV, genotype, sequencing, Austria, Hungary

1. Introduction

Molecular characterization of hepatitis C virus (HCV) revealed the existence of a positive sense RNA genome of approximately 9400 bases in length. The complete genome sequence has been determined in different HCV isolates worldwide and substantial nucleotide sequence variability throughout the viral genome was found (Choo et al., 1991). The comparison of published sequences of HCV has led to the identification of distinct HCV genotypes that may differ from each other by as much as 33% over the entire viral genome (Okamoto et al., 1992). The variability within the HCV genome has formed the basis for several genotyping systems. The currently most commonly used classification system is based on 5' non-coding region (Simmonds et al., 1994). HCV genotypes 1, 2, and 3 show a worldwide distribution, while others such as types 5 and 6 are only found in specific geographical regions (Simmonds et al., 1999). The different genotypes are relevant to epidemiological questions, vaccine development, and clinical management of chronic HCV infection.

Methods for HCV genotyping include amplification of certain genomic regions followed by nucleotide sequencing, reverse transcription (RT)-PCR with genotype-specific primers, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of RT-PCR products, and RT-PCR with universal primers followed by subtype-specific hybridization (Simmonds et al., 1993; Widell et al., 1994; Davidson et al., 1995; Stuyver et al., 1996). Nucleotide sequencing followed by phylogenetic analysis is the current "gold standard" for identifying different HCV genotypes and subtypes but is generally regarded as not practical for routine clinical laboratory settings (Ross et al., 2000). Recently, the TruGene HCV 5'NC Genotyping Kit (Visible Genetics, Toronto, Ontario) has been brought on the market. For this assay, amplification products

generated by the AMPLICOR HCV or AMPLICOR HCV MONITOR assays (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) can be used.

Aim of this study was to determine HCV genotypes of South Hungarian and Southeast Austrian patients with chronic hepatitis C. Results were obtained by the TruGene HCV 5'NC Genotyping Kit and by phylogenetic analysis.

2. Materials and Methods

Sera from 40 patients with chronic hepatitis C were studied. The female-male ratio was 10:10 for Hungarian patients and 11:9 for Austrian patients. The mean age was 49.3 years (Hungarian patients; range, 10-60 years) and 51.4 years (Austrian patients; range, 22-78 years), respectively. All patients were citizens of either Hungary or Austria. None of the patients was on antiviral treatment at the time of specimen collection. All of them had been tested anti-HIV and HBsAg negative.

In all sera, HCV antibodies had been detected by microparticle enzyme immunoassay (MEIA; Abbott AxSym HCV 3.0; Abbott Laboratories, Chicago, Ill.) and for HCV RNA by RT-PCR (Cobas Amplicor HCV 2.0; Roche). For statistical analysis, the Mann-Whitney *U*-test was used. A finding of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

For sequencing by the TruGene kit (Visible Genetics), amplification products generated by the Cobas Amplicor kit (Roche) were used. Amplification products were stored frozen at -70°C until further testing. PCR products were neutralized and purified by the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Sequencing was done with the TruGene HCV 5'NC Genotyping Kit (Visible Genetics) according to the manufacturer's package

insert. The sequencing reaction of the 5'NC gene was generated from the amplification product by CLIP (Visible Genetics) sequencing. This technique allows both directions of the amplification product to be sequenced simultaneously in the same tube using two different dye-labeled primers for each of the four sequencing reactions. Electrophoresis and analysis of data were done with the automated OpenGene DNA sequencing system (Visible Genetics). For electrophoresis, the automated Long-Read Tower was used. Data were acquired with the GeneLibrarian module of GeneObjects software by combination of the forward and reverse sequences and comparison to a standard HCV sequence.

Sequences of the 183-bp HCV 5' non-coding region (nucleotides 96 to 278) were subjected to phylogenetic analysis using the PHYLIP software package, version 3.5c (Forns and Bukh, 1998). Distances between pairs of sequences were estimated with the DNA-DIST program. Phylogenetic trees were constructed by the unweighted pair group method using arithmetic averages on the previous sets of pairwise distance according to Ross et al., 2000.

3. Results

In Hungarian patients, the mean ALT value was 94 U/l (range, 51 to 265 U/l) and 86 U/l (range, 47 to 185 U/l) in Austrian patients (Table 1; not significant). The median serum HCV RNA load was 7.6×10^5 IU/ml (range, 1.2×10^5 to 2.7×10^6 IU/ml) in Hungarian patients and 7.0×10^5 IU/ml (range, 1.1×10^5 to 1.1×10^6 IU/ml) in Austrian patients (not significant).

With the TruGene HCV 5'NC Genotyping Kit, all of the Hungarian patients were found infected with genotype 1 (Table 2). The most common subtype was 1b (18

patients). Subtype 1a was determined in one patient, and in another one, genotype 1 was not further definable. Of all Austrian patients, 15 were found infected with genotype 1 (11 with subtype 1b, 2 with subtype 1a, and 2 patients genotype 1, not further definable). In 2 Austrian patients, genotype 2 and in 3 patients, genotype 3 was found.

The commercially available sequencing assay could be performed within 5 hours. Following neutralization and purification of PCR products, which took 15 minutes, the sequencing reaction could be performed within 3.5 hours including a half-hour manual pipetting. Another hour was needed for electrophoresis and analysis of data.

With phylogenetic analysis, all of the Hungarian patients were found infected with genotype 1 (Table 2). The most common subtype was 1b (19 patients). In one patient, subtype 1c was determined. Patients with subtype 1b showed a high homology among the isolates (Figure 1). Of all Austrian patients, 15 were found infected with genotype 1 (13 with subtype 1b and 2 with subtype 1a). In 2 Austrian patients, genotype 2 and in 3 patients, genotype 3 was found.

4. Discussion

HCV genotyping is useful for solution of epidemiological questions and development of vaccines against HCV. Furthermore it has been shown to be beneficial to facilitate therapeutic decisions and strategies (Poynard et al, 1995; Davis et al., 1998; McHutchinson et al., 1998).

In this study, the TruGene HCV 5'NC Genotyping assay, which has recently been brought on the market and found to be useful for the routine diagnostic lab, was employed (Ross et al., 2000; Ansaldi et al., 2001; Halfon et al., 2001). Both, results

obtained by the GeneObjects software and phylogenetic analysis revealed all Hungarian patients to be infected with HCV genotype 1. These data correspond to previous studies, in which genotypes or serotypes were determined (McOmish et al., 1994; Jarvis et al., 1996; Pár et al., 1998). In one of those studies, 95% of all patients with genotype 1 were infected with subtype 1b (Jarvis et al., 1996). The majority of those patients had received transfusions of blood and/or blood products. Phylogenetic analysis of genotype 1 sequences derived from Hungarian patients revealed a high homology among the isolates.

Of the 20 Austrian patients, 15 were found infected with genotype 1 with both methods. The remaining patients were infected with either genotype 3 or genotype 2. In a recent Austrian study, almost 75% of the patients were infected with HCV genotype 1, followed by genotypes 3 (16%), 4 (5%), and 2 (3%) (Haushofer et al., 2001). The majority of patients with genotype 3 were drug abusers and all of the patients infected with genotype 4 originated from Middle East countries.

Genotype detection with the Trugene HCV 5'NC Genotyping assay was found suitable in a routine diagnostic laboratory. It is mainly automated and can easily be performed by a trained medical technologist. Comparison of that assay with other genotyping methods revealed that the Trugene HCV 5'NC Genotyping assay is practical for routine laboratory use and can detect HCV genotypes safely (Ross et al., 2000; Ansaldi et al., 2001; Halfon et al., 2001). Classification of subtypes, however, was not possible in all HCV isolates. This might be due to the short amplification product within the highly conserved genome region (only one nucleotide difference in position 99 for discrimination of subtype 1a and 1b). In those cases, phylogenetic analysis may help to determinate the HCV subtype. The discrimination between subtype 1a and 1b is, however, not important for therapeutic decisions because

therapeutic strategies differ only between patients infected with subtype 1 and patients infected with non-1 subtypes (Mondelli et al., 1999).

In conclusion, results of this study reflect the present situation regarding the prevalence of HCV genotypes in Southern Hungary and Southeastern Austria, with genotype 1 being the predominant subtype in both regions. The largely automated sequencing assay for determination of HCV genotypes proved to be useful for a high-throughput routine diagnostic laboratory.

Acknowledgements

This study was partly supported by the Scientific and Technological Cooperation between Austria and Hungary, project No. A-26/99.

References

- Ansaldi F, Torre F, Bruzzone BM, Picciotto A, Crovari P, Icardi, G. Evaluation of a new hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. *J Med Virol* 2001;63:17-21.
- Choo Q-L, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby A, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kou G, Houghton M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-5.
- Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follet EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA et al. Survey of major genotypes and subtypes of

- hepatitis C virus using RFLP of sequencing amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995;76:1197-1204
- Davis GL, Mur RE, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht JK, for the Hepatitis Interventional Therapy Group. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *New Engl J of Med* 1998;339:1493-9
- Halfon P, Trimoulet P, Bouliere M, Khiri H, Lédighen V, Couzigou P, Feryn JM, Alcaraz P, Renou C, Fleury HJA, Ouzan D. Hepatitis C virus genotyping based on 5' Noncoding Sequence Analysis (Trugene). *J Clin Microbiol* 2001;39:1771-1773.
- Haushofer AC, Koptý C, Hauer R, Brunner H, Halbmayer W-M. HCV genotypes and age distribution in patients of Vienna and surrounding areas. *J Clin Virol* 2001;20:41-47.
- Jarvis LM, Ludlam CA, Ellender JA, Nemes L, Field SP, Song E, Chuansumrit A, Preston FE, Simmonds P. Investigation of the relative infectivity and pathogenicity of different hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs. *Blood* 1996;87:3007-3011.
- McHutchinson JG, Gordon ST, Schiff ER, Shiffmann ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK, for the Hepatitis Interventional Therapy Group. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *New Engl J of Med* 1998;339:1485-92
- McOmish F, Yap PIL, Dow BC, Follett EAC, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, Lin C, Lai C, Leong S, Medgyesi GA, Héjjas M, Kiyokawa H, Fukada K, Cuypers T, Saeed AA, Al-Rasheed AM, Lin M, Simmonds P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994;32:884-892.

- Mondelli MU, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 1999;31:65-70.
- Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Lizuka H, Tanaka T, Fukuda S, Tsuda F, Mishiro S. Full-length of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 1992;188:331-341
- Pár A, Gervain J, Gógl Á. Hepatitis C virus infection: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998;228:107-14.
- Poynard T, Bedossa P, Chevallier M, Mathurin P, Lemonnier C, Trepo C, Couzigou P, Payen JL, Sajus M, Costa JM, Vidaud M, Chaput JC, the Multicenter Study Group. A comparison of three interferon alfa-2b regimens for the long-term treatment of chronic Non-A, Non-B hepatitis. *New Eng J of Med* 1995;332:1457-62.
- Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, Beyou A, Monnet A, Mazure C, Roggendorf M. Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *J Clin Microbiol* 2000;38:3581-3584.
- Simmonds P, Alberti A, Alter F, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-1324.
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74:2391-2399.
- Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999;31:54-60.

Stuyver L, Wyseur A, Van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996;34:2259-2266.

Widell A, Shev S, Mansson S, Zhang YY, Foberg U, Norkrans G, Fryden A, Weiland O, Kirkus J, Nordenfelt E. Genotyping of hepatitis C virus isolates by a modified polymerase chain reaction assay using type specific primers: epidemiological application. *J Med Virol* 1994;44:272-279.

Table 1
Biochemical and virological profile of the studied patients

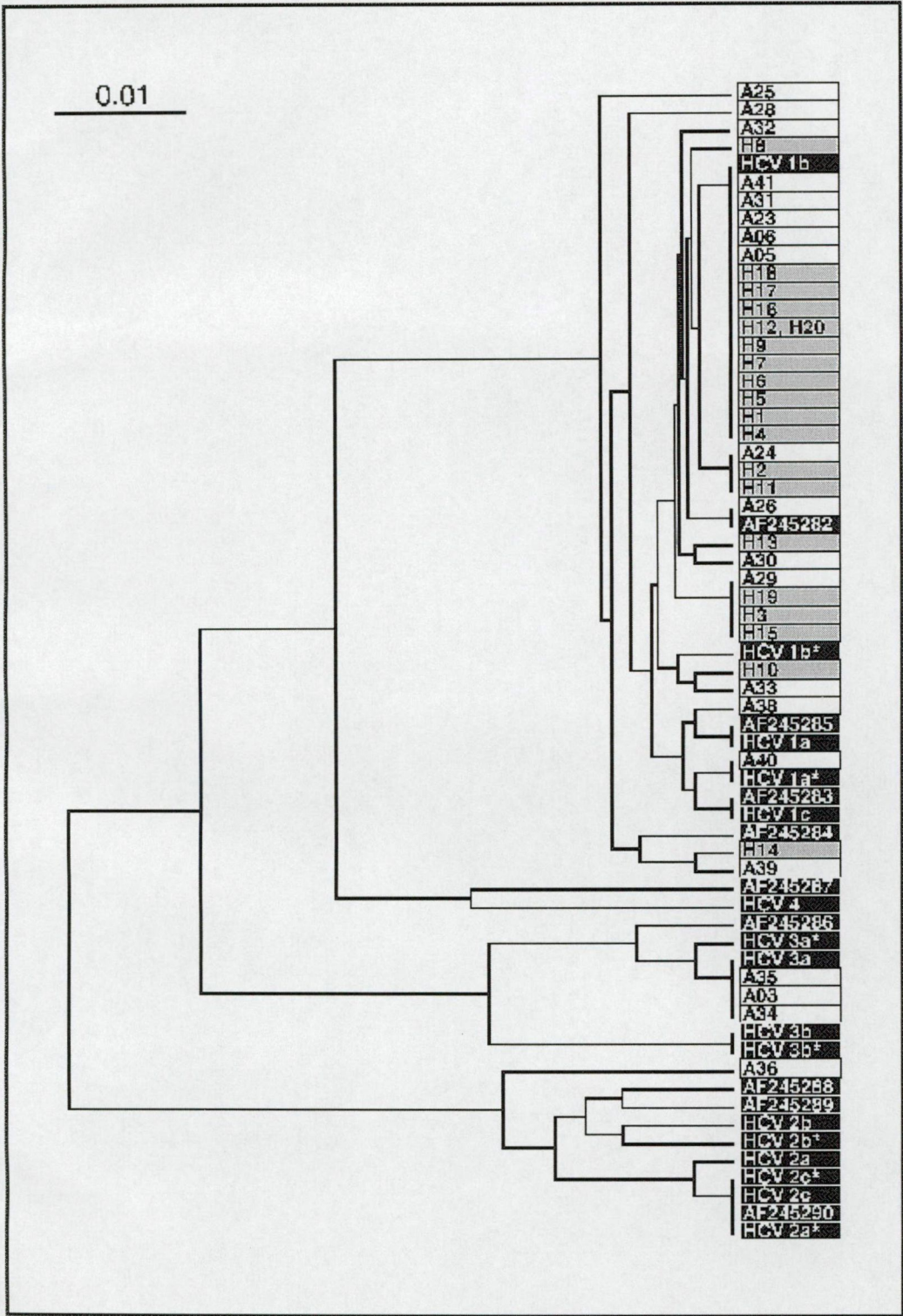
Parameters	Hungarian patients	Austrian patients
No. of patients	20	20
Mean ALT (U/l)	94	86
Median serum HCV- RNA load (IU/ml)	7.6×10^5	7.0×10^5

Table 2
 Distribution of HCV genotypes / subtypes in the studied populations

Genotype	Subtype	Number of patients			
		H - T ^a	H - P ^b	A - T ^c	A - P ^d
1		20	20	15	15
	1a	1	0	2	2
	1b	18	19	11	13
	1c	0	1	0	0
	Unidentified	1	0	2	0
2		0	0	2	2
3		0	0	3	3

^a Number of Hungarian patients tested with the Trugene HCV 5'NC Genotyping assay
^b Number of Hungarian patients tested with phylogenetic analysis
^c Number of Austrian patients tested with the Trugene HCV 5'NC Genotyping assay
^d Number of Austrian patients tested with phylogenetic analysis

Figure 1
 Phylogenetic analysis of 5' NC gene sequences of HCV genotypes / subtypes in the studied populations



H1-20: Number of 5'NC gene sequences of HCV found in Hungary
 A3-41: Number of 5'NC gene sequences o HCV found in Austria