

**Szent István Egyetem**  
**Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**A Hepatitis E vírus előfordulása hazai házi és vadon élő  
emlősökben; a vírustörzsek genetikai jellemzése**

PhD értekezés

Dr. Forgách Petra

2010

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Bakonyi Tamás  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar  
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék  
témavezető

Prof. Dr. Rusvai Miklós  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar  
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék  
témabizottság tagja

Prof. Dr. Szűcs G. György  
Kuwait University, Faculty of Medicine  
Department of Microbiology  
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a .... sz. példány.

.....

dr. Forgách Petra

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>TARTALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>3</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>5</b>
<b>1. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>7</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>8</b>
<b>3. BEVEZETÉS.....</b>	<b>9</b>
<b>4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>11</b>
<b>4.1. A hepatitis E vírus .....</b>	<b>11</b>
4.1.1. Felfedezés .....	11
4.1.2. Genomszerkezet.....	12
4.1.3. Replikáció .....	13
4.1.4. Taxonómia .....	14
<b>4.2. A hepatitis E mint betegség.....</b>	<b>16</b>
4.2.1. A HEV járványtana emberben .....	16
4.2.2. Klinikai jellemzők.....	19
4.2.3. Kórszövetten .....	21
4.2.4. Laboratóriumi diagnózis .....	22
4.2.5. Gyógykezelés.....	24
4.2.6. Megelőzés .....	24
<b>4.3. A HEV járványtana és kórtana élelmiszer-termelő állatokban .....</b>	<b>25</b>
<b>4.4. A HEV fajok közötti terjedésének bizonyítékai, a vírus élelmiszer-biztonsági és     munkaegészségügyi jelentősége .....</b>	<b>28</b>
<b>5. A KUTATÁS CÉLJAI.....</b>	<b>31</b>
<b>6. ANYAG ÉS MÓDSZER.....</b>	<b>32</b>
<b>6.1. Állati eredetű minták vizsgálata.....</b>	<b>32</b>
6.1.1. Mintagyűjtés .....	32
6.1.2. A PCR vizsgálatok előkészítése.....	34
6.1.3. RT-PCR .....	34
6.1.4. A PCR termékek azonosítása .....	37
6.1.5. Nukleotid szekvencia meghatározása, rokonsági vizsgálatok.....	37
<b>6.2. Humán vérsavóminták vizsgálata .....</b>	<b>38</b>
6.2.1. Minták.....	38
6.2.2. Immunoblot vizsgálat.....	38
6.2.3. ELISA vizsgálat.....	39
<b>7. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>40</b>
<b>7.1. HEV RNS jelenlétének kimutatása RT-PCR segítségével .....</b>	<b>40</b>
7.1.1. A HEV kimutatása magyarországi sertéstelepeken; a HEV-fertőzöttség mértéke egyes korcsoportokban.....	41
7.1.2. A párhuzamosan vizsgált máj- és bélsárminták RT-PCR eredményei.....	42
7.1.3. A HEV kimutatása egyéb állatfajokban .....	43
<b>7.2. Szerológiai vizsgálatok .....</b>	<b>45</b>
<b>7.3. A kimutatott vírusok azonosítása, törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatok .....</b>	<b>47</b>
<b>7.4. A teljes HEV-genomszekvencia meghatározása és analízise .....</b>	<b>51</b>
7.4.1. A nyitott leolvasási keretek elemzése .....	54
7.4.2. SimPlot-vizsgálatok .....	59

<b>8.</b>	<b>MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>63</b>
8.1.	A HEV elterjedtsége sertéstartó telepeken .....	65
8.2.	A vírusürítés korcsoportonkénti megoszlása.....	65
8.2.1.	A HEV-fertőzés fennmaradásában szerepet játszó tényezők .....	65
8.2.2.	A sertések fertőzöttségének étel-miszer-higiéniái jelentősége .....	68
8.3.	A HEV kimutatása sertésmájban és bélsárban.....	71
8.4.	A HEV elterjedtsége vadon élő állatokban .....	72
8.5.	A HEV elterjedtsége házi kérődzőkben .....	75
8.6.	Szerológiai vizsgálatok.....	76
8.7.	Törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatok.....	80
8.8.	A teljes genomszekvencia analízise.....	84
8.8.1.	A nyitott leolvasási keretek elemzése.....	85
8.8.2.	A hipervariabilis régió elemzése .....	87
8.8.3.	A genom legkonzervatívabb szakaszának analízise .....	92
8.8.4.	A genotipizálásra felhasználható genomrégiók összehasonlítása.....	93
8.9.	További kutatási lehetőségek .....	97
<b>9.</b>	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>99</b>
<b>10.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>102</b>
<b>11.</b>	<b>A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI .....</b>	<b>127</b>
4.2.	Referált hazai vagy külföldön kiadott tudományos folyóiratokban megjelent (vagy közlésre elfogadott) dolgozatok .....	127
4.3.	Kongresszusi kiadványokban megjelent, egy oldal terjedelmű előadás/poszter összefoglalók .....	127
<b>12.</b>	<b>MELLÉKLET .....</b>	<b>130</b>
	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>148</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADP	Adenosine-diphosphate	Adenozin-difoszfát
ALT	Alanine aminotransferase	Alanin aminotranszferáz
AST	Aspartate aminotransferase	Aszpartát aminotranszferáz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	[nukleotid-szekvencia hasonlóság keresőprogram]
bp	Base pair	Bázispár
cDNS	Complementary DNA	Komplementer DNS
EVENT	Enteric Virus Emergence, New Tools	[Enterális vírusfertőzéseket kutató pályázat]
GGT	Gamma glutamyl transpeptidase	Gamma-glutamil-transzpeptidáz
HEV	Hepatitis E Virus	Hepatitis E vírus
HVR	Hypervariable region	Hipervariabilis terület
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság
IgG	Immune Globulin Class G	Immunglobulin G
IgM	Immune Globulin Class M	Immunglobulin M
kb	kilobase	kilobázis
nt	Nucleotide	Nukleotid
OD	Optical density	Optikai denzitás
OEK	Országos Epidemiológiai Központ	National Center for Epidemiology
ORF	Open reading frame	Nyitott leolvasási keret
PBS	Phosphate buffered saline	Foszfátsókkal pufferolt fiziológias oldat
PCP	Putative capsid protein	Feltételezett kapszidfehérje
PCV	Porcine circovirus	Sertés circovírus
PMWS	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome	Malacok circovírus okozta sorvadása
PPH	Polyproline hinge	Poliprolin kötőszekvencia

RNS	Ribonucleic acid	Ribonukleinsav
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
SPF	Specified Pathogene Free	Meghatározott kórokozótól mentes
TBE	Tris-borate-EDTA	Trisz-borát-EDTA
TMB	Tetramethylbenzidine	Tetra-metil-benzidin
UV	Ultraviolet	Ultraibolya
VPH	Veterinary Public Health	Állatorvosi Közegészségügy
WHO	World Health Organisation	Az ENSZ Egészségügyi Világszervezete

## 1. ÖSSZEFOGLALÁS

Az állatokban enterális fertőzéseket okozó, feltételezetten zoonotikus vírusok közül a Hepatitis E vírus (HEV, *Hepeviridae*, *Hepevirus* nemzetség) emberekben okoz klinikai tünetekkel járó májgyulladást. A világ különböző országaiban kimutatott vírus-változatok négy genocsoportba sorolhatók, melyek közül a 3. és a 4. csoport vírusai embereket és állatokat is fertőzni képesek. Genetikai és járványtani vizsgálatok mellett kísérleti fertőzések is a HEV fajok közötti terjedésének lehetőségét igazolták. A HEV-fertőzés állatokban tünetmentes, a főbb rezervoár fajoknak a házisertés mellett a vaddisznó, illetve különböző vadon élő kérődző fajok bizonyultak.

Kutatásaink célja a HEV magyarországi elterjedtségének felmérése, és a hazai törzsek genetikai jellemzése volt. A vizsgálatainkban házi és vadon élő emlősök máj- és bélsár mintáiból mutattuk ki a vírus nukleinsavát. A hazai vírusok genetikai jellemzése céljából törzsfarekonstrukciós vizsgálatokat végeztünk, és egy sertésből kimutatott HEV csaknem teljes genomszekvenciáját meghatároztuk és elemeztük.

A 41 vizsgált sertéstelepből 16-ban (39%) mutattuk ki a HEV jelenlétét. A 11-16 hetes korcsoportú sertések között találtuk a legmagasabb fertőzöttségi arányt (37%), azonban a véghízó korcsoportban is találtunk vírusürítő egyedeket (9%-ban). A vizsgált vaddisznók 9%-ában, a szarvasok 10%-ában és az őzek 22%-ában igazoltuk a HEV-fertőzöttséget. A házi kérődzőkből, rágcsálókból és kisemlősökből származó minták nem tartalmaztak HEV-nukleinsavat kimutatható mennyiségben.

A Magyarországon, állati eredetű mintákból kimutatott vírusok a filogenetikai vizsgálatok alapján a HEV 3. genocsoport három alcsoportjába (3a, 3e és 3h) tartoztak; a nukleotid-szekvenciák nagyfokú hasonlóságot mutattak más országokban állatokból és emberekből kimutatott szekvenciákkal. A teljes genomszekvencia elemzésével megállapítottuk, hogy genotipizálásra az első és a második nyitott leolvasási keret részleges nukleotid szekvenciái megbízhatóan használhatók.

Vizsgálatainkkal elsőként bizonyítottuk a HEV széles körű hazai előfordulását házisertésben és különböző vadon élő állatfajokban. Genetikai vizsgálataink az állati és emberi eredetű törzsek közeli rokonságát tárták fel, amelyek alátámasztják a vírus zoonotikus jellegére utaló korábbi elméleteket. Eredményeink felhívják a figyelmet a HEV étel- és higiéniai jelentőségére, és további járványtani vizsgálatok alapjául szolgálhatnak.

## 2. SUMMARY

Among potentially zoonotic viruses, that cause enteric infections in animals, the Hepatitis E virus (HEV, *Hepeviridae*, *Hepevirus* genus) can be responsible for clinically manifested acute hepatitis in humans. The virus-variants detected in several countries are classified into 4 genotypes; viruses of the 3rd and 4th genotype can infect both humans and animals. Besides genetic and epidemiological studies, the zoonotic nature of the virus was proven by experimental infections. HEV infections of animals remain subclinical. Besides domestic swine, wild boar and several deer and roe deer species were found to be the main reservoir hosts of HEV.

The aim of our study was to survey the occurrence of HEV in Hungary, and to genetically characterize the local viruses. The nucleic acid of the virus was detected in liver and faecal samples of domestic and wild mammals. Phylogenetic analyses were performed to infer the genetic relatedness of the detected viruses. The nearly complete genome of one HEV of swine origin was also determined and analyzed.

The presence of HEV nucleic acid was demonstrated in 16 (39%) of the investigated 41 Hungarian swine farms. The highest incidence of HEV infection was found among the eleven to sixteen weeks old pigs (37%), but HEV shedding was also detected in the finishing group (9%). Samples from domestic cattle, as well as from rodents collected at pig farms and in natural habitats, did not contain HEV RNA of detectable level.

Phylogenetic investigations revealed that the hepatitis E viruses detected in animals in Hungary belonged into three subgroups (3a, 3e, and 3h) of the 3<sup>rd</sup> genogroup of HEV. The nucleotide sequences showed high similarity to HEV sequences of human and animal origin detected in other countries. The complete genome sequence analysis indicated that partial nucleotide sequences of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> open reading frames were suitable regions for genotyping.

This study provides the first evidence of the widespread occurrence of HEV in domestic swine populations and in different wild (game) mammals in Hungary. The phylogenetic analyses indicated close genetic relationships between hepatitis E viruses from human and animal origins, which further support the theories about the zoonotic character of the virus. The results of the studies emphasize the food-hygiene impact of HEV, and can serve as a basis of further epidemiological investigations.



### 3. BEVEZETÉS

A közegészségügy az emberek társállatokkal, haszonállatokkal és a környezettel való kapcsolata révén elválaszthatatlanul összefügg az állategészségüggyel. Az utóbbi 10 évben az embereket érintő új betegségek 75%-ának kórokozói állatoktól vagy állati eredetű termékektől származtak (Torres-Vélez és Brown, 2004). Számos ilyen betegség járványtani tulajdonságai révén globális veszélyt jelent. Minden fontosabb zoonotikus kórokozó által előidézett megbetegedés, illetve a kórokozók tünetmentes hordozása megnehezíti az állati eredetű élelmiszerek biztonságos előállítását, valamint az állatok és az állati eredetű termékek nemzetközi kereskedelmében is komoly akadályt jelent.

A különféle közegészségügyi jelentőséggel bíró állati kórokozók egyre gyakrabban foglalnak el előkelő helyet a hazai média híradásaiban, olykor a hiányos tájékoztatás, vagy veszélyességük túlzott hangsúlyozása révén riadalmat keltve az élelmiszer-biztonságot egyre fontosabb szempontként kezelő fogyasztókban (Bánáti, 2008). Az "Állatorvosi Közegészségügy" (Veterinary Public Health, VPH) az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation, WHO) által meghatározott alapvető feladatainak (a zoonózisok diagnosztizálása, kutatása, kontrollja, megelőzése és felszámolása; az élelmiszer-biztonság; orvosbiológiai kutatás; egészségügyi oktatás és ismeretterjesztés) megfelelő ellátása révén megelőzhetők és elkerülhetők mind a további állati és emberi megbetegedések, mind pedig a fogyasztók tájékozatlanságából (pontosabban hiányos vagy félretájékoztatásából) adódó termelői nyereségcsökkenés.

A már bizonyítottan zoonotikus és a feltételezhetően zoonotikus kórokozók között számos vírust is találunk. Ezek egy része vektorok útján, más része az élelmiszer-termelő állatokkal, testváladékaikkal, hússal, tejjel való közvetlen érintkezéssel / fogyasztással okozhatnak fertőzést emberekben. Az élelmiszerrel terjedő kórokozóknak nemcsak a mindennapi életben, hanem a bioterrorizmusban is jelentőségük lehet (Pappas *et al.*, 2006). A zoonotikus és az élelmiszerrel terjedő kórokozók illetve az általuk okozott megbetegedések folyamatos vizsgálata során új és új információk látnak napvilágot. Bár a jellemzően ízeltlábú vektorokkal terjedő vírusok is okozhatnak halmozott, élelmiszer-eredetű megbetegedéseket (pl. kullancephalitis vírus nyers kecsketejben, Balogh *et al.*, 2009), élelmiszer-biztonsági szempontból a legnagyobb jelentősége az enteropathogén vírusoknak van.

A genetikai hasonlóság alapján rotavírusok és picobirnavírusok (Bányai *et al.*, 2005; 2008; 2009, Matthijnsens *et al.*, 2008; Martella *et al.*, 2010), illetve calicivírusok (van der Poel *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Mattison *et al.*, 2007) esetében is feltételezik a vírus zoonotikus jellegét. E vírusok zoonotikus potenciáljának felderítése jelenleg is folyamatban van, és nem kizárt, hogy az állati és emberi vírusos megbetegedések, illetve az úgynevezett „újabb és újból felbukkanó betegségek” (“emerging and re-emerging infectious diseases”) kórokozóinak kutatásai során új zoonotikus mikrobák létezésére, a kórokozók eddig nem ismert zoonotikus tulajdonságaira derülhet fény.

Az EVENT projekt indulásakor már rendelkezésre álltak olyan szakirodalmi adatok, mely a projekt keretében vizsgálni kívánt Hepatitis E vírus (HEV) zoonotikus tulajdonságaira hívták fel a kutatók figyelmét. Meng és kutatócsoportja 1998-ban kísérletes fertőzésekkel bizonyította a HEV fajok közötti terjedésének lehetőségét, 2002-ben kimutatta, hogy a sertésekkel gyakoribb kapcsolatban levő emberekben (állatorvosokban) az anti-HEV szeroprevalencia magasabb, mint a sertésekkel ritkábban érintkező személyekben, illetve 2003-ban a vírus zoonotikus jellegének kockázatait a xenotranszplantációval kapcsolatban is felvetette (Meng *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2002; Meng, 2003). Ugyancsak az EVENT project meghirdetésekor vizsgálták Japánban a HEV-fertőzött állatok nyers húsának fogyasztása következtében kialakuló emberi hepatitis E megbetegedéseket (Yazaki *et al.*, 2003; Tamada *et al.*, 2004). Az EVENT program keretében a HEV európai országokban való elterjedtségének mértékének felderítésére irányuló, illetve az állatokban és emberekben kimutatott vírusok genetikai rokonságát célzó vizsgálatok is indultak. E project részeként hazánkban az emberi hepatitis E esetek vizsgálatával megbízott humán orvosi laboratórium (ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézete Regionális Virologiai Laboratórium, Gasztroenterális Vírusok Nemzeti Referencialaboratóriuma) mellett egy állatorvosi laboratórium (Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék) is csatlakozott a kutatásokhoz abból a célból, hogy a HEV étel- és vadállományokban való jelenlétének vizsgálatával minél több információt gyűjthessünk erről a munkaegészségügyi és étel- és élelmiszerbiztonsági kockázatot egyaránt jelentő kórokozóról.

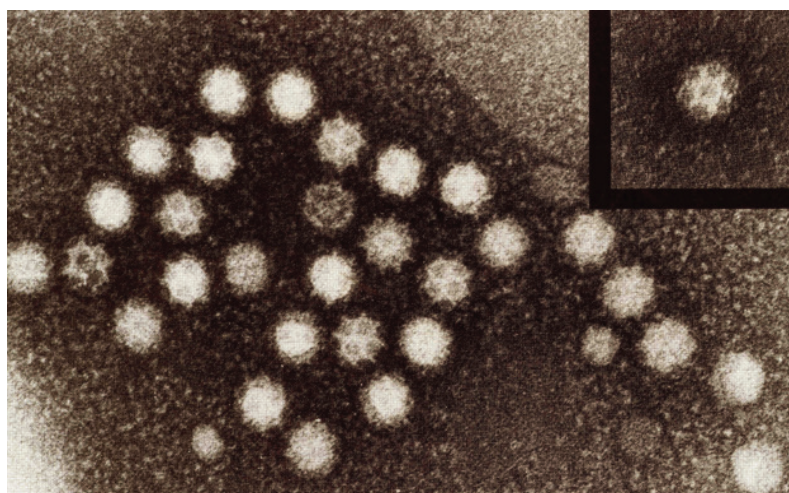
## 4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 4.1. A hepatitis E vírus

#### 4.1.1. Felfedezés

Az akut hepatitis egy enterálisan terjedő, ám az addig ismert hepatitis A-tól eltérő formájának létezését először az 1980-as években írták le, amikor az 1955-56-os indiai hepatitis-járványból származó emberi vérsavók vizsgálata során olyan mintákat találtak, melyeknél a hepatitis-A és hepatitis-B fertőzöttség kizárható volt (Krawczynski *et al.*, 2000). A kórképre ekkor a „járványos, enterális úton terjedő nem-A, nem-B hepatitis” elnevezést használták („epidemic/enterically transmitted non A non B hepatitis”; Jameel, 1999; Worm *et al.*, 2002).

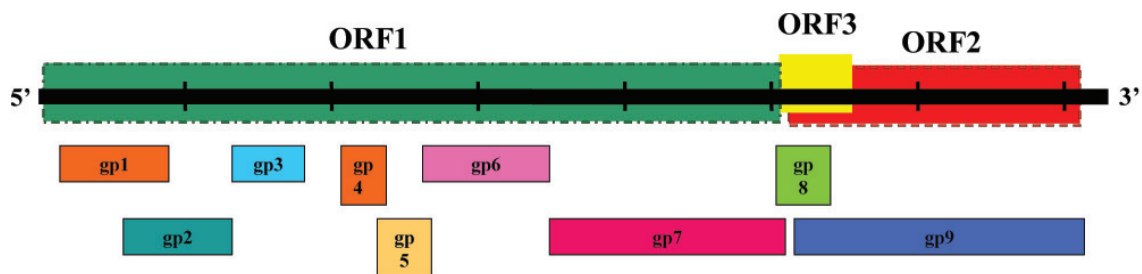
A vírust először 1983-ban Balayan és munkatársai mutatták ki elektronmikroszkópos vizsgálattal (1. ábra) egy önkéntes székletéből, akit mesterségesen fertőztek az enterálisan átvihető non-A non-B hepatitisszel (Balayan *et al.*, 1983). A kórokozónak a Hepatitis E vírus (HEV) elnevezést adták, utalva annak endémiás előfordulására, járványos tulajdonságára és enterális terjedésére (endemic, epidemic, enterically transmitted; Jameel, 1999).



**1. ábra** A HEV elektronmikroszkópos képe. Forrás: Laboratory of Clinical and Epidemiological Virology, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium <http://www.kuleuven.ac.be/regamvr/pictures/HepatitisE-1.jpg> (2005).

#### 4.1.2. Genomszerkezet

A HEV 32-34 nm átmérőjű, burok nélküli, ikozaéder szimmetriájú vírus. A kapszidban található, pozitív irányítottságú, szimplaszálú RNS genom 7,5 kb hosszúságú, három nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) kódol, amelyek egymással részleges átfedésben vannak (2. ábra). Az 5' véghez közelebb, az első kb. 30 nukleotidnyi nem kódoló szakasz után található a kb. 5100 bázis hosszúságú ORF1, amely a „nem strukturális”, vírusreplikációhoz szükséges fehérjéket (5'-3' sorrendben: metil-transzferázok, papain-szerű cisztein-proteáz, polyproline hinge-domén, adenosine-diphosphate (ADP) ribose binding protein, RNS-helikáz, RNS-polimeráz) poliprotein formájában kódolja (Sehgal *et al.*, 2006). A kb. 2000 nukleotid hosszúságú ORF2 a kapszidproteint kódolja. A genom 3' végén egy kb. 60 nt hosszúságú nem kódoló szakasz, valamint egy változatos hosszúságú poli-A farok található (Emerson és Purcell, 2003). A mind az ORF1, mind az ORF2 leolvasási keretekkel átfedésben lévő, 366 nukleotid hosszúságú ORF3 egy ismeretlen funkciójú fehérjét kódol, amely feltételezhetően a virion összeépülésében játszik szerepet (Emerson és Purcell, 2003). Egyes vizsgálatok szerint a genetikailag módosított, az ORF3 régiót nem tartalmazó vírusmutánsok is képesek voltak *in vitro* fertőzést okozni, és szaporodni szövettenyészetben (Emerson *et al.*, 2006), más vizsgálatok szerint azonban az ORF3 kezdeti szakaszán kódolt aminosavak némelyike feltétlenül szükséges a fertőzőképességhez (Huang *et al.*, 2007), illetve az ORF3 nélkülözhetetlen az újonnan képződő virionok sejtekből való kiszabadulásához (Yamada *et al.*, 2009b).



**2. ábra** A HEV genomszerkezete. A kódolt fehérjék sorrendben: gp1, gp2: metil-transzferázok, gp3: papain-szerű cisztein-proteáz, gp4: polyproline hinge-domén, gp5: ADP ribose binding protein, gp6: RNS-helikáz, gp7: RNS-polimeráz, gp8: feltételezett kapszid protein, gp9: strukturális fehérjék.

A fentiekben ismertetett genomszerkezet a HEV 1-3. genocsoportjára jellemző, a 4. genocsoport esetében a nyitott leolvasási keretek elhelyezkedése némiképp eltérő: az ORF3 csak az ORF2-vel található átfedésben (Wang *et al.*, 2000).

#### **4.1.3. Replikáció**

A HEV replikációs stratégiája pontosan még nem ismert, de valószínűleg a Baltimore IV. csoportba tartozó vírusok replikációjával modellezhető (Chandra *et al.*, 2008b). Az ORF1 régió transzlációjával kapcsolatban még nem tisztázódott egyértelműen, hogy a kódolt poliprotein egy több funkcionális doménnel rendelkező fehérjeként működik-e, vagy a transzlációt követően több, kisebb fehérjére darabolódik (Meng, 2010). A genom ORF2 és ORF3 régióiról a transzkripció során egy bicisztronos szubgenomikus mRNS képződik (Graff *et al.*, 2006). A vírus szövettenyésztésben való szaporítása, melyhez különleges körülmények szükségesek, eddig speciális humán hepatoma, tüdőcarcinoma és bélhám-eredetű sejtvonalakon, illetve főemlős (makákó, Rhesus-majom, afrikai zöld majom) vese és máj sejtvonalakon sikerült (Tam *et al.*, 1996 és 1997; Tanaka *et al.*, 2007, Chandra *et al.*, 2008b, Tanaka *et al.*, 2009); az *in vitro* vírusszaporítás, bonyolultsága miatt, egyelőre nem gyakorlatias. A vírus *in situ* kimutatására irányuló nukleinsav hibridizációs vizsgálatok egyértelművé teszik, hogy a vírus a citoplazmában szaporodik, a replikáció az endoplazmatikus retikulum membránján zajlik (Choi és Chae, 2004; Rehman *et al.*, 2008). *In vivo*, állatmodellben a vírusreplikáció folyamatát és lokalizációját is megfigyelték (Deus *et al.*, 2007; Bouwknegt *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009), a vírusszaporodás pontos szervi lokalizációjáról azonban mindezidáig csak ellentmondásos eredmények születtek. Egyes tanulmányok szerint a vírus adszorpciójában valószínűleg specifikus receptorok játszanak szerepet, mivel a HEV kifejezett affinitást mutat a fejlődéstanilag bélhám eredetű sejtekhez (Reuter és Szűcs, 2004). Azonban a HEV genomjának replikatív intermedier, antisense RNS-szálára tervezett primerrel sikerült a vírust kimutatni a májban, a gyomorban, a vastag- és vékonybélben, a lépben és a nyirokcsomókban, valamint a vesében is (Williams *et al.*, 2001). Az antisense genom jelenléte a lymphoid szervekben ellentmond az entodermális specifikus receptor-elméletnek. Ugyanígy azon vizsgálat is ellentmondásos adatokat közöl, melyben az RT-PCR reakció mellett *in situ*

hibridizációt is végeztek. Ennek során ugyanis a bél szövettani vizsgálatakor csak a lamina propria sejtjeiben találtak nukleinsavat, a hámban nem. Nagy számban találták meg a vírust viszont a nyirokcsomókban, a tonsillában, valamint a lépben, mindhárom helyen mononukleáris fehérvérsejtekben, lymphocytákban és makrophagokban (Choi és Chae, 2004). Ez elvileg magyarázható volna a máj gyulladással járó területén lévő aktivált B-lymphocyták és makrophagok vándorlásával, ugyanis ezek képesek phagocytosisra és antigén-prezentációra. Ezek a sejtek felvehetik azoknak a szétesett májsejteknek a maradványait, amelyekben éppen vírusreplikáció folyik. Emellett azonban a lép vizsgálata során a periarteriális lymphoid hüvelyben is nagyszámú pozitív sejtet találtak. A periarteriális hüvely a T-lymphocyták blasztos transzformációjának helye, amelyek nem képesek phagocytosisra. Ez arra utal, hogy a vírus képes bejutni a T-lymphocytákba, és az osztódó T-lymphoblastokban szaporodni.

A vírus az eddigi vizsgálatok alapján nem citopatogén, és mivel a tünetek megjelenésével egy időben indul az ellenanyag-termelés, feltételezhető, hogy a klinikai elváltozások hátterében főként immunológiai folyamatok állnak (Reuter és Szűcs, 2004).

#### **4.1.4. Taxonómia**

A Hepatitis E vírusok rendszertani helye egyelőre bizonytalan. Génszerkezetük és morfológiájuk alapján korábban a *Caliciviridae* családba sorolták őket (Cubitt *et al.*, 1995; Aggarwal és Krawczynski, 2000), későbbi vizsgálatok a togavirusokkal való rokonságukat igazolták (Worm *et al.*, 2002). A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) külön családba (*Hepeviridae*) sorolta őket, ezen belül a *Hepevirus* genusba a Hepatitis E-szerű vírusok közé (Goens *et al.*, 2004), majd a pozitív irányítottágú szimplaszálú RNS vírusok nem besorolt *Hepevirus* genusába tartozott (Fauquet *et al.*, 2005). Jelenleg a „rendbe nem besorolt vírusok” csoportján belül a *Hepeviridae* család *Hepevirus* genusába sorolják (ICTV, 2009). A vírus részletesebb, genetikai vizsgálatára azután adódott lehetőség, hogy 1990-ben a vírusgenom teljes nukleotidsorrendjét meghatározták (Tam *et al.*, 1991). Ezáltal nemcsak érzékenyebb vizsgálati módszerek alkalmazására nyílt mód a fertőzések kimutatásában, hanem a



részletes és pontos, molekuláris biológiai alapú járványtani nyomozás is lehetségessé vált.

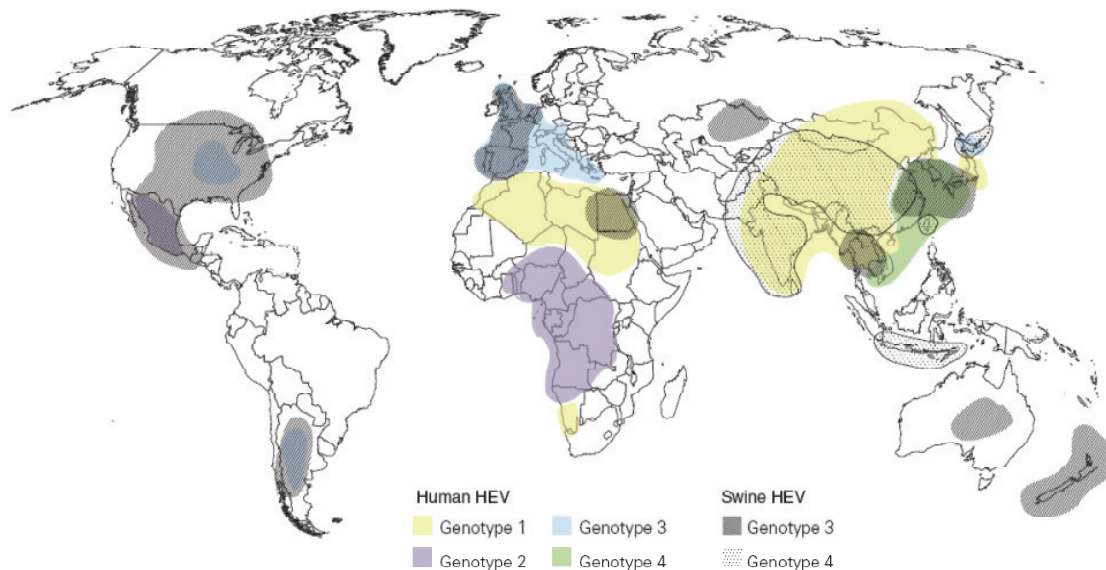
A különböző HEV izolátumok genetikai taxonómiai viszonyainak meghatározására számos módszert alkalmaztak (Lu *et al.*, 2006; Zhai *et al.*, 2006; Fan, 2009). Bár egy adott járványból izolált törzs makákó majmokban történő sorozatos passzálása sem eredményezett jelentős genetikai sodródást (Arankalle *et al.*, 1999), egy meglehetősen változékony genetikai állománnyal rendelkező vírusról van szó, így az egyes genocsoportok és azok alcsoportjai filogenetikai vizsgálattal is elkülöníthetők egymástól (Lu *et al.*, 2006). A strukturális proteineket kódoló régiók genotipizálása alapján az emberi fertőzésekből származó HEV izolátumok 4 (1-4.) genocsoportba, ezeken belül 24 alcsoportba sorolhatók (Worm *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2006). A genocsoportok a prototípus törzs izolálási helye alapján kapták a nevüket (I. táblázat).

**I. táblázat** A HEV izolátumok genocsoport szerinti besorolása (Lu *et al.*, 2006).

<b>Genocsoport</b>	<b>Alcsoport</b>	<b>Izolátumok</b>
<b>I. Burma</b>	a-e	Burma, Kína, India, Pakisztán, Nepál
<b>II. Mexikó</b>	a, b	Mexikó, Namíbia
<b>III. USA</b>	a-j	Európai országok, Amerikai Egyesült Államok, Japán, Ausztrália, Új-Zéland, Argentína  ember és állat eredetű vírusok is
<b>IV. Kína</b>	a-g	Kína, Japán, India  ember és állat eredetű vírusok is

Az 1. genocsoport, egy Burmában (Myanmar) izolált törzsről kapta a nevét, és a Távols-Keleten elterjedt vírusokat tartalmaz (3. ábra). A 2. genocsoportot egy Mexikóban izolált törzsről nevezték el, Mexikóban és Afrika egyes vidékein elterjedt vírusokat sorolnak ide. E két genocsoport csak embereket fertőző törzseket tartalmaz. Egy az USA-ban izolált törzsről elnevezett 3. genocsoportba az Egyesült Államokban, Argentínában, Japánban és Európa országaiban kimutatott vírusok nyertek besorolást. Az utolsó, a 4., egy kínai izolátumról elnevezett, a Távols-Keleten elterjedt vírusokat tartalmazó genocsoport. Ez utóbbi kettőbe tartoznak azok a

vírusok, melyek embert és sertést is fertőzni képesek. Az egyes genocsoportokba sorolt emberi eredetű vírusok egymáshoz való hasonlósága a teljes nukleotid-szekvenciát tekintve kb. 75%, de az aminosav-szekvenciában mutatkozó különbség kisebb (84-93% hasonlóság). Az állatokban kimutatott vírusok genetikai állománya az azonos helyen kimutatott humán törzsekéhez 91-100%-ban hasonlít (Worm *et al.*, 2002).



**3. ábra** A HEV különböző genocsoportjainak elterjedtsége. Emberi eredetű vírusok: sárga – 1. genocsoport; lila – 2. genocsoport; kék – 3. genocsoport; zöld – 4. genocsoport. Állati (sertés) eredetű vírusok: sötétszürke – 3. genocsoport; fehér alapon pontozott – 4. genocsoport (Aggarwal és Naik, 2009).

## 4.2. A hepatitis E mint betegség

### 4.2.1. A HEV járványtana emberben

A hepatitis E járványtanában korábban „endémiás” és „nem endémiás” kategóriába sorolták azokat országokat, ahol az emberek HEV-fertőzöttségét kimutatták, illetve bejelentették (4. ábra). Endémiásnak nyilvánították Délkelet- és Közép-Ázsia (India, Kína, Nepál, Burma, Pakisztán), Közép-Kelet, Afrika északi és nyugati része (Egyiptom), Közép- és Dél-Amerika (Mexikó, Kuba) elmaradott környezeti higiéniajú területeit (Anderson *et al.*, 2002; Schlauder *et al.*, 2003), ahol a szeroprevalancia átlagosan 15%, és jellemző a betegség járványos előfordulása. A

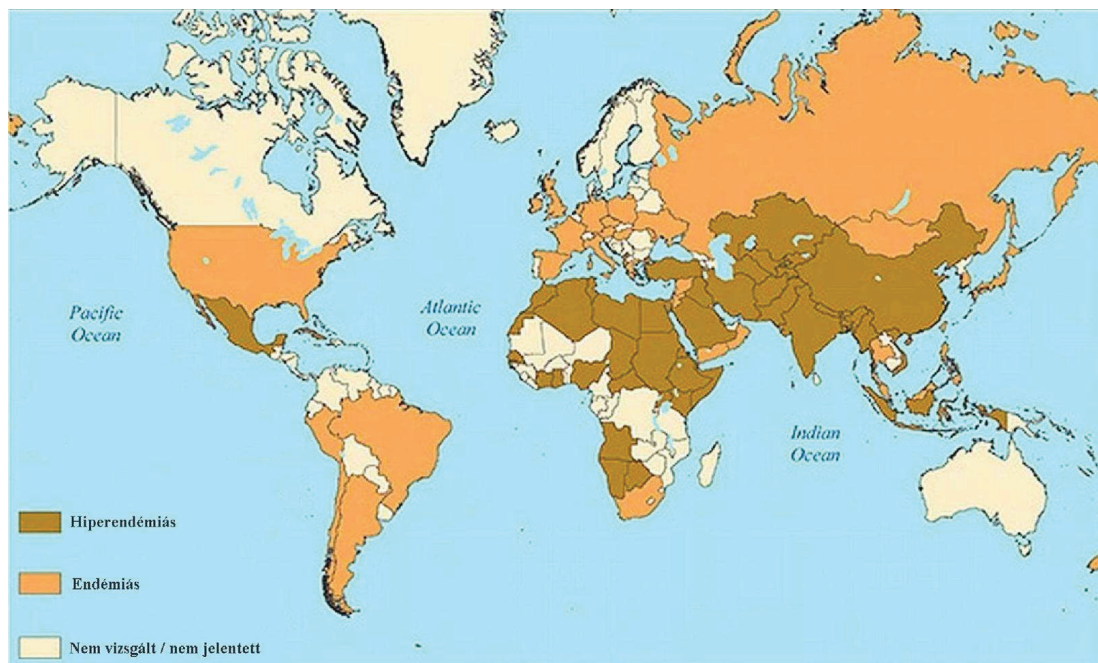


hepatitis E járvány lehet rövid, egy kitörési csúccsal, de lehet összetettebb is, amikor akár több évig is eltarthat. Általában a lakosság 1-15%-át érinti, ám az eddigi legnagyobb, 1986-88 között Xinjingben, lezajlott járvány során több, mint 200.000 ember betegedett meg (Favorov és Margolis, 1999). A betegség klinikai megnyilvánulása fiatal felnőttekben (15-40 év) magasabb (3-30%), míg a 14 évnél fiatalabb gyermekekben alacsonyabb (0,2-10%). A gyerekek kisebb érintettsége e korcsoport kisebb fogékonyságára (Worm *et al.*, 2002), vagy gyakoribb szubklinikai fertőzésére utalhat (Aggarwal és Krawczynski, 2000), esetleg a fertőzés fiatal felnőttek körében szexuális úton való terjedésével is magyarázható (Purcell és Emerson, 2001). Egyes irodalmi adatok szerint a különböző genocsoportba tartozó vírusok különböző emberi korcsoport HEV-fertőzéseit okozzák: az 1. és 2. genocsoport vírusai főleg a fiatal felnőtt korosztály körében okoznak fertőzést, míg a 3. és 4. genocsoport vírusaival fertőzött betegek átlagéletkora több, mint 50 év (FitzSimons *et al.*, 2010). A hepatitis E az "endémiás" területeken a járványos forma mellett sporadikusan is előfordul, ezekben az országokban a sporadikus akut virális hepatitisek 50-70%-át a HEV okozza (Aggarwal és Krawczynski, 2000).

A járványok földrajzi behatároltsága valószínűleg csak az utóbbi időben alakult ki, a XVIII-XIX. században még Európában és az Egyesült Államokban is előfordultak a hepatitis E-hez hasonló epidemiológiai vonásokkal rendelkező járványok (Aggarwal és Krawczynski, 2000). A mai fejlett országokban, melyeket „nem endémiás”-nak tekintenek, a hepatitis E szórványosan fordul elő. Az esetek többségében „importált” fertőzésről van szó, azaz „endémiás” területről hazatérők betegednek meg (Clemente-Cesares *et al.*, 2003). Leírtak már azonban olyan emberi fertőzéseket is, amikor a beteg nem járt „endémiás” területen (Takahashi *et al.*, 2002; Malcolm *et al.*, 2007). Ezekben az esetekben a kórokozó az adott („nem endémiás”) területről, esetleg a rezervoárként szereplő állatokból származhatott (Yazaki *et al.*, 2003; Widdowson *et al.*, 2003; Wichmann *et al.*, 2008).

A sporadikus megbetegedések mellett a korábban „nem endémiás”-nak nyilvánított országokban is (Spanyolország, Olaszország, Görögország, Anglia, Hollandia, Ausztria, USA, Japán Ausztrália és Új-Zéland) 0,4-3,3% -os (Baltimore környékén 20%!) szeropozitivitást mutattak ki, ezért az utóbbi években megkérdőjeleződött az „endémiás” és „nem endémiás” kifejezések használatának helyessége (Williams *et al.*, 2001). Az új kategorizálás szerint a korábban

„endémiás” kategóriába sorolt területeket „hiperendémiás” régióknak nevezik, míg a HEV rezervoár fajokban való állandó jelenléte miatt a korábban „nem endémiás” országokat sorolják „endémiás” kategóriába (Teo, 2010). Ezek a kifejezések nemcsak érzékeltetik a két régió közötti járványtani különbséget, de egyértelműbbé teszik, hogy a HEV a fejlett országokban is folyamatosan jelen van, annak ellenére, hogy a betegség klinikai formája, a jobb higiéniai körülmények miatt, sporadikusan fordul csak elő.



**4. ábra** A hepatitis E előfordulása a világon. Sötétbarna területek: hiperendémiás (korábban endémiás) országok; világosbarna területek: endémiás (korábban nem endémiás) országok; világos területek: a HEV endémiás előfordulását még nem bizonyították. Forrás: Centers for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov/hepatitis/HEV/HEVfaq.htm#section1> (2010. 03. 23.)), módosítva.

A hepatitis E mint humán betegség, tulajdonképpen heveny hepatitis (májgyulladás) szindróma, mely tüneteiben hasonlít a hepatitis A-hoz. A fertőzés átvitelében a fecal-oral terjedési út játssza a főszerepet. A legtöbb járványnál a széklettel kontaminált ivóvíz terjeszti a vírust. Az ivóvíz kontaminációja gyakran kiadós esőzések, áradások után következik be (Bile *et al.*, 1994, Aggarwal és Krawczynski, 2000). A vírus valószínűleg átvihető ételmiszerrel; a rizikócsoportba tartozik a fertőzött nyers hús (sertés, vaddisznó, őz) és különösen a nem kellően hőkezelt sertésmáj (Tei *et al.*, 2003 és 2004; Yazaki *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*,

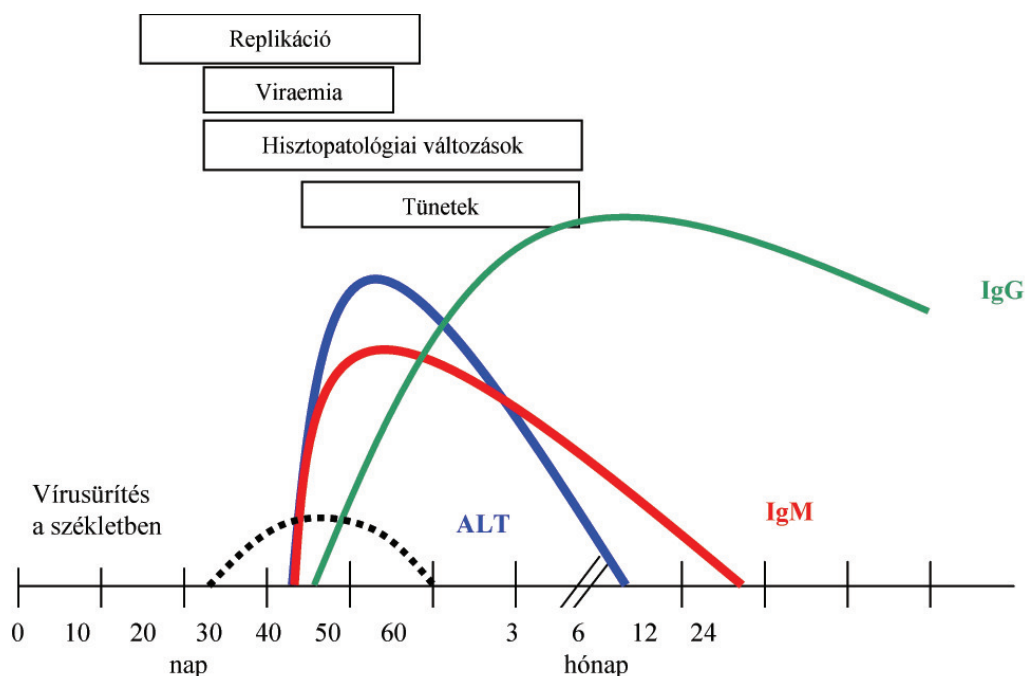
2004; Reuter *et al.*, 2006; Dalton *et al.*, 2008). A HEV nem csak a fertőzött, állati eredetű élelmiszer fogyasztása, hanem a fertőzött anyaggal vagy állatokkal kapcsolatos munkavégzés esetén is veszélyt jelenthet (Pina *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002; Jary, 2005; Olsen *et al.*, 2006).

A közvetlen emberről emberre terjedés valószínűsége nagyon kicsi. A hozzátartozók között a hepatitis E másodlagos előfordulása csupán 0,7-2,2% (hepatitis A esetén ez 50-75%). Ezeket az eseteket valószínűleg nem az emberről emberre terjedés, hanem a közös forrásból való fertőződés okozza (Aggarwal és Krawczynski, 2000). A nosocomialis terjedés lehetősége a viraemiás szakasz rövidsége miatt meglehetősen kicsi, de az egészségügyben dolgozók fertőződését már többször is leírták (Aggarwal és Krawczynski, 2000, Worm *et al.*, 2002). Ugyancsak bizonyították a hepatitis E fertőzés átvitelét transfúzióval (Matsubayasi *et al.*, 2004 és 2008). Elméletileg a transzplantáció és a xenotranszplantáció is szóba jöhet a fertőzés átvitelében (Meng, 2003; Tanaka *et al.*, 2004; Haagsma *et al.*, 2009; Pischke *et al.*, 2009). Vertikális terjedés akkor következik be, ha az anya a terhesség harmadik trimeszterében fertőződik (Worm *et al.*, 2002). Felmerül a szexuális úton történő és intravénás droghasználattal kapcsolatos átvitel lehetősége is, tekintettel arra, hogy elsősorban fiatal felnőttkorban tapasztalható a fertőzések számának emelkedése. Egy olasz tanulmány szerint a homoszexuális férfiak 20%-a, míg az intravénás drogot használók 3%-a szeropozitív (Montella *et al.*, 1994; Aggarwal és Krawczynski, 2000).

#### **4.2.2. Klinikai jellemzők**

A hepatitis E fertőzés megjelenése a fertőző dózis nagyságának függvényében a tünetmentes lefolyástól a súlyos, esetenként halálos kimenetelű májgyulladásig terjedhet (Reuter és Szűcs, 2004). A fertőzés csak nagyon ritkán, az esetek 0,2-4%-ban vezet halálhoz (Worm *et al.*, 2002). Kivételt képeznek ez alól a harmadik trimeszterben fertőződő terhes nők, valószínűleg az endotoxin-mediált kórképekkel szembeni fokozott érzékenységük miatt, mivel a hepatitis E fertőzés alatt a máj endotoxin-semlegesítő képessége jelentősen csökken. A halálozási ráta itt elérheti a 25%-ot is (Aggarwal és Krawczynski, 2000).

A tünetekkel járó fertőzés esetén a klinikai kép alapvetően a heveny hepatitis A fertőzéshez hasonló (Reuter és Szűcs, 2004). A fertőzést követő 2-9 hetes lappangási idő során, a tünetek megjelenése előtt alakul ki a viraemia (5. ábra). A vírus nukleinsavát a székletből a viraemia ideje alatt, és azt követően még kb. 2 hétig lehet kimutatni (Dalton *et al.*, 2008). Az 1-10 napig tartó bevezető szakaszban influenzaszerű tünetek, láz, étvágytalanság, hányinger, hányás, hasi fájdalom, agyagszínű széklet, hasmenés, sötét vizelet és átmeneti kiütések jelentkeznek (Aggarwal és Krawczynski, 2000). A vérben a májenzim-szint növekedés csúcsa (2 hetes lappangási idővel számolva) a fertőzést követő 6. héten tapasztalható, majd a vér májenzim-szintje a 10. hétre normalizálódik (Dalton *et al.*, 2008). A hepatitis E fertőzések legnagyobb része a bevezető szakasz után feloldódik, vagy aszimptomatikus marad (anicteric hepatitis) (Worm *et al.*, 2002). A hepatitis E cholestatikus formájában azonban a bevezető szakasz után sárgaság alakul ki, tovább sötétedik a vizelet, és világosabb lesz a széklet (Aggarwal és Krawczynski, 2000). Fizikális vizsgálattal a máj enyhe megnagyobbodása és nyomásérzékenysége állapítható meg. A lép megnagyobbodása 10-15%-ban fordul elő (Reuter és Szűcs, 2004).



**5. ábra** A hepatitis E lefolyása emberekben (Jameel *et al.*, 1999; Dalton *et al.*, 2008).

A betegség általában akut jellegű, 1-4 hét alatt lezajlik, néhány esetben azonban a klinikai tüneteket mutató szakasz elnyújtottan jelentkezik. A cholestasisos hepatitis ezen elnyújtott formájára a perzisztáló sárgaság és feltűnő viszketés jellemző (Aggarwal és Krawczynski, 2000). A prognózis jó, a sárgaság 2-6 hónap múlva magától megszűnik.

Irodalmi adatok szerint, a betegség egy rendkívül súlyos, gyors lefolyású, hirtelen állapotromlással járó, ún. „fulmináns” hepatitis formában is megjelenhet. Ez a kórforma inkább a 4. genocsoport vírusaira, és elvéve a 3. genocsoportba tartozó vírusokra jellemző. A betegség e formájának kialakulását összefüggésbe hozzák a fertőzést okozó vírus genetikai sajátosságaival, mely szerint bizonyos nukleotid pozíciókban fellépő nukleotid szubsztitúciók a betegség fulmináns formájában, míg e szubsztitúciók hiánya az enyhébb lefolyású heveny, vagy a fulmináns formánál lassabban kialakuló „súlyos heveny” („severe acute”) hepatitis formájában manifesztálódik (Inoue *et al.*, 2006a és 2009).

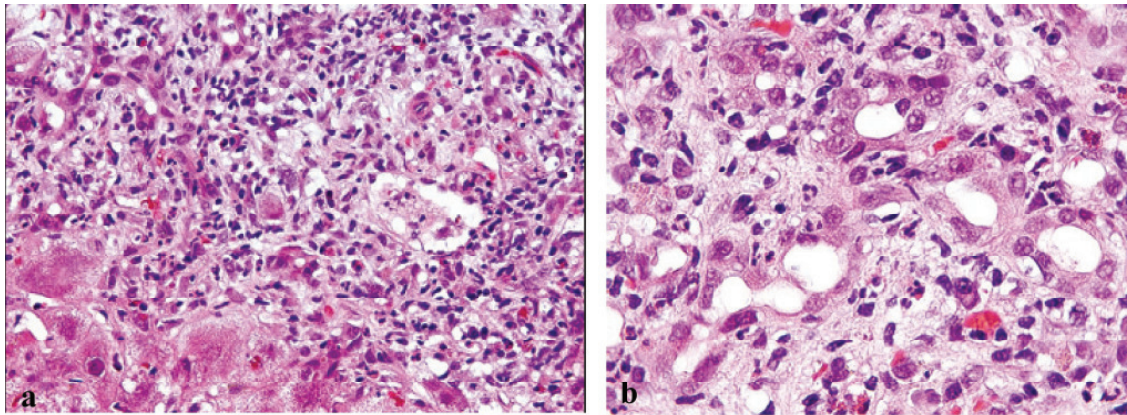
Az eddigi ismeretek alapján a hepatitis E heveny megbetegedés (Aggarwal és Krawczynski, 2000), krónikus formája csak speciális esetekben fordul elő. A hepatitis A-hoz hasonlóan, krónikus, kompenzált májbetegségben szenvedő betegek hepatitis E-felülfertőzése heveny dekompenzációs problémákhoz, súlyosabb esetekben akár halálhoz is vezethet (Ramachandran *et al.*, 2004). Hosszú ideig fennálló HEV-fertőzést szerv-transzplantációt követően, az immunszuppressziós kezeléssel átültetett recipiens betegeknél figyeltek meg (Meng, 2010).

#### **4.2.3. Kórszövettan**

Az esetek kb. felében a hepatitis E fertőzés cholestaticus formája alakul ki. Erre az epepangás és a parenchymasejtek mirigyszerű transzformációja jellemző, míg a hepatocyták degeneratív elváltozásai kevésbé kifejezettek (Aggarwal és Krawczynski, 2000). Az esetek másik felében a kóros folyamatok megnyilvánulása az egyéb akut virális hepatitiszek megjelenéséhez hasonlít. A hepatocyták ballonizáló elfajulása, fókális vagy teljes necrosis, acidophil testek figyelhetők meg. Mindkét esetben gyulladással infiltrátum szűri be a lobulust, mely főleg macrophagokat és lymphocytákat tartalmaz (6. ábra). A cholestasisos formánál ezen felül polymorphonuclearis sejtek is megfigyelhetők (Aggarwal és Krawczynski, 2000). A



kórlefolyásból következő eltérések mellett a különböző vírusok okozta fertőzések is különböző kórszövettani elváltozásokat okozhatnak. Egy, az Egyesült Királyságban végzett tanulmány szerint, melyben az Egyesült Királyságban és távol-keleti utazás során megfertőződött angol betegek májbiopsziájukat vizsgálták, az adott földrajzi területen előforduló vírusok okozta fertőzés kórszövettani képe eltér a más földrajzi területről (Távol-Keletről) importált fertőzés mikroszkopikus elváltozásaitól (Malcolm *et al.*, 2007). A kórszövettani elváltozások a májban 3-6 hónap múlva rendeződnek (Reuter és Szűcs, 2004).



**6. ábra** HEV-okozta hepatitis kórszövettani képe emberben (haematoxilín-eosin festés); a: a periportális hepatocyták ballonizáló elfajulása, és a lymphocytás-gyulladásos beszűrődés; b: abnormalis epeerek, lymphocyták a károsodott epitheliumban (Malcolm *et al.*, 2007).

#### 4.2.4. Laboratóriumi diagnózis

Az emberi megbetegedés felderítésében a tünetek és járványtani adatok (endémiás területre való utazás, nyers hús fogyasztása, rezervoár állatokkal, azok bélsarával vagy nyers húsával való érintkezés) mellett a laboratóriumi vizsgálatok jelentenek segítséget. A hepatitis E fertőzés során a máj parenchymájának különböző fokú károsodása következik be, amit a májenzimek és a bilirubin plazmaszintjének emelkedése jelez. A cholestaticus forma esetén a bilirubin kimutatható a vizeletből is. Az alanin aminotranszferáz (ALT) és az aszpartát aminotranszferáz (AST) a májsejtek, míg a gamma-glutamil transzpeptidáz (GGT) és az alkalikus-foszfataz-szint emelkedése az epecsatornák érintettségét jelzi. A betegség elmúlása után 6 héttel állnak vissza a normál értékek (Aggarwal és Krawczynski, 2000).

A májenzimek és a bilirubin plazmaszintjének emelkedésén túl a vírus indirekt vagy direkt kimutatása is szóba jöhet. A hepatitis E ellen specifikus IgM és IgG ellenanyagok termelődnek. Az IgM, melynek szintje a tünetek megjelenésével azonos időben kezd növekedni a vérben, a fertőzést követően néhány hónapon belül eltűnik, míg az IgG évekig kimutatható a vérből (Dalton *et al.*, 2008). Ezért az IgM pozitivitás a fertőzés akut szakaszára utal, míg az IgG pozitív eredmény alapján nem határozható meg a betegség stádiuma. Leírtak azonban olyan eseteket is, mikor a betegség akut stádiumában csak az IgG volt jelen (Worm *et al.*, 2002). Az immunológiai vizsgálatokhoz kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-kiteket használnak, az ELISA-vizsgálatok eredményét pedig immunoblot (Western blot) módszerrel erősítik meg (Waar *et al.*, 2005, Haagsman *et al.*, 2007; Herremans *et al.*, 2007), mivel autoimmun hepatitis és reumatológiai betegségek esetén ELISA módszerrel téves pozitív IgM eredmények születhetnek (Reuter és Szűcs, 2004). A vírusnak egy szerotípusa van (Mushahwar, 2008), egyes vizsgálatok szerint azonban a szerológiai vizsgálatok megbízhatósága kérdéses, mivel a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható szerológiai kitek az 1. és 2. genocsoportra jellemző antigénekre specifikusak, míg érzékenyséjük az Európában elterjedt, 3. genocsoportba tartozó vírusok antigénjei ellen termelt ellenanyagokkal szemben alacsonyabb (Herremans *et al.*, 2007). A vírus-nukleinsav reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) a szérumból kizárólag a viraemia idején, a székletből és az epéből a kórokozó-ürítés időtartama alatt mutatható ki. Az elektron-mikroszkópos vizsgálat nem rutinszerűen alkalmazott eljárás (Sreenivasan *et al.*, 1984; Krawczynski *et al.*, 2000). A vírus szövettenyésztésre való szaporítására, bár történtek próbálkozások, nem találtak egyszerű, rutinszerűen és megbízhatóan alkalmazható módszert (Tanaka *et al.*, 2007; Chandra *et al.*, 2008b; Tanaka *et al.*, 2009), azonban kimutatták, hogy szérumminta szövettenyésztésre oltása esetén ellenanyagok jelenlétében is szaporítható a vírus (Takahashi *et al.*, 2010). Állati eredetű, formalin-fixált és beágyazott szervminták esetében a vírus kimutatására az immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs módszerek megfelelően specifikusnak és érzékenynek bizonyultak (Lee *et al.*, 2009a és 2009b).

A hepatitis E diagnosztikájában követni kell az Orvosi Mikrobiológiai Szakmai Kollégium vírushepatitis-diagnosztikai algoritmus előírásait (Infektológiai Útmutató, Klinikai Irányelvek Kézikönyve, 2003): figyelembe kell venni, hogy a

kórelőzményben szerepel-e endémiás területre utazás, nyers vagy nem kellően hőkezelt hús, máj fogyasztása, állattartás, kontaktus háziállattal. Minden esetben el kell végezni a májenzimek és a bilirubin vizsgálatát, továbbá ki kell zárni az egyéb, akut hepatitist okozó kóroki tényezők szerepét (hepatitis A-, B-, C-, Citomegalovírus és Epstein-Barr-vírusok). Magyarországon minden fertőzések eredetű hepatitis megbetegedés, így a hepatitis E fertőzés is bejelentésre kötelezett (Reuter és Szűcs, 2004).

#### **4.2.5. Gyógykezelés**

A hepatitis E kezelése csupán tüneti, illetve a máj kímélésére szorítkozik: kerülni kell az alkoholfogyasztást, és el kell hagyni a nélkülözhető hepatotoxikus gyógyszereket is (Reuter és Szűcs, 2004). Specifikus gyógyszeres kezelésre egyelőre nincs lehetőség; amennyiben azonban lesz is specifikus, oki terápiára alkalmas szer, figyelembe kell venni, hogy a replikáció és a viraemia a tünetek megjelenése előtt megkezdődik. Habár előzetes tanulmányok a ribavirin és az interferon-alfa replikációgátló hatásáról számolnak be, a betegek számára elérhető gyógyszerek kifejlesztéséig a betegséggel szembeni védekezést a megelőzésre kell alapozni (Reuter és Szűcs, 2004).

#### **4.2.6. Megelőzés**

Az emberi fertőzés megelőzésében elsősorban a személyi- és konyhai higiénának van kulcsszerepe (Feagins *et al.*, 2008; Eker *et al.*, 2009). Az „endémiás” területeken a hepatitis E fertőzések leggyakoribb forrása a fekáliával szennyeződő ivóvíz. Ezeken a területeken meg kell oldani a szennyvíz kezelését, elvezetését, az ivóvíztől történő elkülönítését. Fontos a turisták figyelmének felhívása a fertőzés lehetőségére. Az „endémiás” területre utazóknak kerülni kell a palackozatlan, forralatlan víz fogyasztását, beleértve ebbe a rendszerint (nem hőkezelt) vezetékes vízből készített jégkockát is, illetve a HEV lehetséges zoonotikus tulajdonsága miatt kerülni kell a potenciálisan vírust tartalmazó élelmiszerek (sertéshús, vadhús, máj, kagyló) nem kellően hőkezelt formában történő fogyasztását is. Terhes nők endémiás területre való utazása kifejezetten ellenjavallt (Reuter és Szűcs, 2004). A vírus



közvetlen emberről emberre terjedése nem valószínű, ezért a fertőzöttek elkülönítése nem indokolt, de a beteg ne végezzen munkát ételkészítéssel. Az endémiás területre utazót tájékoztatni kell arról, hogy a „hepatitis oltások” nem nyújtanak védelmet minden hepatitis-vírus ellen (Reuter és Szűcs, 2004). Vakcina előállítására történtek kísérletek, azonban kereskedelmi forgalomban még nem kaphatók a HEV-fertőzés megelőzésére alkalmas humán vagy állatorvosi célra szánt készítmények (Krawczynski, 2007; FitzSimons *et al.*, 2010). Prevencióra a kereskedelmi forgalomban lévő humán gammaglobulin nem használható, mivel az csak a hiperendémiás országokban gyűjtött plazmából előállítva hatásos (Telegdy, 2005). A sertéssel kapcsolatos foglalkozást űzők személyi és munkahelyi higiénája nemcsak a humán fertőzés elkerülésében, hanem a HEV-fertőzés állatokra való átvitelének elkerülésében, és az ételkészítéssel kapcsolatos kontaminálásának megelőzése érdekében is fontos (Pina *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002; Jary, 2005; Olsen *et al.*, 2006).

#### **4.3. A HEV járványtana és kórtana ételkészítéssel foglalkozó állatokban**

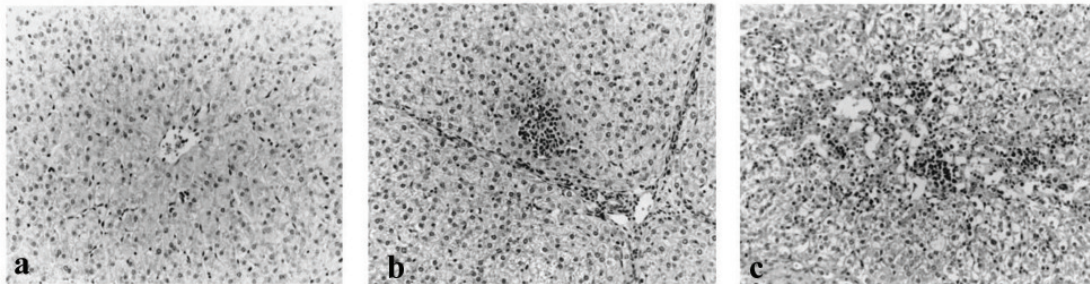
A hepatitis E állatokban való előfordulásának vizsgálatát a HEV tisztázatlan járványtana és a „nem endémiás” országokban előforduló 0,4-3,3%-os szeropozitivitás indokolja. Háziállataink többsége fogékony a HEV-fertőzésre. Mind a korábban endémiásnak tekintett, mind az endémiásnak nem tekintett országokban kimutatták a vírust több háziállat fajtából: a vizsgált juhok és kecskék 42-67%-ában, kutyák 27%-ában, csirkék 44%-ában, patkányok 80%-ában találtak ellenanyagokat (Arankalle *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002b; Peralta *et al.*, 2009a), illetve majmok anti-HEV-szeropozitivitását is leírták (Hirano *et al.*, 2003b; Yamamoto *et al.*, 2008). A HEV-fertőzés molekuláris bizonyítékként házisertésből (van der Poel *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002a), vaddisznóból (Michitaka *et al.*, 2007; Adlhoch *et al.*, 2009; Kaba *et al.*, 2009), vadon élő kérődzőkből (Tei *et al.*, 2003; Sonoda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004), ezen kívül mongúzból (Nakamura *et al.*, 2006), patkányból (Hirano *et al.*, 2003a; Johne *et al.*, 2009) és nyúlból (Zhao *et al.*, 2009) RT-PCR módszerrel virális nukleinsavat is kimutattak. A HEV-fertőzésre a szakirodalmi adatok alapján feltételezhetően fogékony fajok közül Európában a sertésnek, a vaddisznónak és a vadon élő kérődzőknek (őz, szarvas), valamint a szarvasmarhának, a juhoknak és a kecskének, van ételkészítéssel kapcsolatos higiéniai jelentősége.

A szeropozitív egyedek gyakoriságában az egyes vizsgálatok jelentős eltérést mutatnak, azonban mindegyik vizsgálat eredménye azt mutatja, hogy a fertőzésre a fent említett fajok közül a sertés a legfogékonyabb. A sertések rezervoár-szerepére nemcsak a szeroprevalencia mértéke [14-74% (Reuter és Szűcs, 2004), Németországban 49,8% (Baechlein *et al.*, 2009)] utal, hanem a sertésben és emberben kimutatott vírusok nagyfokú genetikai hasonlósága is (Meng *et al.*, 1997; van der Poel *et al.*, 2001). Nyers, fertőzött sertéshús fogyasztását követő emberi HEV-fertőzést több esetben, így Magyarországon is leírtak (Yazaki *et al.*, 2003; Reuter *et al.*, 2006). Emellett Indiában a kereskedelmi forgalomban kapható sertésmájak 0,83%-ában, Japánban 1,9%-ában, míg az USA-ban 11%-ában mutattak ki Hepatitis E vírust (Yazaki *et al.*, 2003; Feagins *et al.*, 2007; Kulkarni és Arankalle, 2008).

A sertések HEV-fertőzéssel szembeni nagyfokú fogékonysága miatt a lehetséges fertőzési utak és a vírus pathogenezise leginkább sertés modellen vizsgálható. Kasorndorkbua és munkatársai (2004) által végzett kutatás során a vírus sertésállományon belüli terjedésének módjait vizsgálták. A kísérletben sikeres fertőzés csak a kontakt úton és a *per os* fertőzött csoportnál volt elérhető. A vizsgálat bizonyította, hogy a véres beavatkozások, valamint a levegő útján történő fertőzés esélye minimális (a sertések egy légtérben voltak), és a fekális-orális fertőzés is csak akkor következhet be, ha ismételt és nagy titerben veszi fel a sertés a fertőző víruspartikulákat. A szerzők szerint további kutatásokat igényel, hogy milyen faktorok tették lehetővé a vírus mára bizonyított világméretű elterjedését.

Egy, a közelmúltban, Japánban végzett vizsgálat során (Kunio és Hiroshi, 2007) nagy mennyiségű szeroprevalencia-adatot vetettek alá statisztikai elemzésnek. Azt találták, hogy sertésekben a fertőződés átlagosan az 59. és a 67. életnap között ered meg, a szerológiai áthangolódást kb. a fertőzéstől számított 25. napra teszik, és 30 napot tartanak szükségesnek a fertőződéstől a vírusürítés megszűntéig. A modell alapján arra a következtetésre jutottak a szerzők, hogy a becsült fertőzési erély mellett az állomány 95%-a átesik a fertőzésen 150 napos koráig, így a 180 napos vágóéletkorra minimális lesz az állomány szintű vírusürítés. Azonban ha a fertőzési erély vagy az immunválasz gyorsasága valamilyen okból csökken, a vágáskori vírusürítés már fokozottabb étel-miszer-biztonsági valamint munkaegészségügyi kockázatot jelenthet.

Az állatokban kialakuló hepatitis E tünetmentes (Martelli *et al.*, 2010). Fertőzési kísérletekben, melyben házisertést emberből és sertésből izolált HEV törzsekkel fertőztek, a kísérleti állatokban nem figyeltek meg klinikai tüneteket, illetve vérükben nem emelkedett a májenzimek és a bilirubin szintje. A vírusszaporodás helyére a májban észlelt kórszövettani elváltozások utaltak: heveny savós májgyulladásra jellemző kórszövettani elváltozások, azaz a májsejt-sorok egymástól való eltávolodása, savó felhalmozódás, körülírt mikroszkopikus területeken májsejt-elhalás, valamint mononukleáris sejtek (lymphocyták, macrophagok) jelenléte (7. ábra). A vírus, mellyel parenterálisan fertőzték a kísérleti állatokat, a májból az epeutakon a bélbe kerülve a bélsárral ürült (Meng *et al.*, 1998, Halbur *et al.*, 2001). A faji átjárhatóság bizonyítására végzett kísérletekben humán és sertés eredetű HEV izolátumokkal nemcsak sertéseket, hanem patkányokat és főemlősöket is sikeresen fertőztek (Meng *et al.*, 1998, Feagins *et al.*, 2008).



**7. ábra** A fertőzési kísérlet kórszövettani eredménye (haematoxillin-eozin festés): a: kontroll máj; b: sertés eredetű HEV törzsszel fertőzött sertés mája; c: emberből izolált HEV törzsszel fertőzött sertés mája. (Halbur *et al.*, 2001).

Bár a hepatitis E sertésekben nem jelenik meg klinikai tünetekben, egyes vizsgálatok szerint a porcine circovírus 2-es típusával (PCV-2) való fertőzéssel szimultán jelen levő HEV-fertőzés a circovírus okozta választást követő leromlást és immunszuppressziót (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS) közepes súlyosságú hepatitis-szel súlyosbítja (Martín *et al.*, 2007).

#### 4.4. A HEV fajok közötti terjedésének bizonyítékai, a vírus élelmiszer-biztonsági és munkaegészségügyi jelentősége

Molekuláris biológiai módszerekkel 1997-ben sertésekből (Meng *et al.*, 1997), 2001-ben madaraktól (Haqshenas *et al.*, 2001) mutatták ki a hepatitis E vírus jelenlétét. A nukleotid-szekvencia elemzésével kimutatták, hogy a madarakat fertőző HEV távoli rokona az emberi megbetegedéseket okozó vírusnak; a baromfiból kimutatott vírusok genomja csak 47-54%-ban hasonlít a humán HEV törzsek örökítő anyagára (Huang *et al.*, 2004, Bilic *et al.*, 2009). Valószínűleg ez is az oka annak, hogy Avian Hepatitis E vírust eddig nem izoláltak emberekből.

A sertés eredetű hepatitis E vírus genomja azonban nagyobb mértékű hasonlóságot mutat az emberi eredetű vírusok genomjával, emellett az RT-PCR segítségével felerősített genomszakaszok nukleotid-sorrendjének meghatározása után kiderült, számos esetben mutattak ki sertés eredetű vírusokat emberekből, és korábban emberekből kimutatott vírusokat sertésekből. Az eddigi irodalmi adatok alapján a zoonotikus HEV törzsek feltételezett rezervoárjai a házisertés és a vaddisznó, a vad kérődzők, valamint különféle rágcsálók. A különböző állatfajok közötti keresztfertőzés több ízben bizonyítást nyert: sikeres volt patkány (Maneerat *et al.*, 1996), sertés (3. genocsoport: Meng *et al.*, 1998; 4. genocsoport: Feagins *et al.*, 2008) és makákó (van Cuyck-Gandré *et al.*, 1998) esetén az emberi eredetű vírusokkal történő kísérleti fertőzés. Emellett az azonos élőhelyen élő szarvasból, vaddisznóból és fertőzött emberből származó HEV-izolátumok 99,7% nukleotid hasonlóságot mutattak (Takahashi *et al.*, 2004).

Az utóbbi néhány évben kezdték el a rágcsálók szerepének vizsgálatát a HEV terjesztésében. Egy Nepálban végzett szerológiai és RT-PCR vizsgálat során a rágcsálók 12%-a bizonyult HEV szeropozitívnak, továbbá a 4 viraemiás állat véréből kimutatott vírus RNS szekvenciája 95, illetve 97 százalékos nukleotid hasonlóságot mutatott két nepáli humán izolátummal (He *et al.*, 2002). Ez volt az első bizonyíték annak, hogy a rágcsálók is lehetnek humán-pathogén HEV-törzsek rezervoárjai. Egy korábbi, az Egyesült Államokban végzett vizsgálat során a városi környezetben befogott rágcsálók sokkal magasabb arányú szeropozitivitást mutattak, mint a vidéken befogott társaik (Favorov *et al.*, 2000). Ugyanez a vizsgálat mutatta ki azt is, hogy a *Rattus* nemzetségbe tartozó patkányok között volt a legnagyobb a szeropozitív aránya, ami alapján a rágcsálók közül a patkányok tűnnek a

legfontosabb rezervoárnak. Ezt erősíti meg egy japán vizsgálati eredmény is: a kutatás során 362 vadon élő házi (*Rattus rattus*) és vándorpatkányból (*R. norvegicus*) származó szérummintát vizsgáltak meg ELISA-módszerrel, és ezek közül 114 pozitívnak bizonyult (31,5%) anti-HEV IgG-re. Vizsgáltak továbbá 51 szérummintát három, Japánban honos egérfajból is, de egyik sem adott pozitív eredményt (Hirano *et al.*, 2003a). Az Egyesült Államokban 1999-ben végzett vizsgálatok a vadon élő patkányok nagymértékű szeropozitivitását mutatták ki: Louisiana államban 44%, Maryland államban 77%, míg Hawaii szigetén 90%-os szeropozitivitást mértek a rágcsálókban. A patkányokban észlelt magas szeropozitivitás kontrasztjaként az adott időszakban a vizsgált emberek mindössze 1%-ának vérmintájában mutattak ki anti-HEV ellenanyagokat (Kabrane-Lazizi *et al.*, 1999). Egy 2009-ben publikált németországi vizsgálat során genetikai vizsgálatokat is végeztek a patkányokból kimutatott HEV izolátumokon. Eredményeik szerint a patkány eredetű HEV genetikailag elkülönül az egyéb emlősökben és emberben kimutatott vírusoktól, ezért további vizsgálatok szükségesek annak bizonyítására, hogy a patkányok rezervoárként részt vesznek-e az emlősök és az ember HEV-fertőzéseinek fenntartásában (Johne *et al.*, 2010).

Az állatról emberre történő terjedésben leginkább az élelmiszer-termelő fajoké a kulcsszerep. Japánban, mivel igen gyakori a nyers, vagy elégtelenül hőkezelt hús fogyasztása, intenzíven vizsgálják az élelmiszer-közvetítette HEV-fertőzéseket, több közleményben ismertettek állati eredetű élelmiszertől történő fertőződést (Maneerat *et al.*, 1996; Tei *et al.*, 2003; Yazaki *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2004; Mizuo *et al.*, 2005). Németországi vizsgálatok is alátámasztják a sertéshús és -belsőség fogyasztásának szerepét az emberi HEV-fertőzések kialakulásában (Wichmann *et al.*, 2008). Az eddig egyetlen publikált, klinikai tünetekben is megnyilvánuló hazai eset is egy élelmiszer eredetű fertőzés eredménye volt (Reuter *et al.*, 2006).

A HEV nem csak a fertőzött állatokból származó élelmiszer hőkezelés nélkül történő fogyasztása, hanem a fertőzött anyaggal vagy állatokkal kapcsolatos munkavégzés esetén is veszélyt jelenthet. A szennyvízzel öntözött török növénytermesztők között 34,8%-os HEV szeroprevalencia volt tapasztalható, míg a hasonló korú és társadalmi státuszú egyéb lakosok között ez 4,4% volt (Ceylan *et al.*, 2003). Az USA különböző államaiban végzett vizsgálat során a sertéssel foglalkozó

állatorvosok 1,5-szer gyakrabban voltak HEV-szeropozitívak, mint a kontroll véradók. Azonban a sertéshez hasonlóan embernél sem jelentenek fokozott veszélyt a bőrsérüléseken keresztüli vagy a sertés vérével történő fertőződés, mivel azok között az állatorvosok között, akik a sertésekkel való munka közben injekciós tűvel, vagy szikével megsértették a kezüket nem volt több szeropozitív, mint az ilyen kórelőzménnyel nem rendelkező társaik között (Meng *et al.*, 2002). Kisebb mértékben ugyan, de a svéd sertéstartók között is valamivel magasabb volt a szeropozitivitás (13%), mint a kontrollcsoport esetén (9,3%) (Olsen *et al.*, 2006). Ezzel szemben Spanyolországban a sertéssel érintkezésben nem kerülő kontrollcsoport anti-HEV IgG pozitivitásához képest 5,4-szer nagyobb volt az anti-HEV IgG-pozitivitás a sertéssel kapcsolatos munkát végzők körében (Galiana *et al.*, 2008). A korábban említett taiwani kísérletben (Wu *et al.*, 2002) az állatok gondozóit is vizsgálták: a 37 tünetmentes páciens szérummintája közül egyben vírus RNS-t, további ötben pedig anti-HEV ellenanyagot mutattak ki. Leírták már hentesek fertőződését is (Jary, 2005), továbbá kimutatták a vírust vágóhidak szennyvizében (Pina *et al.*, 2000). Egy másik, az Egyesült Államokban, Iowában végzett vizsgálat szerint (Karetnyi *et al.*, 1999) az erdei munkát végzők körében szignifikánsan magasabb volt a HEV-szeropozitivitás, mint a más foglalkozást űzők (egészséges véradók) között, ami arra utal, hogy az erdei állatok jelentékeny szerepet játszhatnak a HEV terjesztésében.



## 5. A KUTATÁS CÉLJAI

### 1. A hepatitis E vírus kimutatása Magyarországon, állati eredetű mintákban.

RT-PCR-en alapuló felmérő vizsgálattal kívántuk meghatározni a hepatitis E vírust ürítő állatfajok körét, különös tekintettel az élelmiszer-higiéniai jelentőséggel bíró állatfajokra.

### 2. A HEV-fertőzés lefolyásának vizsgálata sertéstelepeken

Célzott mintagyűjtéssel a HEV-fertőzöttség korcsoportonkénti megoszlásáról, a fertőzés sertéstelepeken belüli terjedésének időbeli lefolyásáról, a sertések vágóhídra kerülése idején a fertőzöttség mértékéről, és a vírus állatok közötti terjedésének módjáról gyűjtöttünk adatokat. Azonos állatokból származó, párhuzamosan vizsgált máj- és bélsárminták vizsgálata alapján kívántuk meghatározni, hogy a sertések fertőzöttségének felderítésére melyik minta vizsgálata ad megbízható eredményt.

### 3. A szerológiai áthangolódás mértékének vizsgálata sertéssel kapcsolatos foglalkozást űzők körében

Ausztriában gyűjtött humán savóminták HEV-szerológiai vizsgálatával célunk az újonnan kifejlesztett szerológiai módszerek (immunoblot és ELISA) és kitek tesztelése, illetve archív savóminták alapján a HEV korábbi ausztriai elterjedtségének vizsgálata volt különböző, sertésekkel kapcsolatos foglalkozást űző emberek körében.

### 4. A Magyarországon, állati eredetű mintákban kimutatott vírusok szekvenciáinak genetikai elemzése

A vizsgálattal a magyarországi vírusok rokonsági viszonyait, más országokban kimutatott vírusokkal való hasonlóságának mértékét kívántuk meghatározni, illetve a vírus zoonotikus jellegének genetikai bizonyításához gyűjtöttünk információt.

### 5. Egy magyarországi vírus teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése

A teljes genomszekvencia és egyes régióinak elemzésével a vírus evolúcióját vizsgáló kutatásokhoz, és a genotipizálásra alkalmas genomrégiók meghatározásához szolgáltatunk adatokat.

## 6. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 6.1. Állati eredetű minták vizsgálata

#### 6.1.1. Mintagyűjtés

Vizsgálataink célja a hepatitis E vírus elterjedtségének megállapítása volt Magyarországon a feltételezett rezervoár fajokban, különösen olyan állatfajok vonatkozásában, melyek HEV-fogékonyságáról a szakirodalom beszámolt. A vizsgálatok során olyan minták gyűjtésére törekedtünk, melyekből a fertőzés szervezetbeni lefolyása alapján nagy valószínűséggel kimutatható a HEV nukleinsava. A házisertés (*Sus scrofa domestica*) máj- és bélsárminták a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar (SzIE-ÁOTK) Nagyállatklinika Kórbonctani Osztályára, illetve a Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékre diagnosztikai célból beküldött, elhullott állatokból, valamint a kutatást önkéntes mintaküldéssel támogató Zala megyei sertéstelepekről származtak. A szarvasmarha (*Bos primigenius taurus*), juh (*Ovis gmelini aries*) és kecske (*Capra aegagrus hircus*) bélsárminták legnagyobb részét a SzIE-ÁOTK Parazitológiai és Állattani Tanszékének vizsgálati anyagát képező borjú bélsárminták, valamint különböző telepekről származó, saját gyűjtésű bélsárminták, valamint különböző telepekről származó, saját gyűjtésű bélsárminták voltak. A vaddisznó (*Sus scrofa*), szarvas (*Cervus elaphus*) és őz (*Capreolus capreolus*) eredetű májmintákat a MAVAD-Vecsés Kft. vadhús-feldolgozó üzemében gyűjtöttük. Takarmányminták, illetve patkány (*Rattus norvegicus*) és egér (*Mus musculus*) minták a vizsgálatban résztvevő Zala megyei sertéstelepekről, a hörcsög (*Cricetus cricetus*) minták dr. Gyuranecz Miklós gyűjtéséből származtak, a cickány (*Sorex araneus*) mintákat pedig dr. Csörgő Tibor (Eötvös Lóránd Tudományegyetem Természet-tudományi Kar) és dr. Jakab Ferenc (Pécsi Tudományegyetem) bocsátotta a rendelkezésünkre.

A mintagyűjtés során minden esetben törekedtünk a kontamináció elkerülésére. A bélsármintákat egyedileg, humán székletminta-gyűjtő szelencékbe vettük az azok tartozékaként mintavételezésre szolgáló spatulával, sertésenként váltott gumikesztyűvel. Az elpusztult állatok szervmintái esetében a boncolás során állatonként és szervenként külön, steril olló és csipesz használatával vágunk a vizsgálathoz kellő mennyiségű szervmintát, melyeket mintánként külön mikrocentrifuga csőben tároltunk, és mintánként steril dörzscsészében



homogenizáltunk. A bélsár-homogenizátumokat és szervdörzsölékeket egyedileg, megjelölt mikrocentrifuga csövekben, -80 °C-on tároltuk. A takarmánymintákat a takarmányok vizsgálatra való küldésének szabályai szerint, mintánként külön papírzacskóba vettük. Homogenizálás után a takarmánymintákat a szervmintákhoz hasonló módon tároltuk.

## II. táblázat A vizsgált minták.

<b>Állatfaj</b>	<b>Egyedszám</b>	<b>Máj</b>	<b>Bélsár</b>
<b>Vaddisznó</b>	75	75	1
<b>Őz</b>	41	34	7
<b>Szarvas</b>	30	30	0
<b>Sertés</b>	251	45	248
<b>Szarvasmarha</b>	125	1	125
<b>Juh</b>	1	0	1
<b>Kecske</b>	5	0	5
<b>Egér</b>	5	5	5
<b>Patkány</b>	2	0	2
<b>Hörcsög</b>	34	34	34
<b>Cickány</b>	25	25	25
<b>Összesen</b>	564	249	423
<b>Takarmány</b>	15		

Összesen 717 mintát vizsgáltunk meg, ebből 702 állati eredetű bélsár- és májminta, illetve 15 takarmányminta volt. Az állati eredetű minták számának és típusának megoszlását a II. táblázat foglalja össze. A kutatások során az ország minden megyéjéből gyűjtöttünk mintákat. A házisertés és szarvasmarha minták esetében törekedtünk arra is, hogy különböző korcsoportokat is megvizsgáljunk annak érdekében, hogy az állományban a fertőzés lefolyásáról adatokat nyerjünk. A rágcsáló minták vizsgálatát járványtani szempontok indokolták: a patkányok és egerek a sertéstelepeken a fertőzés fenntartásának egyik lehetséges tényezői, míg a cickányok az erdei állatok fertőzöttségének fenntartásában játszhatnak szerepet. A hörcsög minták vizsgálatát az indokolja, hogy Magyarországon egyes társadalmi csoportok rendszeresen fogyasztanak hörcsöghúst, s mivel a hörcsögök érintkezhetnek az erdei állatok által ürített hepatitis E vírussal, a HEV

járványtanában mint esetleges emberi fertőzés-forrás szerepelhetnek. A takarmánymintákat a sertéstelepeken mint a fertőzöttség fenntartásának egyik lehetséges tényezőjét vizsgáltuk.

### **6.1.2. A PCR vizsgálatok előkészítése**

A májmintákból kb. 1 g nagyságú darabot steril kvarchomok hozzáadásával dörzscsészében homogenizáltunk, és 3 ml fiziológiás foszfátpufferrel (phosphate buffered saline, PBS) hígítottuk. A bélsárminta borsónyi mennyiségét 1,5 ml PBS-ben homogenizáltuk. A homogenizátumot ezután a sejtek roncsolása és a vírusrészecskék kiszabadulása érdekében  $-20^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztottuk, majd felolvasztás után  $1500\times g$  gyorsuláson 10 percen át centrifugáltuk. A centrifugálás során képződött felülúszóból tisztítottuk a polimeráz láncreakcióhoz szükséges virális nukleinsavat.

Az előzetes vizsgálatokban pozitívnak talált sertéstelepek közül 3 Zala megyei telepen takarmánymintát vettünk a takarmány-tároló helységekből, illetve az etetőkből. Összesen 15 mintát vizsgáltunk meg. A tápmintákból 50 g-ot 125 ml PBS-ben 30 percig mágneskeverővel keverve homogenizáltunk, majd 30 perc ülepítés után a felülúszóból 1,5 ml-t mikrocentrifuga-csőbe mértük át, és a takarmányrészecskék, illetve szennyeződések eltávolítása érdekében  $1500\times g$  gyorsuláson 10 percen át centrifugáltuk.

A rágcsálómintákat a Zala megyei sertéstelepeken gyűjtöttük a rágcsálóirtások alkalmával. A patkányok és egerek máját és bélsarát vizsgáltuk. A minták feldolgozásakor a sertés máj- és bélsárminták feldolgozásához hasonlóan jártunk el.

A felülúszóból QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Düsseldorf, Németország) használatával, a gyártó utasításainak megfelelően tisztítottuk az RNS-t. Az eljárás eredményeként kapott 60  $\mu\text{l}$  tisztított RNS-szuszpenziót, a hígított bélsarakat, illetve minta-homogenizátumokat a későbbiekben  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### **6.1.3. RT-PCR**

Vizsgálataink során a megszakítás nélkül végrehajtott reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció módszerét alkalmaztuk, melynek előnye – a viszonylag

gyors kivitelezhetőség mellett – hogy mivel a reverz transzkripció és az azt követő DNS-amplifikáció ugyanazon reakcióelegyben, a cső felnyitása nélkül zajlik, csökken a kontamináció esélye. A reakcióban többféle primerpárt használtunk. A vírus kimutatására, azaz a pozitív minták kiszűrésére egy, a HEV-vizsgáló laboratóriumokban diagnosztikai célra elfogadott, és genotipizálásra is alkalmas amplifikációs terméket előállító, degenerált primerpárt használtunk, mely az ORF2 (kapszidprotein-régió) 197 nukleotid hosszú darabját amplifikálja (Schlauder *et al.*, 1999, van der Poel *et al.*, 2001). Az eredmény ellenőrzését az ORF1 régióra tervezett degenerált primerpárral végeztük; ez a termék hossza révén (417 bp) az ORF1 régió végzett filogenetikai vizsgálatra is alkalmas.

A diagnosztikai primerek alkalmazásával végzett amplifikációt 25 µl-es reakcióelegyben végeztük QIAGEN OneStep RT-PCR Kit alkalmazásával, a gyártó utasításainak figyelembevételével, melyhez a fentiek szerint tisztított RNS szuszpenzióból 2,5 mikrolitert kevertünk. Negatív kontrollként RNS-mentes reakcióelegy szolgált, míg a pozitív kontrollként először egy Hollandiából származó, a korábbi kísérletekben pozitívnak minősített mintából származó RNS-t, majd a saját, szekvencia meghatározással igazoltan pozitív mintáinkat használtuk. A reakcióelegy összetételét a III. táblázat tartalmazza.

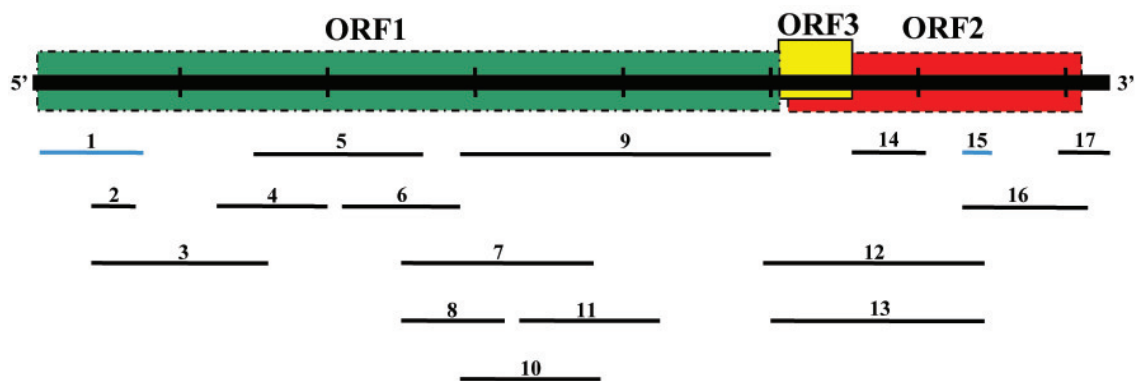
**III. táblázat** Az RT-PCR reakcióelegy összetétele.

<b>Reagensek</b>	<b>µl</b>
RNáz- és DNáz-mentes víz	14,3
5× puffer	5
Dezoxi-nukleotid-trifoszfát (dNTP)-mix (10 mM)	1
Enzim-mix	1
RNáz-inhibitor (40 U/µl)	0,2
Primer F (50 µM)	0,5
Primer R (50 µM)	0,5
RNS	2,5
<b>Összesen</b>	<b>25</b>

A reakciót az Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) PCR készülék használatával végeztük. A

hőprogram első lépése a 30 percen át tartó 50 °C-os inkubáció volt, melynek során a reakcióelegyben végbemenő reverz-transzkripció eredményeként komplementer DNS szál (cDNS) szintetizálódott. Ezt egy 95 °C-os 15 perces inkubációs lépés követte (a reverz transzkriptáz denaturációja és a HotStarTaq aktivációja). Ezt követően 40-szer ismételtük az alábbi lépéseket: 94 °C/1 perc (denaturáció), 55 °C/1,5 perc (a primerek kapcsolódásának szakasza, „annealing”), 74 °C/1perc (extension, láncszintézis). A folyamatot egy 72 °C/7 perc szakasz zárta le, mely a láncszintézis lezárását eredményezte. A program befejeztével további felhasználásig a PCR készülék 4 °C-on tárolta a terméket.

A teljes genom meghatározásához – a diagnosztikai primereket is beleértve – 17 primerpárt használtunk (8. ábra), melyek egymással átfedő termékeket amplifikáltak. A reakcióelegy 100 mikroliterje a diagnosztikai reakciókban használttal megegyező arányban tartalmazta az összetevőket. A PCR program a diagnosztikai programtól csak az annealing hőmérsékletben, illetve az extenzió időtartamában különbözött. A teljes genom szekvenálásához használt primerpárok adatait (az annealing hőmérsékletet és az extenzió hosszát is beleértve) a XII. táblázat (Melléklet) foglalja össze.



**8. ábra** Az RT-PCR reakciókban használt primerek által amplifikált termékek elhelyezkedése a genomhoz viszonyítva. A termékek számozása megegyezik a XII. táblázatban (Melléklet) felsorolt, megfelelő primerpárok sorszámaival. A „diagnosztikai” ORF1s1-ORF1a1 (1.), illetve ORF2s1-ORF2a1 (15.) primerpárok által képzett termékeket kék színnel jelöltük.

#### **6.1.4. A PCR termékek azonosítása**

Az amplifikációt követően 5 µl terméket 6 × töménységű felvivőpufferrel (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Litvánia) összekeverve 0,5 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó 2%-os, trisz-borát-EDTA-val (TBE) pufferolt agaróz gélben 6 V/cm feszültséggel kb. 1 óráig elektroforetizáltunk.

A gélt ezt követően UV átvilágítással vizsgáltuk 312 nm hullámhosszon, majd a gélképet Kodak DS Elektrophoresis Documentation and Analysis System és a hozzá kapcsolódó Kodak Digital Science 1D géldokumentációs program segítségével rögzítettük és tároltuk. A termékek méretét GeneRuler 100bpDNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Litvánia) molekulatömeg-marker segítségével határoztuk meg.

#### **6.1.5. Nukleotid szekvencia meghatározása, rokonsági vizsgálatok**

Járványtani szempontok alapján kiválasztott minták esetében az ORF2s1-ORF2a1, illetve ORF1a1-ORF1s1 primerpárral előállított termékek szekvenciáját meghatároztuk, és ezeket a mintában kimutatott vírus azonosítására, illetve filogenetikai vizsgálatokban használtuk. A teljes genom meghatározása érdekében előállított 17 átfedő termék mindegyikének nukleotidsorrendjét meghatároztuk. A szekvenálás előkészítéséhez a specifikus PCR terméket alacsony olvadási hőmérsékletű (low melting) agaróz gélben való elektroforézis után Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit segítségével kitisztítottuk, és a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont (Gödöllő) laboratóriumában, illetve a Bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem Klinikai Virologia Tanszékén ABIPrism 310 automata szekvenátorral szekvenáltattuk, majd BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) segítségével azonosítottuk.

A szekvenciaelemzést és filogenetikai vizsgálatot a GenBank-ban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) elérhető teljes és részleges HEV szekvenciák felhasználásával, AlignPlus4 (Align Plus 4 for Windows 95, Scientific and Educational Software, 4.00 verzió), ClustalX (ClustalX Multiple Sequence Alignment, 1.81 verzió), TreeView (Win32 1.6.6. verzió) és a Phylogeny Inference Program Package (PHYLP, 3.57c verzió) program segítségével végeztük. A törzsfá

megbízhatóságát leíró bootstrap értékeket a SEQBOOT program használatával, 1000-szer megismételt „újramintázási” elemzéssel határoztuk meg. A törzsfa létrehozásakor a szekvenciapárok közötti távolságot a használt számítógépes program a Kimura 2 paraméteres modell, 2-es arányú transition/transversion alapján határozta meg. A teljes genom szekvenciák egyes szakaszai variabilitásának grafikus megjelenítését a SimPlot 3.5.1. (RaySoft, Baltimore, USA) programmal végeztük.

## **6.2. Humán vérsavóminták vizsgálata**

### **6.2.1. Minták**

A szerológiai vizsgálatokhoz 1994-ben Graz (Ausztria) környékén gyűjtött humán vérsavómintákat használtunk (Deutz *et al.*, 2003). A minták különböző, sertéssel vagy vaddisznóval kapcsolatos foglalkozást végző emberekből (sertés vágóhídi dolgozók, sertéstelepi dolgozók, állatorvosok, vadászok), illetve sertéssel vagy sertés bélsárral ritkábban kapcsolatba kerülő kontrollcsoportból (baromfi vágóhídi dolgozók, városi lakosok) származtak. A mintákat eredetileg más, korábbi vizsgálatok céljaira gyűjtötték, és a mintavételtől kezdődően -20 °C-on tárolták. Információ a vizsgálatokban résztvevő emberek koráról, neméről, kórtörténetéről vagy külföldi utazásairól nem állt rendelkezésre. A laboratóriumi vizsgálat során a foglalkozási adatokat nem vettük figyelembe, ezt az információt csak az eredmények értékelésekor használtuk fel.

### **6.2.2. Immunoblot vizsgálat**

A vizsgálatot 2007-ben a *recomBlot* HEV IgG/IgM<sup>®</sup> (Mikrogen, Neuried, Germany) diagnosztikai kittel végeztük. Minden savómintában megvizsgáltuk mind az IgG, mind az IgM típusú anti-HEV ellenanyagok jelenlétét. A HEV antigénnel ellátott tesztsíkokat a hígított vérsavómintákkal 2 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte utáni mosási lépést követően peroxidáz enzimmel konjugált, IgG- és IgM-specifikus anti-humán ellenanyagokat adtunk a megfelelő tesztsíkokhoz. További 1 óra inkubáció után a szubsztrát oldat (tetrametil-benzidin (TMB) redox festék) hozzáadását követően a tesztsíkokon oldhatatlan színváltozás jelölte az ellenanyagok jelenlétét. A reakció leállítása a

tesztcsíkok 3-szori mosásával (ioncserélt vízzel) történt. Az egyes mintákkal inkubált tesztcsíkokon tapasztalt színváltozás mértékét a pozitív kontrollhoz viszonyítva bíráltuk el.

Az eredmények értékelését a kit használati utasításában leírtaknak megfelelően, pontozásos módon végeztük. Az IgG-specifikus tesztcsíkok esetében a színváltozás 0-2 pontnak megfelelő mértéke negatív, a 3 pontos intenzitás kétes, míg a 4-12 pont pozitív eredményt jelentett. Az IgM-specifikus tesztcsíkok esetében a hasonló módon végzett pontozásos elbírálás esetében a 0-4 pont a negatív, az 5 pont a kétes, míg a 6-12 pont a pozitív eredménynek felelt meg.

### **6.2.3. ELISA vizsgálat**

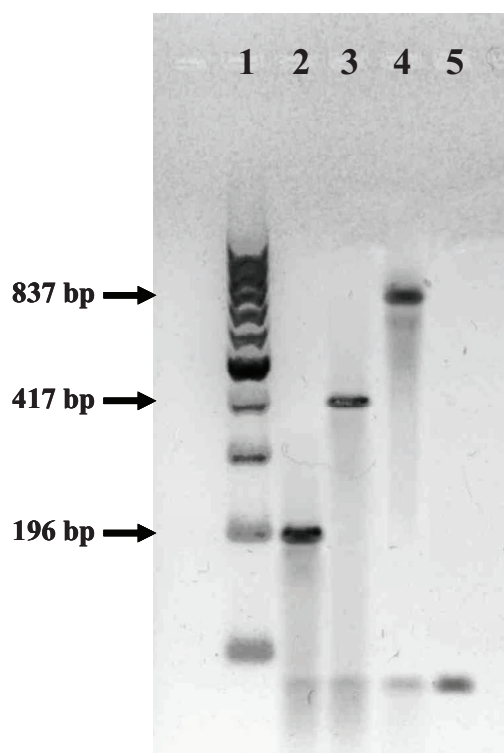
Az immunoblot vizsgálatban pozitívnak vagy gyenge pozitívnak talált vérsavókat, illetve néhány negatívnak talált vérsavót ELISA módszerrel is teszteltünk. A vizsgálatot a *recomWell HEV IgG* és *recomWell HEV IgM ELISA* kitékkel (Mikrogen, Neuried, Germany) végeztük. Az indirekt szendvics ELISA teszt során a hígított savómintákat a HEV antigéneket tartalmazó lemez mélyedéseibe mértük, majd 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte utáni mosási lépést követően peroxidáz enzimmel konjugált, IgG- és IgM-specifikus anti-humán ellenanyagokat adtunk a lemezekhez. További 30 perc (37 °C) inkubációt követő mosási lépés után H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - TMB szubsztráttal inkubáltuk a lemezeket szobahőmérsékleten 30 percig. A reakciót H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> hozzáadásával állítottuk le, majd a kialakult színreakció erősségét Labsystems Multiscan EX-355 típusú ELISA-leolvasó segítségével 450 nm hullámhosszon mértük meg. Az optikai denzitás (OD) értékeket a Genesis Lite 3.03 szoftverrel (Life Sciences Ltd., Basingstoke, Egyesült Királyság) jelenítettük meg. A teszt elbírálása a kit használati utasításának megfelelően történt.

Az immunoblot tesztben IgM-pozitívnak talált vérsavókból a korábban ismertetett módon nukleinsavat vontunk ki, és az ORF2s1-ORF2a1 primerpár alkalmazásával RT-PCR segítségével a már leírt módon mutattunk ki HEV nukleinsavat. A PCR termékek detektálását, azonosítását, a szekvenálásra kiválasztott PCR termékek szekvenciáinak meghatározását is a fentebb leírtaknak megfelelően végeztük.

## 7. EREDMÉNYEK

### 7.1. HEV RNS jelenlétének kimutatása RT-PCR segítségével

A különböző primerpárok által előállított PCR termékek a gélben jól láthatóak, és a szakirodalomban leírtnak, illetve a primertervezéskor meghatározottnak megfelelő méretűek voltak (9. ábra). Az ORF2s1-ORF2a1 primerpárokkal pozitívnak talált minták minden esetben pozitívnak bizonyultak az eredmény ellenőrzése érdekében alkalmazott ORF1s1-ORF1a1 primerpárokkal is. A negatív kontroll minden esetben negatív volt.



**9. ábra** Agarózgél-elektroforézis során kapott kép. 1.: GeneRuler 100bpDNA Ladder molekulatömeg marker; 2.: Az ORF2s1-ORF2a1 primerpárral létrehozott ampikon; 3.: Az ORF1s1-ORF1a1 primerpárral létrehozott ampikon; 4.: Az ORF2s1-HEV7135r primerpárral létrehozott ampikon; 5.: negatív kontroll. A nyilak az RT-PCR során képződött termékek méretét jelzik.



**7.1.1. A HEV kimutatása magyarországi sertéstelepeken; a HEV-fertőzöttség mértéke egyes korcsoportokban**

A házisertés mintákat 41 magyarországi sertéstelepről gyűjtöttük, melyek között 16 (39%) olyan telepet találtunk, ahol molekuláris biológiai módszerrel igazoltuk a HEV jelenlétét. A 251 vizsgált házisertés közül 62 sertésből (25%) mutattuk ki a HEV nukleinsavat: 45 májmintából 14 (31%), 248 bélsárból 52 (21%) pozitív mintát találtunk. A vizsgált sertések közül 204 állat életkoráról állt rendelkezésünkre adat. Ezen állatokat a fertőzés korcsoportonkénti megoszlásának vizsgálatához a Magyarországon alkalmazott sertéstartási-technológiai gyakorlatnak megfelelően 4 korcsoportba osztottuk.

Az eredményeket többféle módon is értékelhetjük. Amennyiben az összes beazonosítható korú állatot figyelembe vesszük, a választás előtti (1-28 nap, 1-9 kg – os) malacok 9%-a, a malac I. (5-10 hét, 10-19 kg) korcsoportba sorolt malacok 27%-a, a malac II. - hízó I. (11-16 hét, 20-50 kg) korcsoportba tartozó sertések 37%-a, és a hízó II. (véghízó, 17 hét után, 50 kg felett) korcsoport 9%- bizonyult HEV-fertőzöttnek (IV. táblázat, 10. ábra).

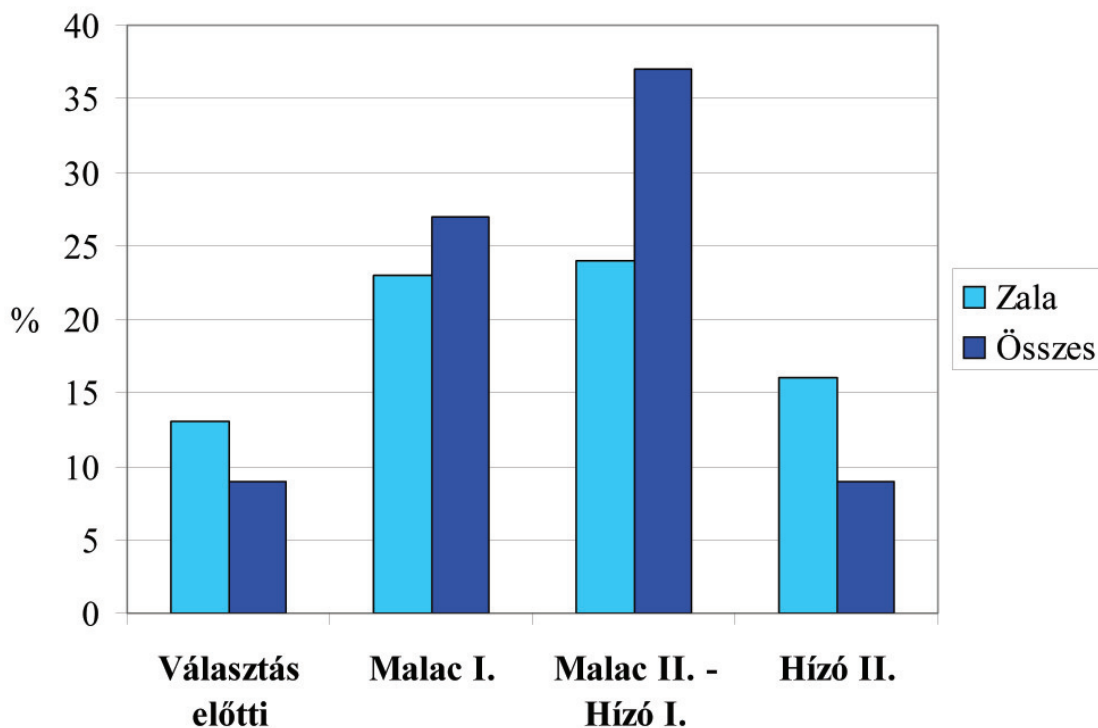
**IV. táblázat** A HEV-fertőzöttség megoszlása az egyes korcsoportokban – országos adatok.

	Választás előtti (1-9 kg)	Malac I. (10-19 kg)	Malac II. – Hízó I. (20-50 kg)	Hízó II. (>50 kg)	Összesen
<b>Pozitív</b>	2 (9%)	21 (27%)	10 (37%)	5 (9%)	38
<b>Negatív</b>	20	58	17	50	145
<b>Összesen</b>	22	79	27	55	183

**V. táblázat** A HEV-fertőzöttség megoszlása az egyes korcsoportokban – Zala megyei adatok.

	Választás előtti (1-9 kg)	Malac I. (10-19 kg)	Malac II. – Hízó I. (20-50 kg)	Hízó II. (>50 kg)	Összesen
<b>Pozitív</b>	2 (13%)	15 (23%)	4 (24%)	5 (16%)	24
<b>Negatív</b>	13	50	13	32	108
<b>Összesen</b>	15	65	17	37	132

A véghízó korcsoport pozitív egyedei mind a Zala megyei telepekről származtak, míg a többi korcsoportból az ország más sertéstelepeiről is érkeztek pozitív minták. Amennyiben csak a célzott mintavételben részt vevő Zala megyei telepekről származó mintákat vizsgáljuk (kisebb mintaszám), az eredmény egy kicsit eltér az országos adatoktól. A Zala megyei sertéstelepeken a választás előtti (13%) és véghízó korcsoportokban (16%) magasabb, a malac I. (23%) és malac II.-hízó I. (24%) korcsoportokban pedig alacsonyabb volt a vírusürítés mértéke, mint az egész országra kivetített vizsgálat esetében. A korcsoportok HEV-pozitivitásának megoszlása azonban az országos eredményekkel korrelált (V. táblázat, 10. ábra).



**10. ábra** A HEV-fertőzöttség megoszlása az egyes korcsoportokban.

### **7.1.2. A párhuzamosan vizsgált máj- és bélsárminták RT-PCR eredményei**

A 42 sertés közül, melyek esetében párhuzamosan vizsgáltunk máj- és bélsármintát is, 13 állat esetében mutattunk ki HEV RNS-t a májban. Közülük 10 állat bélsara is tartalmazott vírus nukleinsavat, 3 állat bélsara pedig negatív volt. A vizsgált állatok közül 29 esetben a májminta nem tartalmazott HEV nukleinsavat.

Közülük 25 állat bélsarában sem találtunk vírus RNS-t, míg 4 állat bélsára HEV pozitívnak bizonyult (Melléklet, XI. táblázat). Vizsgálataink során 42 bélsármintából 14-ben (33%), 42 májmintából pedig 13-ban (31%) mutattunk ki HEV RNS-t (VI. táblázat). Mind a máj-, mind a bélsárminta 25 állat esetében bizonyult negatívnak. A két minta közül legalább egyben 17 állat esetében mutattuk ki a HEV jelenlétét.

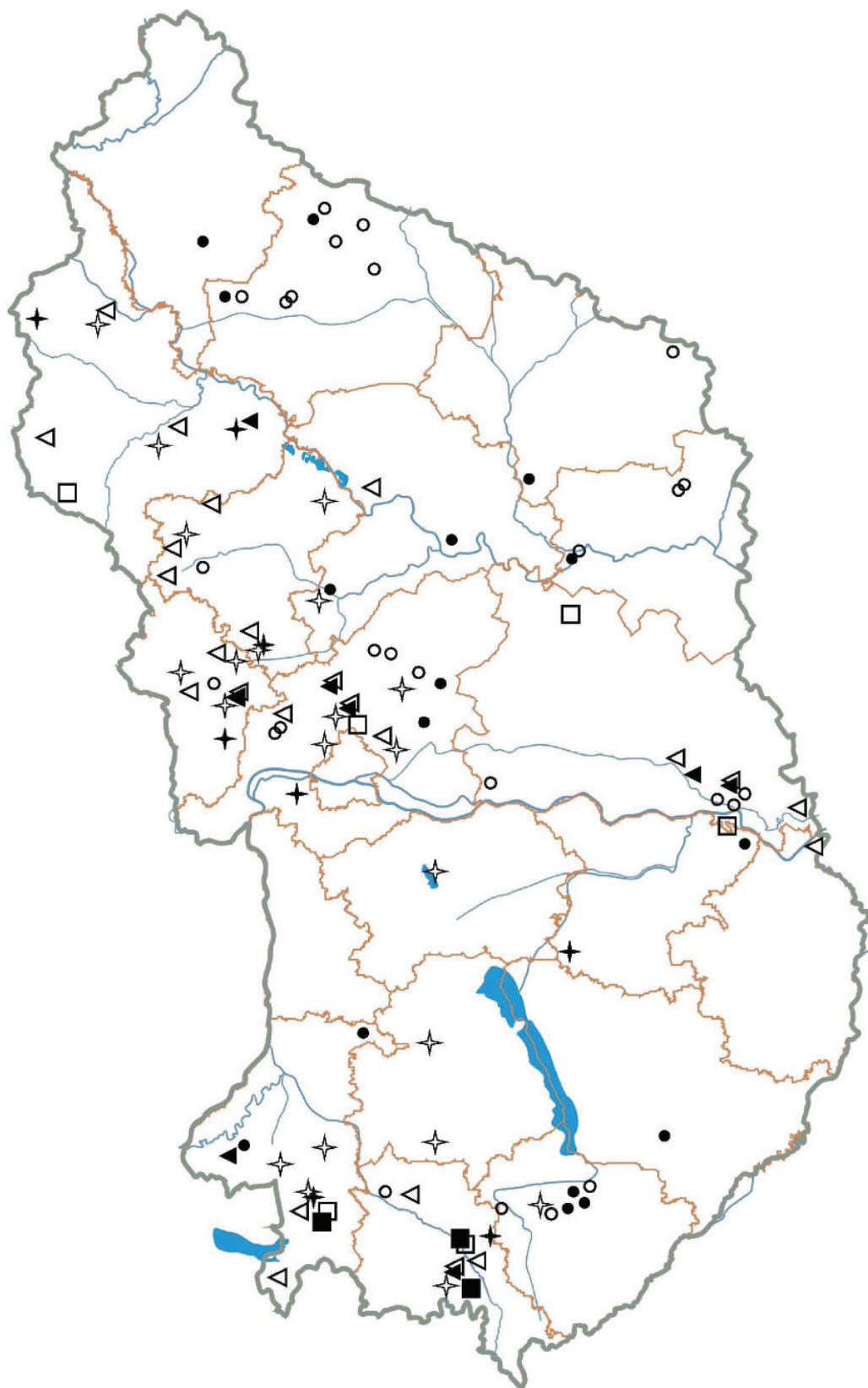
**VI. táblázat** A sertés máj- és bélsárminták pozitivitása.

	<b>Pozitív máj</b>	<b>Negatív máj</b>	<b>Összesen</b>
<b>Pozitív bélsár</b>	10 (24%)	4 (10%)	14 (33%)
<b>Negatív bélsár</b>	3 (7%)	25 (59%)	28
<b>Összesen</b>	13 (31%)	29	42

### **7.1.3. A HEV kimutatása egyéb állatfajokban**

A vaddisznó és a vadon élő kérődzők esetében javarészt májmintákat vizsgáltunk, melyek egy része (7 vaddisznó, 9 őz, 3 szarvas) HEV pozitívnak, míg a meglehetősen alacsony számú (7 őz és 1 vaddisznó) bélsárminták mindegyike negatívnak bizonyult. A pozitív minták származási helyét térképen (11. ábra) tüntettük fel, míg állatfajonkénti megoszlását az VII. táblázat foglalja össze. A pozitív minták részletes adatai (mintagyűjtés időpontja, származási hely, minta eredete) a XIII. táblázatban (Melléklet) található.

A házi kérődzőkből gyűjtött (125 szarvasmarha bélsár, 1 juh és 5 kecske bélsár) minták mindegyike HEV negatívnak bizonyult. A járványtani szempontokból vizsgált egyéb állatfajokból (egér, patkány, hörcsög, cickány) gyűjtött máj- és bélsármintákban, illetve a sertéstelepeken gyűjtött takarmánymintákban nem lehetett kimutatni a HEV jelenlétét.



**11. ábra** A vizsgált minták származási helyei. Jelmagyarázat: ○ - sertéstelep, △ - vaddisznó, ✦ - őz, □ - szarvas. A negatív mintákat üres, a pozitív mintákat kitöltött alakzatokkal jelöltük.

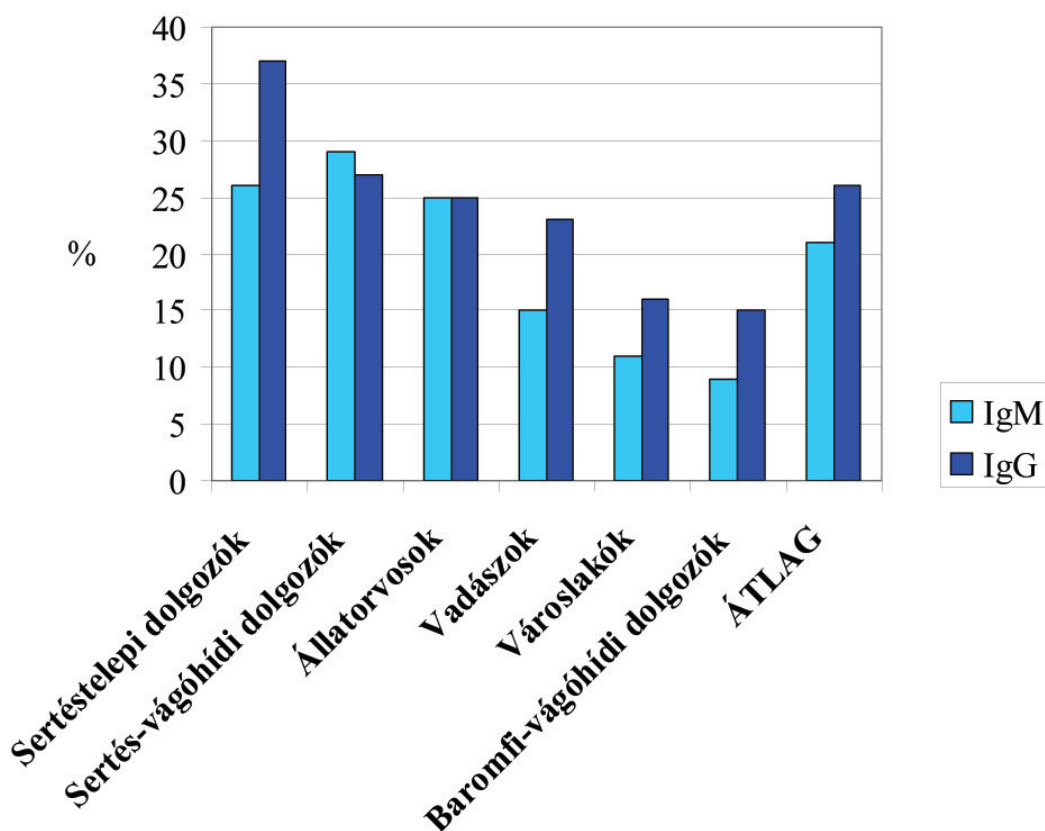
VII. táblázat A pozitív minták megoszlása a vizsgált minták függvényében.

Állatfaj	Egyedszám	Máj	Máj +	Bélsár	Bélsár +
Vaddisznó	75	75	7	1	0
Őz	41	34	9	7	0
Szarvas	30	30	3	0	0
Sertés	251	45	14	248	52
Szarvasmarha	125	1	0	125	0
Juh	1	0	0	1	0
Kecske	5	0	0	5	0
Egér	5	5	0	5	0
Patkány	2	0	0	2	0
Hörcsög	34	34	0	34	0
Cickány	25	25	0	25	0
<b>ÖSSZESEN</b>	<b>594</b>	<b>249</b>	<b>33</b>	<b>453</b>	<b>52</b>
<b>Takarmány</b>	15 minta		<b>Eredmény</b>		negatív

## 7.2. Szerológiai vizsgálatok

Immunoblot módszerrel összesen 639 archivált emberi vérsavómintában vizsgáltuk az IgM- és IgG-típusú anti-HEV ellenanyagok jelenlétét. A szubjektív elbírálás esélyének csökkentése érdekében a tesztcsíkok eredményeinek értékelését ugyanaz a személy végezte el, illetve a minták eredetét csak a tesztcsíkok elbírálása után azonosítottuk. A reakció megfelelő működését minden esetben jelezte a tesztcsíkon megjelenő kontroll csík. A mintákat az eredmények értékelésekor származásuk (foglalkozás) szerint 6 csoportba soroltuk: a sertéstelepi dolgozók és a sertés-vágóhídi dolgozók, mint a sertésekkel gyakori kapcsolatba kerülők, az állatorvosok és vadászok, mint sertésekkel (vaddisznóval) kevésbé gyakran kapcsolatba kerülők, és a baromfi-vágóhídi dolgozók illetve városlakók, mint a sertésekkel alkalmasszerűen kapcsolatba kerülő embercsoportok szerepeltek a vizsgálatban. Az eredményeket az XIV. táblázatban (Melléklet) foglaltuk össze. A táblázat adatai alapján készült 12. ábrán látható, hogy a szeropozitivitás az elvártan megfelelően alakult: az átlagnál magasabb a szerokonverzió aránya a sertéstelepi és sertésvágóhídi dolgozók esetében, míg az állatorvosok és a vadászok körében az

átlag körüli, a baromfi-vágóhídi dolgozók és a városlakók körében pedig átlag alatti a szeropozitivitás.

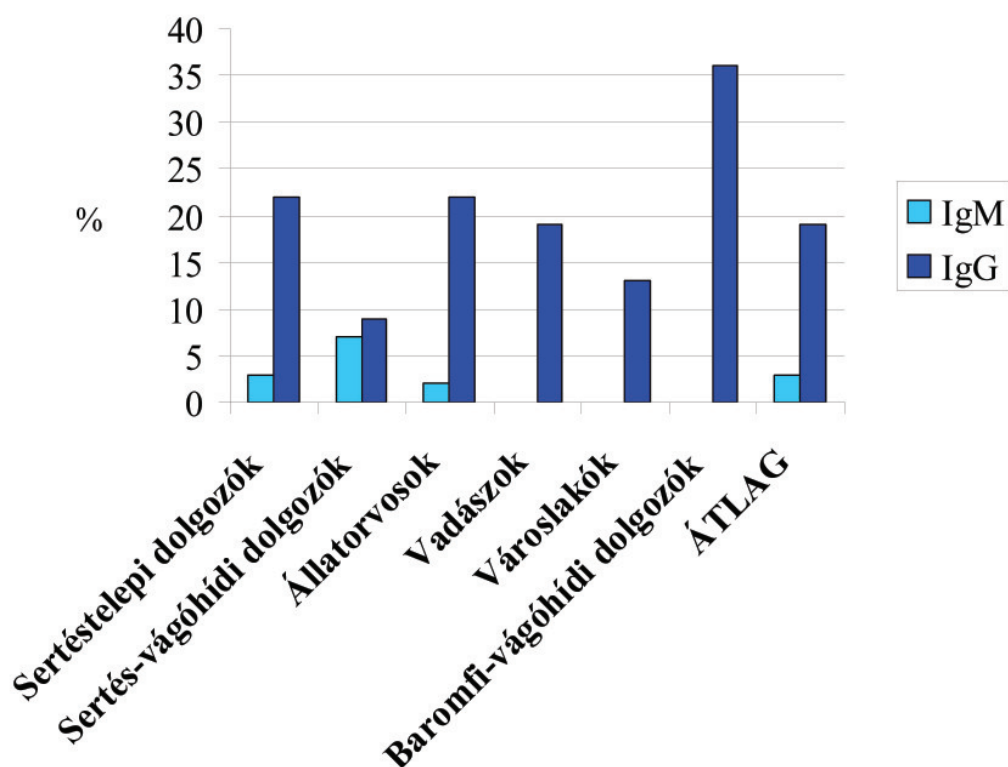


12. ábra Az immunoblot vizsgálat eredményei.

Az ELISA tesztekben 275 vérsavómintát vizsgáltunk: anyagi okokból elsősorban azokat a mintákat teszteltük, melyeket az előzetes immunoblot vizsgálatban pozitívnak vagy gyenge pozitívnak találtunk. A lemezeken fennmaradó üres mélyedésekbe kontrollként minden foglalkozási csoportból néhány, az immunoblot vizsgálatokban negatívnak bizonyult mintát mértük. Az eredményeket az XV. táblázat (Melléklet), a táblázat alapján készült 13. ábra, és a mindkét módszerrel megvizsgált minták részletes adatait felsoroló XVI. táblázat (Melléklet) foglalja össze. Az ELISA vizsgálatokban a szeropozitivitás mértéke eltérő az immunoblot vizsgálatban talált eredménytől. Ebben az esetben a szeropozitivitás gyakorisága az egyes foglalkozási csoportokban nem korrelál a sertésekkel való kapcsolatba kerülés feltételezett gyakoriságával.



Mivel az IgM jelenléte a savómintákban a betegség bevezető szakaszát jelzi, feltételeztük, hogy a savóban kimutatható a HEV nukleinsav. Néhány kiválasztott IgM pozitív savómintában kísérletet tettünk a vírus RNS kimutatására, azonban az RT-PCR során képződött termékek mennyisége ismételt próbálkozások ellenére sem volt elegendő a nukleotid szekvencia meghatározáshoz.



13. ábra Az ELISA vizsgálat eredményei.

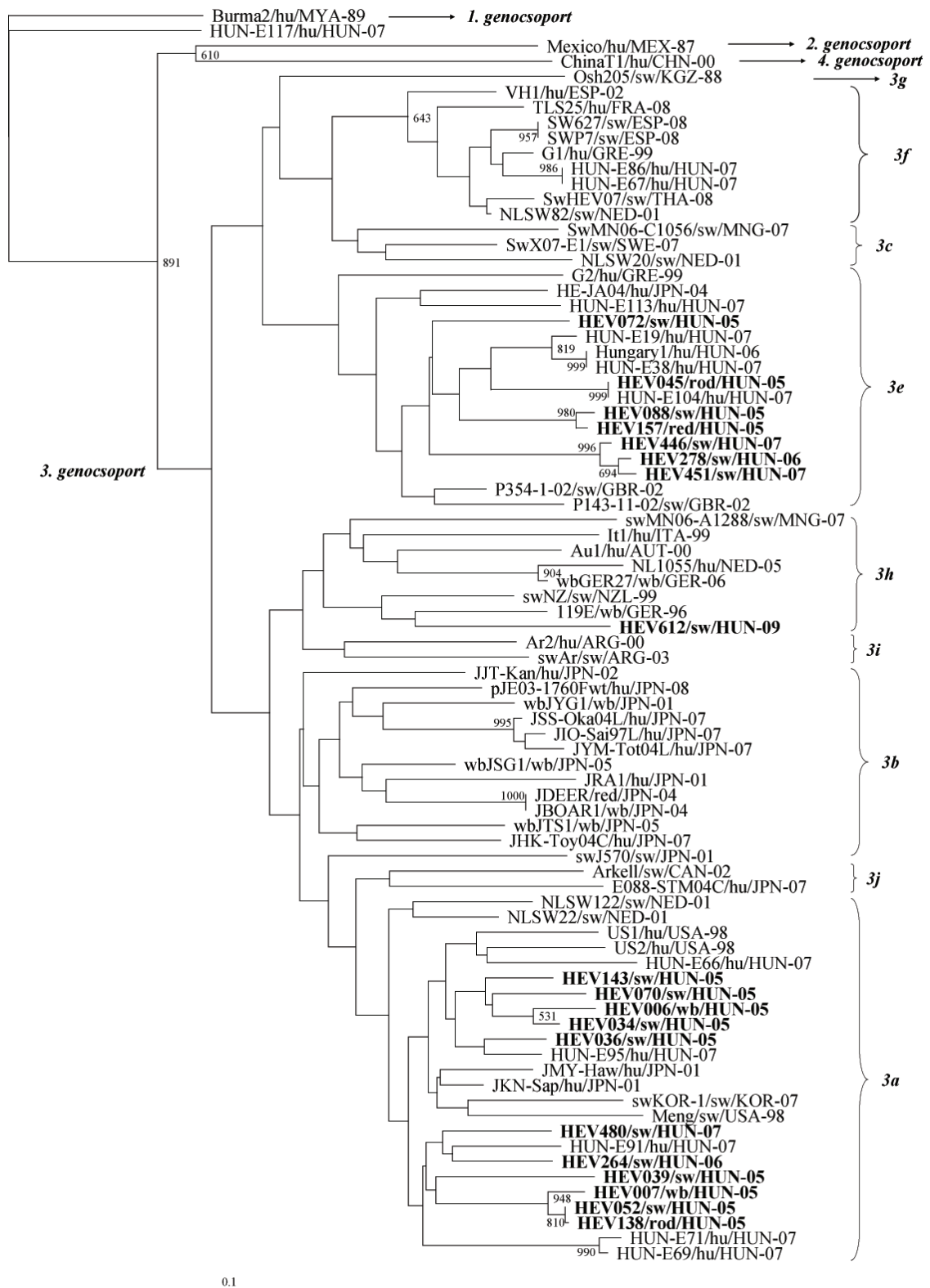
### 7.3. A kimutatott vírusok azonosítása, törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatok

A pozitív minták közül törzsfa-rekonstrukciós vizsgálat céljára kiválasztott 29 (24 sertés, 2 vaddisznó, 2 őz és 1 szarvas eredetű) minta ORF2s1-ORF2a1 primerrel előállított termékének, illetve öt minta ORF1s1-ORF1a1 primerrel előállított termékének nukleotid szekvenciáját határoztuk meg. Egy minta (HEV072) esetében a teljes genomból egy 7189 nt hosszú egybefüggő szakasz nukleotidsorrendjét sikerült meghatározni. A szekvenciákat a génbankban EU718629-EU718650, EU530671-EU530676, GQ468295, GQ468296 és HM055579-HM055581 akcessziós számokon, a csaknem teljes szekvenciát HM055578 akcessziós számon

publikáltuk. A BLAST elemzés alapján mindegyik szekvencia HEV szekvenciának bizonyult, a filogenetikai elemzés pedig kimutatta, hogy a Magyarországon állatokban előforduló hepatitis E vírusok a HEV 3. genocsoportján belül „a”, „e” és „h” alcsoportba tartozó, különböző országokban kimutatott, állati és emberi eredetű vírusokkal mutatták a legnagyobb hasonlóságot.

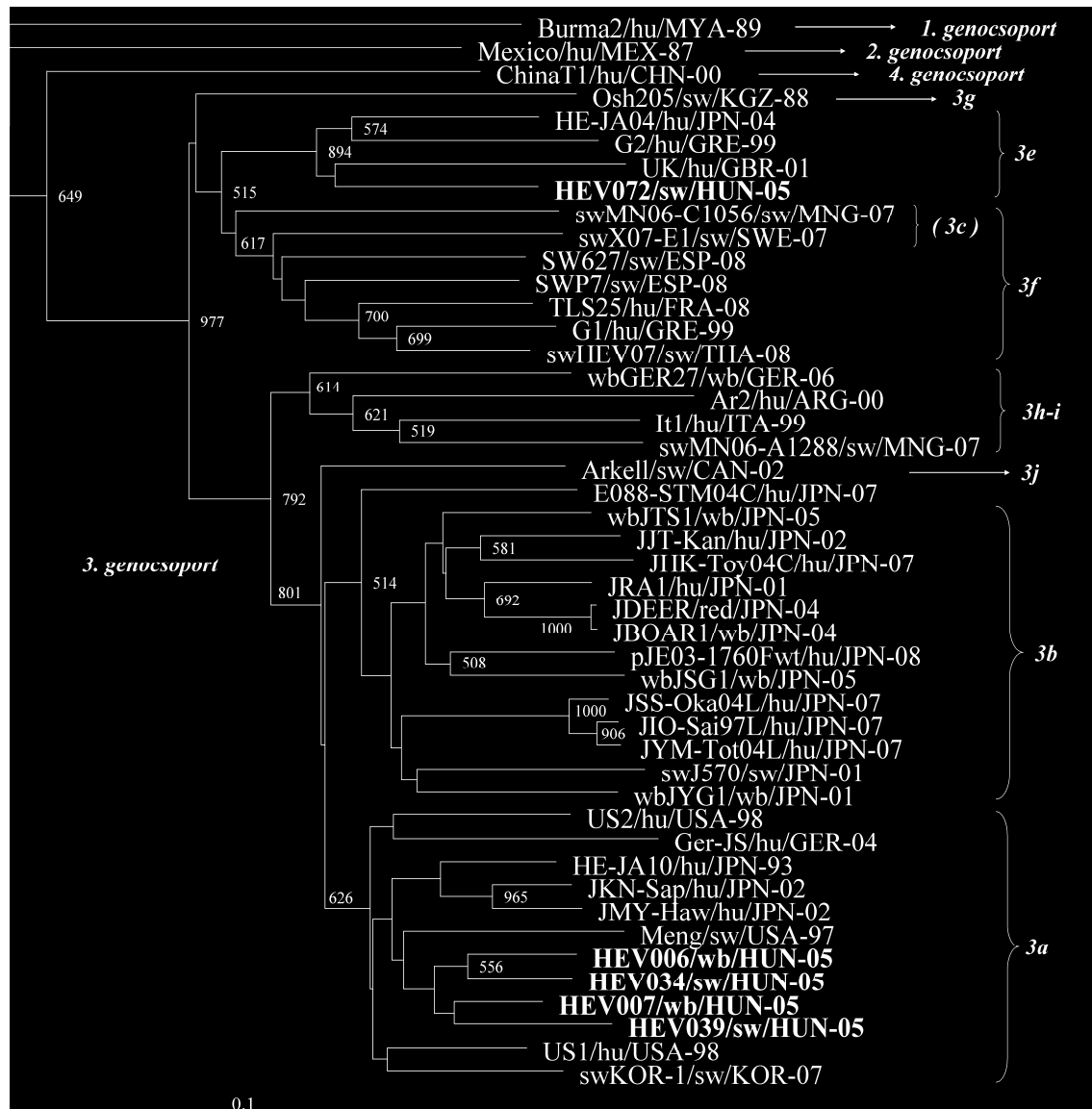
Habár a 197 bázispár hosszú PCR termékből meghatározható 147 nukleotid hosszú szekvencia meglehetősen rövid a megbízható filogenetikai vizsgálathoz, a HEV genom e szakasza változékonysága miatt megfelelő a kimutatott vírusok rokonsági fokának megállapításához. Minthogy a HEV278-279, 281-285, 288 és 290 minta ugyanarról a sertéstelepről származott, és az ORF2s1-ORF2a1 primerpárral előállított szekvenciájuk identikus, egy reprezentatív szekvenciát (HEV278) ábrázoltunk a törzsfán. Ugyanígy jártunk el a HEV611-613 jelzésű, identikus szekvenciájú vírusokkal, melyek közül a HEV612 jelzésűt használtuk fel a filogenetikai vizsgálatokban. A HEV480 jelzésű vírus két másik (HEV478-479), azonos sertéstelepen azonos időben gyűjtött vírust képvisel a törzsfán. A vírusok nukleotid-szekvenciája a vizsgált genomszakaszon identikus. Az ORF2s1-ORF2a1 primerpárral előállított szekvenciák felhasználásával készített törzsfán (14. ábra) a 3a alcsoportba sorolt 7 sertés, 2 vaddisznó és egy őz eredetű vírus két elkülönülő csoportot alkot. Az egyik csoportot 4 sertés és egy vaddisznó eredetű vírus alkotja (HEV143, 070, 006, 034, 036), melyek Magyarországon és az Egyesült Államokban kimutatott, emberi eredetű, vírusokkal mutatják a legnagyobb hasonlóságot. A HEV034 és 036 jelzésű vírusokat azonos időben, azonos sertéstelepen mutattuk ki. A két vírus szekvenciája 3 nukleotid pozícióban tér el egymástól, és a pontmutációk eredményeképp egy aminosav pozícióban is változás történt. A másik csoportba 4 sertés- 1 vaddisznó- és 1 őz eredetű vírus tartozik (HEV 480, 264, 39, 143, 007, 052, 138), melyek Magyarországon, embereken kimutatott vírusok szekvenciáihoz hasonlítanak legjobban.

A 3e alcsoportba 13 sertésből, 1 őzből és egy szarvasból kimutatott vírus tartozik, melyek egymással és Magyarországon, emberi eredetű mintákból kimutatott vírusokkal szoros rokonságot mutatnak, a más országokból kimutatott emberi és állati eredetű vírusoktól elkülönülő csoportot alkotnak. A magyarországi HEV törzsek Görögországban, Nagy-Britanniában és Japánban kimutatott emberi és állati vírusokkal mutatnak szoros rokonságot.



**14. ábra** Az ORF2s1-ORF2a1 primerpárral előállított szekvenciák alapján készített törzsfá. A vírusok jelölése: törzs neve/faji eredete/izolálás helye (ország hárombetűs kódja)-izolálás éve (utolsó két számjegy); sw: sertés, wb: vaddisznó, rod: őz, red: szarvas, hu: ember. Félkövérrel a dolgozatban ismertetett vizsgálat során kimutatott szekvenciákat jelöltük. A vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.

A HEV612 jelzésű sertés eredetű vírus Magyarország észak-keleti részéről származott, a 3. genocsoport „h” alcsoportjába tartozik. A vírus szoros rokonságot mutat emberi és állati eredetű HEV törzsekkel, melyeket Hollandiában, Németországban, Olaszországban és Mongóliában mutattak ki.



**15. ábra** Az ORF1s1-ORF1a1 primerpárral előállított szekvenciák alapján készített törzsfá. A vírusok jelölése: törzs neve/faji eredete/izolálás helye (ország hárombetűs kódja)-izolálás éve (utolsó két számjegy); sw: sertés, wb: vaddisznó, rod: őz, red: szarvas, hu: ember. Félkövérrel a dolgozatban ismertetett vizsgálat során kimutatott szekvenciákat jelöltük. A 16. ábrán látható törzsfá alapján a 3c alcsoportba tartozó vírusok ezen a törzsfán a 3f alcsoportba olvadtak, eredeti besorolásukat a zárójelbe tett alcsoport-elnevezéssel jelöltük. A vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.

Az ORF1 területén amplifikált PCR termékek közül 3 sertés és 2 vaddisznó eredetű szekvenciát határoztunk meg. Ezek elhelyezkedése a törzsfán megegyezik az ORF2s1-ORF2a1 primerek által előállított szekvenciák alapján meghatározott törzsfán látható elhelyezkedéssel (15. ábra). A két törzsfa topológiája a 3c alcsoport elhelyezkedésében tér el. A Magyarországon kimutatott vírusok vizsgált szekvenciáinak eltéréseit pontmutációk okozták, melyek többsége néma mutáció.

#### **7.4. A teljes HEV-genomszekvencia meghatározása és analízise**

A korábbi vizsgálatokban pozitívnak bizonyult minták közül a HEV072 jelű mintát választottuk ki a teljes genomszekvencia meghatározására irányuló vizsgálatokhoz. A minta házisertés bélsár eredetű, a mintavétel a sertés kórbonctani vizsgálata során történt. A boncolási jegyzőkönyv szerint az elhullás oka idült nyelőcsőtájéki gyomorfekély, anaemia, idült savós-fibrines mellhártya- és szívurokgyulladás, kiterjedt hurutos-gennyes bronchopneumonia. Habár a sertés májában makroszkópos vizsgálattal kimutatható elváltozás nem utalt májgyulladásra, a HEV nukleinsav a sertés májmintájából is kimutatható volt, és az ORF2s1-ORF2a1 primerpárral előállított szekvencia megegyezett a bélsármintából kimutatott vírus megfelelő szekvenciájával. A teljes genom meghatározásához használt primerpárokat a HEV072 jelű vírussal a „diagnosztikai” primerpárokkal előállított szekvenciák alapján szoros genetikai rokonságot mutató, Japánban kimutatott vírus (HA-JA04) és a HEV072 vírusgenom korábban megszekvenált szakaszának illesztése alapján terveztük meg. Más magyarországi vírus esetében a velük szoros genetikai rokonságot mutató vírusok szekvenciája is túlságosan eltérő volt ahhoz, hogy ezek alapján biztosan működő primereket tervezhessünk. A 17 primerpárral egymással átfedő termékeket amplifikálva a HEV072 vírus esetében egy 7189 nukleotid hosszú, egybefüggő szekvenciát határoztunk meg, amely a HEV 3. genocsoport referencia vírusa (GenBank akcessziós szám AF060669) 7277 nt hosszúságú genomszekvenciájának 63. és 7267. nukleotidja közé illeszthető. (A továbbiakban az egyszerűség kedvéért a vizsgálatainkban meghatározott összefüggő szekvenciát „teljes” genomszekvenciaként említjük.) A teljes genom filogenetikai analízise mellett a nukleotid-szekvencia öt szakaszát vizsgáltuk: a 3 nyílt leolvasási keretet, és

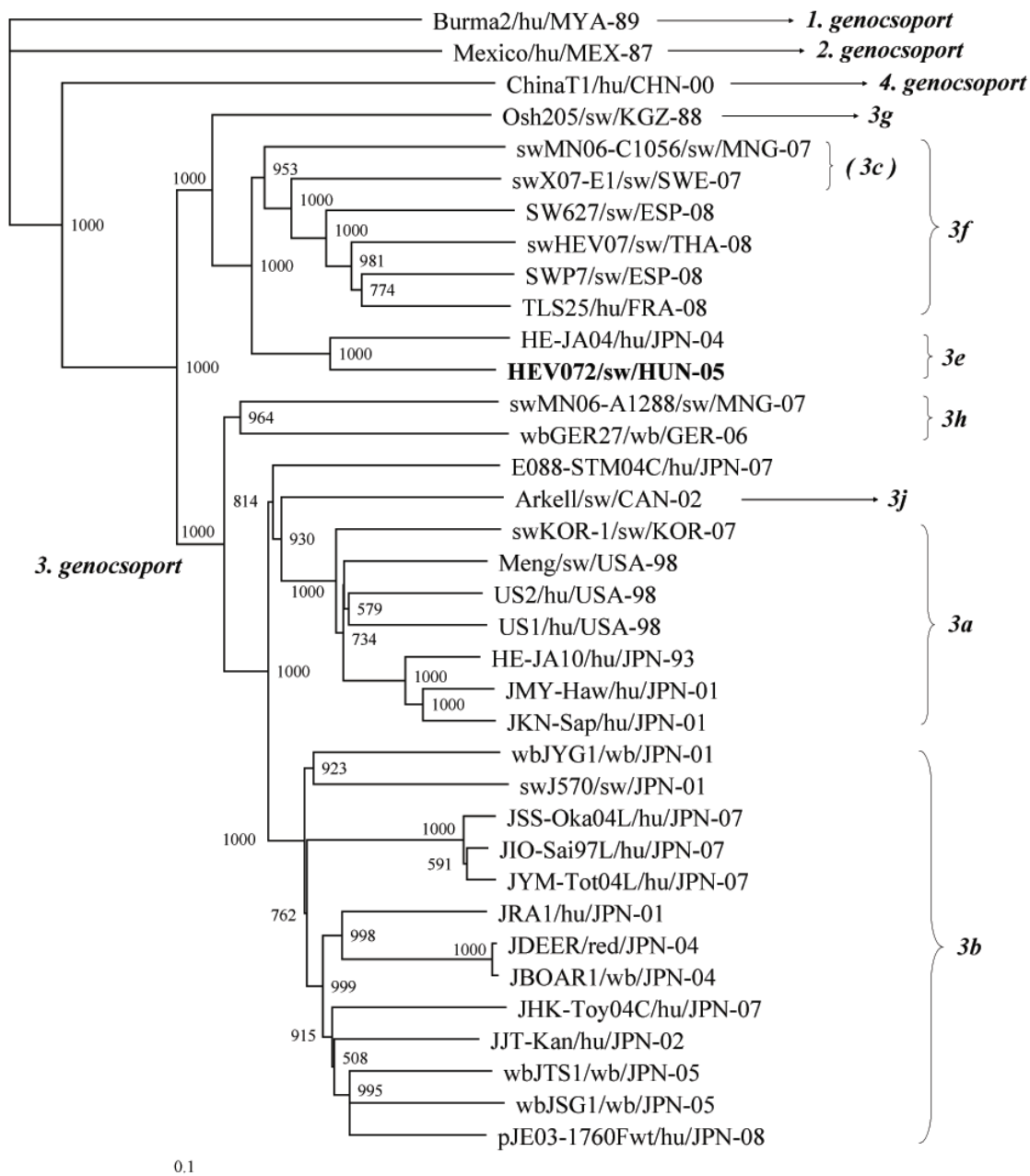
a teljes genom SimPlot analízise alapján a vírusszekvencia két, „legkonzervatívabb” és „legvariábilisabb” szakaszát is részletes vizsgálatnak vetettük alá.

Korábbi vizsgálatokban a HEV072 jelzésű vírust a Lu és munkatársai (2006) által felállított rendszer szerint a HEV 3. genocsoportjának „e” alcsoportjába soroltuk. A vizsgált teljes genomszekvenciákkal a magyarországi vírus nukleotid szinten 72-89% hasonlóságot mutat. A hasonlóság az 1. (Burma2; 73%), a 2. (Mexico; 72%) és a 4. (ChinaT1; 74%) genocsoport vírusaihoz alacsonyabb, míg a 3. genocsoport vizsgált vírusaival 80% feletti. A további öt ismert európai szekvenciával a hasonlóság 80% (wbGER27, Németország), 83% (TLS25, Franciaország), 84% (SwX07, Svédország) és 85% (Swp7 és Sw627, Spanyolország). Ezek a vírusok mind a 3. genocsoport a HEV072-től eltérő alcsoportjaiba (3c, 3f és 3h) tartoznak. A magyarországi vírus a legközelebbi rokonságot a már említett, szintén a 3e alcsoportba tartozó HE-JA04 jelzésű Japánban kimutatott vírussal mutatja (89%) (VIII. táblázat).

**VIII. táblázat** A vizsgált vírusok a HEV072 vírushoz való hasonlósága a teljes genomon, illetve a három nyílt leolvasási kereten (százalékos adat).

Vírusok	A HEV072 vírushoz való hasonlóság (%)						
	Teljes genom	ORF1		ORF2		ORF3	
		nt	aa	nt	aa	nt	aa
<b>Burma</b>	73	71	79	78	91	83	82
<b>Mexico</b>	72	71	79	77	90	83	83
<b>China</b>	74	71	79	78	90	73	72
<b>3. genocsoport</b>	80-89	78-87	90-94	83-91	96-98	91-98	90-97
<b>HE-JA04</b>	89	87	94	91	98	98	97
<b>Sw627</b>	85	84	93	87	98	94	97
<b>Swx07</b>	84	83	93	88	98	94	96
<b>Swp7</b>	84	82	92	87	97	94	96
<b>TLS25</b>	83	82	92	87	97	94	94
<b>wbGER27</b>	80	80	94	84	97	86	90





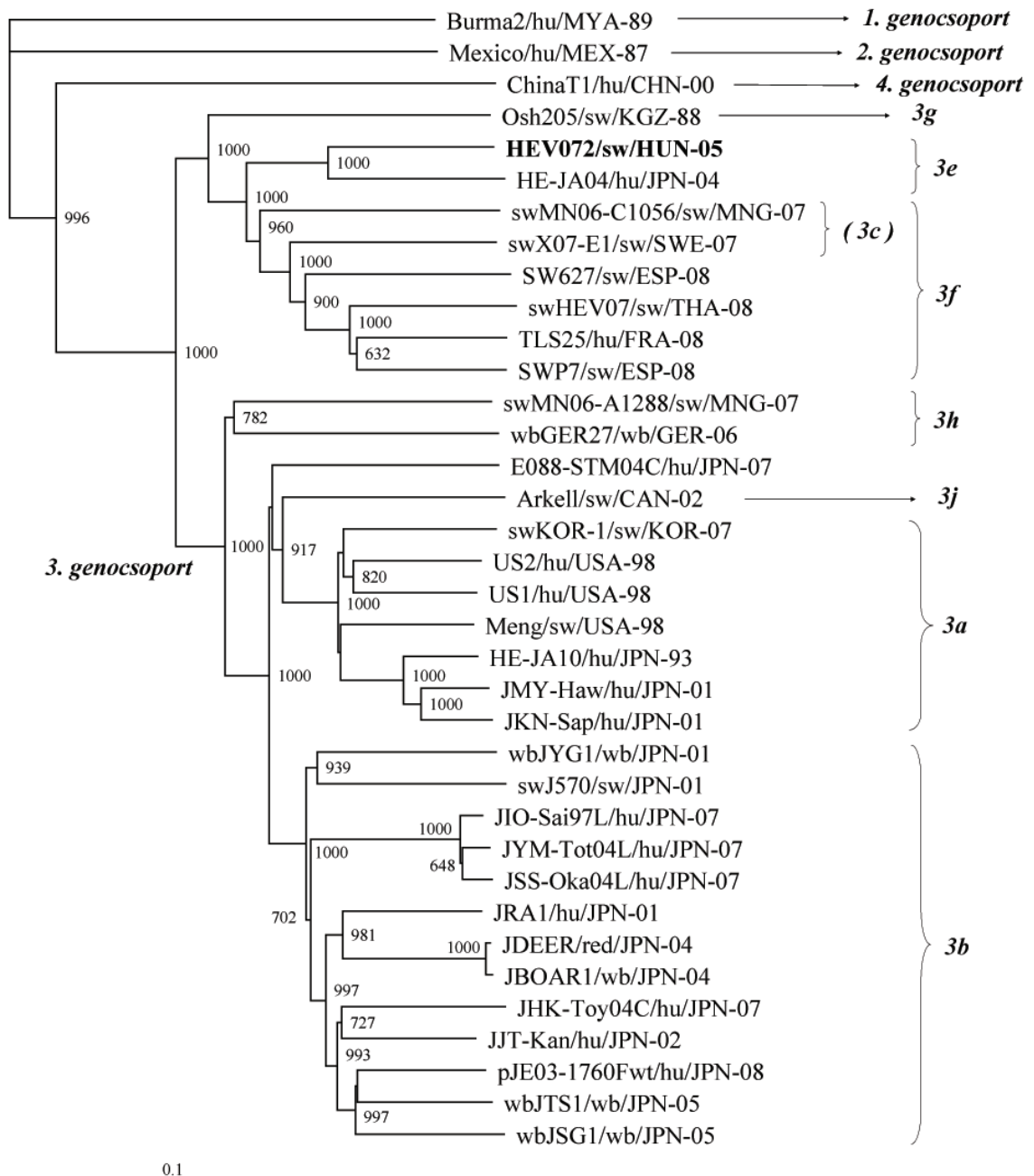
**16. ábra** A teljes genom szekvenciák alapján készített törzsfá. A vírusok jelölése: törzs neve/faji eredete/izolálás helye (ország hárombetűs kódja)-izolálás éve (utolsó két számjegy); sw: sertés, wb: vaddisznó, rod: őz, red: szarvas, hu: ember. Félkövérrel a dolgozatban ismertetett vizsgálat során kimutatott szekvenciát jelöltük. A 16. ábrán látható törzsfá alapján a 3c alcsoportba tartozó vírusok ezen a törzsfán a 3f alcsoportba olvadtak, eredeti besorolásukat a zárójelbe tett alcsoport-elnevezéssel jelöltük. A vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.

A teljes genom szekvencia felhasználásával készített törzsfán (16. ábra) a Lu és munkatársai (2006) által felállított rendszer szerint a 3. genocsoport „a”, „b”, „c”,

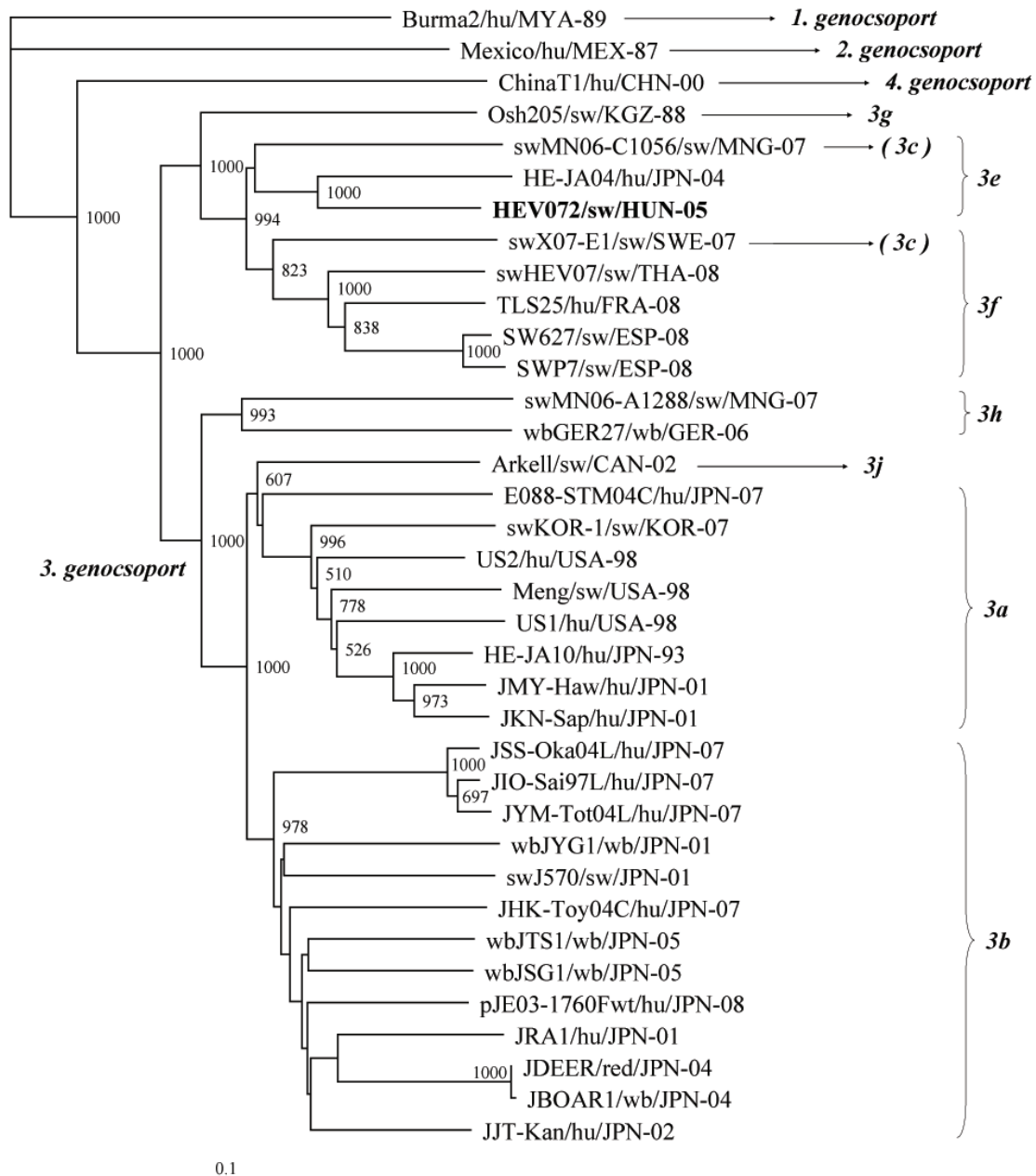
„e”, „f”, „g”, „h” és „j” alcsoportjait tüntették fel; a HEV072-es vírus a 3e alcsoportban található. Ez az elhelyezkedés megegyezik a „diagnosztikai” primerpárokkal előállított szekvenciák alapján készített törzsfán megfigyelt pozícióval. A teljes genomszekvenciák alapján készített törzsfán az ORF1s1-ORF1a1 primerpárral előállított szekvenciákon alapuló törzsfához hasonlóan a 3c alcsoport a 3f alcsoportba olvadt.

#### ***7.4.1. A nyitott leolvasási keretek elemzése***

Az ORF1 szakaszon nukleotid szinten a HEV072 az 1. (Burma2), 2. (Mexico) és 4. (ChinaT1) genocsoportok referencia vírusaival 71%-os, míg a 3. genocsoport vírusaival 78-87%-os hasonlóságot mutat. A 3. genocsoporton belül a szintén „e” alcsoportba tartozó HE-JA04 vírussal a HEV072 hasonlósága az ORF1 szakaszon 87%, az európai szekvenciákkal pedig 80% (wbGER27, Németország), 82% (SWP7, Spanyolország, és TLS25, Franciaország), 83% (SwX07, Svédország) és 84% (SW627, Spanyolország) (VIII. táblázat). Aminosav szinten ezen a szakaszon a vírusok HEV072-eshez való hasonlósága néhány százalékkal magasabb: az 1. (Burma2), 2 (Mexico) és 4. (ChinaT1) genocsoportok referencia vírusaival 79%-os, míg a 3. genocsoport vírusaival 90-94%-os. A 3. genocsoporton belül a HE-JA04 (Japán) és a wbGER27 (Németország) vírussal 94%, a többi európai szekvenciával pedig 92% (SWP7, Spanyolország és TLS25, Franciaország), illetve 93% (SwX07, Svédország és SW627, Spanyolország) a HEV072 ORF1-aminosav szekvenciájának hasonlósága. Az ORF1 régiót kódoló szekvenciák alapján felállított törzsfá (17. ábra) és a teljes genomszekvenciák alapján készült törzsfá topológiája megegyezik, az ORF1 régió a genom meghatározó szakasza.



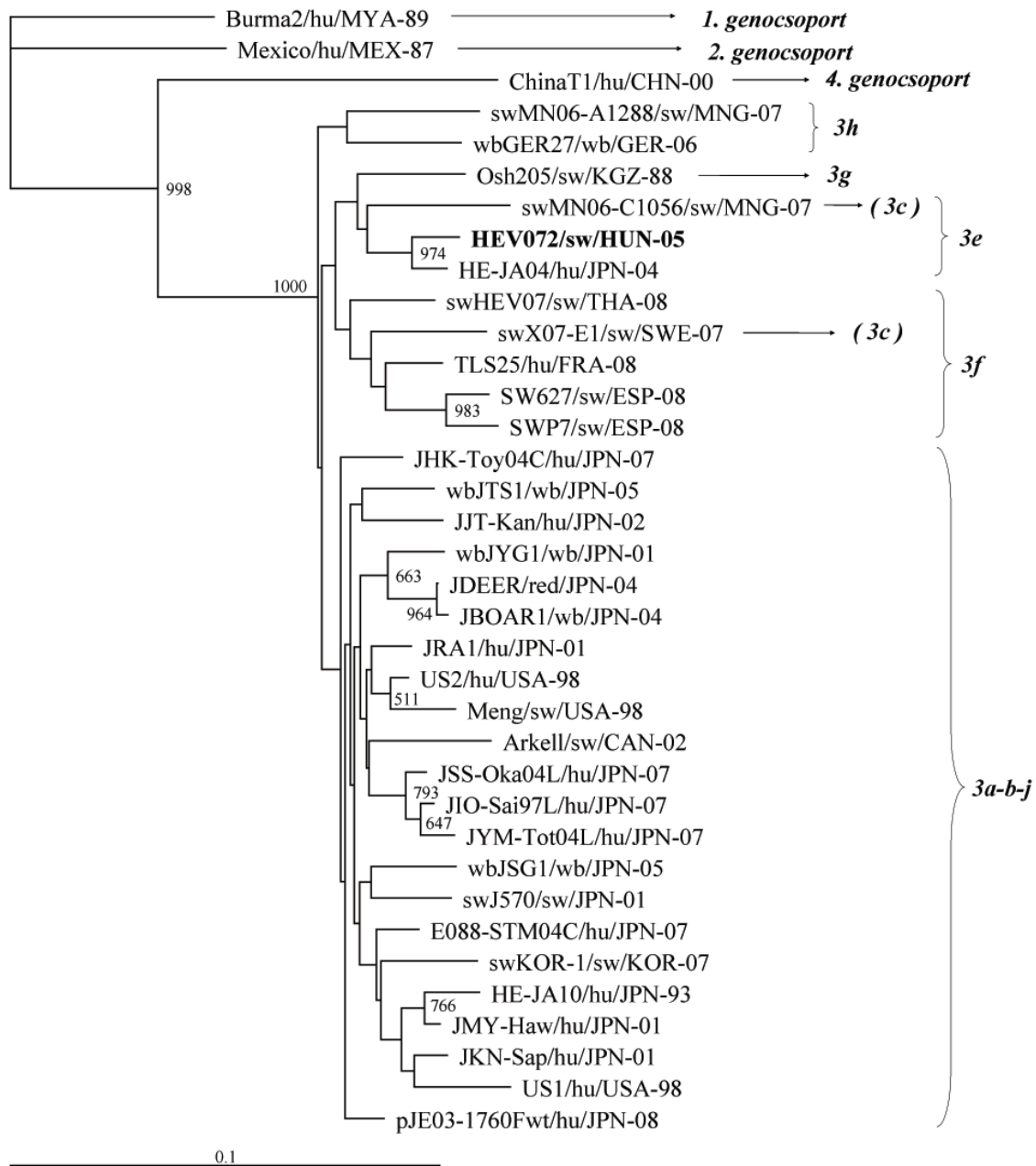
**17. ábra** A teljes genomok ORF1 régiójának nukleotid szekvenciája alapján készített törzsfá. A vírusok jelölése: törzs neve/faji eredete/izolálás helye (ország hárombetűs kódja)-izolálás éve (utolsó két számjegy); sw: sertés, wb: vaddisznó, rod: őz, red: szarvas, hu: ember. Félkövérrrel a dolgozatban ismertetett vizsgálat során kimutatott szekvenciát jelöltük. A 16. ábrán látható törzsfá alapján a 3c alcsoportba tartozó vírusok ezen a törzsfán a 3f alcsoportba olvadtak, eredeti besorolásukat a zárójelbe tett alcsoport-elnevezéssel jelöltük. A vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.



**18. ábra** A teljes genomok ORF2 nukleotid szekvenciái alapján készített törzsfá. A vírusok jelölése: törzs neve/faji eredete/izolálás helye (ország hárombetűs kódja)-izolálás éve (utolsó két számjegy); sw: sertés, wb: vaddisznó, rod: őz, red: szarvas, hu: ember. Félkövérrel a dolgozatban ismertetett vizsgálat során kimutatott szekvenciát jelöltük. A 16. ábrán látható törzsfá alapján a 3c alcsoportba tartozó vírusok ezen a törzsfán a 3e és 3f alcsoportokba olvadtak, eredeti besorolásukat a zárójelbe tett alcsoport-elnevezéssel jelöltük. A vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.

Az ORF2 régióban nukleotid szinten a HEV072 77%-ban (Mexico, 2. genocsoport), illetve 78%-ban (Burma2, 1. genocsoport és ChinaT1, 4. genocsoport) hasonlít a nem 3. genocsoportba tartozó vírusokhoz. A 3. genocsoport vírusaival a hasonlóság 83-91%, ezen belül a HE-JA04 vírussal („e” alcsoport) 91%, az európai vírusokkal pedig 84% (wbGER27; Németország), 87% (SWP7 és SW627; Spanyolország, illetve TLS25; Franciaország) és 88% (swX-07, Svédország). Aminosav szinten 90% a hasonlóság a 2. és 4. genocsoport vírusaival, míg az 1. genocsoport referencia vírusához 91%-ban hasonlít a Magyarországon kimutatott vírus. A HEV072 és a 3. genocsoportba tartozó vírusok között 96-98% a hasonlóság, ezen belül 97% SWP7, TLS25 és wbGER27; vírussal, míg 98% a hasonlóság a HE-Ja04, SW627 és swX07 vírusokkal. A szekvenciák alapján készített törzsfán (18. ábra) a 3c alcsoportba tartozó vírusok a korábbiakkal ellentétben nem egységesen a 3f alcsoportba olvadtak: a swMN06-C1056 jelzésű vírus a 3e alcsoportba, míg a swX07-E1 vírus a 3f alcsoportba került.

Az ORF3 régióban a vírusok HEV072-eshez való hasonlóságának mértéke nukleotid szinten az 1. és 2. (Burma2, Mexico) genocsoport vírusai esetében 83%, míg a 4. (ChinaT1) genocsoport esetében csak 73%. A 3. genocsoportba tartozó vírusokhoz a HEV072 91-98%-ban hasonlít az ORF3 régióban, ezen belül a HE-Ja04 98%-ban, míg az európai szekvenciák egységesen 94%-ban hasonlítanak a magyarországi vírushoz. Aminosav szinten a hasonlóság mértéke az 1. genocsoporttal 82%, a 2. genocsoporttal 83%, a 4. genocsoporttal 72%, míg a 3. genocsoport vírusaival 90-97%. A genomrégió szekvenciái alapján felállított filogenetikai fán a 3a, 3b és 3j alcsoport összeolvadása figyelhető meg, míg a 3c alcsoport vírusai az ORF2 régió szekvenciái alapján készített filogenetikai fához hasonlóan helyezkednek el (19. ábra).

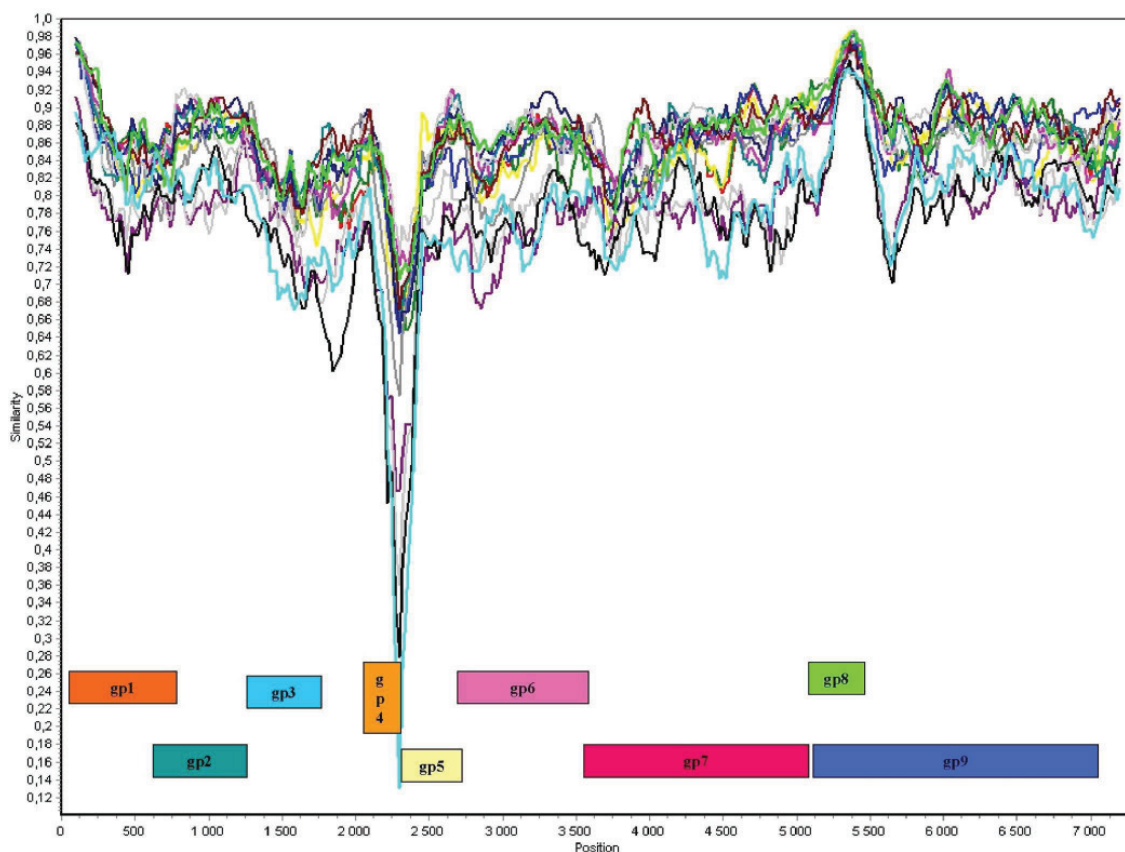


**19. ábra** A teljes genomok ORF3 nukleotid szekvenciái alapján készített törzsfá. A vírusok jelölése: törzs neve/faji eredete/izolálás helye (ország hárombetűs kódja)-izolálás éve (utolsó két számjegy); sw: sertés, wb: vaddisznó, rod: őz, red: szarvas, hu: ember. Félkövérrel a dolgozatban ismertetett vizsgálat során kimutatott szekvenciát jelöltük. A 16. ábrán látható törzsfá alapján a 3c alcsoportba tartozó vírusok ezen a törzsfán a 3f és 3f alcsoportokba olvadtak, eredeti besorolásukat a zárójelbe tett alcsoport-elnevezéssel jelöltük. A vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.



#### 7.4.2. SimPlot-vizsgálatok

SimPlot analízis során a vizsgált szekvenciák hasonlóságát grafikusan ábrázoltuk. Az elemzéssel a genom 2 jellegzetes régióját azonosítottuk (20. ábra).



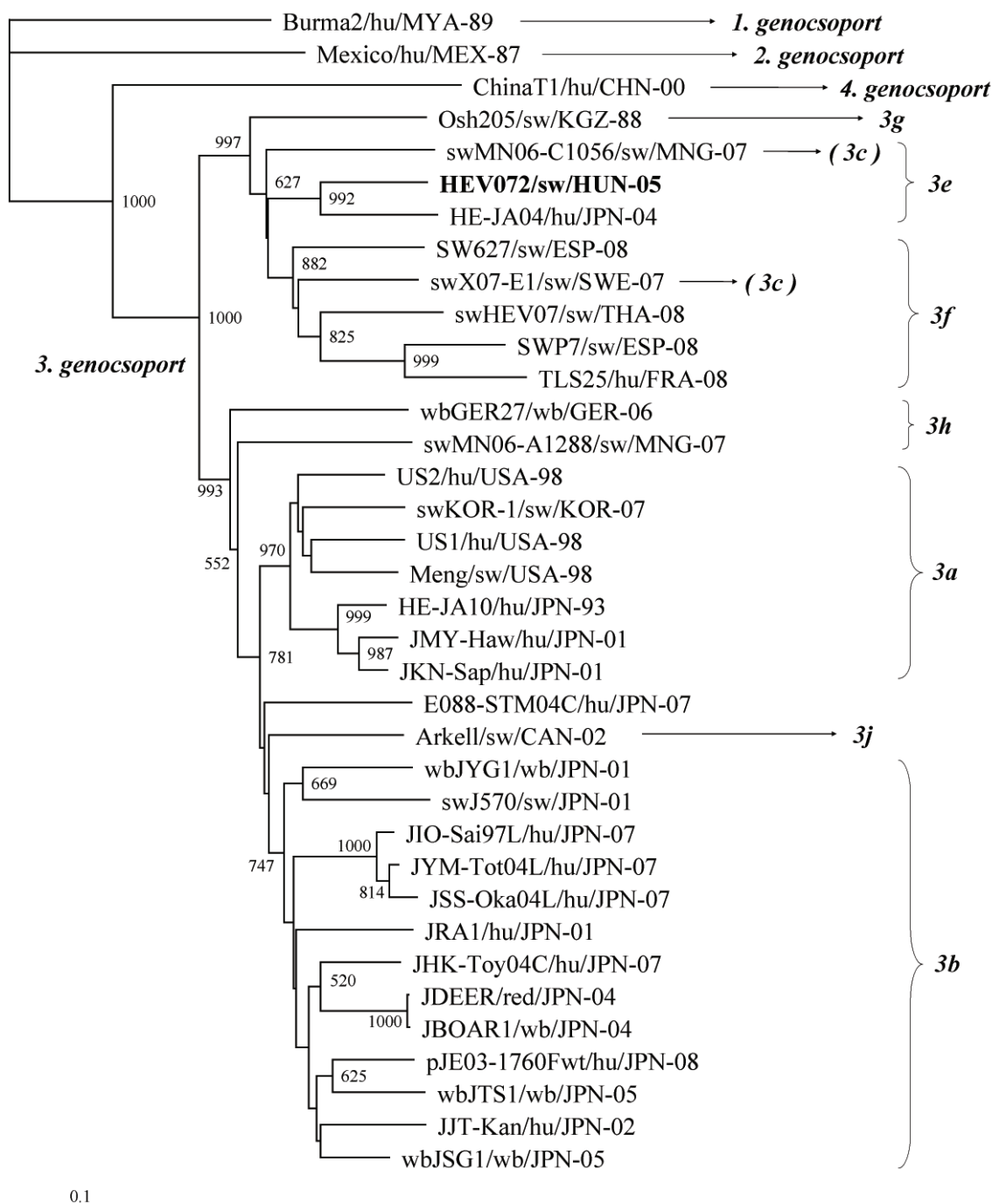
**20. ábra** A 3. genocsoportba tartozó vírusok SimPlot analízise. Az egyes vírusok szekvenciáit eltérő színekkel jelöltük. ORF1: Gp1, gp2: metil-transzferázok, gp3: papain-szerű cisztein-proteáz, gp4: polyproline hinge-domén, gp5: ADP ribose binding protein, gp6: RNS-helikáz, gp7: RNS-polimeráz, ORF2 és ORF3(átfedésben): gp8: feltételezett kapszid protein, gp9: strukturális fehérjék.

A 2125-2500 nt pozíciók között (polyproline hinge (PPH) régió vagy hipervariabilis régió (HVR) a 3. genocsoportba tartozó vírusok szekvenciái nagyon különbözőek, nukleotid szinten a hasonlóság ezen a genomszakaszon mindössze 14-78%. Ezzel szemben az 5250-5500 nt pozíciók között (putative capsid protein, PCP régió) a 3. genocsoportba tartozó vírusok szekvenciái nukleotid szinten nagyfokú, 92-98% hasonlóságot mutatnak. Aminosav szinten a hasonlóság a HVR régióban 64-80% míg a PCP régióban 91-99% a 3. genocsoportba tartozó vírusok szekvenciái között (IX. táblázat).

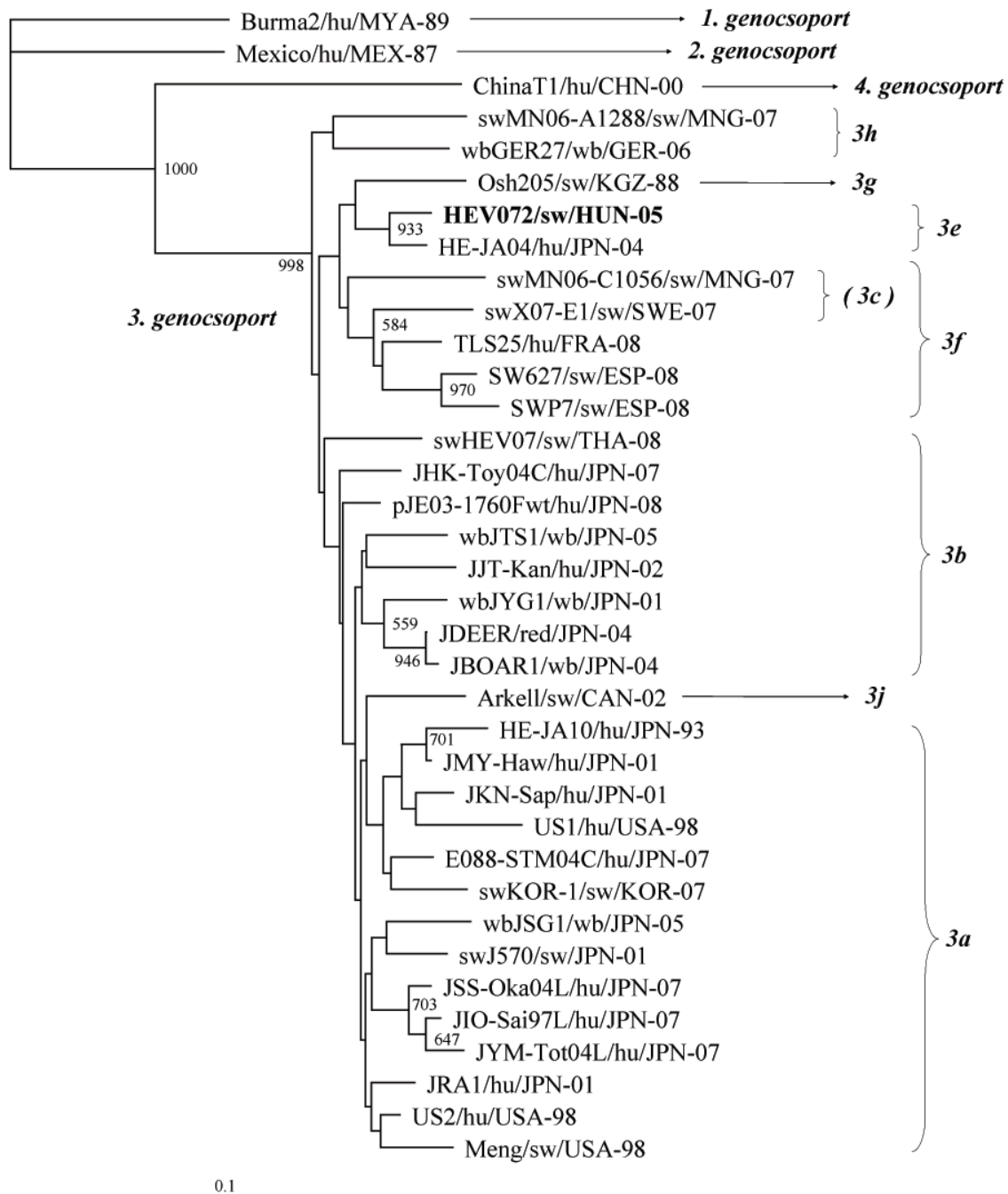
**IX. táblázat** A vizsgált vírusok a HEV072 vírushoz való hasonlósága a hipervariabilis régió és a feltételezett kapszid protein domén konzervatív szakaszának területén (százalékos adat).

Vírusok	A HEV072 vírushoz való hasonlóság (%)			
	hipervariabilis régió		feltételezett kapszid protein	
	nt	aa	nt	aa
<b>Burma</b>	55	43	84	83
<b>Mexico</b>	52	46		82
<b>China</b>	57	51		78
<b>3. genocsoport</b>	61-78	64-80	92-98	91-99
<b>HE-JA04</b>	78	78	98	99
<b>Sw627</b>	78	80	95	99
<b>Swx07</b>	78	75	94	96
<b>Swp7</b>	64	66	94	98
<b>TLS25</b>	61	64	95	98
<b>wbGER27</b>	71	71	94	92

A hipervariabilis régió szekvenciáinak felhasználásával készített törzsfán a 3c alcsoport tagjai az ORF2 és ORF3 szekvenciák alapján készített törzsfához hasonlóan a 3e és 3f alcsoportba sorolódtak (21. ábra), míg a 3. genocsoport többi alcsoportja elkülönül egymástól. A feltételezett kapszid protein régió szekvenciái alapján felállított törzsfá a szekvenciák nagyfokú hasonlósága ellenére jól tagolt, az egyes alcsoportok elkülönülnek (22. ábra). A 3c alcsoport vírusai a teljes genomszekvencia és az ORF1 régió elemzése során tapasztaltakhoz hasonlóan a 3f alcsoportban találhatóak.



**21. ábra** A SimPlot analízis alapján legleváltozékonyabbnak talált genomszakasz nukleotid szekvenciái alapján készített törzsfá. A vírusok jelölése: törzs neve/faji eredete/izolálás helye (ország hárombetűs kódja)-izolálás éve (utolsó két számjegy); sw: sertés, wb: vaddisznó, rod: őz, red: szarvas, hu: ember. Félkövérrrel a dolgozatban ismertetett vizsgálat során kimutatott szekvenciát jelöltük. A 16. ábrán látható törzsfá alapján a 3c alcsoportba tartozó vírusok ezen a törzsfán a 3e és 3f alcsoportokba olvadtak, eredeti besorolásukat a zárójelbe tett alcsoportelnevezéssel jelöltük. A vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.



**22. ábra** A SimPlot analízis alapján leghasonlóbbnak talált genomszakasz nukleotid szekvenciái alapján készített törzsfá. A vírusok jelölése: törzs neve/faji eredete/izolálás helye (ország hárombetűs kódja)-izolálás éve (utolsó két számjegy); sw: sertés, wb: vaddisznó, rod: őz, red: szarvas, hu: ember. Félkövérrel a dolgozatban ismertetett vizsgálat során kimutatott szekvenciát jelöltük. A 16. ábrán látható törzsfá alapján a 3c alcsoportba tartozó vírusok ezen a törzsfán a 3f alcsoportba olvadtak, eredeti besorolásukat a zárójelbe tett alcsoport-elnevezéssel jelöltük. A vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.

## 8. MEGBESZÉLÉS

A hepatitis E vírus, első kimutatása óta a kutatók egyre intenzívebb érdeklődésének középpontjában áll. Az utóbbi években számos vizsgálat folyt a fertőzés emberek közötti terjedésével, a vírus zoonotikus jelentőségével és a fertőzés átvitelében szerepet játszó kockázati tényezőkkel kapcsolatban (Lewis *et al.*, 2010). Az emberi HEV-fertőzés átvitelének több útját azonosították melyek között az endémiás országokban jellemző szennyezett ivóvízzel való fertőződés, illetve a fejlett országokban az emberi fertőzések fő okaiként számon tartott állatoktól (sertés, szarvas) való fertőződés, illetve szerv-transzplantáció és vértranszfúzió útján közvetlen emberek közötti fertőzés-átvitel is bizonyított (Dalton *et al.*, 2008).

A humán hepatitis E fertőzöttség elterjedtségének mértékére vonatkozó adatok – akár a részletesebb vizsgálatok, akár az érzékenyebb módszerek, akár pedig a járványtani körülmények változása miatt – az utóbbi évek vizsgálatai alapján más, korábban „nem endémiás” kategóriába sorolt országban is megváltoztatták az adott országról HEV-járványtani szempontból kialakult képet (Wichmann *et al.*, 2008). Magyarországot a HEV járványtana alapján korábban “nem endémiás” országgént tartották nyilván (Worm *et al.*, 2002): a klinikai tünetekben megnyilvánuló esetek sporadikusan fordulnak elő (Reuter *et al.*, 2006 és 2009b), szemben azokkal az (endémiás) országokkal, ahol akár több száz esettel járó járványok is kialakulhatnak. A járványtani különbségeknek higiéniai és táplálkozási okai lehetnek: a rezervoár állatfajok bélsarával szennyezett ivóvízzel való érintkezés, illetve a nyers hús fogyasztása hazánkban kisebb gyakorisággal fordul elő, összehasonlítva a fejlődő országokkal, ahol a higiéniai körülmények alacsonyabb szintűek, illetve azokkal a kultúrákkal (Japán), ahol az emberek gyakran fogyasztanak nyers húst. Korábbi vizsgálatok alapján azonban az anti-HEV szeropozitivitás hazánkban is meglehetősen magas, bizonyos népesség-kategóriákban akár az endémiás országokra jellemző gyakoriság is előfordulhat (Reuter és Szűcs, 2004). A betegség klinikai tünetekben megnyilvánuló formájának hazai előfordulása, a teljes lakosságra vetítve viszonylag ritka: 2004-2008 között mindössze 92 bejelentett esetet regisztrált az Országos Epidemiológiai Központ, mely a 2004-2008 közötti időszakban bejelentett, és etiológiájában azonosított vírushepatitisek (hepatitis A, B, C és E) 4%-a (OEK, 2009a). A fertőzés következtében egy, az 50-59 éves korcsoportba tartozó beteg veszítette életét 2008-ban (OEK, 2009b).

A „nem endémiás” országokban az emberi szeropozitivitás mértéke a rezervoár fajok fertőzöttségének mértékével is kapcsolatba hozható. Felmérések szerint az állatok széles körében lehet HEV ellenanyagokat kimutatni. Endémiás területen juhok és kecskék között 42-67%-ban, kutyákban 27%-ban, csirkékben 44%-ban, patkányokban 80%-ban találtak ellenanyagokat (Williams *et al.*, 2001). Sertésekben átlagosan kb. 60% (Yoo *et al.*, 2001) a szeroprevalencia. A hepatitis E vírus eddigi vizsgálata során számos olyan adat gyűlt össze, mely a vírus zoonotikus tulajdonságát valószínűsíti. Számos tudományos értekezés ismerteti a fertőzés állatfajok közötti terjedését kísérleti, és állatokról emberekre való átvitelét természetes körülmények között (Maneerat *et al.*, 1996; Meng *et al.*, 1998; van Cuyck-Gandré *et al.*, 1998; Feagins *et al.*, 2008). Több tanulmány foglalkozik az emberek alimentáris úton való fertőződésével, mely esetekben nem megfelelően hőkezelt sertés- (Yazaki *et al.*, 2003; Meng, 2005; Wichmann *et al.*, 2008; Reuter, 2009a), vaddisznó-, őz- vagy szarvashús (Tei *et al.*, 2003; Tamada *et al.*, 2004) fogyasztása előzte meg a klinikai tünetek kialakulását. Emellett a molekuláris biológiai vizsgálatok az emberekből és állatokból (sertés, vaddisznó, őz, szarvas) kimutatott vírusok nagyfokú genetikai hasonlóságát írták le (van der Poel *et al.*, 2001) A vizsgálatok során a HEV magyarországi elterjedtségének mértékét határoztuk meg azokban az állatfajokban, melyek a feltételezések szerint közvetlen vagy közvetett szerepet játszhatnak az emberi hepatitis E járványtanában: míg a sertés-, vaddisznó-, őz- és szarvashús, esetleg szarvasmarha-, juh-, kecske-, illetve bizonyos társadalmi csoportok esetében a hörcsöghús fogyasztása jelenthet egészségügyi kockázatot, addig a fertőzés fenntartásában az egér, patkány, cickány, illetve a hörcsög lehet meghatározó tényező. Természetesen ez utóbbi állatfajok mellett a fő rezervoár fajok is részt vesznek a fertőzés fajon/állattartó telepen/természetes élőhelyen való fennmaradásában: a Taenia-fajokkal való fertőződéshez hasonlóan a bélsárral ürített víruspartikulák szájon át való felvétele (koprofágia vagy fertőzött bélsárral szennyezett takarmány felvétele során) fertőzheti a fogékony egyedeket (Gonzalez *et al.*, 2006).

## **8.1. A HEV elterjedtsége sertéstartó telepeken**

A hazai sertéstelepek HEV-fertőzöttségének felméréséhez, valamint a fertőzés lefolyásának meghatározásához célzott, korcsoport szerinti mintavétellel gyűjtöttünk adatokat. Eredményeink alapján a vizsgált hazai sertésállományok 39%-a (16/41) bizonyult HEV pozitívnak. Más országokban végzett vizsgálatok eredményeivel összehasonlítva a magyarországi sertéstelepek fertőzöttsége közepesnek mondható. Az Egyesült Államokban 2002-ben végzett PCR vizsgálatokban a sertéstelepek 54%-át, 2005-ben 40%-át találták HEV-fertőzöttnek (Huang *et al.*, 2002a; Kasorndorkbua *et al.*, 2005), Kínában, a Sanghaj környéki sertéstelepek 73% bizonyult HEV pozitívnak a nukleinsav-kimutatáson alapuló vizsgálatok során (Ning *et al.*, 2008). Az európai országokban végzett felmérésekben, észak-olaszországi sertéstelepek vizsgálatában polimeráz láncreakcióval a vizsgált 6 sertéstelep mindegyikében kimutatták a HEV jelenlétét (Di Bartolo *et al.*, 2008), Hollandiában 1999-ben a sertéstelepek 22%-a, 2005-ben 55%-a bizonyult fertőzöttnek (Rutjes *et al.*, 2007). Hasonlóan alakultak a spanyolországi felmérések eredményei is: míg 2006-ban a sertéstelepek 38%-ában mutatták ki a HEV jelenlétét, a polimeráz láncreakcióval kimutatható fertőzöttség mértéke 2007-re 76%-ra nőtt (Fernandez-Barredo *et al.*, 2006 és 2007). A nukleinsav-kimutatáson alapuló vizsgálatokkal meghatározott fertőzöttség (vírusürítés előfordulása) mértékéhez képest a szerológiai áthangolódás alapján meghatározott fertőzöttség a sertések körében magasabb is lehet: 2008-ban 41 spanyolországi sertésfarmon 97%-os anti-HEV IgG és 83% IgM pozitivitást mutattak ki (Seminati *et al.*, 2008), míg kanadai szerológiai vizsgálatokban a szeropozitivitás a vizsgált sertéstelepeken 0-100% között változott (Leblanc *et al.*, 2007).

## **8.2. A vírusürítés korcsoportonkénti megoszlása**

### ***8.2.1. A HEV-fertőzés fennmaradásában szerepet játszó tényezők***

A sertéstelepeken a fertőzés lefolyását, az egyes sertés-korcsoportokban tapasztalható vírusürítés mértékét járványtani és étel-miszer-higiéniai szempontokból is vizsgáltuk. A hazánkban vizsgált 251 házisertés közül 204 állat koráról álltak



rendelkezésre adatok. A mintákat a Magyarországon alkalmazott sertéstartási technológia alapján 4 korcsoportba osztottuk. A legfiatalabb korosztályba az újszülött és választás előtti malacokat soroltuk (1-28. nap, 1-9 kg, 22 állat). Ebben a korcsoportban feltételezéseink szerint az esetleges maternális immunitás megvédi a malacokat a fertőzéstől. A választást követő malac I. (5-10. hét, 10-19 kg, 79 állat) korcsoportban a fertőzések megeredésének legnagyobb jelentőségű körülménye a választás és az újracsoportosítás miatti stressz (Kelley, 1980). A malac II. és hízó I. korcsoportokat statisztikai és technológiai okokból vontuk össze (11-16. hét, 20-50 kg 27 állat): előbbire az alacsony mintaszám a magyarázat, utóbbira pedig az a gyakorlat, hogy a hízó csoportba soroláskor általában kiválogatják a korcsoport átlagánál rosszabb paraméterekkel jellemezhető állatokat, és visszacsoportosítják, azaz a következő korosztály malac II. korcsoportjába tartozó állatai közé keverik őket. Ez a csoport járványtani szempontból szintén fontos lehet: egyrészt lehetnek közöttük nem fertőződött, fogékony állatok és vírusürítő állatok is, amelyek a fogékony állatokat fertőzhetik. A hízó II. (17. hét után, 50 kg felett, 56 állat) korcsoportba pedig a véghízókat, kocákat és tenyészkacákat soroltuk.

A RT-PCR vizsgálatokban az elhullott állatok esetében mind máj-, mind bélsárminták, az élő állatok esetében (Zala megyei sertéstelepeken gyűjtött minták) csak bélsárminták vizsgálatára volt lehetőségünk. Amennyiben egy sertés legalább egy mintájából (máj vagy bélsár) kimutattuk a vírus nukleinsav jelenlétét, azt az egyedat a továbbiakban fertőzöttnek tekintettük. Eredményeink szerint a magyarországi sertéstelepeken a HEV-fertőzöttség előfordulása a legfiatalabb és legidősebb korosztályban a legalacsonyabb, míg a malac I., és malac II. – hízó I. korosztályban éri el csúcspontját.

A választás előtti malacok kis százaléka fertőződik a kevés számú vírusürítő kocától. Az újszülött malacok vasigényüket (a kocatej alacsony vastartalma miatt) természetes körülmények között részben anyjuk bélsarából fedezik (Sansom és Gleed, 1981). Habár a modern technológiában az újszülöttkori bélfertőzések elkerülése érdekében a koca bélsarát mihamarabb eltávolítják, vagy az elletőben az alkalmazott padozat révén a kismalacok nem férnek az esetlegesen HEV tartalmú koca bélsárhoz (Gleed és Sansom, 1982), előfordulhatnak olyan esetek, melyek során mégis bekövetkezhet a fertőződés. Amennyiben a vírusfelvétel a fertőzés megeredése szempontjából kedvező időpontban, azaz a maternális immunitás megszűnésekor

történik, a vírusszaporodást követően nagy titerben hepatitis E vírust tartalmazó bélsarat ürítenek.

A választás előtt fertőződött, választás körül már vírusürítő malacok a malac I. korcsoportba kerülve fertőzhetik az új, fogékony kutricatársakat. A technológia e szakaszában általában a bélsár eltávolítása nem azonnali, és nem hatékony, így a fogékony egyedek a bélsárral közvetlenül érintkezve, vagy a szennyezett takarmány, esetleg ivóvíz útján fertőződhetnek. A fertőzöttség az 5-16 hetes korcsoportokban (malac I., malac II. - hízó I.) a legmagasabb, a fertőzés elhúzódó (akár 12 héten át tartó) lefolyását az esetleges visszacsoportosítás is elősegítheti. Figyelembe véve az egyedileg értékelhető minták eredményeit és a sertések tartási-takarmányozási körülményeit, illetve etológiai szempontokat (koprofágia), valószínűsíthető, hogy ha egy telepen jelen van a HEV, vírusürítő sertések mindig lesznek az állományban.

Eredményeinkből levont következtetéseink megfelelnek a más országokban végzett hasonló vizsgálatok megállapításaival. A szakirodalmi adatok alapján a sertések nagyobb valószínűséggel egymástól, kontakt úton fertőződnek: sertéstelepeken a fertőzés forrása általában a fertőzött koca, választás után pedig a fogékony egyedekkel egy kutricába kerülő vírusürítő sertés (Tanaka *et al.*, 2004; Kasorndorkbua *et al.*, 2004; de Deus *et al.*, 2008a; Bouwknecht *et al.*, 2008 és 2009). A fertőzött kocától született almok vizsgálatok a malacok a kolosztrális immunitás megszűntével szeronegatívnak bizonyultak, továbbá a koca fertőzöttsége nem volt szignifikáns hatással a magzatok méretére, életképességére, a malacok születési súlyára és növekedésére. A vírus vertikális terjedésével kapcsolatos vizsgálatok sertésben negatív eredményt hoztak (Meng *et al.*, 1997; Kasorndorkbua *et al.*, 2003). A vírusürítő kocák malacait a szopatás közben fertőzik meg (de Deus *et al.*, 2008a), s bár a maternális immunitás megvédi a szopós malacokat az esetleges fertőzéstől (Andries *et al.*, 1978), az anyai ellenanyagok jelenléte immunosuppresszív hatású is lehet (Siegrist, 2003). A maternális immunitás védő hatását a malacok hepatitis E fertőzése esetében még nem bizonyították egyértelműen. Az anyai anti-HEV ellenanyagok jelenlétének hatására tapasztaltak ugyan szignifikáns késedelmet a viraemia kialakulásában a szeronegatív kocától született malacokban kialakult viraemia időpontjával szemben, azonban a később kialakuló viraemia kitolhatja azt az időpontot is, amikor a malacok immunrendszere reagál a fertőzésre (Kanai *et al.*, 2010).

A bélsárral történő vírusürítés sertésben akár 80 napig is eltarthat (Kanai *et al.*, 2010), így a választáskori újracsoportosításkor, vagy gyengébben fejlett malacok fiatalabb malacok közé való visszacsoportosításakor a vírusürítő sertések fogékony állatokkal való összekeverésének van a legnagyobb szerepe a fertőzés terjedésében és fenntartásában a sertés koprofág viselkedése vagy a vírustartalmú bélsárral szennyezett takarmány felvétele miatt (Gonzalez *et al.*, 2006, Bouwknegt *et al.*, 2008, Casas *et al.*, 2009).

A vírustartalmú bélsárral való érintkezés útján való fertőződést támasztja alá vizsgálatunknak azon része, melyben takarmány- és rágcsálóminták vizsgálatával azt az elméletet szerettük volna bizonyítani, hogy a telepeken a fertőzést a rágcsálók, és a rágcsáló-bélsárral szennyezett takarmány tartja fent (Favorov *et al.*, 2000). A legtöbb hazai sertés- és szarvasmarhatelepen jelen vannak azok a *Rattus* genusba tartozó patkányok (*R. rattus*, *R. norvegicus*), amelyek a legfogékonyabb rágcsálóknak bizonyultak a HEV-fertőzésre (Johne *et al.*, 2010). Ezek bélsárjukkal kontaminálhatják a takarmányt, ami ismételt vírusforrást jelent (Favorov *et al.*, 2000). Habár a megvizsgált takarmányminták egy részében találtunk rágcsáló bélsarat, ami arra utal, hogy a sertéstelepeken előforduló egereknek, illetve patkányoknak lehetőségük van kontaminálni a takarmányt, sem a tápminták, sem a rágcsáló máj- és bélsárminták nem tartalmaztak HEV nukleinsavat kimutatható mennyiségben. E mellett a patkányokból kimutatott vírusok molekuláris biológiai vizsgálatának eredményei szerint a rágcsálóknak fertőzést okozó hepatitis E vírusok genetikailag nagyobb mértékben különböznek az embereket fertőző, élelmiszer-termelő fajokból származó vírusoktól, olyannyira, hogy a patkány-eredetű vírusokat egyik eddig ismert HEV genocsoportba sem lehetett teljes bizonyossággal besorolni (Johne *et al.*, 2010). A rágcsálók fertőzés-közvetítő szerepe gyanújának tisztázásához ezért további vizsgálatok szükségesek.

### **8.2.2. A sertések fertőzöttségének élelmiszer-higiéniai jelentősége**

Az emberi megbetegedés szempontjából a hízó II. korcsoport HEV-fertőzöttsége a legfontosabb. Ebbe a kategóriába a vágásra kerülő állatokat és a tenyészállatokat (kocák, kanok) soroltuk. Az 55 hízó II. korcsoportba tartozó állat közül 54 hasznosítását sikerült meghatározni: 16 vágóállat, 25 koca, és 13 kan tartozik ebbe a csoportba. A kanok közül 11 kiállításra is bemutatott tenyészállat,

míg 2 tenyészkoca a részletesen is vizsgált Zala megyei telepekről származik. A tenyészkocák bélsármintájában HEV RNS-t nem mutattunk ki. A 25 tenyészkoca közül 4 egy Vas megyei sertéstelepről származik: az erről a telepről származó többi, más koresoportoktól vett minta is negatív. A 21 további koca a Zala megyei telepekről származik, közülük mindössze egy koca bélsárában mutattunk ki HEV RNS-t, ami a vizsgált kocák 4%-ának fertőzöttségét jelenti.

A valódi humán egészségügyi kockázatot jelentő vágóállatok közül 16-ot vizsgáltunk. Közülük 4 bizonyult vírusürítőnek (25%), ugyanarról a telepről származtak. A mintavétel időpontjában mind a 4 vírusürítő vágóállat a hízó II. technológiai szint kezdetén állt (50 kg-os állatok). Ha a bélsárral való vírusürítés kb. 1 hónapos időtartamát vesszük alapul, feltételezhetjük, hogy ezek a sertések nagy valószínűséggel nem ürítenek már vírust a bélsarukkal, amikor vágóhídra kerülnek.

Egy taiwani vizsgálat (Wu *et al.*, 2002) eredményei hasonlóak saját eredményeinkhez. A szérumból RT-PCR vizsgálatával a szopós malacokban nem mutattak ki viraemiát, a 8 hetes malacokban volt a legmagasabb a viraemiás egyedek aránya (4,5%), a 2-5 hónapos növendékekben alacsonyabb (1,3%), az 5 hónapnál idősebb véghízókban pedig csak 0,8%. Bélsárral történő vírusürítést is csak a növendék- és véghízó csoportban tapasztaltak. Egy kanadai kísérlet (Leblanc *et al.*, 2007) némiképp eltérő eredményeket hozott. Ennek során egy malacnevelő telepen 2 hetesen választott malacokat vizsgáltak. A bélsárból és a szérumból vírus-nukleinsav kimutatást, valamint szerológiai vizsgálatot a malacok 2, 8, 18 és 22-29 hetes korában végeztek. A legmagasabb arányú vírusürítést (86,2%) 18 hetes korban találták, továbbá nagyarányú vírusürítést találtak a véghízók között is (41,2%). Ez a nagyüzemi vizsgálat arra enged következtetni, hogy a HEV eredményezett étel- és munkabiztonsági- és munkaegészségügyi kockázat korai választás esetében sokkal nagyobb, mivel emiatt a fertőzés lassabban ér végig az állományon, így a sertések egy része véghízó korában fertőződik, lesz viraemiás, és ürít vírust.

Habár a szakirodalomban számos adat található kísérleti fertőzések nyomomonkövetéséről (Halbur *et al.*, 2001; Meng, 1998), olyan adat, hogy a sertésmáj vagy -hús a fertőzést követően milyen időtartamon belül tartalmaz HEV partikulákat, és melyik az az időpont, amikor a sertés szervezetéből az immunválasz hatására kiürül a hepatitis E vírus, és ezáltal a fertőzést követően mennyi idő múlva lesz újra biztonságos és HEV mentes a sertéshús, nem található. Ezért étel- és

biztonsági szempontból nem lehet irodalmi adatokra támaszkodva bízni abban, hogy a hízó II. technológiai szakasz kezdetén vírusűrítő sertések mája és húsa az állatok vágóhidra kerülése időpontjában már nem tartalmazza a kórokozót. Egy közelmúltban megjelent publikációban közölt eredmények szerint vágóhídon vett különböző szervminták real-time RT-PCR módszerrel történő vizsgálatában a sertések izomszövetében nem mutatták ki a vírus jelenlétét. A vizsgált 43 állat közül azonban 14 állatban a májból, májkapui nyirokcsomóból, az epéből és epehólyagból, illetve 6 állat bélsarából is kimutatható volt a HEV nukleinsava. A 14 fertőzött állat közül egy sertés esetében a tonsilla nagy mennyiségben, illetve a vérsavó is tartalmazott vírus nukleinsavat, azaz ez az állat a vágóhidra kerülés időpontjában viraemiás volt (Leblanc *et al.*, 2010). Más szakirodalmi adatok szerint a vizsgált, emberi fogyasztásra szánt sertéshúsból vett minták 50%-ában kimutatták a HEV jelenlétét, s az izomszövetben a vírusűrítés kezdetétől számított 4 hétig kimutatható volt a vírus (Bouwknegt *et al.*, 2009). Kereskedelmi forgalomban kapható sertésmájak RT-PCR vizsgálatával Indiában a minták 0,83%-ában, Japánban 1,9%-ában, Hollandiában 6,5%-ában míg az Egyesült Államokban a minták 11%-ában mutatták ki a HEV nukleinsavat (Yazaki *et al.*, 2003; Bouwknegt *et al.*, 2007; Feagins *et al.*, 2007; Kulkarni és Arankalle, 2008). Egy németországi vizsgálat során is találtak összefüggést a sertés belsőségek, illetve nem megfelelően hőkezelt sertés- és vaddisznó hús fogyasztása és az emberi HEV-fertőzések között (Wichmann *et al.*, 2008). Mivel sertések esetében szerológiai vizsgálatok elvégzésére nem volt alkalmunk, ezért vizsgálataink alapján azt bizonyítani nem lehetett, hogy a Hízó II. korcsoportban vizsgált, nem vírusűrítő állatok mindegyike átesett-e már korábban a fertőzésen, azaz, hogy a vágóhidra kerülő állatok között viraemiás fázisban levő fertőzött állat nem volt. A sertések vágáskori fertőzöttségét azonban Magyarországi vizsgálatok is bizonyítják, melyekben a felderített étel-miszer-közvetítette fertőzések közül 4 esetben házi sertésvágásból származó, nem hőkezelt hús- és kolbászaru, míg egy esetben „részlegesen kisütött” malac volt azonosítható a fertőzés forrásaként (Reuter *et al.*, 2009a).

A szakirodalmi adatok és saját vizsgálataink eredménye szerint tehát előfordulhat, hogy a vágásra kerülő állatok egy része vírusűrítő, vagy éppen viraemiás. Emiatt fokozottan ügyelni kell mind a vágóhídi higiénéjára, mind pedig a sertés hús (különösen máj) fogyasztásra való előkészítéskor a megfelelő hőkezelésre, illetve a nyersen fogyasztásra kerülő élelmiszerek (pl. saláta)

sertéshússal való kontaminációjának elkerülésére. A HEV-fertőzés fecal-oral terjedése azt jelzi, hogy a vírus ellenáll az emésztőtraktusra jellemző savas, illetve enyhén lúgos kémhatásnak. HEV-pozitív sertés bélsár hőkezelésével azt találták, hogy a vírus 56 °C-on ellenálló, ám 60 °C-on majdnem teljesen inaktiválható (Emerson *et al.*, 2005). Sertés máj hőkezelésének vizsgálatokor a különböző hőkezelési típusok közül az 5 percig tartó vízben való forralás vagy 191 °C-on olajban való sütés (kevergetéssel, maghőmérséklet kb. 71 °C) eredményezte a vírus 100%-os inaktiválását, míg 56 °C-on 60 percig való inkubálás után a vírus fertőzőképes maradt (Feagins *et al.*, 2008). A kísérletek eredményei szerint nem csak a hőmérsékletnek, hanem a hőntartás időtartamának is szerepe van a vírus inaktiválásában, továbbá feltételezhető, hogy a vizsgálatban alkalmazott 0,5-1 cm<sup>2</sup>-nél nagyobb húsdarabok esetében a vírus inaktiválásához magasabb hőmérséklet, vagy a biztonságosnak talált minimum 71 °C-os maghőmérséklet mellett hosszabb idő szükséges (Feagins *et al.*, 2008). A HEV a sertéshús hőelvonásos tartósítása, illetve nyers húskészítmények előállítására és tárolása során bekövetkező inaktiválódását eddig még nem vizsgálták.

### **8.3. A HEV kimutatása sertésmájban és bélsárban**

Kutatásaink során 42 sertés esetében párhuzamosan vizsgáltunk máj- és bélsármintákat annak érdekében, hogy felderítsük, melyik minta vizsgálatával mutatható ki biztosabban a sertés HEV-fertőzöttsége. Fertőzési kísérletek publikált eredményeiből tudjuk, hogy kontakt fertőzés esetén a bélsárral való vírusürítés a fertőzést követő 7. nap körül kezdődik, a viraemiás fázis pedig a fertőzést követő 20. naptól alakul ki. A bélsárban kb. 3 hétig figyelhető meg a vírusürítés, míg a viraemia mindössze kb. 10 napig tart (Kasorndorkbua *et al.*, 2004; Bouwknegt *et al.*, 2009). A bélsárban a fertőzés két szakaszában is kimutatható a HEV nukleinsav: a fertőződéskor, amikor a szájon át felvett virionok egy része közvetlenül a bélsárral ürül, majd később, a vírusszaporodás megkezdődése után, amikor a májból, a szaporodás fő helyéről az epével jut a vastagbélbe a vírus (Lee *et al.*, 2009).

Eredményeink (VI és XI. táblázat) hasonlóak a szakirodalomban publikált korábbi vizsgálatok eredményeivel: de Deus és munkatársai (2007) vizsgálatában 24 állatból 11 bizonyult negatívnak. A máj vagy a bélsár HEV pozitivitása alapján fertőzöttnek nyilvánított sertések között 9 esetben mutattak ki HEV RNS-t a májban,



8 esetben a bélsárban: 4 állat esetében mindkét mintában, 5 állat esetében csak a májban, 4 állat esetében pedig csak a bélsárban mutatták ki a vírust. Egy másik, szintén de Deus és munkatársai (2008a) által végzett vizsgálatban 20 vizsgált állatból 10 májában és 13 bélsárában mutattak ki HEV nukleinsavat. Saját vizsgálataink eredményei és a szakirodalomban publikált adatok alapján nem találtunk egyértelmű különbséget a párhuzamosan vizsgált máj- és bélsárminták pozitivitása között, azaz mind a máj, mind a bélsár vizsgálata alkalmas és megbízható eredményt ad a sertések fertőzöttségének kimutatására. A sertéstelepi fertőzöttség vagy az egyes korcsoportok fertőzöttségének mértékét élő sertések esetében a bélsár vizsgálatával is meghatározhatjuk, étel-miszer-higiéniai vizsgálatok (kiegészítő mikrobiológiai húsvizsgálat) során pedig, ahol a bélsár vizsgálatára a vágási technológia és higiéniai előírások miatt nincs lehetőség, a máj vizsgálata megbízható eredményt ad a sertés és a sertés hús esetleges HEV-fertőzöttségéről.

#### **8.4. A HEV elterjedtsége vadon élő állatokban**

A vadon élő állatok húsának fogyasztása az Föld számos országában nagy népszerűségnek örvend. Habár ezen állatok zsigereinek (pl. máj) fogyasztása ritkább, mint a húské, több esettanulmány ismerteti a HEV-fertőzött, nem megfelelően hőkezelt vad-eredetű élelmiszerek fogyasztásával összekapcsolható humán megbetegedéseket (Takahashi *et al.*, 2004, Tei *et al.*, 2004). E tanulmányok szerint az emberi táplálkozásban szerepet játszó, HEV-fogékony vadállatok (vaddisznó, őz, szarvas) húsának fogyasztása során a hepatitis E vírus állatokról emberekre terjedhet. Japán étkezési szokásokkal ellentétben, hazánkban a vadhúst döntően hőkezelést követően fogyasztják, azonban a vadon élő HEV-rezervoárok nemcsak a háziállatok, de hússal, bélsárral való érintkezés következtében az erdészek, vadászok és vad-vágóhidon, vad-feldolgozóban alkalmazott emberek lehetséges fertőzési forrásai lehetnek.

Vizsgálataink szerint a magyarországi vaddisznó populáció HEV-fertőzöttsége, más országokban végzett vizsgálatok eredményeivel összehasonlítva, közepes. Az egyes országokban a vaddisznók fertőzöttségének mértéke eltérő. Olaszországi kutatásokban a vizsgált 88, vaddisznóból származó epeminta 25%-ában, spanyolországi tanulmányokban a vizsgált 150 szérumminta 20%-ban mutattak



ki HEV nukleinsavat (Martelli *et al.*, 2008; de Deus *et al.*, 2008b). Ezzel szemben Japánban, 2001 és 2004 között gyűjtött vaddisznó minták 3%-a (Michitaka *et al.*, 2007), a Dél-Franciaországban gyűjtött vaddisznó minták real-time PCR módszerrel való vizsgálatában pedig a vaddisznók mindössze 2,5%-a bizonyult HEV-pozitívnak (Kaba *et al.*, 2009). Németországban két alkalommal is végeztek hasonló vizsgálatokat: 1995-1996 között gyűjtött savóminták mindössze 5%-ában (Kaci *et al.*, 2008), míg a 2005 és 2008 között Németország két tartományában gyűjtött vaddisznómáj-minták 15%-ában (Schielke *et al.*, 2009) mutatták ki a HEV RNS-t. E két vizsgálat eredményének különbözőségét az archivált savóminták vizsgálatának esetleges problémái is okozhatják: a viraemiás szakasz rövidege miatt bizonytalanabb a HEV RNS kimutathatósága a savóban, összehasonlítva a máj- vagy a bélsármintákkal (Huang *et al.*, 2002a; Kasorndorkbua *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2005; Fernandez-Barredo *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2006; Rutjes *et al.*, 2007; Bouwknegt *et al.*, 2009), emellett pedig a minták hosszas tárolása miatt a vírus nukleinsav sérülhet, így kimutathatósága csökken.

A vaddisznó minták vizsgálata nem csak élelmiszer-higiéniai szempontból, hanem állategészségügyi szempontból is fontos lehet. Egyes vírusok esetében feltételezik, hogy a házisertések vaddisznóktól fertőződhetnek (Meng *et al.*, 2009). A Magyarországon vizsgált vaddisznó és sertés minták földrajzi eredete nem egyezik, s a vizsgált vaddisznók és sertések közt járványtani kapcsolatról nincs információnk. Emellett Európában a vaddisznó populációk mérete folyamatosan nő (Schielke *et al.*, 2009), a vaddisznók akár városi környezetben is előfordulhatnak, s az emberekkel való közvetlen érintkezésük során zoonotikus kórokozók terjesztésében is szerepet játszanak (Jansen *et al.*, 2007). Vaddisznó hús fogyasztását követően kialakuló, klinikai tünetekben is megnyilvánuló humán hepatitis E esetekről is több esetben beszámoltak már (Matsuda *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Filogenetikai vizsgálataink nagymértékű hasonlóságot mutattak ki a vadon élő és háziastított sertésekben, valamint emberekben kimutatott vírusok között. A vaddisznók HEV-rezervoár szerepe állategészségügyi szempontokból is tisztázásra szorul, illetve a vaddisznó populációk sűrűségének változásait a HEV-fertőzés fennmaradásának szempontjából további kutatásokban vizsgálni kell.

Vadon élő kérődzők esetében a HEV-fertőzöttséget nem vizsgálták olyan mélységekben, mint a sertések és vaddisznók fertőzöttségét. Japánban, ahol szokás a

szarvas húst hőkezelés nélkül fogyasztani, 100, azonos területen élő őz mintájának mindössze 1%-ában mutatták ki a HEV nukleinsavat, míg az ugyanazon területen élő vaddisznók esetében 7 mintából hármát pozitívnak találtak (Takahashi *et al.*, 2004). Egy másik vizsgálatban 4% anti-HEV szeroprevalenciát mutattak ki szarvasokban, míg a vírus nukleinsavát nem mutatták ki a szarvasokból származó savó- és májmintákban.

A vadon élő állatok esetében a HEV járványtana még tisztázásra szorul: a vírus terjedése, cirkulációja az egyes fajok és korcsoportok között nem ismert. Sajnos a vadon élő állatok populáció-méretéről európai országok és Japán esetében nem állnak rendelkezésünkre információk, így eredményeink értékelése nehézségekbe ütközik. A vizsgált állatfajok Magyarország egész területén előfordulnak, a 2008-as adatok szerint a becsült vaddisznó-populáció 95 582 egyedet számlál, míg ugyanebben az évben a szarvasállomány becsült egyedszáma 85 081, az őzállomány egyedszáma pedig 340 384 állat volt (Csányi *et al.*, 2008). A vadon élő állatokból származó minták Magyarország 4 régiójából származtak: a Nyugat-, Dél- és Észak-Magyarország területéről, illetve Közép-Magyarország és Budapest környékéről (11. ábra). Általánosságban elmondható, hogy vaddisznó mintákban mind a 4 vizsgált régióban kimutatható volt a HEV-fertőzöttség, míg Nyugat- és Észak-Magyarországról származó őz- és szarvas minták is fertőzöttnek bizonyultak. A vadon élő állatok között a házisertéshez hasonlóan a vaddisznó lehet a vírus fő rezervoár faja. Elképzelhető, hogy a vadon élő kérődzők a téli etetőhelyek környékén fertőződnek a vírusürítő vaddisznók bélsarával kontaminált takarmány felvételével (Bao *et al.*, 2005; Lescano *et al.*, 2007). A vadon élő állatok nagyobb csoportokba rendeződése a téli időszakban jellemző viselkedés (Bao *et al.*, 2005), s a téli etetőhelyek környékén mind a vaddisznók, mind a vadon élő kérődzők megfordulnak. A vírusürítő egyedek bélsarukkal kontaminálhatják a takarmányt, különösen, ha annak kihelyezése a talajra történik. Bár kérődzők esetében a koprofágia nem jellemző (Lescano *et al.*, 2007), a téli időszakban az őzek és szarvasok mégis felvehetik a bélsárral kontaminált takarmányt. Ezt az elméletet a kutatásainkban vizsgált, fertőzöttnek bizonyult állatok kilövésének időpontja is alátámasztja: a fertőzött vaddisznók és szarvasok, illetve 5 fertőzött őz kilövése februárban, míg 4 fertőzött őz kilövése áprilisban történt. Az októberben kilőtt állatok (13 vaddisznó, 1 őz) mindegyike HEV-negatívnak bizonyult. Elméletünk

bizonyítására, illetve a vadon élő állatokban a HEV-fertőzés lefolyásának tisztázására további vizsgálatok szükségesek.

Kutatásainkban, a sertéslepekhez hasonlóan, természeti élőhelyekről származó kisemlősök máj- és bélsármintáit is vizsgáltuk, azonban, ahogy a sertéslepeken gyűjtött patkány és egér minták negatívnak bizonyultak, úgy nem lehetett kimutatni a HEV nukleinsavat sem hörcsög, sem cickány mintákból. Kínai vizsgálatokban szerológiai áthangolódást figyeltek meg nyulakban a HEV 1. és 4. genocsoportjába tartozó vírusokkal való kísérletes fertőzés eredményeképpen (Ma *et al.*, 2010). Ugyancsak Kínában bizonyították a HEV jelenlétét nyulakban, azonban a molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei szerint a nyulakban természetes fertőzést okozó vírusok – a patkányokból kimutatott vírusokhoz hasonlóan – nem mutatnak hasonlóságot az emberekben és élelmiszer-termelő állatokban kimutatott vírusokkal, illetve a nyúl eredetű hepatitis E vírusok nem sorolhatók be a HEV eddig ismert genocsoportjaiba (Zhao *et al.*, 2009; Johne *et al.*, 2010). Ezt az elméletet, illetve a kisemlősök HEV-fertőzés közvetítő szerepét további vizsgálatokkal kell bizonyítani.

### **8.5. A HEV elterjedtsége házi kérődzőkben**

A fő rezervoár fajoknak tekintett állatokon kívül más állatokat is hepatitis E - fogékonyak találtak (Meng, 2005). A vadon élő kérődzőkhöz hasonlóan házi kérődző állataink is fertőződhetnek hepatitis E vírussal: Szomáliában, Tadzsikisztánban és Türkmenisztánban a szarvasmarhák 29-62%-ában HEV-szeropozitivitást mutattak ki. Ukrajnában a vizsgált szarvasmarhák 12%-a, Indiában 4-7%-a, Kínában 6%-a szeropozitív (Arankalle *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Kecskékben és juhokban 0,6-1,92%-os szeropozitivitást írtak le (Peralta *et al.*, 2009a). A hazai házi kérődzők körében végzett felmérés során a hepatitis E vírus 125 szarvasmarha, 1 juh és 5 kecske bélsárminta egyikében sem volt jelen kimutatható mennyiségben.

A vadon élő kérődző állatok májmintáinak pozitivitása, és a szakirodalomban publikált szerológiai áthangolódás mértéke egyértelműen jelzi a fertőzés lehetőségét kérődzőkben. Egyes, bélsárral ürülő paraziták járványtana párhuzamosságot mutathat a HEV-fertőzés kérődzők közötti terjedésében: mivel a kérődző állatok általában nem koprofágok, a bélsárral való vírusfelvétel inkább véletlenszerűnek tekinthető, a

takarmány bélsárral való fertőzöttségének tudható be. Ugyanakkor, mivel a kérődző állatok elkerülik a bélsárral szennyezett takarmány felvételét (Lescano *et al.*, 2007), valószínűbb, hogy csak kis mennyiségű víruspartikula juthat be az állat szervezetébe, így a részecskeszámától függően kisebb valószínűséggel ered meg a HEV-fertőzés a kérődző állatok szervezetében. Ezen kívül, Magyarországon a házi kérődzők ritkábban érintkeznek sertésekkel, esetleg vaddisznóval, azok vírustartalmú bélsarával. Bár házi kérődzők nagyszámú bélsármintáiból sem lehetett kimutatni a HEV jelenlétét, a sertések párhuzamosan vizsgált máj- és bélsármintáinak eredményeiből láttuk, hogy a negatív bélsárral azonos állatból származó máj az esetek 11%-ában pozitivitást mutatott, azaz az állat fertőzött volt. Emiatt nem állíthatjuk egyértelműen, hogy a házasított kérődző állatok nem fogékonyak a HEV-fertőzésre, illetve, hogy a szarvasmarha-, juh-, és kecskehús feldolgozása és fogyasztása HEV-szempontról nem jelent élelmiszer-higiéniai, közegészségügyi vagy akár munka-egészségügyi kockázatot. A Magyarországon tartott kérődző állatok HEV-fertőzöttségének felderítése és bennük a fertőzés lefolyásának vizsgálata későbbi tanulmányok témájául szolgálhat.

## **8.6. Szerológiai vizsgálatok**

A sertések hepatitis E vírus fertőzöttsége munkaegészségügyi szempontból jelentős fontosságú kockázat lehet. A fertőzött sertésekkel, sertés hússal, bélsárral való érintkezés során a személyi higiénia nem megfelelő mértékű betartása esetén történhet meg az emberek fertőződése. Több tanulmányban is vizsgálták a sertésekkel kapcsolatos foglalkozást űzők körében a HEV szeroprevalencia alakulását, az eredményeket a vírussal való fertőződés veszélyének kevésbé kitett társadalmi csoportokban mért eredményekhez viszonyítva. Kutatásaink során lehetőségünk nyílt Ausztriában gyűjtött, archivált humán savóminták vizsgálatára immunoblot és ELISA módszerrel. Az immunoblot vizsgálat eredményei részben megfeleltek várakozásainknak, hiszen a sertéssel (vaddisznóval) kapcsolatos foglalkozást űzők (sertéstelepi- sertés-vágóhídi dolgozók, állatorvosok, vadászok) körében tapasztaltunk nagyobb mértékű (23-37%) szerológiai áthangolódást, míg a kontrollcsoportokban (városi polgárok, baromfi-vágóhídi dolgozók) az anti-HEV szeropozitivitása kisebb (15-16%) volt (12. ábra). A vizsgálat eredményeinek

értékelése azonban szubjektív módon történt, hiszen a *recomBlot* HEV IgG/IgM<sup>®</sup> (Mikrogen) diagnosztikai kit immunoblot-csíkjainak szabad szemmel való elbírálása a megjelenő csíkok erősségének a pozitív kontrollhoz való hasonlósága alapján, pontozással történt. Emellett, IgM pozitív kontroll savót nem tartalmazott a kit, így jobb híján az IgG pozitív kontroll által adott csíkok erősségéhez viszonyítottuk az IgM csíkok eredményeit. Ez lehet talán az egyik oka az eredmények azon furcsaságának, hogy több foglalkozási csoportban az IgG és IgM-pozitivitás mértéke szinte megegyezik. A *recomBlot* HEV IgG/IgM<sup>®</sup> használati utasításában csak arra vonatkozólag találtunk információt, hogy a tesztsíkokra tisztított, rekombináns HEV antigéneket blottoltak, azonban, hogy ezen antigének melyik HEV genocsoportra jellemző antigének voltak, illetve, hogy az egyes eredmény-csíkok milyen antigén elleni ellenanyag jelenlétét jelzik, nem találtunk. A módszer csekély megbízhatóságát és a felhasználók esetlegesen kritikus észrevételeit talán az is jelzi, hogy a *recomBlot* HEV IgG/IgM<sup>®</sup> már nem kapható kereskedelmi forgalomban, helyette a számítógépes szoftver segítségével leolvasható és elbírálható *recomLine* HEV IgG/IgM<sup>®</sup> immunoblot kitesztet forgalmazza a gyártó cég. Ezen új kit leírásában szerepel, hogy az 1. és 3. genocsoport vírusaira jellemző antigének találhatóak a tesztsíkokra kötve, s hogy a kit megbízhatóan kimutatja mind a 4 genocsoport vírusai ellen termelődött ellenanyagok jelenlétét.

Az eredmények megerősítése érdekében az immunoblot módszerrel pozitívnak talált savómintákat, s mellettük kontrollként, néhány, az immunoblot módszerrel negatívnak bizonyult mintát ELISA módszerrel is megvizsgáltunk, anti-HEV IgM és IgG jelenlétére is. Habár a *recomWell* HEV IgG/IgM<sup>®</sup> kitesztet leírásában sem szerepel a lemezre kötött, rekombináns antigének genocsoportbeli hovatartozása, a teszt eredményének elbírálása objektív módon, az optikai denzitási értékek mérésén alapul. Az ELISA eredmények a várttól eltérően alakultak, a szeropozitivitás mértéke nem korrelált a sertésekkel kapcsolatba kerülés gyakoriságával (13. ábra). Az ELISA vizsgálattal ráadásul jóval kevesebb pozitív mintát találtunk, sőt, előfordult olyan eset is, amikor az immunoblot vizsgálattal negatívnak talált savó az ELISA vizsgálatban pozitívnak bizonyult (XVI. táblázat, Melléklet).

A két vizsgálat eredményeinek eltérésére több magyarázat is lehet, a sikertelenségért részben a tesztek kivitelezése, részben a minták minősége okolható.

A „megbízhatóként” elfogadott vizsgálati módszerben rendszerint ELISA módszerrel tesztelik először a savómintákat, majd az ELISA módszer specificitásának ellenőrzése vagy akár növelése érdekében immunoblot módszerrel erősítik meg az eredmények valóságát (Waar *et al.*, 2005; Herremans *et al.*, 2007; Haagsman *et al.*, 2007). Esetünkben a vizsgálatok sorrendje szervezési okokból fordítva történt: a forgalmazó cég eredetileg a *recomBlot* kit tesztelésére kérte fel munkacsoportunkat, s az immunoblot eredmények ellenőrzésére biztosította a későbbiekben az ELISA kiteket. Az immunoblot-vizsgálatban nagyobb mértékűnek talált szeropozitivitás kivitelezési hibája valószínűleg a szubjektív elbírálás volt, melynek megszüntetésére a gyártó cég az új, számítógéppel elbírálható *recomLine* kitek bevezetése mellett döntött. Emellett több tanulmányban bizonyították, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható HEV immunoblot csíkok és ELISA lemezek felületére 1. és 2. genocsoportba tartozó vírusok antigénjeit kötik, ezáltal a tesztek kevésbé érzékenyek, esetleg kevésbé specifikusak lehetnek a 3. és 4. genocsoportba tartozó vírusok antigénjei ellen képződött ellenanyagok kimutatásához (Wang *et al.*, 2001, Herremans *et al.*, 2007). Valószínűleg ez is indokolja, hogy a gyártó cég újonnan bevezetett *recomLine* immunoblot kitjei már az Európában elterjedt 3. genocsoport vírusaira jellemző antigéneket is tartalmaznak.

A minták minőségén is múlhat egy szerológiai vizsgálat eredménye. A vizsgált savó mintákat 1994-ben, Graz (Ausztria) környékén gyűjtötték, eredetileg más kórokozók ellen képződött ellenanyagok kimutatására. Habár a mintákat biztosító kutatók elmondása szerint a savókat -20 °C-on tárolták, a mintagyűjtéstől a vizsgálatig (2006-2007) több, mint 10 év telt el. Emellett a mintákat a korábbi vizsgálatokhoz is fel kellett, talán többször is, olvasztani. Az ELISA vizsgálatok idejére a savók több felolvasztást-lefagyasztást is elszenvedtek, ami károsíthatja a bennük levő fehérjéket, így az ellenanyagokat is (dr. Tuboly Tamás, személyes közlés). Valószínűleg ezért írja elő minden szerológiai vizsgálatra alkalmazott, kereskedelmi forgalomban megvásárolható ELISA vagy immunoblot kit lehetőleg friss vagy kevésszer felolvasztott savóminták használatát. Elképzelhető, hogy az immunoblot módszer a károsodott, széttöredezett fehérjék több darabját is megkötötte, míg az ELISA lemezen csak az inkább épségben maradt ellenanyag-fehérjék kötődtek, s ez is lehet magyarázata az eltérő eredményeknek. Az RT-PCR sikertelenségét is a hosszú tárolási idővel lehet magyarázni. A minták ismételt felolvasztása és lefagyasztása során a vírus nukleinsav olyan mértékben károsodhatott, hogy ez az



érzékeny módszer sem tudta kellő mennyiségben felerősíteni. Vizsgálatunk tanulsága, ennek megfelelően, hogy ne csak érzékeny, hanem kellően specifikus, objektíven elbírálnakó módszereket alkalmazzunk a kutatások, és ezen belül a szerológiai vizsgálatok során, valamint, hogy friss mintákkal dolgozzunk, vagy a vizsgálatok során igyekezzünk megőrizni a minták minőségét.

Habár saját, archivált savómintákból kiinduló vizsgálataink nem támasztották alá egyértelműen azt a feltételezést, hogy a sertésekkel való gyakoribb kapcsolat kockázatot jelent a hepatitis E vírussal való fertőződés szempontjából, irodalmi adatok számos, hasonló vizsgálat eredményeiről számolnak be. Egyes vizsgálatok szerint a sertéstelepeket ellátó állatorvosok nagyobb eséllyel fertőződhetnek meg a vírussal, szemben olyan emberekkel, akik foglalkozásuk révén kevesebbszer kerülnek kontaktusba HEV-fertőzött állatokkal (Meng *et al.*, 2002). Egy ELISA módszeren alapuló svédországi tanulmány szerint az Európai országokban <1% - 9,3% az átlagos populáció anti-HEV szeroprevalenciája, ezzel szemben a svéd sertéstartók körében 13%-os szeropozitivitást mutattak ki (Olsen *et al.*, 2006). Egy spanyolországi tanulmány is alátámasztja ezt az eredményt: a vizsgálatban résztvevő személyek 51%-a gyakori kapcsolatban állt sertésekkel. Ebben a csoportban a szeroprevalancia 18,8%-os volt, szemben a sertésekkel nem érintkező vizsgálati csoport 4,1%-os szeroprevalenciájával (Galiana *et al.*, 2008). Mindezen adatok azt sugallják, hogy a sertésekkel kapcsolatos foglalkozást űzők (sertéstelepi gondozók, vágóhídi dolgozók, állatorvosok, esetleg konyhai dolgozók) körében a hepatitis E foglalkozási betegségként fordulhat elő, ezért a dolgozók egészségvédelme érdekében különös figyelmet kell fordítani a munkahelyi és személyi higiénára. Érdekesség, hogy bár egy, az Egyesült Királyságban végzett vizsgálatban a kisállat (kutya, macska) tartást a HEV-fertőzés szempontjából rizikófaktornak találták a fertőzött nyers hússal való érintkezés miatt (Lewis *et al.*, 2008), a német kutatók eredményei ezzel ellenkeznek. Az utóbbiak feltételezése szerint egyrészt a húsevési szokások a macskatulajdonosok körében a macskát nem tartók szokásaitól eltérőek, másrészt, mivel a macskát tartók kedvenceiket nyers hússal etetik, a fertőzött hússal való érintkezés során felvett kis mennyiségű víruspartikulával való fertőzödést követő tünetmentes átvészelés során szerológiailag áthangolódnak, s ezáltal a hepatitis E-fertőzéssel szemben ellenállóvá válnak (Wichmann *et al.*, 2008).



## 8.7. Törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatok

A hazai házisertésekből, vaddisznókból és vadkérődzőkből kimutatott hepatitis E genetikai jellemzése, valamint a hazai humán esetekből származó vírusok és más országokban kimutatott vírusok közötti rokonsági viszonyok megállapítása céljából néhány vírust kiválasztottunk, és törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatoknak vetettük alá. A szélesebb körű elemzést a „diagnosztikai” ORF2s1-ORF2a1 és ORF1s1-ORF1a1 primerpárokkal előállított PCR termékek szekvencia meghatározásával kezdtük. Ezek a szakaszok, különösen az ORF2 régió előállított termékek (197 bp) meglehetősen rövidek a megbízható filogenetikai vizsgálatokhoz, azonban ezeket a primerpárokat a világ több HEV-kutató laboratóriumában alkalmazzák diagnosztikai vizsgálatokhoz, így a génbanki adatbázisokban elhelyezett, Európában kimutatott HEV szekvenciák is többségében ezekkel a primerpárokkal készültek. Ezért a magyarországi hepatitis E vírusok filogenetikai besorolását is e szekvenciák alapján végeztük el.

A szekvenciák alapján elsőként elvégzett BLAST elemzés alapján mindegyik szekvencia HEV szekvenciának bizonyult, a törzsfa-rekonstrukciós vizsgálat pedig kimutatta, hogy a Magyarországon állatokban előforduló hepatitis E vírusok a HEV 3. genocsoportjába tartozó vírusokkal mutatják a legközelebbi rokonságot. A vizsgálatok során 29 minta ORF2s1-ORF2a1 primerrel előállított termékből, illetve öt minta ORF1s1-ORF1a1 primerrel előállított termékéből készült szekvenciát használtunk fel a részletesebb filogenetikai elemzésekhez.

Az ORF2s1-ORF2a1 primerpárok egy 197 bp hosszú amplikont állítanak elő, melyből szekvenálás után 147 nt hosszú szekvencia nyerhető. A filogenetikai vizsgálatokban készített, az ORF2s1-ORF2a1 szakasz alapján felállított, törzsfa (14. ábra) az alacsony bootstrap értékek ellenére jól illusztrálja a kimutatott vírusok rokonsági viszonyait. E szerint az ORF2 vizsgált szakasza, változékonysága miatt, felhasználható a különböző hepatitis E vírusok genocsoporton belüli besorolására. A Lu és munkatársai (2006) által felállított rendszer alapján a HEV 3. genocsoportja további 10 alcsoportra osztható. A „d” alcsoport képviselői közül a génbankban nem lehet sem teljes szekvenciát, sem az ORF2s1-ORF2a1 vagy ORF1s1-ORF1a1 primerpárok által amplifikált genomszakaszoknak megfelelő szekvenciát találni, ezért vizsgálatunk során ezt az alcsoportot nem ábrázoltuk a törzsfán.

A 3a alcsoportban található vaddisznó és sertés eredetű vírusok közt, a nagyfokú hasonlóság ellenére, adataink szerint sem földrajzi, sem járványtani kapcsolat nem volt, így azt a feltételezést, hogy esetleg vaddisznók közvetíthetik a HEV-fertőzést a háziastott sertések felé, eddigi vizsgálatainkban nem tudtuk sem bizonyítani, sem kizárni. Az eredményeink alapján készített törzsfán a 3a alcsoportban a fentiek mellett Hollandiában, Dél-Koreában és az Egyesült Államokban kimutatott sertés-, illetve Japánban kimutatott emberi eredetű vírusok találhatóak. Az ORF2 régió más szakaszainak vizsgálata során az előbbieket mellett Németországban, emberi eredetű mintákban kimutatott hepatitis E vírusokat is a 3a alcsoportba sorolnak (Wichmann *et al.*, 2008). A Magyarországon kimutatott emberi és állati vírusok, illetve a magyarországi és más országokban kimutatott vírusok közötti járványtani kapcsolatról nem áll rendelkezésre információ.

A vizsgálataink során kimutatott állati eredetű vírusok egy másik nagy csoportja a 3. genocsoport „e” alcsoportjában található (HEV072, 045, 088, 157, 446, 278, és 451). Ezek a vírusok egy fő ágon elhelyezkedve négy csoportot alkotnak. A HEV072 jelű, sertésből kimutatott vírus elkülönül a „magyarországi ág” többi tagjától, míg a többi vizsgált vírus Magyarországon, emberi mintákból kimutatott vírusokhoz hasonlít legjobban. A HEV045 jelzésű, őz eredetű vírus szekvenciája identikus egy emberi szekvenciával (HUN-E104), azonban közöttük járványtani kapcsolat nem volt, a beteg, akinek mintájából a HUN-E104-es vírust kimutatták, nem érintkezett őzekkel (dr. Reuter Gábor, személyes közlés). Mivel a mintákat két különböző laboratóriumban mutatták ki és szekvenálták meg, a vizsgálat során fellépő esetleges kontamináció sem jöhet szóba a vírusszekvenciák identikusságának magyarázataként.

A 3e alcsoportban a magyarországi vírusokon kívül egy Japánban kimutatott, emberi eredetű szekvencia, és további európai (Görögország - ember és Egyesült Királyság - sertés) eredetű vírusok találhatóak. A HEV278 jelzésű vírus kimutatási helyével azonos sertésstelepen, azonban kb. másfél évvel később mutattuk ki a HEV446 és HEV451 jelzésű vírusokat. E három vírus azonos ágon helyezkedik el a fán, egy csoportot alkotnak. A HEV446 és HEV451 jelzésű vírusok egy-egy (különböző) pozícióban, nukleotid-szubsztitúció révén különböznek a HEV278 jelzésű vírustól. Mindkét pontmutáció néma mutációt jelent, a három vírus aminosav-szekvenciája a vizsgált szakaszon megegyezik. Habár korábbi vizsgálatban

a sorozatos passzálások során is stabilnak mutatkozott a kutatásban használt vírus genetikai állománya (Arankalle *et al.*, 1999), eredményeink szerint egy sertéstelepen másfél év alatt a HEV több genetikai variánsa is kialakulhat, illetve egy időben különböző nukleotid-szekvenciájú vírusok is jelen lehetnek az adott sertésállományban. A HEV088 jelzésű, sertés eredetű, és a HEV157, szarvasból kimutatott vírus nagyfokú hasonlóságot mutat. A két vírust ugyanabban az évben, azonban egymástól kb. 300 km távolságban élő állatokból mutattuk ki, a két állat között járványtani kapcsolatról nincs információnk.

A 3. genocsoport „h” alcsoportjába 3 teljesen identikus szekvenciájú vírus tartozik. Ezeket a vírusokat egy időben, ugyanazon a sertéstelepen mutattuk ki, ezért a három vírust a HEV612 jelzésű vírus képviseli a törzsfán. Az Észak-Kelet Magyarországon kimutatott vírus Új Zélandon (sertés mintából) és Németországban (vaddisznó mintából) kimutatott vírusokkal mutat nagyfokú hasonlóságot.

További magyarországi HEV törzsek is megtalálhatók a törzsfán, azonban ezek emberi eredetűek. Két (identikus) vírus (HUN-E67 és HUN-E86) a 3. genocsoport „f” alcsoportjában, hollandiai és spanyolországi sertés, illetve görög-, francia- és spanyolországi emberi eredetű vírusokkal együtt található, míg egy Indiából importált (Dr. Reuter Gábor, személyes közlés) vírus (HUN-E117) a Burma2 vírussal az 1. genocsoportban található.

Az ORF1s1-ORF1a1 primerekkel előállított ampikonok közül ötöt szekvenáltunk meg, melyeket felhasználtunk filogenetikai vizsgálatainkban. A PCR vizsgálatok során az ORF1s1-ORF1a1 primerpárt ellenőrzésképpen alkalmaztuk az ORF2s1-ORF2a1 primerpárral pozitívnak talált minták pozitivitásának a szekvenálásnál egyszerűbb, gyorsabb, gazdaságosabb bizonyítására. Az ORF1s1-ORF1a1 törzsfát is az ORF2s1-ORF2a1 törzsfá ellenőrzése érdekében készítettük el. Ezen a törzsfán (15. ábra) magyarországi emberi eredetű vírusokat nem tudunk feltüntetni, mert ilyen szekvenciák nem találhatóak meg a génbankban. Ez a hiányosság sajnos több más országból kimutatott vírus esetében is fennáll (P354, P143, Nagy-Britannia), sok esetben (pl. a Hollandiában kimutatott vírusoknál) amiatt, hogy ezekben az országokban az ORF1 régió más szakaszát amplifikálják és publikálják rutinszerűen. A törzsfáról azonban így is leolvasható, hogy a vizsgált állati eredetű magyarországi törzsek ezen a genomszakaszon is a korábban említett alcsoportokba tartozó vírusokkal állnak közelebbi rokonságban: A HEV072-es vírus

az ORF1s1-ORF1a1 törzsfán is 3e, míg a HEV006, 007, 034 és 039 vírusok a 3a alcsoportba tartoznak, ahol külön „magyarországi” csoportot alkotnak. A HEV072 sertés eredetű vírus a törzsfán egy, az Egyesült Királyságban kimutatott, emberi eredetű vírussal alkot egy csoportot a 3e alcsoporton belül, míg a 3a alcsoportba tartozó magyarországi, sertés és vaddisznó eredetű vírusok legközelebbi rokona egy USA-ban kimutatott emberi eredetű vírus.

A „diagnosztikai” primerpárokkal előállított ampliconok nukleotid-szekvenciáinak filogenetikai analízise alapján megállapítható, hogy a Magyarországon állatokat fertőző hepatitis E vírusok genetikailag rendkívül sokfélék. Az egyes vírusok genetikai hasonlóságának mértéke nem függ a vírusok izolálási helyének földrajzi távolságától. Egymástól néhány kilométerre fekvő sertésletelepeken kimutatott vírusok nukleotid-szekvenciái jobban különbözhetnek egymástól [HEV264 és HEV278 – 7km távolság, Zala megye], mint az egymástól nagyobb távolságban vizsgált, esetleg különböző fajú állatokból kimutatott vírusok [HEV264 és HEV480 – 38km távolság, Zala megye; HEV088 sertés (Csongrád megye) és HEV157 szarvas (Vas megye)]. Járványtani kapcsolatról a vizsgált állatok között, illetve az állati- és a más laboratóriumban vizsgált emberi minták között nem tudunk, azonban saját vizsgálataink eredményeként állatokban, illetve más vizsgálatok során emberekben kimutatott vírusok genetikai hasonlósága alátámasztja a HEV zoonotikus tulajdonságairól megfogalmazott, és humán klinikai esetek vizsgálata során jórészt bizonyított feltételezéseket (Dalton *et al.*, 2008).

Az országban előforduló HEV szekvenciák sokfélesége nem csak Magyarországra jellemző egyedi eset: németországi és franciaországi vizsgálatokban hasonlóan sokféle nukleotid-szekvenciájú, ezáltal a 3. genocsoport különböző alcsoportjaiba sorolható vírusokat mutattak ki emberekben (Wichmann *et al.*, 2008; Legrand-Abravanel *et al.*, 2009), hollandiai vizsgálatokban pedig sertésekben (van der Poel *et al.*, 2001). Ezzel szemben Spanyolországban két sertésletelep vizsgálatakor, bár nukleotid szekvenciájukban különböző vírusokat mutattak ki, ezek mindegyike a 3f alcsoportba tartozik (Peralta *et al.*, 2009b).

## 8.8. A teljes genom szekvencia analízise

Habár a HEV kimutatása klinikai, állati vagy természeti (szennyvíz) eredetű mintákból kimutatott vírusok azonosítása és genocsoportokba-alcsoportokba sorolása a diagnosztikai PCR-ekben kimutatott rövid genom szakaszok nukleotid-szekvenciájának vizsgálatával is történhet, a kutatók általában törekednek az országaikban kimutatott vírusok közül legalább egy (esetleg „reprezentatív”) vírus teljes genom szekvenciájának meghatározására és részletes analízisére (Xia *et al.*, 2008; Legrand-Abravanel *et al.*, 2009; Peralta *et al.*, 2009b; Schielke *et al.*, 2009). A teljes genom szekvenciából rendszerint több információ nyerhető, mely alapján következtetéseket lehet levonni e mai napig nem teljesen ismert biológiai tulajdonságokkal bíró vírusról. Kezdetben a teljes genom szekvencia vizsgálata a vírusgenomban kódolt fehérjék azonosítására szolgált, s a kutatók egyúttal következtetéseket is levonhattak az egyes vírusfehérjék funkciójáról (Tam *et al.*, 1991; Fry *et al.*, 1992; Jameel *et al.*, 1999), illetve a vírus szaporodási stratégiáiról (Wang *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2008b). A vírusfehérjék és funkcióik azonosításán kívül a virulenciáért és antigenitásért felelős genom szakaszokat is keresik (Inoue *et al.*, 2009), illetve a teljes genom szekvencia vagy az egyes ORF-ek vizsgálatával igyekeznek pontosítani a kimutatott vírusok genocsoportokba sorolását (Zhai *et al.*, 2006; Fan 2009).

A teljes genom szekvencia felhasználásával készített törzsfán (16. ábra) a HEV072-es vírus a 3e alcsoportban található. Ez az elhelyezkedés megegyezik a „diagnosztikai” primerpárokkal előállított szekvenciák alapján készített törzsfán megfigyelt pozícióval. A teljes nukleotid-szekvencia vizsgálata alapján a HEV072-es vírus a HE-JA04 jelű, Japánban, kimutatott emberi eredetű vírussal mutatja a legnagyobb hasonlóságot. A magyarországi vírus más európai országokban kimutatott vírusokkal való hasonlósága, bár 80% feletti, nem nagyobb, mint az Egyesült Államokban vagy a Távol-Keleten kimutatott vírusokkal való hasonlóság, a rendelkezésünkre álló szekvenciák vizsgálata alapján tehát kifejezetten „európai” vírusok létezésére nem állapítható meg.

### 8.8.1. A nyitott leolvasási keretek elemzése

A HEV pozitív irányítottságú, szimplaszálú RNS-e 3 nyitott leolvasási keretet kódol. A genom 5' végéhez legközelebb található az ORF1, melynek kezdeti szakasza 58 nukleotid hosszúságban meglehetősen konzervatív, itt másodlagos struktúrák (hairpin) kialakulásának lehetőségét feltételezik (Jameel *et al.*, 1999). Az ORF1 kb. 1700-1733 aminosavat kódol, de az egyes vírusok esetében különböző hosszúságú lehet. A genom e szakasza a nem-strukturális proteinek kódoló régiója, a kódolt fehérjék a vírus szaporodásában játszanak szerepet (metiltranszferáz, proteináz, helikáz, RNS-dependens RNS polimeráz) (Fry *et al.*, 1992; Chandra *et al.*, 2008b).

Ezen a szakaszon nukleotid szinten a HEV072 a teljes genomszekvencia esetében mérthez képest kisebb mértékben hasonlít a vizsgált vírusokhoz. Az aminosav-szekvenciák nagyobb mértékű hasonlósága arra utal, hogy a nukleotid-szubsztitúciók nagy része néma mutáció, aminosav-változást nem okoz. Az ORF1 szakaszok a különböző vírusokra jellemző eltérő hosszúsága lehet az oka annak, hogy a 3 nyílt leolvasási keret közül (a szekvenciák hasonlóságának számszerűsítése alapján) az ORF1 tűnik a legváltozékonyabbnak.

Az ORF1 szekvenciák alapján felállított törzsfán (17. ábra) az egyes alcsoportok elkülönülnek egymástól, alcsoportok összeolvadása nem figyelhető meg. A törzsfá topológiája a teljes genomszekvenciákon, illetve a diagnosztikai primerpárokkal előállított szekvenciákon alapuló fa topológiájával megegyezik. E szerint az ORF1 a genom egyik meghatározó szakasza.

Az ORF2 a strukturális fehérjék régiója, *in vitro* kísérletekben a 368-606. aminosav közötti szakaszon kódolt fehérjét találták felelősnek a sejtes immunválasz kiváltásáért (Wu *et al.*, 2008). Az ORF2 az 1., 2. és 3. genocsoport minden vírusa esetében 660, míg a 4. genocsoport esetében 672 aminosav hosszúságú. A 3. genocsoport vírusainak esetében, bármilyen hosszúságú is legyen az ORF1, közte és az ORF2 között 37 nukleotid található, mely az ORF3 kezdeti szakaszának felel meg. Az 1. és a 2. genocsoport esetében az ORF1 és ORF2 közötti szakasz 40 nukleotid hosszú, míg a 4. genocsoport esetében a genomszerkezetben eltérések mutatkoznak. Az ORF2 a ChinaT1 vírustörzs (4. genocsoport) esetében az ORF1 régió utolsó 2 nukleotidjával átfedésben van, mely átfedés az 5159. nukleotid-pozícióban található timidin (uracil) inzerciója miatt alakult ki (Wang *et al.*, 2000). A 4. genocsoport



ráadásul az ORF3 régió genombeli elhelyezkedésében is eltér a másik 3 genocsoport vírusaitól (Wang *et al.*, 2000).

A nukleotid- és aminosav-szekvenciák összehasonlítása szerint az ORF2 területen a HEV072 többi vizsgált vírus szekvenciához viszonyított hasonlósága magasabb, mint a nem-strukturális fehérjéket kódoló ORF1 esetében, azonban a genom e szakasza nukleotid szinten változékonyabb, mint az ORF3 régió. Aminosav szinten az egyes vírusok a 3 nyitott leolvasási keret közül az ORF2 régióban mutatják a legnagyobb hasonlóságot, melynek oka, hogy a konzervatív kapszid-protein domén ebben a genomrégióban található.

A vizsgált vírusok ORF2 régiójának nukleotid szekvenciái alapján készített törzsfá (18. ábra) topológiája nem egyezik meg teljes egészében a teljes genom (és az ORF1) törzsfájának topológiájával. Bár az alcsoportok összeolvadása ezen a fán sem tapasztalható, a swMN06-C1056 jelzésű, Mongóliában kimutatott vírus az „c” alcsoport helyett az „e” alcsoport vírusaihoz áll közelebb, míg a szintén 3c alcsoportba sorolt swX07-E1 vírus inkább a 3f alcsoport vírusaival mutat nagyobb hasonlóságot. A HEV072 –es vírus az ORF2 nukleotid-szekvenciák alapján készült törzsfán is az „e” alcsoportban található.

Az ORF3 az 1. és 2. genocsoport vírusai esetében 123, a 3. genocsoport esetében 122, míg a 4. genocsoport esetében 112 aminosav hosszúságú. A kódolt fehérje funkciója egyelőre nem pontosan ismert: egyes vizsgálatok szerint a kódolt fehérje esszenciális a vírus *in vivo* infektivitásához (Huang *et al.*, 2007), más vizsgálatok szerint azonban az ORF3 fehérje kifejeződése nem szükséges a vírus *in vitro* replikációjához, a virionok sejtből való kiszabadulásához vagy a májsejtek fertőzéséhez (Emerson *et al.*, 2006). Újabb kísérletek eredményei szerint az ORF3 által kódolt fehérje a fertőzött májsejtek élettartamának növelésében, ezáltal a vírus-replikáció és patogenezis támogatásában játszik szerepet (Moin *et al.*, 2007 és 2009; Chandra *et al.*, 2008a és 2010). Az ORF3 a 1., 2. és 3. genocsoportba tartozó vírusok esetében a másik két nyitott leolvasási keret között, azokkal átfedésben található. Az átfedő szakasz hossza az ORF1 esetében mindössze 1 nukleotid, az ORF2 esetében pedig hosszabb, 328 nukleotid. A 4. genocsoport esetében a 3. nyitott leolvasási keret csak az ORF2 szakasszal áll átfedésben: az ORF3 az ORF2 29. nukleotid-pozíciójában kezdődik.

A vírusok HEV072-eshez való hasonlóságának mértéke alapján az ORF3 régió területén a vírusok nukleotid szinten a legnagyobb mértékben ezen a szakaszon



hasonlítanak egymásra, míg aminosav szinten, az ORF2 régióval összehasonlítva nagyobb az eltérés a vizsgált vírusok között. Ennek magyarázata az lehet, hogy bár az ORF3 régió és a 1-3. genocsoport esetében az ORF2 régió kezdeti szakasza nukleotid szekvenciájában, az átfedés miatt megegyezik, azonban a két nyitott leolvasási keretben a frame-shift miatt az aminosavakat kódoló tripletek eltérnek egymástól. Az ORF3 régió területén emiatt a nukleotid-szinten bekövetkezett változások több esetben is a triplet 3. nukleotidját érintik, így a szubsztitúciók több esetben eredményezhettek aminosav-változást.

Az ORF3 nukleotid-szekvenciák alapján készült törzsfá (19. ábra) topológiája nagyfokú eltérést mutat az teljes genom, illetve a másik két nyílt leolvasási keret törzsfáinak topológiájához képest. Az „a”, „b” és „j” alcsoport összeolvadt, míg az swMN06-C1056 jelzésű, az ORF1 és a teljes genom szekvenciák alapján készült törzsfá szerint 3c alcsoportba tartozó vírus az ORF2 törzsfához hasonlóan ezen a szakaszon is az „e”, míg az swX07-E1 a 3f alcsoport vírusaival mutat nagyobb hasonlóságot. Az ORF3 törzsfán, összehasonlítva pl. az ORF2 fával, ahol a 0,1 egységnyi genetikai távolságot jelző skála hosszúsága megegyezik az ORF2 skálájának hosszúságával, szemmel láthatóan kisebb a genetikai távolság az egyes vírusok között, ami a nukleotid szekvenciák közötti - korábban említett - nagyfokú hasonlóság következménye.

Az egyes nyitott leolvasási kereteket értékelve megállapíthatjuk, hogy míg nukleotid szinten az ORF1 a legváltozékonyabb és az ORF3 a legkonzervatívabb szakasza a genomnak, addig aminosav szinten az ORF2 bizonyult a legkonzervatívabbnak. Azaz a nukleotid-változások legnagyobb mértékben az ORF1 szakaszon, legkisebb mértékben pedig az ORF2 szakaszon okoztak aminosav-változást. Mindkét nyitott leolvasási keret a vírusok esszenciális fehérjéit kódolja (polimeráz domének – ORF1, kapszid domén – ORF2), melyek legalább részben konzervatív szekvenciájúak. Az ORF1 szakasz változékonyságának okát a törzsfá-elemzés mellett más módszerekkel is vizsgáltuk.

### ***8.8.2. A hipervariabilis régió elemzése***

A SimPlot analízis során legvariábilisabbnak talált genomszakasz a HEV072-es vírus 1995-2380. nt pozíciói közt található. A vizsgált 35 vírus hasonlósága a

HEV072-es szekvenciához viszonyítva az 1., 2., és 4. genocsoport referencia vírusai esetében 60% alatti, míg a 3. genocsoportba tartozó vírusok esetében is 80% alatti. A változékonyság magyarázata az egyes vírusok tekintetében különböző hosszúságú nukleotid-szekvencia: a HVR-szakaszon az egyes vírusok tekintetében különböző hosszúságú nukleotid-szekvenciák inzerciója figyelhető meg, mely jelenséget eddig két vírus vizsgálata kapcsán írtak le (Inoue *et al.*, 2006b, Legrand-Abravanel *et al.*, 2009).

A HEV legkorábban kimutatott variánsai az 1. és 2. genocsoportba tartozó, vizsgálatunkban e genocsoportok reprezentatív vírusaiként felhasznált Burma2 (kimutatás éve: 1989) és Mexico (kimutatás éve: 1987) (van Cuyck-Gandré *et al.*, 2000), illetve a 3g alcsoportba tartozó Kirgizisztánban 1988-ban kimutatott Osh205 (Lu *et al.*, 2004) jelzésű vírusok. Ezen vírusok hipervariabilis régiója a legrövidebb: 347 (Mexico) és 353 (Burma2), illetve 365 (Osh205) nukleotid hosszú. Az 1. genocsoport vírusai a HVR hosszát tekintve konzervatívok, míg a 3. genocsoportba tartozó vírusok hipervariabilis régiója – hosszát tekintve is - a legvariábilisabb (X. táblázat). Bár vírusok tekintetében „ősiségről” beszélni nem minden esetben megalapozott, a HEV esetében is csak a kimutatás évéből indulhatunk ki, valójában nem tudhatjuk, melyik vírus-változat keletkezett időben hamarabb. A kimutatás éveire alapozva azonban úgy tűnik, a rövidebb hipervariabilis régió egy „ősibb” tulajdonság, a Burma2 és Mexico törzsekkel való nagyobb hasonlóságot jelenti, s az evolúció során hosszabb-rövidebb szakaszok inzertálódtak a vírusgenomba a polyproline-hinge régió területén. A 3. genocsoportban tapasztalt változékonyság azonban nem támasztja alá ezt a feltételezést: a szakirodalomban és a génbanki adatbázisban található adatok (kimutatás éve) alapján nem vonható párhuzam a hipervariabilis régió hossza és az egyes vírusok kimutatási éve között. Az egyes vírusok közötti járványtani kapcsolatról sincs információnk, így a jelenlegi adatok alapján csak „érdekes” jelenségnek tarthatjuk, hogy az 1988-ban Kirgizisztánban kimutatott Osh205 jelzésű vírus és a HE-JA10 jelzésű, Japánban 1993-ban kimutatott vírus hipervariabilis régiójának hossza között 36 nukleotid a különbség.

Az egyes vírusok törzsfákon való elhelyeződése (alcsoportokba tartozása) sem korrelál a hipervariabilis régió hosszával (X. táblázat). Egyes alcsoportok (3b és 3h) HVR-hossz tekintetében egységesekek, míg más alcsoportok (3a, 3f, 3e) tagjainak HVR hossza között 3-87 nukleotid is lehet a különbség. A hipervariabilis régió

hossza a kimutatás helyével sem mutat párhuzamot, pl. a Spanyolországban, azonos évben (2008) kimutatott két vírus (SWP7 és SW627) HVR szakasza is különböző hosszúságú: az SWP7 vírus 473 nt hosszú hipervariabilis régiójával az egyik leghosszabb a vizsgált 35 hepatitis E vírus közül, míg az SW627 jelű vírus hipervariabilis régiójának hossza megegyezik a Magyarországon kimutatott víruséval.

A HVR régió hossza nem korrelál a kimutatott HEV gazdafaji eredetével sem: igaz ugyan, hogy a 386 nukleotid hosszú HVR-rel rendelkező HEV072 (3e alcsoport, Magyarország), SW627 (3f alcsoport, Spanyolország), swX-07-E1 (3f alcsoport, Svédország), és swHEV07 (3f alcsoport, Thaiföld) vírusok mindegyikét sertés mintákban mutatták ki, mind a hosszabb, mind a rövidebb hipervariabilis régiójú vírusok között vannak humán és állati eredetű variánsok is.

A HVR régió, és a PPH doménon kódolt fehérje funkciója egyelőre ismeretlen. Egér leukémia vírusok esetében a szintén hipervariabilis PPH régiót a vírus sejtbe való bejutásának pH-függőségével hozták kapcsolatba (Nussbaum *et al.*, 1993), más adatok szerint e vírusok esetében egy mesterségesen genomba inzertált extra PPH régió megváltoztatta a vírus infektivitását és gazdafaj-spektrumát (Valsesia-Whittmann *et al.*, 1996). Rubeola vírusok genomjuk hipervariabilis régiójának törlése után is képesek voltak replikálódni (Tzeng és Frey, 2003). A HEV esetében is végeztek hasonló vizsgálatokat, melyek eredménye szerint a vizsgálatban alkalmazott 1. genocsoportba tartozó vírus HVR régió hiányában *in vitro* nem volt képes replikálódni, míg ha egy 3. genocsoportba tartozó vírus genomjából törölték a HVR régiót, a vírus *in vivo* késleltetett szerokonverziót okozott, kimutatható viraemia vagy bélsárral történő vírusürítés nélkül (Pudupakam *et al.*, 2009).

Feltételezhetjük, hogy a hipervariabilis régió esetleg a HEV különböző variánsainak virulenciájával áll összefüggésben. Inoue és munkatársai (2009) fulmináns hepatitiszes eseteket vizsgálva azt találták, hogy abban az esetben, ha a vírusgenom bizonyos nukleotid-pozícióiban meghatározott nukleotidok találhatók (3148. nt. pozíció – uracil; 5907. nt pozíció – citozin; AB097812 – HE-JA1 jelű vírus, X. táblázat) a fulmináns hepatitis kialakulása statisztikailag valószínűbb, mint abban az esetben, ha ezen nukleotid pozíciókban más nukleotidok találhatók.

**X. táblázat** A HVR régió hossza és a fulmináns klinikai forma kialakulásáért felelősnek tartott nukleotid-szubsztitúciók összefüggése. Félkövér: a Magyarországon kimutatott vírus. Dölt: az 1., 2. és 4. genocsoport képviselői. Piros: fulmináns klinikai tünetekből kimutatott vírusok. Kék: a legkorábban kimutatott vírusok. A táblázatban szereplő vírusok részletes adatait a XVII. táblázat (Melléklet) tartalmazza.

Vírus	Genocsoport és alcsoport	HVR hossza		Nukleotid-szubsztitúció			
		nukleotid	aminosav	3148. nt	kódolt aa	5907. nt	kódolt aa
SWP7/sw/ESP-08	3f	473	157	g	Val	a	Ile
TLS25/hu/FRA-08	3f	473	157	g	Val	a	Ile
HE-JA04/hu/JPN-04	3e	425	141	g	Val	g	Val
HE-JA10/hu/JPN-93	3a	401	133	g	Val	u	Ile
JMY-Haw/hu/JPN-01	3a	401	133	g	Val	u	Ile
JKN-Sap/hu/JPN-01	3a	401	133	g	Val	u	Ile
Arkell/sw/CAN-02	3j	398	132	g	Val	u	Ile
US2/hu/USA-96	3a	398	132	g	Val	u	Ile
swKOR-1/sw/KOR-07	3a	398	132	g	Val	u	Ile
Meng/sw/USA-98	3a	398	132	g	Val	u	Ile
US1/hu/USA-95	3a	395	131	g	Val	a	Ile
<i>ChinaT1/hu/CHN-00</i>	<i>4d</i>	<i>395</i>	<i>131</i>	<i>c</i>	Val	<i>a</i>	Ile
<i>AB097812 – HE-JA1</i>	<i>4c</i>	<i>395</i>	<i>131</i>	<i>u</i>	<i>Val</i>	<i>c</i>	<i>Ile</i>
<b>HEV072/sw/HUN-05</b>	<b>3e</b>	<b>386</b>	<b>128</b>	<b>g</b>	<b>Val</b>	<b>a</b>	<b>Ile</b>
SW627/sw/ESP-08	3f	386	128	g	Val	a	Ile
swHEV07/sw/THA-08	3f	386	128	g	Val	a	Ile
swX07-E1/sw/SWE-07	3c	386	128	g	Val	a	Ile
swMN06-C1056/sw/MNG-07	3c	383	127	g	Val	a	Ile
wbGER27/wb/GER-06	3h	383	127	g	Val	u	Ile
wbJTS1/wb/JPN-05	3h	383	127	g	Val	u	Ile
JDEER/red/JPN-04	3b	383	127	g	Val	u	Ile
JBOAR1/wb/JPN-04	3b	383	127	g	Val	u	Ile
wbJSG1/wb/JPN-05	3b	383	127	g	Val	u	Ile
JIO-Sai97L/hu/JPN-07	3b	383	127	g	Val	u	Ile
JYM-Tot04L/hu/JPN-07	3b	383	127	g	Val	u	Ile
JJT-Kan/hu/JPN-02	3b	383	127	g	Val	u	Ile
JRA1/hu/JPN-01	3b	383	127	u	Val	u	Ile
JSS-Oka04L/hu/JPN-07	3b	383	127	g	Val	u	Ile
swJ570/sw/JPN-01	3b	383	127	g	Val	u	Ile
wbJYG1/wb/JPN-01	3b	383	127	g	Val	c	Ile
pJE03-1760Fwt/hu/JPN-08	3b	383	127	g	Val	u	Ile

Vírus	Genocsoport és alcsoport	HVR régió hossza		Nukleotid-szubsztitúció			
		nukleotid	aminosav	3148. nt	kódolt aa	5907. nt	kódolt aa
JHK-Toy04C/hu/JPN-07	3b	383	127	g	Val	c	Ile
E088-STM04C/hu/JPN-07	3?	383	127	g	Val	c	Ile
swMN06-A1288/sw/MNG-07	3b	383	127	c	Val	u	Ile
Osh205/sw/KGZ-88	3g	365	121	a	Val	a	Ile
<i>Burma2/hu/MYA-89</i>	<i>1a</i>	<i>353</i>	<i>117</i>	<i>c</i>	<i>Val</i>	<i>a</i>	<i>Ile</i>
<i>AF051830 – TK15/92 (1992)</i>	<i>1a</i>	<i>353</i>	<i>117</i>	<i>c</i>	<i>Val</i>	<i>a</i>	<i>Ile</i>
<i>M80581 – Sar-55 (1987)</i>	<i>1b</i>	<i>353</i>	<i>117</i>	<i>c</i>	<i>Val</i>	<i>a</i>	<i>Ile</i>
<i>AY204877 – T3-Chad (1983)</i>	<i>1e</i>	<i>353</i>	<i>117</i>	<i>u</i>	<i>Val</i>	<i>a</i>	<i>Ile</i>
<i>X98292 – hev037 (II-FHF) (1996)</i>	<i>1c</i>	<i>353</i>	<i>117</i>	<i>c</i>	<i>Val</i>	<i>a</i>	<i>Ile</i>
<i>Mexico/hu/MEX-87</i>	<i>2</i>	<i>347</i>	<i>115</i>	<i>c</i>	Val	<i>a</i>	Ile

A rendelkezésünkre álló adatok alapján tehát nem vonhatunk párhuzamot a HVR régió, és a fulmináns hepatitis kialakulásáért felelős nukleotid-pozíciókban bekövetkező szubsztitúciók között. Elképzelhető, hogy van összefüggés a vírusgenom e két tulajdonsága, illetve a kialakuló klinikai tünetek erőssége között, ezt azonban csak kísérletes fertőzéssel és objektív értékelési rendszerrel lehetne elemezni és bizonyítani. A HVR régió változékonysága egyfelől azt jelentheti, hogy a vírus számára nélkülözhető genomszakasról van szó, hiszen ha ez a szakasz a kapszid proteinhez vagy a polimeráz enzimekhez hasonlóan létfontosságú lenne, a mutációk jelentősen befolyásolhatnák a vírus szaporodóképességét. Azonban a vírus számára a terjedésben vagy infektivitásban nélkülözhető genomszakaszok *in vivo* – különösen a HEV-hez hasonló kisméretű RNS vírusok esetében – gyorsan elvesznek a genomból (Pudupakam *et al.*, 2009). Az a tény, hogy egy hipervariabilis régió helyet kap a vírus genomjában, azt sugallja, hogy a genom e szakaszának mégis van valamilyen szerepe a HEV életciklusában, azonban ennek felderítésére további vizsgálatok szükségesek.

A HVR régió nukleotid-szekvenciái alapján készített törzsfa (21. ábra) elrendeződése az ORF2 régió szekvenciái alapján készített törzsfa topológiájához hasonlít jobban. Az ORF2s1-a1 szekvenciák alapján a 3c alcsoportba sorolt két vírus itt is más alcsoportok vírusaival keveredik. Az swMN06-C1056 vírus a 3e alcsoport

virusaival, míg a swX07-E1 vírus a 3f alcsoport vírusaival mutat nagyobb hasonlóságot. A 3. genocsoport alcsoportjai azonban ettől eltekintve tisztán elkülönülnek egymástól.

### ***8.8.3. A genom legkonzervatívabb szakaszának analízise***

A HEV072-es vírus teljes genom szekvencia meghatározásához használt primereket kísérletképpen, más magyarországi vírusokon is (HEV006, HEV007) kipróbáltuk, azonban a többi magyarországi vírushoz ezek a primerpárok nem amplifikáltak nukleinsavat. Munkánk során arra a következtetésre jutottunk, hogy a HEV nagyfokú variabilitása miatt, ha nem kívánunk többszörösen degenerált primereket használni, még az egy országban (Magyarországon) kimutatott vírusokra is külön-külön primerszettet kell tervezni a teljes genom meghatározásához. E megfigyelés alapján felvetődhet az igény egy olyan univerzális primerpár megtervezésére, mely az összes (az adott országban jellemző genocsoport(ok)ba tartozó) HEV változatot kimutatja, illetve, egy olyan primerpár, mely nemcsak a fenti diagnosztikai célra, hanem megbízható filogenetikai vizsgálatok céljára is alkalmas lenne. A SimPlot-analízis (20. ábra) alapján legkonzervatívabb szakasznak a HEV072-es genom alapján 5124-5451 nt. pozíciók közötti régió bizonyult. Ez a strukturális proteinek kódoló ORF2 régió kezdeti részének megfelelő szakasz, mely a feltételezett kapszid protein aminosav sorrendjét határozza meg. Itt nukleotid szinten a 3. genocsoport vírusai a magyarországi vírus szekvenciájával 90% feletti hasonlóságot mutatnak. A genomrégió nukleotid szekvenciái alapján készült törzsfán (22. ábra) a nukleotid szekvenciák nagymértékű hasonlósága miatt a 3a, 3b és 3j alcsoportok összeolvadása figyelhető meg. A 3c alcsoport vírusai, bár kissé elkülönülnek, a 3f alcsoport vírusaival mutatnak nagyobb hasonlóságot. A 3e, 3g, és 3h alcsoport jól elkülönül a törzsfán.

A korábbiakban említett „diagnosztikai” primerpár az ORF2 régió a 6298-6470 nt. pozíciók között állít elő egy 197 bp hosszú amplicont, melyből 147 nt hosszú szekvencia nyerhető. Ez az a primerpár, melyet a világ több HEV-kutató laboratóriumában diagnosztikai célra használnak. Ezen a szakaszon a HEV072-es vírushoz viszonyított hasonlóság az 1., 2., és 4. genocsoportba tartozó vírusok esetében 81 (ChinaT1) – 82% (Burma2, Mexico), míg a 3. genocsoportba tartozó

vírusok esetében „mindössze” 53-93%. A Magyarországon kimutatott vírusok is csak 53-74%-ban hasonlítanak a HEV072-es vírusra. Ennek megfelelően feltételezhetjük, hogy az 5124-5451. nt pozíciók közötti szakasz, mivel itt az egyes vírusok szekvenciái az ORF2s1-a1 primerpárok által előállított szekvenciáknál nagyobb mértékben megegyeznek, alkalmas lenne diagnosztikai vizsgálatra. Ezen a szakaszon a GC-arány 68%, ami több, mint a primertervező programok által általában optimálisnak tartott 50-60%. A laboratóriumunkban használt SECentral programmal ezen a szakaszon nem találtunk olyan primerpárt, mely a kritériumok alapján megbízhatóan működne. Az a primerpár, melynek forward és reverse tagja a legközelebb helyezkedik el a legkonzervatívabb szakasz két széléhez, és amely a primertervezési kritériumok alapján megfelelően működne, a 4916-5531 nt. közötti szakaszt amplifikáló primerpár. A primerpozíciókban azonban a vírusok közötti hasonlóság csupán 64-88% (forward primer), illetve 72-96% (reverse primer), így szinte a jelenleg diagnosztikai célokra használt ORF2s1-ORF2a1 primerpárhoz hasonló eséllyel mutatná ki a mintákból a különböző HEV változatokat. A primerek degenerálásával (mint ez az ORF2s1-ORF2a1 primerpárra is jellemző) növelni lehetne a kimutatható vírusváltozatok számát, azonban ez a primerek stabilitásának, illetve specificitásának, ezáltal megbízható működésének csökkenésével járna. Ez a genomszakasz, azonban, éppen konzervativitása miatt, *in situ* hibridizációs vizsgálatokban felhasználható probe-ok tervezésére elméletileg alkalmas lehet.

#### **8.8.4. A genotipizálásra felhasználható genomrégiók összehasonlítása**

A HEV genotipizálása régóta foglalkoztatja a kutatókat, több tanulmány született, melyek a legegyszerűbb és legmegfelelőbb módszert vagy a genotipizálásra legalkalmasabb genomszakaszt keresik (Lu *et al.*, 2006; Zhai *et al.*, 2006; Fan 2009). A legátfogóbb elemzést Lu és munkatársai (2006) készítették: 421 különböző vírus 6 különböző genomszakaszának nukleotid-szekvenciái alapján állították fel genotipizálási rendszerüket. Annak ellenére, hogy az Európában meghatározott teljes genomszekvenciák genotipizálásánál is a Lu és munkatársai-féle rendszert veszik alapul (Xia *et al.*, 2008; Legrand-Abravanel *et al.*, 2009; Peralta *et al.*, 2009b; Schielke *et al.*, 2009), mégsem egységes az egyes országokban kimutatott vírusok genocsoportokon belüli alcsoportokba sorolása. A dolgozatban is felhasznált



spanyolországi (SW627 és SWP7, Peralta *et al.*, 2009b) illetve franciaországi (TLS25, Legrand-Abravanel *et al.*, 2009 ) vírus besorolása vizsgálatunkban megegyezik a spanyol és francia kutatók megállapításaival. A Svédországban kimutatott vírust (swX07-E1, Xia *et al.*, 2008) a szekvenciát elsőként publikáló kutatók a 3c csoportba sorolták, mely megegyezik a jelen vizsgálatban leírt besorolással, ugyanakkor ugyanebben a publikációban más vírusokat a Lu és munkatársai-féle besorolástól eltérő alcsoportokba soroltak (pl. az Osh205 vírus Lu és munkatársai szerint a 3g alcsoportba tartozik, míg a Xia és munkatársai tollából származó cikkben a 3e alcsoportba sorolva található). A Németországban meghatározott teljes genom szekvencia (wbGER27, Schielke *et al.*, 2009) esetében, melyet Schielke és mtsai. (2009) a Lu-féle rendszer szerint az Au1 jelzésű vírussal együtt a 3i alcsoportba soroltak, saját vizsgálatunk eredményei nem támogatják a korábbi besorolást: az ORF2s1-ORF2a1 szekvenciákon alapuló törzsfán ezek a vírusok egyértelműen a 3h alcsoportban foglalnak helyet. Így a németországi vírust vizsgálatunkban a 3i alcsoport helyett a 3h alcsoport tagjaként kezeltük.

Kutatásaink során a genom 7 szakaszának elemzése alapján készítettünk törzsfákat. A legrészletesebb törzsfának az ORF2s1-a1 primerpárok által előállított szekvenciákon alapuló törzsfá bizonyult. Annak ellenére, hogy ez a szekvencia mindössze 147 nt hosszú, s emiatt a törzsfá bootstrap értékekkel jelzett stabilitása meglehetősen alacsony, az egyes vírusok szekvenciái kellőképpen változatosak, ugyanakkor kellőképpen hasonlítanak is egymáshoz ahhoz, hogy az egyes vírusok közötti hasonlóságok vagy eltérések a törzsfán megjelenjenek. Az ORF2s1-ORF2a1 terület másik előnye, hogy ezen a genom szakaszon nagyon sok szekvencia található a génbanki adatbázisban, így sok különböző vírus szekvenciája használható fel a filogenetikai elemzéshez.

Az egyes vírusokról a lehető legtöbb információt a teljes genom szekvencia hordozza, így a teljes genom szekvenciák alapján készült törzsfák tűnnek a legmegbízhatóbbnak, melyet a bootstrap értékek nagysága is jelez. Ugyanakkor teljes genom szekvenciából jóval kevesebbet találunk a génbanki adatbázisban, így pl. a Lu és mtsai (2006) által a 3d vagy 3i alcsoportba sorolt vírusok közül egyet sem tudunk a teljes genom szekvenciákon alapuló törzsfán elhelyezni. Emellett a teljes genom szekvencia alapján láthatjuk, hogy a 3c, 3e és 3f alcsoportba tartozó vírusok viszonylag közeli közös őssel rendelkeznek, s emiatt szorosabb rokonságban állnak

egymással. Ez, vagy a vírusevolúció során bekövetkezett rekombináció lehet az oka, hogy az ORF2s1-ORF2a1 szekvenciákon alapuló törzsfán a 3c alcsoportba sorolt swMN06-C1056 és swX07-E1 vírusok látszólag „nem találják a helyüket” a teljes genom szekvencián alapuló törzsfán (valamint az ORF1, ORF2, és ORF3 alapján készített törzsfákon is); hol a 3e alcsoport vírusaihoz (swMN06-C1056), hol a 3f alcsoport vírusaihoz (swX07-E1) állnak közelebb. A teljes genom szekvencián alapuló törzsfa azonban jól tagolt, az egyes alcsoportok tisztán elkülönülnek egymástól. Az ORF1 szekvenciákon alapuló törzsfa topológiája 1-2 alcsoportokon belüli átrendeződéstől eltekintve megegyezik a teljes genom szekvenciákon alapuló törzsfa elrendeződésével, így megállapítható, hogy az ORF1 régió meghatározó része a genomnak, ezáltal felhasználható a megbízható genotipizálásra. Ugyanakkor a teljes ORF1 szekvenciával ugyanaz a probléma, mint a teljes genom szekvenciával: kevés vírus esetében áll rendelkezésre szekvencia a génbanki adatbázisokban.

Az ORF1 régió belül amplifikáló ORF1s1-ORF1a1 primerpárok által előállított szekvenciákon alapuló törzsfa is szóba jöhet a genotipizálás alapjaként. Ezen a genom szakaszon több vírusról áll rendelkezésre információ, tehát kellőképpen részletgazdag a törzsfa, ugyanakkor egyes alcsoportok nem különülnek el teljesen. Az ORF2s1-ORF2a1 szekvenciák alapján 3c alcsoportba sorolt vírusok nem különülnek el egyértelműen a 3f alcsoport vírusaitól, illetve a 3h és 3i alcsoport is összeolvadt egymással. E genom szakasz alapján tehát bizonytalan a genotipizálás, s ezért a Németországban kimutatott vírus (wbGER27) alcsoportba-sorolási problémájára sem találtunk megoldást.

Az ORF2 szekvenciákon alapuló törzsfán „mindössze” a korábban 3c alcsoportba sorolt vírusok jelentik a problémát, melyek közül a Svédországban kimutatott vírus (swX07-E1) a 3f alcsoport vírusaival mutat nagyobb hasonlóságot a Mongóliában kimutatott vírus (swMN06-C1056), bár elkülönül tőlük, a 3e alcsoport vírusaihoz. Ettől eltekintve ez a törzsfa is kellőképpen tagolt, az egyes alcsoportok tisztán elkülönülnek egymástól. A HVR régió szekvenciáin alapuló törzsfa topológiája hasonlít ORF2 szekvenciákon alapuló törzsfa elrendeződéséhez, azonban a 3j alcsoportba tartozó vírus a HVR régió alapján inkább a 3b alcsoport vírusaival mutat nagyobb hasonlóságot, a Svédországban kimutatott, korábban 3c alcsoportba sorolt vírus egyértelműen a 3f alcsoport vírusai közé tagozódik, míg a 3c alcsoport másik tagja elkülönül a többi alcsoporttól, s a 3f és 3e alcsoport vírusaival is

hasonlóságot mutat. A HVR régiót, ennek megfelelően genotipizálásra nem tartjuk alkalmasnak, ugyanakkor járványtani nyomozásra – a 3. genocsoport vírusai esetében - megfelelő terület lehet.

A korábbiakban említettük, hogy a Magyarországon kimutatott HEV072 jelzésű vírus teljes genomszekvencián és az egyes ORF-ek szekvenciáin alapuló elemzésben a HE-JA04 vírushoz mutatja a legnagyobb mértékű hasonlóságot. Ez alapján járványtani kapcsolatot is feltételezhetnénk a két vírus között. Azonban, ha megvizsgáljuk a vírusok HVR régióját, egyértelmű a különbség: a magyarországi vírus HVR régiója 39 nukleotiddal rövidebb, mint a Japánban kimutatott vírus megfelelő genomszakasza. A HE-JA04 jelzésű vírust 2004-ben emberben detektálták (Inoue et al., 2006b), a magyarországi vírust 2005-ben sertésből mutattuk ki. A japán beteg nem utazott külföldre, és nincs információ arról, hogy kapcsolatba került volna Magyarországról Japánba exportált fertőzött sertéshússal. A japán kutatók a HE-JA04 vírus eredetét az Egyesült Királyságban feltételezik, bár a Nagy-Britanniából importált sertéshússal való vírus-behurcolásra nincs bizonyítékuk. Sajnos a 3e genocsoporton belül más vírusokból nem áll rendelkezésünkre sem teljes genomszekvencia, sem a HVR régió szekvenciája, hogy a két vírus közötti rokonsági viszonyokat és evolúciós eseményeket egyértelműbben tisztázhassuk. A HVR régió más alcsoportba tartozó vírusok között is alapja lehet a járványtani nyomozásnak és a rokonsági viszonyok felderítésének, hiszen a 3. genocsoport egy-egy alcsoportjában többségében eltérő hosszúságú HVR régióval rendelkező vírusok találhatóak. A genomszakasz ilyen téren való felhasználási lehetőségének tisztázására azonban további vizsgálatok szükségesek.

A genom ORF2 régió kezdeti szakaszán található legkonzervatívabb szakaszának szekvenciáin alapuló törzsfák néhány részletben hasonlóságot mutat az ORF3 szekvenciákon alapuló törzsfák elrendeződésével. Ez nem meglepő, hiszen a legkonzervatívabb genomszakasz az ORF2 és ORF3 átfedése miatt megegyezik az ORF3 régió végső szakaszával. Mindkét törzsfán a 3a, 3b és 3j alcsoportok összeolvadását figyelhetjük meg, azonban, amíg az ORF3 szekvenciákon alapuló törzsfán a 3c alcsoport swMN06-C1056 vírusa a 3e alcsoport vírusaihoz áll közelebb, a swX07-E1 vírus pedig a 3f alcsoport vírusai közé keveredik, addig a genom legkonzervatívabb régióján alapuló törzsfán mindkét vírus a 3f alcsoport vírusaihoz mutat nagyobb hasonlóságot. Az ORF3 régió kezdeti szakasza (mely

nincs átfedésben a genom legkonzervatívabb régiójával), legalábbis a Mongóliában kimutatott vírus esetében variábilisebb, a genom e szakaszán a swMN06-C1056 vírus jobban eltér a 3f alcsoportba tartozó vírusoktól.

Összességében megállapítható, hogy a törzsfákon alapuló genotipizálásra rövidege ellenére az ORF2s1-ORF2a1 primerpár által előállított szekvenciák, és a teljes genom, vagy annak ORF1 része a legalkalmasabb. Minden esetben azonban kellő számú vírusszekvencia bevonásával kell végezni az elemzést, lehetőleg úgy, hogy a vizsgálni kívánt genocsoport mindegyik alcsoportjából legalább egy reprezentatív vírust alkalmazzunk a vizsgálatban.

### **8.9. További kutatási lehetőségek**

A jelen dolgozatban ismertetett eredmények természetesen nem jelentik a hepatitis E vírussal kapcsolatos (magyarországi) vizsgálatok végét. Azonban eddigi kutatásaink eredményei kiindulási pontot, összehasonlítási alapot szolgáltathatnak mindazon jövőbeni vizsgálat elvégzéséhez, azok eredményeinek értékeléséhez, melyekre ez idáig anyagi okokból, vagy szakmai kapcsolatok, ismeretek és infrastrukturális feltételek hiányában nem volt lehetőségünk. Ilyen kutatások lehetnek pl. állati mintákból további hepatitis E vírus törzsek kimutatása, hiszen Németországhoz hasonlóan elképzelhető, hogy más genocsoportba (4. genocsoport) sorolható, állatokat és embert is fertőző vírusok is megjelenhetnek és elterjedhetnek Magyarországon (Wichmann *et al.*, 2008). Járványtani szempontból a rágcsálók (patkány, egér; Johne *et al.*, 2010), és a természetes élőhelyeken a fertőzés fenntartásában feltehetően részt vevő kisemlősök (pl. nyúl; Zhao *et al.*, 2009) vizsgálata is lehet a jövőbeni kutatások célja. Sertés-egészségügyi szempontból a más vírusokkal (pl. PCV-2; Martín *et al.*, 2007) való párhuzamos HEV-fertőzések tünet-súlyosbító hatásai is vizsgálhatók. Élelmiszer-higiéniai szempontból sem aknáztunk ki minden kutatási lehetőséget, hiszen kereskedelmi forgalomban kapható sertésmájak, vagy további élelmiszer-termelő állatok (pl. nyúl, Zhao *et al.*, 2009) HEV-fertőzöttségének vizsgálatára ez idáig nem volt alkalmunk. Habár a HEV hőpusztulását korábban már vizsgálták (Feagins *et al.*, 2008), az irodalmi adatok között találunk olyan esetleírásokat, ahol nem hőkezelt kolbász fogyasztása során történt az emberi fertőződés (Wichmann *et al.*, 2008). Ennek megfelelően a

későbbiekben vizsgálható a HEV fertőzőképességének fennmaradása nem hőkezelt húskészítményekben, illetve hőelvonásos tartósítás során is. Mindezek mellett reméljük, hogy e zoonotikus vírus további kutatásában a Magyarországon emberi HEV-fertőzéseket vizsgáló humán orvosokkal is együttműködhetünk.

## 9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### 1. A HEV kimutatása Magyarországon, állati eredetű mintákban

Felmérő vizsgálataink során elsőként mutattuk ki a HEV nukleinsavának jelenlétét Magyarországon gyűjtött házisertés és vadon élő emlősállatok mintáiból. A vizsgált 717 mintából 85 mintában, a 11 vizsgált állatfajból 4 fajban igazoltuk a HEV-fertőzöttséget. A felmérés során 41 sertéstartó telep vizsgálatával felderítettük a magyarországi sertéstelepek HEV-fertőzöttségének mértékét, mely a szakirodalmi adatoknak megfelelő, 39%-os.

Vizsgálataink során elsőként mutattuk ki a HEV hazai jelenlétét vadon élő állatokban (vaddisznó, őz, szarvas). A vizsgált vaddisznók 9%-a, az őzek 22%-a és a szarvasok 10%-a bizonyult HEV-fertőzöttnek. A minták földrajzi eredete alapján kimutattuk, hogy a HEV állatokban – az emberi fertőzésekhez hasonlóan (OEK, 2009b) Magyarország teljes területén megtalálható, nincsenek jellegzetesen fertőzött vagy mentes országrészek.

A házi kérődző állatok (szarvasmarha, kecske, juh), illetve a rágcsálók (egér, patkány, hörcsög, cickány) esetében sem a máj-, sem a bélsárminták nem tartalmaztak HEV nukleinsavat kimutatható mennyiségben, így ezen állatfajok fertőzés-közvetítő szerepét nem bizonyítottuk. A sertéstelepeken takarmányraktárakban gyűjtött sertéstáp-minták HEV előfordulásra irányuló vizsgálatának eredményei nem utalnak a takarmány jelentős szerepére a kórokozó járványtanában.

### 2. A HEV-fertőzés lefolyásának vizsgálata sertéstelepeken

Sertésállományokban vizsgáltuk a fertőzés lefolyásának menetét. Célzott, korcsoportonkénti mintavétellel meghatároztuk az egyes korcsoportokban a vírusürítés mértékét. Ez alapján a telepeken leginkább fertőzött korcsoportnak a malac II. – hízó I. korcsoport bizonyult (37%-os fertőzöttség). A vágóhidra kerülő állatokban a vírusürítés előfordulásának mértéke alapján megállapítottuk, hogy a sertések HEV-fertőzöttsége ételmszer-biztonsági kockázatot jelenthet.

A sertésekben párhuzamosan vizsgált máj- és bélsárminták pozitivitása alapján kijelenthetjük, hogy mindkét minta vizsgálata alkalmas a sertések HEV-fertőzöttségének kimutatására.

### 3. A szerológiai áthangolódás mértékének vizsgálata sertéssel kapcsolatos foglalkozást űzők körében.

Összehasonlítottunk két szerológiai módszert (immunoblotot és ELISA-t) a HEV elleni IgM és IgG osztályú ellenanyagok kimutatására archivált emberi savómintákból. Megállapítottuk, hogy bár az immunoblot módszerrel kapott eredmény illik a minták járványtani előzmények alapján elvárt tendenciához, a magas pozitív (és különösen a magas IgM pozitív) savók aránya a módszer csekélyebb megbízhatóságára, vagy aspecifikus reakciók bekövetkeztére is utalhat. Vizsgálataink eredményei felhívják a figyelmet a savóminták hosszú tárolása közben bekövetkező olyan változásokra, amelyek a HEV szerológiai vizsgálatok eredményét kedvezőtlenül befolyásolhatják.

### 4. A Magyarországon, állati eredetű mintákban kimutatott vírusok szekvenciáinak genetikai elemzése.

Az állati eredetű mintákban kimutatott hepatitis E vírusok filogenetikai elemzése során azonosítottuk a Magyarországon állatokban fertőzést okozó vírustörzseket. Eredményeink alapján Magyarországon a HEV 3. genocsoportjába tartozó vírusok vannak jelen. A kimutatott vírusok nagyfokú diverzitást mutatnak, a 3. genocsoport „a”, „e” és „h” alcsoportjába tartoznak. Eredményeink szerint a Magyarországon, állati eredetű mintákban kimutatott hepatitis E vírusok rokonságban állnak magyarországi, és más országokban kimutatott, emberi eredetű vírusokkal.

### 5. Egy magyarországi vírus teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése.

Elsőként végeztük el egy magyarországi HEV törzs csaknem teljes genomszekvenciájának meghatározását: 17 egymást átfedő terméket létrehozó primerpárral egy 7189 bp hosszú összefüggő genomszakaszt amplifikáltunk. A teljes genomszekvencia analízise során mindhárom ORF részletes genetikai vizsgálatát elvégeztük, melynek során megállapítottuk, hogy a HEV evolúciójában a pontmutáció és a genom egy meghatározott szakaszán inzerció/delécio játszsa a fő szerepet. A vizsgálatok során a Magyarországon kimutatott vírus esetében rekombinációt nem fedeztünk fel.



Két, a genetikai rokonságot nagymértékben meghatározó genomrégiót ismertünk fel. A feltételezett kapszid protein domént találtuk a genom legkonzervatívabb részének. Megállapítottuk, hogy az általánosan alkalmazott primer-tervezési paraméterek alapján ez a régió PCR során alkalmazható, a HEV minden genocsoportját kimutató primerek tervezésére nem alkalmas, azonban felhasználható lehet más típusú vizsgálatokban, pl. *in situ* hibridizáció során probe tervezéséhez.

Az egyes vírusok genomjának vizsgálatokor hipervariabilis régióban tapasztalt eltéréseket a rendelkezésünkre álló adatok alapján nem lehetett összefüggésbe hozni a vírus kimutatásának idejével, helyével, gazdafaji eredetével vagy az esetlegesen kialakított klinikai tünetek súlyosságával. Változékonysága alapján azonban a genom e régiója a 3. genocsoport vírusai esetében járványtani nyomozás során felhasználható.

A genom egészének és 7 további szakaszának filogenetikai analízisével megállapítottuk, hogy az ORF2s1-ORF2a1 primerpárok által amplifikált genomszakasz szekvenciája, rövidege ellenére alkalmas a kimutatott vírusok genotipizálására. A teljes genomsekvencia és az ORF1 szekvenciák vizsgálata alapján kijelenthetjük, hogy az ORF1 régió a genom meghatározó szakasza, s kellő számú vírus szekvenciájának felhasználása esetén felhasználható a vírusok genocsoportjának meghatározására.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

Adlhoch C., Wolf A., Meisel H., Kaiser M., Ellerbrok H., Pauli G.: **High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany**, Vet. Microbiol. 139(3-4). 270-278, 2009.

Aggarwal R., Krawczynski K.: **Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research**, J. Gastroen. Hepatol. 15. 9-20, 2000.

Aggarwal R., Naik S.: **Epidemiology of hepatitis E: current status**, J. Gastroenterol. Hepatol. 24(9). 1484-1493, 2009.

Anderson D.A. Shrestha I.L.: **Hepatitis E virus**, In: *Clinical Virology, 2<sup>nd</sup> edition*. Szerk: Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. Washington DC.: ASM Press. p. 1061-1074, 2002.

Andries K., Pensaert M.B., Vandeputte J.: **Effect of experimental infection with pseudorabies (Aujeszky's disease) virus on pigs with maternal immunity from vaccinated sows**, Am. J. Vet. Res. 39(8). 1282-1285, 1978.

Arankalle V.A., Joshi M.V., Kulkarni A.M., Gandhe S.S., Chobe L.P., Rautmare S.S., Mishra A.C., Padbidri V.S.: **Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species**, J. Viral. Hepat. 8(3). 223-227, 2001.

Arankalle V.A., Paranjape S., Emerson S.U., Purcell R.H., Walimbe A.M.: **Phylogenetic analysis of Hepatitis E virus isolates from India (1976-1993)**, J. Gen. Virol. 80. 1691-1700, 1999.

Baechlein C., Schielke A., Johne R., Ulrich R.G., Baumgaertner W., Grummer B.: **Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays**, Vet. Microbiol. 2009. dec. 16. [Epub ahead of print]

Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S., Ketiladze E.S., Braginsky D.N., Savinov A.P., Poleschuk V.F.: **Evidence for a virus in Non-A, Non-B hepatitis transmitted via faecal-oral route**, Intervirology. 20. 23-31, 1983.

- Balogh Z., Ferenczi E., Szeles K., Stefanoff P., Gut W., Szomor K.N., Takács M., Berencsi Gy.: **Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk**, J. Virol. Methods. 163(2). 481-485, 2010.
- Banas B., Tausch U., Hofstaedter F., Woenckhaus M., Pietrzyk M.C., Riegger Gn.A.J., Kraemer B.K., Boehm S., Rohrhofer A., Jilg W.: **Infection with hepatitis E virus: first report of a chronic case and molecular characterization of the virus**, Unpublished. 2004.
- Bánáti D.: **Fear of food in Europe? Fear of foods in Europe through Hungarian experience**, Trends in Food Science and Technology. 19(8). 441-444, 2008.
- Banks M., Heath G.S., Grierson S.S., King D.P., Gresham A., Girones R., Widen F., Harrison T.J.: **Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom**, Vet. Rec. 154(8). 223-227, 2004.
- Bányai K., Forgách P., Erdélyi K., Martella V., Bogdán A., Hocsák E., Havasi V., Melegh B., Szűcs Gy.: **Identification of the novel lapine rotavirus genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry**, Virus Res. 113(2). 73-80, 2005.
- Bányai K., Martella V., Bogdán A., Forgách P., Jakab F., Meleg E., Bíró H., Melegh B., Szűcs Gy.: **Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains**, J. Gen. Virol. 89(2). 534-539, 2008.
- Bányai K., Matthijnsens J., Szűcs Gy., Forgách P., Erdélyi K., van Ranst M., Lorusso E., Decaro N., Elia G., Martella V.: **Frequent rearrangement may explain the structural heterogeneity in the 11th genome segment of lapine rotaviruses**, Acta Vet. Hung. 57(3). 453-461, 2009.
- Bao W., Solt S., Lehoczki R. Csányi S.: **Grouping behavior of field roe deer *Capreolus capreolus* population in Hungary**, Acta Zool. Sinica. 51. 156-160, 2005.
- Bile K., Isse A., Mohamud O.: **Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia**, Am. J. Trop. Med. Hyg. 51. 466-474, 1994.

Bilic I., Jaskulska B., Basic A., Morrow C.J., Hess M.: **Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes**, J. Gen. Virol. 90(Pt 4). 863-873, 2009.

Bouwknegt M., Frankena K., Rutjes S.A., Wellenberg G.J., de Roda Husman A.M., van der Poel W.H., de Jong M.C.: **Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure**, Vet. Res. 39. 40, 2008.

Bouwknegt M., Lodder-Verschoor F., van der Poel W.H., Rutjes S.A., de Roda Husman A.M.: **Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands**, J. Food Prot. 70. 2889-2895, 2007.

Bouwknegt M., Rutjes S.A., Reusken C.B., Stockhofe-Zurwieden N., Frankena K., de Jong M.C., de Roda Husman A.M., van der Poel W.H.: **The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation**, B.M.C. Vet. Res. 5. 7, 2009.

Casas M., Pina S., de Deus N., Peralta B., Martín M., Segalés J.: **Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels**, Vet. Microbiol. 138(1-2). 78-84, 2009.

Ceylan A., Ertem M., Ilcin E., Ozekinci T.: **A special risk group for hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation**, Epidemiology and Infection. 131. 753-756, 2003.

Chandra V., Kalia M., Hajela K., Jameel S.: **The ORF3 protein of hepatitis E virus delays degradation of activated growth factor receptors by interacting with CIN85 and blocking formation of the Cbl-CIN85 complex**, J. Virol. 84(8). 3857-3867, 2010.

Chandra V., Kar-Roy A., Kumari S., Mayor S., Jameel S.: **The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response**, J. Virol. 82. 7100-7110, 2008a.

Chandra V., Taneja S., Kalia M., Jameel S.: **Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus**, J. Biosci. 33. 451-464, 2008b.

- Choi C., Chae C.: **Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization**, *J. Hepatol.* 38. 827–832, 2004.
- Choi I.-S., Song Y.-J., Lee S.-W., Lee J.-B., Park S.-Y., Song C.-S.: **Complete genome of Swine hepatitis E virus**, Unpublished. 2008.
- Clemente-Casares P., Pina S., Buti M., Jardí R., Martín M., Bofill-Mas S., Girones R.: **Hepatitis E Virus Epidemiology in Industrialized Countries**, *Emerg. Inf. Dis.* 9(4). 448-454, 2003,
- Cooper K., Huang F.F., Batista L., Rayo C.D., Bezanilla J.C., Toth T.E., Meng X.J.: **Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations**, *J. Clin. Microbiol.* 43. 1684-1688, 2005.
- Csányi, S., Lehoczki, R. Sonkoly, K.: **Vadgazdálkodási Adattár 2007/2008. vadászati év.** Országos Vadgazdálkodási Adattár, Gödöllő, 2008.
- Cubitt W.D., Bradley D., Carter M., Chiba S., Estes M.K., Saif L., Schaffer F.L., Smith A.W., Studdert M.J., Thiel H.J.: **Caliciviridae**, In: *Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on the Taxonomy of viruses.* Arch. Virol. Suppl. 10. 359-363, 1995.
- Dalton H.R., Bendall R., Ijaz S., Banks M.: **Hepatitis E: an emerging infection in developed countries**, *Lancet Infect. Dis.* 8. 698–709, 2008.
- de Deus N., Casas M., Peralta B., Nofrarias M., Pina S., Martín M., Segalés J.: **Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm**, *Vet. Microbiol.* 132. 19-28, 2008a.
- de Deus N., Peralta B., Pina S., Allepuz A., Mateu E., Vidal D., Ruiz-Fons F., Martín M., Gortazar C., Segalés J.: **Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain**, *Vet. Microbiol.* 129. 163-170, 2008b.

de Deus N., Seminati C., Pina S., Mateu E., Martín M., Segalés J.: **Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions**, *Vet. Microbiol.* 119. 105-114, 2007.

Deutz A., Fuchs K., Nowotny N., Auer H., Schuller W., Stünzner D., Aspöck H., Kerbl U., Köfer J.: [**Sero-epidemiological studies of zoonotic infections in hunters--comparative analysis with veterinarians, farmers, and abattoir workers**], *Wien Klin. Wochenschr.* 115(Suppl. 3). 61-67, 2003. [Article in German]

Di Bartolo I., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F.M.: **Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy**, *Vet. Microbiol.* 132. 47-55, 2008.

Donati M.C., Fagan E.A., Harrison T.J.: **Sequence analysis of full length HEV clones derived directly from human liver in fulminant hepatitis E**, In: *Viral hepatitis and liver disease*. Szerk.: Rizzetto M., Purcell R.H., Gerin J.L., Verme G. Torino: Edizioni Minerva Medica, pp: 313-316; 1997.

Eker A., Tansel O., Kunduracılar H., Tokuç B., Yuluğkural Z., Yüksel P.: [**Hepatitis e virus epidemiology in adult population in Edirne province, Turkey**], *Mikrobiyol. Bul.* 43. 251-258, 2009. [Article in Turkish].

Emerson S.U, Nguyen H., Torian U., Purcell R.H.: **ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro**, *J. Virol.* 80. 10457-10464, 2006.

Emerson S.U., Arankalle V.A., Purcell R.H.: **Thermal stability of hepatitis E virus**, *J. Infect. Dis.* 192(5). 930-933, 2005.

Emerson S.U., Nguyen H., Graff J., Stephany D.A., Brockington A., Purcell R.H.: **In vitro replication of Hepatitis E Virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein**, *Journal of Virology.* 78. 4838–4846, 2004.

Emerson S.U., Purcell R.H.: **Hepatitis E virus**, *Rev. Med. Virol.* 13. 145-154, 2003.

Fan J.: **Open reading frame structure analysis as a novel genotyping tool for hepatitis E virus and the subsequent discovery of an inter-genotype recombinant.** J. Gen. Virol. 90. 1353-1358, 2009.

Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A.: **VIII<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, Academic Press, p. 583-587, 2005.

Favorov M. O., Margolis H. S.: **Hepatitis E virus infection: an enterically transmitted cause of hepatitis**, In: *Emerging Infections 3*. Szerk: Schied W. M. Craig W. A., J. M. Hughes, Washington, DC.: ASM Press, 1999. p. 1-16.

Favorov M.O., Kosoy M.Y., Tsarev S.A., Childs J.E., Margolis H.S.: **Prevalence of antibody to Hepatitis E Virus among rodents in the United States**, J. Infect. Dis. 181. 449-455, 2000.

Feagins A.R., Opriessnig T., Guenette D.K., Halbur P.G., Meng X.J.: **Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA**, J. Gen. Virol. 88. 912-917, 2007.

Feagins A.R., Opriessnig T., Guenette D.K., Halbur P.G., Meng X.J.: **Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States**, Int. J. Food. Microbiol. 123. 32-37, 2008.

Fernandez-Barredo S., Galiana C., Garcia A., Gomez-Munoz M.T., Vega S., Rodriguez-Iglesias M.A., Perez-Gracia M.T.: **Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs**, Can. J. Vet. Res. 71. 236-240, 2007.

Fernandez-Barredo S., Galiana C., Garcia A., Vega S., Gomez M.T., Perez-Gracia M.T.: **Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction**, J. Vet. Diagn. Invest. 18. 462-465, 2006.

FitzSimons D., Hendrickx G., Vorsters A., Van Damme P.: **Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology**, Vaccine. 28. 583-588, 2010.



Forgách P, Bakonyi T., Nowotny N, Lussy H., Molnár B.: **Characterisation and analysis of the complete genome sequence of swine HEV detected in Hungary**, Unpublished. 2010.

Forgách P., Nowotny N., Erdélyi K., Boncz A., Zentai J., Szűcs Gy., Reuter G., Bakonyi T.: **Detection of Hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary**, Veterinary Microbiology. In Press, Corrected Proof, Available online 18 November 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.004

Fry K.E., Tam A.W., Smith M.M., Kim J.P., Luk K.C., Young L.M., Piatak M., Feldman R.A., Yun K.Y., Purdy M.A., McCaustland K.A., Bradley D.W., Reyes G.R.: **Hepatitis E virus (HEV): strain variation in the nonstructural gene region encoding consensus motifs for an RNA-dependent RNA polymerase and an ATP/GTP binding site**, Virus Genes. 6(2). 173-185, 1992.

Galiana C., Fernández-Barredo S., García A., Gómez M.T., Pérez-Gracia M.T.: **Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers**, Am. J. Trop. Med. Hyg. 78(6). 1012-1015, 2008.

Gleed P.T., Sansom B.F.: **Ingestion of iron in sow's faeces by piglets reared in farrowing crates with slotted floors**, Br. J. Nutr. 47(1). 113-117, 1982.

Goens S.D., Perdue M.L.: **Hepatitis E viruses in humans and animals**, Anim. Health Res. Rev. 5(2). 145-156, 2004.

Gonzalez A.E., Lopez-Urbina T., Tsang B., Gavidia C., Garcia H.H., Silva M.E., Ramos D.D., Manzanedo R., Sanchez-Hidalgo L., Gilman R.H., Tsang V.C.: **Transmission dynamics of Taenia solium and potential for pig-to-pig transmission**, Parasitol. Int. 55. Suppl, S131-135, 2006.

Gouvea V., Snellings N., Popek M.J., Longer C.F., Innis B.L.: **Hepatitis E virus: complete genome sequence and phylogenetic analysis of a Nepali isolate**, Virus Res. 57(1). 21-26, 1998.

Graff J., Torian U., Nguyen H., Emerson S.U.: **A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus**, J. Virol. 80. 5919–5926, 2006.

Haagsma E.B., Niesters H.G., van den Berg A.P., Riezebos-Brilman A., Porte R.J., Vennema H., Reimerink J.H., Koopmans M.P.: **Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients**, *Liver Transpl.* 15. 1225-1228, 2009.

Haagsman A., Reuter G., Duizer E., Nagy G., Herremans T., Koopmans M., Szücs G.: **Seroepidemiology of hepatitis E virus in patients with non-A, non-B, non-C hepatitis in Hungary**, *J. Med. Virol.* 79(7). 927-930, 2007.

Halbur P.G., Kasorndorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M.B., Purcell R.H., Emerson S.U., Toth T.E., Meng X.J.: **Comparative pathogenesis of infection of pigs with Hepatitis E viruses recovered from a pig and a human**, *J. Clin. Microbiol.* 39. 918-923, 2001.

Haqshenas G., Shivaprasad H.L., Woolcock P.R., Read D.H., Meng X.J.: **Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States**, *J. Gen. Virol.* 82(Pt 10). 2449-2462, 2001.

He J., Innis B.L., Shrestha M.P., Clayson E.T., Scott R.M., Linthicum K.J., Musser G.G., Gigliotti S.C., Binn L.N., Kuschner R.A., Vaughn D.W.: **Evidence that rodents are a reservoir of Hepatitis E Virus for humans in Nepal**, *J. Clin. Microbiol.* 40. 4493-4498, 2002.

Herremans M., Bakker J., Duizer E., Vennema H., Koopmans M.P.: **Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity**. *Clin. Vaccine Immunol.* 14(5). 562-568, 2007.

Hirano M., Ding X., Li T.C., Takeda N., Kawabata H., Koizumi N., Kadosaka T., Goto I., Masuzawa T., Nakamura T., Taira K., Kuroki T., Tanikawa T., Watanabe H., Abe K.: **Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan**. *Research.* 27. 1-5, 2003a.

Hirano M., Ding X., Tran H.T., Li T.C., Takeda N., Sata T., Nakamura S., Abe K.: **Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*)**, *Jpn. J. Infect. Dis.* 56(1). 8-11, 2003b.

Huang C.C., Nguyen D., Fernandez J., Yun K.Y., Fry K.E., Bradley D.W., Tam A.W., Reyes G.R.: **Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV)**, *Virology*. 191(2). 550-558, 1992.

Huang F.F., Haqshenas G., Guenette D.K., Halbur P.G., Schommer S.K., Pierson F.W., Toth T.E., Meng X.J.: **Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States**, *J. Clin. Microbiol.* 40.1326-1332, 2002a.

Huang F.F., Haqshenas G., Shivaprasad H.L., Guenette D.K., Woolcock P.R., Larsen C.T., Pierson F.W., Elvinger F., Toth T.E., Meng X.J.: **Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States**, *J. Clin. Microbiol.* 40. 4197-4202, 2002b.

Huang F.F., Sun Z.F., Emerson S.U., Purcell R.H., Shivaprasad H.L., Pierson F.W., Toth T.E., Meng X.J.: **Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV**, *J. Gen. Virol.* 85(Pt 6). 1609-1618, 2004.

Huang R., Nakazono N., Ishii K., Li D., Kawamata O., Kawaguchi R., Tsukada Y.: **Hepatitis E Virus (87a strain) propagated in A549 cells**, *J. Med. Virol.* 47. 299–302, 1995.

Huang Y.W., Opriessnig T., Halbur P.G., Meng X.J.: **Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo**, *J. Virol.* 81. 3018–3026, 2007.

International Committee on Taxonomy of Viruses: **Virus Taxonomy: 2009 Release**. [URL: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>], 2010. 05. 04.

Inoue J., Nishizawa T., Takahashi M., Aikawa T., Mizuo H. Suzuki K., Shimosegawa T., Okamoto H.: **Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E**, *J. Med. Virol.* 78(4). 476-484, 2006a.

Inoue J., Takahashi M., Ito K., Shimosegawa T., Okamoto H.: **Analysis of human and swine hepatitis E virus (HEV) isolates of genotype 3 in Japan that are only 81-83%**

**similar to reported HEV isolates of the same genotype over the entire genome**, J. Gen. Virol. 87(8). 2363-2369, 2006b.

Inoue J., Takahashi M., Mizuo H., Suzuki K., Aikawa T., Shimosegawa T., Okamoto H.: **Nucleotide substitutions of hepatitis E virus genomes associated with fulminant hepatitis and disease severity**, Tohoku J. Exp. Med. 218(4). 279-84, 2009.

Jansen A., Luge E., Guerra B., Wittschen P., Gruber A.D., Loddenkemper C., Schneider T., Lierz M., Ehlert D., Appel B., Stark K., Nöckler K.: **Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany**. Emerg. Infect. Dis. 13. 739–742, 2007.

Jameel S.: **Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus**. Expert. Rev. Mol. Med. 6. 1-16, 1999.

Jary C.: **Hepatitis E and meat carcasses**. British Journal of General Practice. 55. 557–558, 2005.

Johne R., Plenge-Bönig A., Hess M., Ulrich R.G., Reetz J., Schielke A.: **Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR**, J. Gen. Virol. 91(3). 750-758, 2010.

Kaba M., Davoust B., Marié J.L., Colson P.: **Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers**, Vet. J. 2009. Sep 9. [Epub ahead of print]

Kabrane-Lazizi Y., Fine J.B., Elm J., Glass G.E., Higa H., Diwan A., Gibbs C.J. Jr., Meng X.J., Emerson S.U., Purcell R.H.: **Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States**, Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(2). 331-335, 1999.

Kaci S., Nockler K., Johne R.: **Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples**, Vet. Microbiol. 128(3-4). 380-385, 2008.

Kanai Y., Tsujikawa M., Yunoki M., Nishiyama S., Ikuta K., Hagiwara K.: **Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies**, J. Med. Virol. 82(1). 69-76, 2010.

Karetnyi Y.V., Gilchrist M.J., Naides S.J.: **Hepatitis E virus infection prevalence among selected populations in Iowa**, J. Clin. Virol. 14(1). 51-55, 1999.

Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F., Thomas P.J., Meng X.J., Halbur P.G.: **Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs**, J. Clin. Microbiol. 42. 5047-5052, 2004.

Kasorndorkbua C., Opriessnig T., Huang F.F., Guenette D.K., Thomas, P.J., Meng, X.J., Halbur, P.G.: **Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking**, Appl. Environ. Microbiol. 71. 7831-7837, 2005.

Kasorndorkbua C., Thacker B.J., Halbur P.G., Guenette D.K., Buitenwerf R.M., Royer R.L., Meng, X.J.: **Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus**, Can. J. Vet. Res. 67. 303-306, 2003.

Kelley K.W.: **Stress and immune function: a bibliographic review**, Ann. Rech. Vet. 11. 445-478, 1980.

Krawczynski K., Aggarwal R., Kamili S.: **Hepatitis E**, Infect. Dis. Clin. North. Am. 14. 669-687, 2000.

Krawczynski K.: **Hepatitis E vaccine--ready for prime time?** N. Engl. J. Med. 356(9). 949-951, 2007.

Kulkarni M.A., Arankalle V.A.: **The detection and characterization of hepatitis E virus in pig livers from retail markets of India**. J. Med. Virol. 80. 1387-1390, 2008.

Kunio S., Hiroshi N.: **Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection**, BMC Vet. Res. 3. 9, 2007.

Leblanc D., Poitras E., Gagné M.J., Ward P., Houde A.: **Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR**. Int. J. Food. Microbiol. 139(3). 206-209, 2010.

Leblanc D., Ward P., Gagné M-J., Poitras E., Müller P., Trottier Y-L., Simard C., Houde A.: **Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter**, Int. J. Food. Microbiol. 117. 160-166, 2007.

Lee Y.H., Ha Y., Ahn K.K., Chae C.: **Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs**, Vet. J. 179. 417-421, 2009a.

Lee Y.H., Ha Y., Ahn K.K., Cho K.D., Lee B.H., Kim S.H., Chae C.: **Comparison of a new synthetic, peptide-derived, polyclonal antibody-based, immunohistochemical test with in situ hybridisation for the detection of swine hepatitis E virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues**, Vet. J. 182(1). 131-135, 2009b.

Legrand-Abravanel F., Mansuy J.M., Dubois M., Kamar N., Peron J.M., Rostaing L., Izopet J.: **Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France**, Emerging Infect. Dis. 15(1). 110-114, 2009.

Lescano A.G., Garcia H.H., Gilman R.H., Guezala M.C., Tsang V.C., Gavidia C.M., Rodriguez S., Moulton L.H., Green J.A., Gonzalez A.E.: **Swine cysticercosis hotspots surrounding *Taenia solium* tapeworm carriers**, Am. J. Trop. Med. Hyg. 76. 376-383, 2007.

Lewis H.C., Boisson S., Ijaz S., Hewitt K., Ngui S.L., Boxall E., Teo C.G., Morgan D.: **Hepatitis E in England and Wales**, Emerg. Infect. Dis. 14(1). 165-167, 2008.

Lewis H.C., Wichmann O., Duizer E.: **Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review**. Epidemiol. Infect. 138(2). 145-166, 2010.

Li T.C., Chijiwa K., Sera N., Ishibashi T., Etoph Y., Shinohara Y., Kurata Y., Ishida M., Sakamoto S., Takeda N., Miyamura T.: **Hepatitis E virus transmission from wild boar meat**. Emerg. Infect. Dis. 11. 1958–1960, 2005.

Lorenzo F.R., Tsatsralt-Od B., Ganbat S., Takahashi M., Okamoto H.: **Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from farm pigs in Mongolia**, J. Med. Virol. 79(8). 1128-1137, 2007.

Lu L., Drobeniuc J., Kobylnikov N., Usmanov R.K., Robertson B.H., Favorov M.O., Margolis H.S.: **Complete sequence of a Kyrgyzstan swine hepatitis E virus (HEV) isolated from a piglet thought to be experimentally infected with human HEV**, J. Med. Virol. 74 (4). 556-562, 2004.

Lu L., Li C., Hagedorn C.H.: **Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis**, Rev. Med. Virol. 16. 5–36, 2006.

Ma H., Zheng L., Liu Y., Zhao C., Harrison T.J., Ma Y., Sun S., Zhang J., Wang Y.: **Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses**, PLoS One. 5(2). e9160, 2010.

Malcolm P., Dalton H., Hussaini H.S., Mathew J.: **The histology of acute autochthonous hepatitis E virus infection**, Histopathology. 51(2).190-194, 2007.

Maneerat Y., Clayson E.T., Myint K.S., Young G.D., Innis B.L.: **Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus**, J. Med. Virol. 48. 121-128, 1996.

Martella V., Bányai K., Matthijnsens J., Buonavoglia C., Ciarlet M.: **Zoonotic aspects of rotaviruses**, Vet. Microbiol. 140(3-4). 246-255, 2010.

Martelli F., Caprioli A., Zengarini M., Marata A., Fiegna C., di Bartolo I., Ruggeri F.M., Delogu M., Ostanello F.: **Detection of Hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy**, Vet. Microbiol. 126. 74-81, 2008.

Martelli F., Toma S., Di Bartolo I., Caprioli A., Ruggeri F.M., Lelli D., Bonci M., Ostanello F.: **Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions**. Res. Vet. Sci. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]

Martín M., Segalés J., Huang F.F., Guenette D.K., Mateu E., de Deus N., Meng X.J.: **Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs**, Vet. Microbiol. 122. 16-24, 2007.

Masuda J., Yano K., Tamada Y., Takii Y., Ito M., Omagariu K., Kohno S.: **Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan**. Hepatol. Res. 31. 178–183, 2005.

Matsuda H., Okada K., Takahashi K., Mishira S.: **Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar**. J. Infect. Dis. 188. 944, 2003.

Matthijnsens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S.M., Palombo E.A., Iturriza-Gómara M., Maes P., Patton J.T., Rahman M., Van Ranst M.: **Full**



**genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains**, *J. Virol.* 82(7). 3204-3219, 2008.

Mattison K., Shukla A., Cook A., Pollari F., Friendship R., Kelton D., Bidawid S., Farber J.M.: **Human noroviruses in swine and cattle**. *Emerg. Infect. Dis.* 13(8). 1184-1188, 2007.

Matsubayashi K., Kang J.H., Sakata H., Takahashi K., Shindo M., Kato M., Sato S., Kato T., Nishimori H., Tsuji K., Maguchi H., Yoshida J., Maekubo H., Mishiro S., Ikeda H.: **A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route**, *Transfusion.* 48. 1368-1375, 2008.

Matsubayashi K., Nagaoka Y., Sakata H., Sato S., Fukai K., Kato T., Takahashi K., Mishiro S., Imai M., Takeda N., Ikeda H.: **Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan**, *Transfusion.* 44. 934-940, 2004.

Meng X.J., Halbur P.G., Shapiro M.S., Govindarajan S., Bruna J.D., Mushahwar I.K.: **Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus**, *J. Virol.* 72. 9714-9721, 1998.

Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N.: **Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans**, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364(1530). 2697-7207, 2009.

Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J., Emerson S.U.: **A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(18). 9860-9865, 1997.

Meng X.J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D.K., Toth T.E., Engle R.E., Emerson S.U., Purcell R.H.: **Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries**. *J. Clin. Microbiol.* 40. 117–122, 2002.

Meng X.J.: **Hepatitis E virus: cross-species infection and zoonotic risk**, Clin. Microbiol. Newsl. 27. 43-48, 2005.

Meng XJ.: **Recent advances in Hepatitis E Virus**, J. Viral. Hepat. 17. 153-161, 2010.

Meng X.J.: **Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation**, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 278. 185-216, 2003.

Michitaka K., Takahashi K., Furukawa S., Inoue G., Hiasa Y., Horiike N., Onji M., Abe N., Mishiro S.: **Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan**, Hepatol. Res. 37. 214-220, 2007.

Mizuo H., Yazaki Y., Sugawara K., Tsuda F., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H.: **Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan**. J. Med. Virol. 76(3). 341-349, 2005.

Moin S.M., Chandra V., Arya R., Jameel S.: **The hepatitis E virus ORF3 protein stabilizes HIF-1alpha and enhances HIF-1-mediated transcriptional activity through p300/CBP**, Cell Microbiol. 11(9). 1409-1421, 2009.

Moin S.M., Panteva M., Jameel S.: **The hepatitis E virus Orf3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death**, J. Biol. Chem. 282(29). 21124-21133, 2007.

Montella F., Rezza G., Di Sora F., Pezzotti P., Recchia O.: **Association between hepatitis E virus and HIV infection in homosexual men**, Lancet. 344. 1433, 1994.

Mushahwar I.K.: **Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention**, J. Med. Virol. 80(4). 646-658, 2008.

Nakai I., Kato K., Miyazaki A., Yoshii M., Li T.C., Takeda N., Tsunemitsu H., Ikeda H.: **Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75. 1171-1177, 2006.

Nakamura M., Takahashi K., Taira K., Taira M., Ohno A., Sakugawa H., Arai M., Mishiro S.: **Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan:**

**Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence,** Hepatol. Res. 34(3). 137-40, 2006.

National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Ning H., Yu S., Zhu Y., Dong S., Yu R., Shen S., Niu Z., Li Z.: **Genotype 3 hepatitis E has been widespread in pig farms of Shanghai suburbs,** Vet. Microbiol. 126. 257-263, 2008.

Nishizawa T., Takahashi M., Endo K., Fujiwara S., Sakuma N., Kawazuma F., Sakamoto H., Sato Y., Bando M., Okamoto H. **Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan,** J. Gen. Virol. 86(Pt 12). 3321-3326, 2005.

Nishizawa T., Takahashi M., Mizuo H., Miyajima H., Gotanda Y., Okamoto H.: **Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome,** J. Gen. Virol. 84(Pt 5). 1245-1251, 2003.

Nussbaum O., Roop A., Anderson W.F.: **Sequences determining the pH dependence of viral entry are distinct from the host range-determining region of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins,** J. Virol. 67. 7402-7405, 1993.

Okamoto H., Takahashi M., Nishizawa T., Fukai K., Muramatsu U., Yoshikawa A.: **Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan,** Biochem. Biophys. Res. Commun. 289(5). 929-936, 2001.

Olsen B., Axelsson-Olsson D., Thelin A., Weiland O.: **Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls.** Scand. J. Infect. Dis. 38. 55-58, 2006.

Országos Epidemiológiai Központ: **Előzetes jelentés a 2008. évben bejelentett fertőző megbetegségekről,** Epiinfo. 30. 350, 2009a.

Országos Epidemiológiai Központ: **Tájékoztató a hepatitis E vírus által okozott májgyulladás hazai előfordulásáról**, [Elektronikus dokumentum] URL: <http://oek.hu/oek.web?nid=796&pid=1> (2009. 07. 22.). 2009b.

Orvosi Mikrobiológiai Szakmai Kollégium: **Vírushepatitis – diagnosztikai algoritmus**. In: *Infektológiai Útmutató, Klinikai Irányelvek Kézikönyve*. Budapest: Medition Kiadó. p. 24-25, 2003.

Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L., Akritidis, N.: **Category B Potential Bioterrorism Agents: Bacteria, Viruses, Toxins, and Foodborne and Waterborne Pathogens**. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 20. 395-421, 2006.

Pei Y., Yoo D.: **Genetic characterization and sequence heterogeneity of a canadian isolate of swine hepatitis e virus**, *J. Clin. Microbiol.* 40(11). 4021-4029, 2002.

Peralta B., Casas M., de Deus N., Martín M., Ortuño A., Pérez-Martín E., Pina S., Mateu E.: **Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA**. *Vet. Microbiol.* 137. 66-73, 2009a.

Peralta B., Mateu E., Casas M., de Deus N., Martín M., Pina S.: **Genetic characterization of the complete coding regions of genotype 3 hepatitis E virus isolated from Spanish swine herds**, *Virus Res.* 139(1). 111-116, 2009b.

Pina S., Buti M., Cotrina M., Piella J., Girones R.: **HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain**. *J. Hepatol.* 33. 826-833, 2000.

Pischke S., Suneetha P.V., Baechlein C., Barg-Hock H., Heim A., Kamar N., Schlue J., Strassburg C.P., Lehner F., Raupach R., Bremer B., Magerstedt P., Cornberg M., Seehusen F., Baumgaertner W., Klempnauer J., Izopet J., Manns M.P., Grummer B., Wedemeyer H.: **Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients**. *Liver Transpl.* 16. 74-82, 2009.

Pudupakam R.S., Huang Y.W., Opriessnig T., Halbur P.G., Pierson F.W., Meng X.J.: **Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo**, *J. Virol.* 83. 384-395, 2009.

Purcell R.H., Emerson S.U.: **Hepatitis E virus**. In: *Fields Virology (4<sup>th</sup> ed.)*. Szerk: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Martin M.A., Lamb R.A., Roizman B., Straus S.E., Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. p. 3051–3061, 2001.

Ramachandran J., Eapen C.E., Kang G., Abraham P., Hubert D.D., Kurian G., Hephzibah J., Mukhopadhyaya A., Chandy G.M.: **Hepatitis E superinfection produces severe decompensation in patients with chronic liver disease**. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2. 134-138, 2004.

Rehman S., Kapur N., Durgapal H., Panda S.K.: **Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase**. *Virology.* 370(1). 77-92, 2008.

Reuter G., Fodor D., Forgách P., Kátai A., Szűcs Gy.: **A hepatitis E-vírus molekuláris epidemiológiája hazánkban: endémiás, élelmiszer közvetítette zoonosis**, *Orvosi Hetilap.* 150(9). 415-421, 2009a.

Reuter G., Fodor D., Forgách P., Kátai A., Szűcs Gy.: **Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary**, *J. Clin. Virol.* 44. 277-281, 2009b.

Reuter G., Fodor D., Kátai A., Szűcs Gy.: **Identification of a novel variant of human hepatitis E virus in Hungary**. *J. Clin. Virol.* 36(2). 100-102, 2006.

Reuter, G., Szűcs, Gy.: **Endémiás hepatitis E fertőzések a fejlett országokban? – Szaporodó ismeretek a hepatitis E vírusról és a hepatitis E fertőzésről**. *Orvosi Hetilap.* 51. 2555-2561, 2004.

Rutjes S.A., Lodder W., Bouwknegt M., de Roda Husman A.M.: **Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR**, *J. Virol. Methods.* 143. 112-116, 2007.

Rutjes S.A., Lodder W.J., Lodder-Verschuur F., van den Berg H.H.J.L., Vennema H., Duizer E., Koopmans M., de Roda Husman A.M.: **HEV genotype 3 sources in the Netherlands**, Unpublished. 2008.

Sansom B.F., Glead P.T.: **The ingestion of sow's faeces by suckling piglets**, *Br. J. Nutr.* 46(3). 451-456, 1981.

Schielke A., Sachs K., Lierz M., Appel B., Jansen A., Johne R.: **Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain**, *Virology Journal*. 6. 58, 2009.

Schlauder G.G., Dawson G.J., Erker J.C., Kwo P.Y., Knigge M.F., Smalley D.L., Rosenblatt J.E., Desai S.M., Mushahwar I.K.: **The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States**, *J. Gen. Virol.* 79(Pt 3). 447-456, 1998.

Schlauder G.G., Desai S.M., Zanetti A.R., Tassopoulos N.C., Mushahwar I.K.: **Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV**. *J. Med. Virol.* 57(3). 243-251, 1999.

Schlauder G.G., Frider B., Sookoian S., Castano G.C., Mushahwar I.K.: **Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina**, *J. Infect. Dis.* 182(1). 294-297, 2000.

Schlauder, G.G., Dawson, G.J.: **Hepatitis E virus**. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> edition. Szerk: Murray P.R. Washington DC.: ASM Press. 98.1495-1511, 2003.

Sehgal D., Thomas S., Chakraborty M., Jameel S.: **Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein**, *Virol. J.* 3. 38-46, 2006.

Seminati C., Mateu E., Peralta B., de Deus N., Martin M.: **Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain**, *The Veterinary Journal*. 175. 130-132, 2008.

Siegrist C.A.: **Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants**, *Vaccine*. 21(24). 3406-3412, 2003.

Siripanyaphinyo U., Laohasinnarong D., Siripanee J., Kaeoket K., Kameoka M., Ikuta K., Sawanpanyalert P.: **Full-length sequence of genotype 3 hepatitis E virus derived from a pig in Thailand**, *J. Med. Virol.* 81(4). 657-664, 2009.

Sonoda H., Abe M., Sugimoto T., Sato Y., Bando M., Fukui E., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H.: **Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan.** J. Clin. Microbiol. 42(11). 5371-5374, 2004.

Sreenivasan M.A., Arankalle V.A., Sehgal A., Pavri, K.M.: **Non-A, non-B epidemic hepatitis: visualization of virus-like particles in the stool by immune electron microscopy,** J. Gen. Virol. 65. 1005-1007, 1984.

Takahashi K., Abe N., Mishiro S.: **Nearly complete nucleotide sequence of hepatitis E virus isolate recovered from a Japanese patient,** Published Only in Database. 2009.

Takahashi K., Iwata K., Watanabe N., Hatahara, T., Ohta Y., Baba K., Mishiro S.: **Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan,** Virology. 287(1). 9-12, 2001.

Takahashi K., Kang J.H., Ohnishi S., Hino K., Mishiro S.: **Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis.** J. Infect. Dis. 185(9). 1342-1345, 2002.

Takahashi K., Kang J.H., Ohnishi S., Hino K., Miyakawa H., Miyakawa Y., Maekubo H., Mishiro S.: **Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan,** Intervirology. 46(5). 308-318, 2003.

Takahashi K., Kitajima N., Abe N., Mishiro S.: **Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer.** Virology. 330(2). 501-505, 2004.

Takahashi M., Tanaka T., Takahashi H., Hoshino Y., Nagashima S., Jirintai, Mizuo H., Yazaki Y., Takagi T., Azuma M., Kusano E., Isoda N, Sugano K., Okamoto H.: **Hepatitis E Virus (HEV) Strains in Serum Samples Can Replicate Efficiently in Cultured Cells Despite the Coexistence of HEV Antibodies: Characterization of HEV Virions in Blood Circulation,** J. Clin. Microbiol. 48(4). 1112-1125, 2010.



Tam A.W., Smith M.M., Guerra M.E., Huang C.C., Bradley D.W., Fry K.E., Reyes G.R.: **Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome**, *Virology*. 185(1). 120-131, 1991.

Tam A.W., White R., Reed E., Short M., Zhang Y., Fuerst T.R., Lanford R.E.: **In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes**, *Virology*. 215(1). 1-9, 1996.

Tam A.W., White R., Yarbough P.O., Murphy B.J., McAtee C.P., Lanford R.E., Fuerst T.R.: **In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes**. *Virology*. 238(1). 94-102, 1997.

Tamada Y., Yano K., Yatsunami H., Inoue O., Mawatari F., Ishibashi H.: **Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E**, *J. Hepatol.* 40. 869-70, 2004.

Tanaka H., Yoshino H., Kobayashi E., Takahashi M., Okamoto H.: **Molecular investigation of hepatitis E virus infection in domestic and miniature pigs used for medical experiments**. *Xenotransplantation*. 11. 503-510, 2004.

Tanaka T., Takahashi M., Kusano E., Okamoto H.: **Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus**. *J. Gen. Virol.* 88. 903-911, 2007.

Tanaka T., Takahashi M., Takahashi H., Ichiyama K., Hoshino, Y., Nagashima S., Mizuo H., Okamoto H.: **Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient**, *J. Clin. Microbiol.* 47. 1906-1910, 2009.

Tei S., Kitajima N., Ohara S., Inoue Y., Miki M., Yamatani T., Yamabe H., Mishiro S., Kinoshita Y.: **Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: An age- and sex-matched case-control study**, *J. Med. Virol.* 74(1). 67-70, 2004.

Tei S., Kitajima N., Takahashi K., Mishiro S.: **Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings**. *Lancet*. 362. 371-373, 2003.

Telegdy L.: **A vírushepatitisek epidemiológiája, diagnosztikája és kezelési lehetősége**, Hippocrates. VII(2). 2005. [Elektronikus dokumentum] URL: <http://www.medlist.com/HIPPOCRATES/VII/2/088.htm>

Teo C.G.: **Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E**, Clin. Microbiol. Infect. 16(1). 24-32, 2010.

Tokita H., Harada H., Gotanda Y., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H.: **Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype III hepatitis E virus in 1993**, J. Gen. Virol. 84(Pt 2). 421-427, 2003.

Torres-Vélez F., Brown C.: **Emerging infections in animals—potential new zoonoses?** Clinics in Laboratory Medicine. 24(3). 825-838, 2004.

Tsarev S.A., Emerson S.U., Reyes G.R., Tsareva T.S., Legters L.J., Malik I.A., Iqbal M., Purcell R.H.: **Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus**, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89(2). 559-563, 1992.

Tzeng W.P., Frey T.K.: **Complementation of a deletion in the rubella virus p150 nonstructural protein by the viral capsid protein**, J. Virol. 77. 9502-9510, 2003.

Valsesia-Wittmann S., Morling F.J., Nilson B.H., Takeuchi Y., Russell S.J., Cosset F.L.: **Improvement of retroviral retargeting by using amino acid spacers between an additional binding domain and the N terminus of Moloney murine leukemia virus SU**, J. Virol. 70. 2059-2064, 1996.

van Cuyck-Gandré H., Cockman-Thomas R., Caudill J.D., Asher L.S., Armstrong K.L., Hauroeder B., Clements N.J., Binn L.N., Longer C.F.: **Experimental African HEV infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*)**. J. Med. Virol. 55(3). 197-202, 1998.

van Cuyck-Gandré H., Zhang H.Y., Tsarev S.A., Clements N.J., Cohen S.J., Caudill J.D., Buisson Y., Coursaget P., Warren R.L., Longer C.F.: **Characterization of hepatitis E virus (HEV) from Algeria and Chad by partial genome sequence**, J. Med. Virol. 53(4). 340-347, 1997.

van Cuyck-Gandré H., Zhang H.Y., Tsarev S.A., Warren R.L., Caudill J.D., Snellings N.J., Bégot L., Innis B.L., Longer C.F.: **Short report: phylogenetically distinct hepatitis E viruses in Pakistan**, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62(2). 187-189, 2000.

van der Poel W.H., Verschoor F., van der Heide R., Herrera M.I., Vivo A., Kooreman M., de Roda Husman A.M.: **Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands**, *Emerging Infect. Dis.* 7(6). 970-976, 2001.

van der Poel W.H., Vinjé J., van der Heide R., Herrera M.I., Vivo A., Koopmans M.P.: **Norwalk-like calicivirus genes in farm animals**, *Emerg. Infect. Dis.* 6(1). 36-41, 2000.

Waar K., Herremans M.M., Vennema H., Koopmans M.P., Benne C.A.: **Hepatitis E is a cause of unexplained hepatitis in The Netherlands**, *J. Clin. Virol.* 33(2). 145-149, 2005.

Wang Q.H., Han M.G., Cheetham S., Souza M., Funk J.A., Saif L.J.: **Porcine noroviruses related to human noroviruses**. *Emerg. Infect. Dis.* 11(12). 1874-1881, 2005.

Wang Y., Levine D.F., Bendall R.P., Teo C.G., Harrison T.J.: **Partial sequence analysis of indigenous hepatitis E virus isolated in the United Kingdom**, *J. Med. Virol.* 65(4). 706-709, 2001a.

Wang Y., Zhang H., Li Z., Gu W., Lan H., Hao W., Ling R., Li H., Harrison T.J.: **Detection of sporadic cases of hepatitis E virus (HEV) infection in China using immunoassays based on recombinant open reading frame 2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4**, *J. Clin. Microbiol.* 39(12). 4370-4379, 2001b.

Wang Y.C., Zhang H.Y., Xia N.S., Peng G., Lan H.Y., Zhuang H., Zhu Y.H., Li S.W., Tian K.G., Gu W.J., Lin J.X., Wu X., Li H.M., Harrison T.J.: **Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China**, *J. Med. Virol.* 67. 516-521, 2002.

Wang Y., Zhang H., Ling R., Li H., Harrison T.J.: **The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3**, *J. Gen. Virol.* 81(7). 1675-1686, 2000.

Wichmann O., Schimanski S., Koch J., Kohler M., Rothe C., Plentz A., Jilg W., Stark K.: **Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany**, *J. Infect. Dis.* 198(12). 1732-1741, 2008.

Widdowson M.A., Jaspers W.J., van der Poel W.H., Verschoor F., de Roda Husman A.M., Winter H.L., Zaaijer H.L., Koopmans M.: **Cluster of cases of acute hepatitis associated with hepatitis E virus infection acquired in the Netherlands**, *Clin. Infect. Dis.* 36(1). 29-33, 2003.

Williams T.P., Kasorndorkbua C., Halbur P.G., Haqshenas G., Guenette D.K., Toth T.E., Meng X.J.: **Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model**. *J. Clin. Microbiol.* 39. 3040-3046, 2001.

Worm H.C., van der Poel W.H.M., Brandstätter G.: **Hepatitis E: an overview**, *Microbes Infect.* 4. 657-666, 2002.

Wu J.C., Chen C.M., Chiang T.Y., Tsai W.H., Jeng W.J., Sheen I.J., Lin C.C., Meng X.J.: **Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan**, *J. Med. Virol.* 66. 488-92, 2002.

Wu T., Zhang J., Su Z.J., Liu J.J., Wu X.L., Wu X.L., Lin C.X., Ou S.H., Yan Q., Shih J.W., Xia N.S.: **Specific cellular immune response in hepatitis E patients**, *Intervirology.* 51(5). 322-327, 2008.

Xia H., Liu L., Linde A.M., Belak S., Norder H., Widen F.: **Molecular characterization and phylogenetic analysis of the complete genome of a hepatitis E virus from European swine**, *Virus Genes.* 37(1). 39-48, 2008.

Yamada K., Takahashi M., Hoshino Y., Takahashi H., Ichiyama K., Nagashima S, Tanaka T, Okamoto H.: **ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells**. *J Gen Virol.* 90(8). 1880-1891, 2009b.

Yamada K., Takahashi M., Hoshino Y., Takahashi H., Ichiyama K., Tanaka T., Okamoto H.: **Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells**, *J. Gen. Virol.* 90(2). 457-462, 2009a.

Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N., Arikawa J., Yagami K., Asano M., Tezuka H., Suzuki N., Kurosawa T., Shibahara T., Furuya M., Mohri S., Sato H., Ohsawa K., Ibuki K., Takeda N.: **Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan**, *Exp. Anim.* 57(4). 367-376, 2008.

Yano K., Tamada Y., Yatsunami H., Ishibashi H., Takahashi K., Mishiro S.: **Hepatitis E virus genomic RNA, complete genome**, Unpublished. 2007.

Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y.: **Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food**, *J. Gen. Virol.* 84. 2351-2357, 2003.

Yoo D., Willson P., Pei Y., Hayes M.A., Deckert A., Dewey C.E., Friendship R.M., Yoon Y., Gottschalk M., Yason C., Giulivi A.: **Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus**, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8. 1213–1219, 2001.

Zhai L., Dai X., Meng J.: **Hepatitis E virus genotyping based on full-length genome and partial genomic regions**, *Virus Res.* 120. 57-69, 2006.

Zhao C., Ma Z., Harrison T.J., Feng R., Zhang C., Qiao Z., Fan J., Ma H., Li M., Song A., Wang Y.: **A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China**, *J. Med. Virol.* 81(8). 1371-1379, 2009.

## 11. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

### 4.2. Referált hazai vagy külföldön kiadott tudományos folyóiratokban megjelent (vagy közlésre elfogadott) dolgozatok

Reuter G., Fodor D., Forgách P., Kátai A., Szűcs Gy.: **Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary**, J. Clin. Virol. 44. 277-281, 2009.

Forgách P., Boncz A., Erdélyi K., Lőrincz M., Molnár B., Zentai J., Szűcs Gy., Reuter G., Bakonyi T.: **A Hepatitis E vírus - irodalmi áttekintés és hazai helyzet állatorvos szemmel**, Magyar Állatorvosok Lapja.132(4). 237-248, 2010.

Forgách P., Nowotny N., Erdélyi K., Boncz A., Zentai J., Szűcs Gy., Reuter G., Bakonyi T.: **Detection of Hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary**, Veterinary Microbiology. In Press, Corrected Proof, Available online 18 November 2009.doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.004

### 4.3. Kongresszusi kiadványokban megjelent, egy oldal terjedelmű előadás/poszter összefoglalók

Forgách P., Haagsman A., Szügyi D., Zentai J., Reuter G., Bakonyi T., Szűcs Gy.: **A Hepatitis-E vírus előfordulása Magyarországon állati eredetű mintákban**, Magyar Zoonózis Társaság, 2005. évi Szent-Iványi - Binder Napok, Sárospatak, Magyarország, 2005.

Forgách P., Haagsman A., Szügyi D., Zentai J., Reuter G., Bakonyi T., Szűcs Gy.: **Presence and phylogenetic relationship of Hepatitis E virus of animal origin in Hungary**, Abstracts of the Annual Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, Hungary, 2005.

Reuter G., Fodor D., Forgách P., Molnár B., Zentai J., Kátai A., Szűcs Gy.: **Molecular detection and sequence analysis of hepatitis E viruses (HEV) in humans and animals in Hungary**, Proceedings of the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Nice, France, 2006.

Forgách P., Boncz A., Molnár B., Zentai J., Bakonyi T., Reuter G., Fodor D., Kátai A., Szűcs Gy.: **A Hepatitis E vírus előfordulása magyarországi sertésállományokban**, Magyar Országos Állatorvos Egyesület Sertés-egészségügyi Társasága, 2006. évi Köves-napok, Keszthely, Magyarország, 2006.

Forgách P., Boncz A., Molnár B., Zentai J., Bakonyi T., Reuter G., Fodor D., Kátai A., Szűcs Gy.: **A Hepatitis E vírus előfordulása magyarországi sertésállományokban**, Magyar Állatorvosok Világszövetsége, Sertés-egészségügyi Konferencia, Galánta, Szlovákia, 2006.

Forgách P., Boncz A., Molnár B., Zentai J., Bakonyi T., Reuter G., Fodor D., Kátai A., Szűcs Gy.: **Hepatitis E virus is endemic in Hungary**, Proceedings of the 8th European Congress of Chemotherapy and Infection and 4th European Conference on Viral Diseases, Budapest, Hungary, 2006.

Forgách P., Bakonyi T., Deutz A., Nowotny N.: **Prevalence of hepatitis E virus antibodies in occupational groups with different exposure to swine**, Proceedings of the International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2007) Vienna, Austria, 2007.

Forgách P., Bakonyi T., Deutz A., Nowotny N.: **A hepatitis E vírus szeroprevalenciája sertésekkel kapcsolatos foglalkozást űzők körében**, Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2007.

Forgách P., Bakonyi T., Deutz A., Nowotny N.: **Prevalence of Hepatitis E virus antibodies in occupational groups with different exposure to swine**, Proceedings of the 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Hungary, 2007.

Forgách P., Boncz A., Kiss G., Nowotny N., Bakonyi T.: **A Hepatitis E vírus fertőzöttség mértéke különböző korcsoportú sertésekben**, Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2008.

Forgách P., Lussy H., Nowotny N., Molnár B., Bakonyi T.: **Analysis of the complete genome sequence of a Hungarian Hepatitis E virus strain**, Proceedings of the 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, Hungary, 2008.



Forgách P., Reuter G., Lussy H., Nowotny N., Bakonyi T.: **Phyogenetic analysis of partial and complete genome sequences of Hungarian Hepatitis E virus strains with animal origin**, Proceedings of the 8th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 2009.

## 12. MELLÉKLET

**XI. táblázat** A párhuzamosan vizsgált máj- és bélsár mintákból végzett RT-PCR eredményei. (n.a.: nincs adat).

	<b>Sertés</b>	<b>Testsúly</b>	<b>Máj</b>	<b>Bélsár</b>
1.	048/05/1	n.a.	-	-
2.	048/05/2	n.a.	-	-
3.	048/05/3	n.a.	-	-
4.	048/05/4	n.a.	-	-
5.	050/05	2 kg	-	-
6.	050-5-06	288 g	-	-
7.	065-1-05	31 kg	+	+
8.	065-2-05	29 kg	+	+
9.	065-3-05	17 kg	+	+
10.	077-1-06	n.a.	-	-
11.	080-2-05	14 kg	+	+
12.	080-3-05	47 kg	+	+
13.	088-06/3	n.a.	-	-
14.	103-05-2	27 kg	-	+
15.	103-05-3	n.a.	-	+
16.	103-05-4	16 kg	-	-
17.	106-1M-05	7 kg	-	-
18.	106-2M-05	19 kg	-	-
19.	108-1-05	5 kg	-	-
20.	108-2-05	10 kg	-	-
21.	108-3-05	12 kg	-	-
22.	108-4-05	12 kg	-	-
23.	108-5-05	11 kg	-	+
24.	118-4-05	36 kg	+	+
25.	118-5-05	75 kg	-	-
26.	119-05	3 kg	-	-
27.	126-05	n.a.	+	+
28.	128-3-05	n.a.	-	-
29.	133-4-06	n.a.	-	-
30.	149-03-05	n.a.	+	+
31.	172-1-05	n.a.	+	-
32.	177-1-05	n.a.	+	-
33.	192-1-05	n.a.	+	+
34.	198-1-05	n.a.	+	-
35.	255-1-06	n.a.	-	-

	<b>Sertés</b>	<b>Testsúly</b>	<b>Máj</b>	<b>Bélsár</b>
36.	299-7-06	n.a.	-	-
37.	542-05	n.a.	-	-
38.	576-05	n.a.	-	-
39.	E7	n.a.	-	-
40.	Ja2000-1	n.a.	-	+
41.	Ja2000-2	n.a.	-	-
42.	Ja2000-3	n.a.	+	+

**XII. táblázat** Az RT-PCR vizsgálatban használt primerpárok. Pozíció és a termék mérete a Burma2 (akcessziós szám: AJ272108) szekvencia alapján. f = forward, r = reverse.

	Primer	Szekvencia 5'-3'	Nt. pozíció	Termék mérete (bp)	Annealing hőmérséklet °C	Extenzió időtartama
1	ORF1-s1 f	CTGGCATYACTACTGCYATTGGC	56-79	417	55	1 perc
	ORF1-a1 r	CCATCRARRCAGTAA GTGGGTC	473-451			
2	HEV421f	CTCCGGCTTACGAGGTCTAC	421-440	317	54	1 perc
	HEV737r	CACGGAGAATGACACATCA	737-718			
3	HEV420f	GCTCCGCRTTACGWGGTCTA	420-439	1193	56	1,5 perc
	HEV1612r	CTCAAGCTGGYGSCCRTGRA	1612-1593			
4	HEV1276f	ATCCGGCCGTGATTATATCC	1276-1295	737	55	1 perc
	HEV2013r	GAGTGGCGCTGAGTGAATCT	2013-1994			
5	HEV1512f	GCCATGACAATGAGGCCTAT	1512-1531	1156	56	1,5 perc
	HEV2667r	TCAGGAGCCACAGCATGAAT	2667-2648			
6	HEV2139f	GGTCTACATCTGGCTTCTCT	2139-2158	775	55	1 perc
	HEV2917r	GCGAGCTGTGTCTTCAGTAA	2917-2898			
7	HEV2491f	AGACTGTGACTGGCTGGTTA	2491-2510	1354	55	1,5 perc
	HEV3836r	TCGGCTAGCTGATGATAGGC	3836-3817			
8	HEV2561f	TATCAGCGCTTCCAGCAGTC	2561-2580	662	55	1 perc
	HEV3223r	TGAGCAGCAGGAGGTGTG	3223-3204			
9	HEV2908f	CCYGGVATTGTSCAYTATCA	2908-2927	2103	56	2, 5 perc
	HEV5010r	CTGCAGCATRCCAATAAGGT	5010-4991			
10	HEV2930f	GCGCTCGAGATTGACTCTGC	2930-2949	914	56	1 perc
	HEV3843r	AGTCCCTCGGCTAGCTGATG	3843-3824			
11	HEV3535f	CTBACYCGCCACACWGAGAA	3535-3554	704	54	1 perc
	HEV4238r	TTRCTCCARGCCGAKATDCC	4238-4219			

	Primer	Szekvencia 5'-3'	Nt pozíció	Termék mérete (bp)	Annealing hőmérséklet °C	Extenzió időtartama
12	HEV4980f	GAACAGTTGCCGCTTAGCAGT	4980-4999	1523	55	2 perc
	HEV6483r	CCTTATCCTGCTGTGCATTC	6483-6464			
13	HEV5013f	CGCAGGTCCTGTGTTGATGTT	5013-5032	1471	55	1,5 perc
	HEV6483r	CCTTATCCTGCTGTGCATTC	6483-6464			
14	HEV5532f	GCTGCGCCGTTAACTGCTGT	5532-5551	504	56	1 perc
	HEV6035r	ACCTGATGTCGCCTCCCTCCT	6035-6016			
15	ORF2-s1 f	GACAGAAATTRATTTTCGTCGGCTGG	6298-6321	197	55	1 perc
	ORF2-a1 r	CTTGTTTCRTGYTGGTTRTCATAATC	6494-6470			
16	ORF2-s1 f	GACAGAAATTRATTTTCGTCGGCTGG	6298-6321	837	54	1 perc
	HEV7135r	CGCTGAAGCTCAGCAAATAGT	7135-7116			
17	HEV6975f	CCTTGGTGCTGGTCCAGTGT	6975-6994	307	50 (42)	1 perc
	Oligo dT					

**XIII. táblázat** A vizsgálat során pozitívnak bizonyult minták részletes adatai.

Mintavétel ideje	Származási hely	Rövid jellemzés
2005.02.14.	Érsekcsanak	130-0802 vaddisznó máj
2005.02.14.	Hajós	021771 vaddisznó máj
2005.02.16.	Törökszentmiklós	065-1-05 31 kg sertés máj
2005.02.16.	Törökszentmiklós	065-1-05 31 kg sertés bélsár
2005.02.16.	Törökszentmiklós	065-2-05 29 kg sertés máj
2005.02.16.	Törökszentmiklós	065-2-05 29 kg sertés bélsár
2005.02.16.	Törökszentmiklós	065-3-05 17 kg sertés máj
2005.02.16.	Törökszentmiklós	065-3-05 17 kg sertés bélsár
2005.02.16.	Dunaszekcső	080-2-05 14 kg sertés máj
2005.02.16.	Dunaszekcső	080-2-05 14 kg sertés bélsár
2005.02.16.	Dunaszekcső	080-3-05 47 kg sertés máj
2005.02.16.	Dunaszekcső	080-3-05 47 kg sertés bélsár
2005.02.01.	Telkibánya	105-1102 őz máj
2005.02.01.	Tamási	148-0786 őz máj
2005.02.01.	Balogunyom	121-0868 őz máj
2005.02.01.	Szentendre	258-0054 őz máj
2005.02.01.	Kapuvár	157-3793 őz máj
2005.02.24.	Ceglédcsémő	103-05-2 sertés bélsár 27 kg
2005.02.24.	Ceglédcsémő	103-05-3 sertés bélsár 32 kg
2005.02.24.	Ceglédcsémő	108-5-05 11 kg sertés bélsár
2005.02.24.	Ceglédcsémő	118-4-05 36 kg sertés máj
2005.02.24.	Ceglédcsémő	118-4-05 36 kg sertés bélsár
2005.04.13.	Böhönye	149-03-05 sertés máj
2005.04.13.	Böhönye	149-03-05 sertés bélsár
2005.04.13.	Dánszentmiklós	198-1-05 sertés máj
2005.04.13.	Mosonmagyaróvár	172-1-05 sertés máj
2005.04.13.	Veszprémvarsány	192-1-05 sertés máj
2005.04.13.	Veszprémvarsány	192-1-05 sertés bélsár
2005.04.13.	Csongrád	126-05 sertés máj
2005.04.13.	Csongrád	126-05 sertés bélsár
2005.04.13.	Szarvas	177-1-05 sertés máj
2005.02.01.	Valkó	130628 vaddisznó máj
2005.02.01.	Vanyarc	277-0188 vaddisznó máj
2005.02.01.	Mezőkeresztes	255-1134 vaddisznó máj
2005.02.01.	Mosonmagyaróvár	161-1915 vaddisznó máj
2005.02.01.	Isaszeg	130901 vaddisznó máj
2005.02.01.	Ják	152-1373 vaddisznó máj
2005.04.25.	Mezőkeresztes	155-0485 őz máj
2005.02.14.	Ják	152-1384 szarvas máj
2005.04.25.	Kapuvár	170-0488 őz máj
2005.02.14.	Kapuvár	157-4007 szarvas máj
2005.05.25.	Jászapáti	sertés bélsár
2005.05.25.	Jászapáti	sertés máj
2005.05.25.	Jászapáti	sertés bélsár

<b>Mintavétel ideje</b>	<b>Származási hely</b>	<b>Rövid jellemzés</b>
2005.04.25.	Gyöngyöstarján	135-0779 őz máj
2005.04.25.	Galgamácsa	253-0151 őz máj
2005.02.14.	Vasvár	178-0802 szarvas máj
2006.01.05.	Magyarszerdahely	sertés bélsár, 36 hónapos koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes ártány
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes ártány
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes ártány
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes ártány
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes ártány
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes koca
2006.01.18.	Pölöskefő	sertés bélsár, 7-8 hetes ártány
2007.06.19.	Pölöskefő	sertés bélsár – választási
2007.06.19.	Pölöskefő	sertés bélsár – választási
2007.06.19.	Pölöskefő	sertés bélsár – 10 hetes
2007.06.19.	Pölöskefő	sertés bélsár – 10 hetes
2007.06.19.	Ormándlak	sertés bélsár – véghízó
2007.06.19.	Ormándlak	sertés bélsár – hízó2-11 hetes
2007.06.19.	Ormándlak	sertés bélsár – hízó3 – 11 hetes
2007.06.19.	Ormándlak	sertés bélsár – 50kg
2007.06.19.	Ormándlak	sertés bélsár – 50kg
2007.06.19.	Ormándlak	sertés bélsár – 50kg
2007.06.19.	Magyarszerdahely	sertés bélsár – választás előtt
2007.06.19.	Magyarszerdahely	sertés bélsár – választás előtt
2009. 02. 03.	Nyíregyháza	sertés bélsár - előhízallda
2009. 02. 03.	Nyíregyháza	sertés bélsár - utóhízallda
2009. 02. 06.	Debrecen	sertés bélsár
2009. 02. 11.	Tedej	sertés bélsár – 11 hetes
2009. 02. 11.	Tedej	sertés bélsár – 11 hetes
2009. 02. 11.	Tedej	sertés bélsár – 11 hetes
2009. 02. 11.	Tedej	sertés bélsár – 11 hetes



**XIV. táblázat** Az immunoblot vizsgálat eredményei.

Minta	Összesen	IgG			IgM		
		Negatív	Gyenge pozitív	Pozitív	Negatív	Gyenge pozitív	Pozitív
Sertéstelepi dolgozók	153	86 (56%)	11 (7%)	56 (37%)	103 (67%)	11 (7%)	39 (26%)
Sertés-vágóhídi dolgozók	95	59 (62%)	10 (11%)	26 (27%)	60 (63%)	8 (8%)	27 (29%)
Állatorvosok	126	87 (69%)	7 (6%)	32 (25%)	88 (70%)	6 (5%)	32 (25%)
Vadászok	149	108 (72%)	7 (5%)	34 (23%)	113 (76%)	14 (9%)	22 (15%)
Városlakók	70	54 (77%)	5 (7%)	11 (16%)	56 (80%)	6 (9%)	8 (11%)
Baromfi-vágóhídi dolgozók	46	32 (70%)	7 (15%)	7 (15%)	36 (78%)	6 (13%)	4 (9%)
<b>ÖSSZESEN</b>	<b>639</b>	<b>426 (67%)</b>	<b>47 (7%)</b>	<b>166 (26%)</b>	<b>456 (71%)</b>	<b>51 (8%)</b>	<b>132 (21%)</b>

**XV. táblázat** Az ELISA vizsgálat eredményei.

Minta	Összesen	ELISA IgG			ELISA Ig M		
		Negatív	Kétes	Pozitív	Negatív	Kétes	Pozitív
Sertéstelepi dolgozók	81	60 (74%)	3 (4%)	18 (22%)	79 (97%)	0 (0%)	2 (3%)
Sertés-vágóhídi dolgozók	44	40 (91%)	0 (0%)	4 (9%)	39 (88%)	2 (5%)	3 (7%)
Állatorvosok	59	46 (78%)	0 (0%)	13 (22%)	58 (98%)	0 (0%)	1 (2%)
Vadászok	60	49 (80%)	0 (0%)	11 (20%)	57 (95%)	3 (5%)	0 (0%)
Városlakók	16	12 (74%)	2 (13%)	2 (13%)	15 (94%)	0 (0%)	1 (6%)
Baromfi-vágóhídi dolgozók	14	9 (64%)	0 (%)	5 (36%)	14 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>ÖSSZESEN</b>	<b>274</b>	<b>214 (79%)</b>	<b>5 (2%)</b>	<b>132 (19%)</b>	<b>262 (95%)</b>	<b>5 (2%)</b>	<b>7 (3%)</b>

**XVI. táblázat** Az immunoblot és ELISA módszerrel párhuzamosan vizsgált savóminták adatai.

	<b>MINTA</b>	<b>IB IgM</b>	<b>IB IgG</b>	<b>ELISA IgM</b>	<b>ELISA IgG</b>
1.	állatorvos	<b>gyenge pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
2.	állatorvos	negatív	negatív	negatív	negatív
3.	állatorvos	negatív	negatív	negatív	negatív
4.	állatorvos	negatív	negatív	negatív	negatív
5.	állatorvos	negatív	negatív	negatív	negatív
6.	állatorvos	negatív	negatív	negatív	negatív
7.	állatorvos	negatív	negatív	negatív	negatív
8.	állatorvos	negatív	negatív	negatív	negatív
9.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
10.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
11.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
12.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
13.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
14.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
15.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
16.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
17.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
18.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
19.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
20.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
21.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
22.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
23.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
24.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
25.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
26.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
27.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
28.	állatorvos	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
29.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	negatív
30.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	negatív
31.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	negatív
32.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	negatív
33.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
34.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
35.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
36.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
37.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
38.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
39.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
40.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
41.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
42.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
43.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív

	<b>MINTA</b>	<b>IB IgM</b>	<b>IB IgG</b>	<b>ELISA IgM</b>	<b>ELISA IgG</b>
44.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
45.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
46.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
47.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
48.	állatorvos	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	<b>pozitív</b>
49.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
50.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
51.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
52.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
53.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
54.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
55.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
56.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
57.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
58.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
59.	állatorvos	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív
60.	baromfi-vágóhídi dolgozó	<b>gyenge pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
61.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	negatív	negatív	negatív
62.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	negatív	negatív	negatív
63.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	negatív	negatív	negatív
64.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	negatív	negatív	negatív
65.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	negatív	negatív	<b>pozitív</b>
66.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
67.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
68.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
69.	baromfi-vágóhídi dolgozó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
70.	baromfi-vágóhídi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	negatív
71.	baromfi-vágóhídi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	negatív
72.	baromfi-vágóhídi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
73.	baromfi-vágóhídi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
74.	sertés-vágóhídi dolgozó	<b>gyenge pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
75.	sertés-vágóhídi dolgozó	negatív	negatív	negatív	negatív
76.	sertés-vágóhídi dolgozó	negatív	negatív	negatív	negatív
77.	sertés-vágóhídi dolgozó	negatív	negatív	negatív	negatív





	<b>MINTA</b>	<b>IB IgM</b>	<b>IB IgG</b>	<b>ELISA IgM</b>	<b>ELISA IgG</b>
168.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
169.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
170.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
171.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
172.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
173.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
174.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
175.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
176.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
177.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
178.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
179.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
180.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	<b>pozitív</b>
181.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	<b>pozitív</b>
182.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	<b>pozitív</b>
183.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	<b>pozitív</b>
184.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<i>kétes</i>
185.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
186.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
187.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
188.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
189.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
190.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
191.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
192.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
193.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
194.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
195.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
196.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
197.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
198.	sertéstelepi dolgozó	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív
199.	vadász	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	?	negatív
200.	vadász	<b>gyenge pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
201.	vadász	<b>gyenge pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
202.	vadász	negatív	negatív	negatív	negatív
203.	vadász	negatív	negatív	negatív	negatív
204.	vadász	negatív	negatív	negatív	negatív
205.	vadász	negatív	negatív	negatív	negatív
206.	vadász	negatív	negatív	negatív	negatív
207.	vadász	negatív	negatív	negatív	negatív
208.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	?	negatív
209.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<i>kétes</i>
210.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<i>kétes</i>
211.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
212.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív

	<b>MINTA</b>	<b>IB IgM</b>	<b>IB IgG</b>	<b>ELISA IgM</b>	<b>ELISA IgG</b>
213.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
214.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
215.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
216.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
217.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
218.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
219.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
220.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
221.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
222.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
223.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
224.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
225.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
226.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
227.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
228.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
229.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
230.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
231.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
232.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
233.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
234.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
235.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
236.	vadász	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
237.	vadász	<b>pozitív</b>	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	negatív
238.	vadász	<b>pozitív</b>	<b>gyenge pozitív</b>	negatív	negatív
239.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
240.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
241.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
242.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
243.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
244.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
245.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
246.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
247.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
248.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
249.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
250.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
251.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
252.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
253.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
254.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
255.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
256.	vadász	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
257.	vadász	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<i>kétes</i>	negatív



	<b>MINTA</b>	<b>IB IgM</b>	<b>IB IgG</b>	<b>ELISA IgM</b>	<b>ELISA IgG</b>
258.	vadász	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
259.	városlakó	negatív	negatív	negatív	negatív
260.	városlakó	negatív	negatív	negatív	negatív
261.	városlakó	negatív	negatív	negatív	negatív
262.	városlakó	negatív	negatív	negatív	negatív
263.	városlakó	negatív	negatív	negatív	negatív
264.	városlakó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<i>kétes</i>
265.	városlakó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<i>kétes</i>
266.	városlakó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
267.	városlakó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
268.	városlakó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív
269.	városlakó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
270.	városlakó	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>
271.	városlakó	<b>pozitív</b>	negatív	<i>kétes</i>	negatív
272.	városlakó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
273.	városlakó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív
274.	városlakó	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív

**XVII. táblázat** A filogenetikai vizsgálatokhoz és teljes genom elemzéséhez felhasznált szekvenciák adatai.

Törzsa kód	Akcessziós szám	Törzs neve	Faj	Ország	Év	Referencia	Genom régió
swMN06-C1056/sw/MNG-07	AB290313	swMN06-C1056	sertés	Mongólia	2007	Lorenzo <i>et al.</i> , 2007	teljes genom
SW627/sw/ESP-08	EU723513	SW627		Spanyolország	2008	Peralta <i>et al.</i> , 2009b	
swX07-E1/sw/SWE-07	EU360977	swX07-E1		Svédország	2007	Xia <i>et al.</i> , 2008	
swHEV07/sw/THA-08	EU375463	Thai-swHEV07		Thaiföld	2008	Siripanyaphinyo <i>et al.</i> , 2009	
HE-JA04/hu/JPN/04	AB248520	HE-JA04-1911	ember	Japán	2004	Inoue <i>et al.</i> , 2006b	
pJE03-1760Fwt/hu/JPN-08	AB437316	pJE03-1760F/wt			2008	Yamada <i>et al.</i> , 2009a	
wbJTS1/wb/JPN-05	AB222183	wbJTS1			2005	Nishizawa <i>et al.</i> , 2005	
JDEER/red/JPN-04	AB189071	JDEER-Hyo03L	vaddisznó	Japán	2004	Takahashi <i>et al.</i> , 2004	
JBOAR1/wb/JPN-04	AB189070	JBOAR1-Hyo04	vad szarvas		2005	Nishizawa <i>et al.</i> , 2005	
wbJSG1/wb/JPN-05	AB222182	wbJSG1	vaddisznó		1998	Schlauder <i>et al.</i> , 1998	
US2/hu/USA-98	AF060669	HEV-US2	ember	USA	2007	Takahashi <i>et al.</i> , 2009	
JHK-Toy04C/hu/JPN-07	AB291962	JHK-Toy04C					
JIO-Sai97L/hu/JPN-07	AB291951	JIO-Sai97L					
JYM-Tot04L/hu/JPN-07	AB291956	JYM-Tot04L					
JJT-Kan/hu/JPN-02	AB091394	JJT-Kan	vaddisznó	Japán	2002	Takahashi <i>et al.</i> , 2003	
JRA1/hu/JPN-01	AP003430	JRA1			2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	
wbJYG1/wb/JPN-01	AB222184	wbJYG1	sertés	Mongólia	2007	Lorenzo <i>et al.</i> , 2007	
swMN06-A1288/sw/MNG-07	AB290312	swMN06-A1288					
SWP7/sw/ESP-08	EU723515	SWP7					
TLS25/hu/FRA-2008	EU495148	TLS25	ember	Spanyolország	2008	Peralta <i>et al.</i> , 2009b	
Osh205/sw/KGZ-88	AF455784	Osh 205	sertés	Franciaország		Legrand-Abbravanel <i>et al.</i> , 2009	
JSS-Oka04L/hu/JPN-07	AB291954	JSS-Oka04L		ember	Kirgizisztán	1988	Lu <i>et al.</i> , 2004
				Japán	2007	Takahashi <i>et al.</i> , 2009	

Törzsfaj kód	Akcessziós szám	Törzsnéve	Faj	Ország	Év	Referencia	Genom régió
HE-JA10/hu/JPN-93	AB089824	HE-JA10	ember	Japán	1993	Tokita <i>et al.</i> , 2003	teljes genom
Arkell/sw/CAN-02	AY115488	Arkell	sértés	Kanada	2002	Pei és Yoo, 2002	
JMY-Haw/hu/JPN-01	AB074920	JMY-Haw	ember	Japán	2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2002	
JKN-Sap/hu/JPN-01	AB074918	JKN-Sap	ember	Japán	2001	Takahashi <i>et al.</i> , 2002	
E088-STM04C/hu/JPN-07	AB369689	E088-STM04C			2007	Yano <i>et al.</i> , 2007	
US1/hu/USA-98	AF060668	HEV-US1		USA	1998	Schlauder <i>et al.</i> , 1998	
swJ570/sw/JPN-01	AB073912	swJ570	sértés	Japán	2001	Okamoto <i>et al.</i> , 2001	
swKOR-1/sw/KOR-07	FJ426403	swKOR-1		Dél-Korea	2007	Choi <i>et al.</i> , 2008	
Meng/sw/USA-98	AF082843	Meng		USA	1998	Meng <i>et al.</i> , 1997	
HEV072/sw/HUN-05	HM055578	HEV072		Magyarország	2005	Forgách <i>et al.</i> , 2010	
Mexico/hu/MEX-87	M74506	Mexico		Mexikó	1987	Huang <i>et al.</i> , 1992	
Burma2/hu/MYA-89	D10330	HEVNE8L Burma 2	ember	Myanmar	1989	Tam <i>et al.</i> , 1991	
ChinaT1/hu/CHN-00	AJ272108	ChinaT1	vaddisznó	Kína	2000	Wang <i>et al.</i> , 2000	
wbGER27/wb/GER-06	FJ705359	wbGER27		Németország	2006	Shielke <i>et al.</i> , 2009	
NLSW122/Sw/NED-01	AF336299	NLSW122	sértés	Hollandia	2001	van der Poel <i>et al.</i> , 2001	
NLSW22/Sw/NED-01	AF336291	NLSW22		Nagy-Britannia	2002	Banks <i>et al.</i> , 2004	
P354-1-02/Sw/GBR-02	AF503511	P354-1-02					
P143-11-02/Sw/GBR-02	AF503512	P143-11-02					
NLSW82/Sw/NED-01	AF336294	NLSW82	vaddisznó	Hollandia	2001	van der Poel <i>et al.</i> , 2001	
HEV006/Wb/HUN-05	EF530675	HEV006		Magyarország	2005	Reuter <i>et al.</i> , 2006	
HEV007/Wb/HUN-05	EF530676	HEV007					
HEV034/Sw/HUN-05	EF530671	HEV034					
HEV052/Sw/HUN-05	EU718629	HEV052					
Ar2/Hu/ARG-00	AF264012	Ar2	ember	Argentína	2000	Schlauder <i>et al.</i> , 2000	
It1/Hu/ITA-99	AF110390	It1		Olaszország	1999	Schlauder <i>et al.</i> , 1999	

Törzsfaj kód	Akcessziós szám	Törzsnév	Faj	Ország	Év	Referencia	Genom régió
G1/Hu/GRE-99	AF110391	G1	ember	Görögország		Schlauder <i>et al.</i> , 1999	
G2/Hu/GRE-99	AF110392	G2					
Hungary1/Hu/HUN-06	AY940427	Magyarország1	sertés	Magyarország	2006	Reuter <i>et al.</i> , 2006	
HEV036/Sw/HUN-05	EU718633	HEV036			2005	Forgách <i>et al.</i> , 2009	
HEV088/Sw/HUN-05	EU718634	HEV088	sertés		2005		
HEV264/Sw/HUN-06	EU718635	HEV264					
HEV278/Sw/HUN-06	EU718636	HEV278					
HEV039/Sw/HUN-05	EU718640	HEV039					
HEV143/Sw/HUN-05	EU718641	HEV143	szarvas	Magyarország	2005	Forgách <i>et al.</i> , 2009	
HEV157/red/HUN-05	EU718642	HEV157					
HEV070/sw/HUN-05	EU718644	HEV070	sertés		2009		
HEV612/sw/HUN-09	GQ468295	HEV612					
HEV451/sw/HUN-07	HM055580	HEV450	sertés		2007		ORF2
HEV446/sw/HUN-07	HM055579	HEV446					
HEV480/sw/HUN-07	HM055581	HEV480					
VH1/hu/ESP-02	AF491000	VH1	ember	Spanyolország	2002	Clemente-Casares <i>et al.</i> , 2003	
HEV138/rod/HUN-05	GQ468296	HEV138	őz	Magyarország	2005	Forgách <i>et al.</i> , 2009	
NL1055/hu/NED-05	EU526647	NL1055	ember	Hollandia		Rutjes <i>et al.</i> , 2008	
119E/wb/GER-96	EU035813	119E	vaddisznó	Németország	1996	Kaci <i>et al.</i> , 2008	
HEV045/rod/HUN-05	EU057982	HEV045	őz		2005		
HUN-E113/hu/HUN-07	EF530669	HUN-E113	ember	Magyarország	2007	Reuter <i>et al.</i> , 2009b	
HUN-E91/hu/HUN-07	EF530666	HUN-E91					
HUN-E71/hu/HUN-07	EF530664	HUN-E71					
HUN-E69/hu/HUN-07	EF530663	HUN-E69					
HUN-E117/hu/HUN-07	EF530670	HUN-E117					
HUN-E104/hu/HUN-07	EF530668	HUN-E104					

Törzsfaj kód	Akcessziós szám	Törzsnév	Faj	Ország	Év	Referencia	Genom régió
HUN-E95/hu/HUN-07	EF530667	HUN-E95	ember	Magyarország	2007	Reuter <i>et al.</i> , 2009b	ORF2
HUN-E86/hu/HUN-07	EF530665	HUN-E86					
HUN-E67/hu/HUN-07	EF530662	HUN-E67					
HUN-E66/hu/HUN-07	EF530661	HUN-E66					
HUN-E38/hu/HUN-07	EF530660	HUN-E38					
HUN-E19/hu/HUN-07	EF530659	HUN-E19					
Ger-JS/Hu/GER-04	AY753647	Ger-JS	ember	Magyarország	2007	Reuter <i>et al.</i> , 2009b	ORF1
UK/Hu/GBR-01	AJ315768	UK		Németország	2004	Banas <i>et al.</i> , 2004	
Ar2/Hu/ARG-00	AF264010	Ar2		Nagy-Britannia	2001	Wang <i>et al.</i> , 2001a	
G2/Hu/GRE-99	AF110389	G2		Argentína	2000	Schlauder <i>et al.</i> , 2000	
G1/Hu/GRE-99	AF110388	G1		Görögország	1999	Schlauder <i>et al.</i> , 1999	
It1/Hu/ITA-99	AF110387	It1		Olaszország			
HEV006/Wb/HUN-05	EU718646	HEV006	vaddisznó	Magyarország	2005	Forgách <i>et al.</i> , 2009	Genom régió
HEV007/Wb/HUN-05	EU718647	HEV007					
HEV034/Sw/HUN-05	EU718648	HEV034	sertés				
HEV039/Sw/HUN-05	EU718649	HEV039					
<b>XIII. táblázat kód</b>	<b>Akcessziós szám</b>	<b>Törzsnév</b>	<b>Faj</b>	<b>Ország</b>	<b>Év</b>	<b>Referencia</b>	<b>Genom régió</b>
AB097812 – HE-JA1	AB097812	HE-JA1	ember	Japán	2002	Nishizawa <i>et al.</i> , 2003	HVR, fulminancia-nukleotidok
AF051830 – TK15/92	AF051830	TK15/92	ember (makákó)	Nepál	1992	Gouvea <i>et al.</i> , 1998	
M80581 – Sar-55	M80581	Sar-55		Pakisztán	1987	Tsarev <i>et al.</i> , 1992	
AY204877 – T3-Chad	AY204877	T3-Chad	ember	Csád	1983	van Cuyck-Gandré <i>et al.</i> , 1997	
X98292 – hev037 (II-FHF)	X98292	hev037 (II-FHF)		India	1996	Donati <i>et al.</i> , 1997	

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Tudományos munkám anyagi- és infrastrukturális feltételeinek maradéktalan biztosításában, a kutatás menetének irányításában, a kapott eredmények értékelésében, a publikációim kéziratának lektorálásában nyújtott segítségéért, szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Dr. Bakonyi Tamás egyetemi adjunktusnak. Hálás vagyok a Szent István Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék és Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék, jelenlegi és volt dolgozóinak szakmai támogatásáért, valamint a kollegiális, baráti légkör megteremtéséért, barátságukért, mellyel munkámat segítették. Köszönöm a Bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem Klinikai Virologia Tanszék munkatársai, különösen Dr. Norbert Nowotny szerológiai vizsgálatokban való közreműködését, illetve a vizsgált minták szekvencia-meghatározásában és a CEEPUS-ösztöndíjas munkám során kapott segítséget.

Köszönettel tartozom Dr. Lőrincz Mártának és Dr. Molnár Beátának, a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Nagyállatklinika Kórbonctani Osztályán való munkavégzésük közben a kutatásban felhasznált sertés bélsár- és máj minták gyűjtéséért. Köszönöm Dr. Boncz Attilának a Zala Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság munkatársának, hogy a Zala megyei sertéstelepeken a mintagyűjtést megszervezte és lebonyolította. Köszönöm Dr. Zentai Jánosnak, a MAVAD-Vecsés Kft. állatorvosának a vaddisznó, őz és szarvas máj minták, Dr. Erdélyi Károlynak, a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Kórbonctani Főosztály-Emlős Kórbonctani és Vadbetegségek Osztálya laboratóriumi állatorvosának, őz és szarvas bélsár minták, illetve dr. Gyuranecz Miklósnak, dr. Csörgő Tibornak és dr. Jakab Ferencnek a hörcsög és cickány minták. rendelkezésemre bocsátását. Hálásan köszönöm Dr. Annika Haagsmannak, Dr. Szügyi Dezsőnek és Dr. Kiss Gergőnek, hogy ösztöndíjas-, szakdolgozati- és tudományos diákköri kutatásaik során a minták feldolgozásában és a szakirodalmi adatok gyűjtésében segítségemre voltak. Konstantinos Tampakisnak és Romada Péternek köszönöm a teljes genomszekvencia meghatározásában felmerült problémák megoldásában nyújtott segítséget.

Hálás vagyok a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Állatorvos-tudományi Könyvtár dolgozóinak, különösen Orbán Évának és Oláh Editnek, hogy az irodalmi adatok összegyűjtésében segítettek. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kővágó Csaba, Üveges Péter és Abonyi-Tóth Zsolt informatikai problémák megoldásában nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Szűcs Györgynek, Dr. Reuter Gábornak és Dr. Bányai Krisztiánnak az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat Dél-dunántúli Regionális Intézete Regionális Virologiai Laboratórium, Gasztroenterális Vírusok Nemzeti Referencialaboratóriuma munkatársainak szakmai segítségét, és az EVENT projektben való részvételi lehetőséget. Köszönöm a humán- és állatorvos mikrobiológus kollegáknak, hogy nemzetközi és hazai konferenciákon, előadásaimmal kapcsolatban feltett kérdéseikkel, megjegyzéseikkel és tanácsaikkal segítették a kutatást.

Végül, de nem utolsó sorban, nagyon köszönöm családomnak, szeretteimnek és barátaimnak türelmüket és sokszor lemondásokkal járó áldozatvállalásaikat: támogatásukkal és gondoskodásukkal lehetővé tették számomra, hogy minél több időt és energiát fordíthassak kutatásaimra. Édesanyámnak ez úton is köszönöm, hogy minden energiáját és tudását beleadva 3 hónap alatt felkészített a Doktori Iskola követelményei között szereplő francia alapfokú nyelvvizsgára.

A vizsgálatokat a „Providing tools to prevent emergence of enteric viruses Enteric Viruses Emergence, New Tools” EVENT, EU Framework 6. SP22-CT-2004-50571 pályázat, a Magyar-Osztrák Kormányközi TÉT Együttműködési Program A-8/2005 projekt, az OTKA D 48647 projekt, a CEEPUS ösztöndíjprogram és a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Doktori Iskola anyagi támogatásával végeztük.