



Állatorvostudományi Egyetem

Patológia Tanszék

**Magyarországon izolált macska hepadnavírus
törzsek filogenetikai jellemzése**

Phylogenetic characterization of feline hepadnavirus
strains isolated in Hungary

Készítette: Honics Marcell

Témavezető: Dr. Szilasi Anna, egyetemi adjunktus
Patológia Tanszék

Budapest

2022

Absztrakt

A domestic cat hepadnavirus (DCH) a *Hepadnaviridae* család, *Orthohepadnavirus* nemzetségének tagja. A családba tartozó vírusokat napjainkra már a halak, a kételtűek, a hüllők, a madarak és az emlősök osztályából egyaránt kimutattak. A világon elsőként Aghazadeh és munkatársai (2018) izoláltak hepadnavírust egy házi macska (*Felis catus*) tumoros elváltozásának (multicentrikus, nagysejtes, high-grade, B-sejtes lymphoma) kórszöveti mintájából. A DCH első kimutatását követően rövid időn belül felmérő vizsgálatokat végeztek a világ számos táján annak érdekében, hogy – a különféle biológiai mintákból történő izolálásával – igazolják a vírus előfordulását. A független kutatócsoportok eredményei alapján eddig hét ország jelentette a DCH jelenlétét, ugyanakkor valószínűsíthető, hogy egy világszerte előforduló kórokozóról van szó. Az eddig megjelent publikációk szerzői feltételezik, hogy a vírus a – nemzetség prototípus faja által előidézett – humán hepatitis B megbetegedéshez hasonló makro- és mikroszkópos patológiai elváltozásokat, illetve vérbiokémiai és immunológiai eltéréseket idéz elő macskákban. A vizsgálataink során – a korábban megkezdett hazai prevalencia-vizsgálat kiterjesztéseként – a teljes vérmintákból a nukleinsav kinyerése után RT-PCR segítségével mutattuk ki a vírust. A detektálást követően a különféle törzseket Sanger-féle szekvenálással kívántuk vizsgálni szekvenciaelemzés és filogenetikai jellemzés céljából. Bár a nukleinsav extrakciója sikeres volt először és ismételve is a diagnosztikai vizsgálatok során, a hosszabb nukleinsav szegmenseket nem sikerült amplifikálni semelyik vérmintából, több módszerrel sem – ennek következtében a szekvenciaanalízis is sikertelen volt. Ennek hátterében feltehetően a mintákban található igen alacsony vírus kópiaszám, és esetleg a nukleinsav töredezettsége, avagy sérülése állhat.

Domestic cat hepadnavirus (DCH) is a member of the *Orthohepadnavirus* genus, *Hepadnaviridae* family. Viruses of this family have now been detected in fishes, amphibians, reptilians, birds, and mammals as well. Hepadnavirus was first isolated by Aghazadeh *et al.* (2018) from a histopathological sample of tumour lesion (multicentric, large cell, high-grade, B-cell lymphoma) of a domestic cat (*Felis catus*). Shortly after the first detection of DCH, screening studies were conducted all around the world in order to confirm the presence of the virus (by isolating it from various biological samples). According to the result of independent research groups, so far seven countries reported the presence of DCH, although it can be assumed that it is a worldwide pathogen. The authors of the previously published studies hypothesize that in cats the virus induces macroscopic and microscopic pathological lesions, clinical chemistry, and immunology abnormalities similar to human hepatitis B disease, which is caused by the prototype species of the genus. In our studies – as an extension of the previously initiated Hungarian prevalence screening – the virus was detected by RT-PCR after nucleic acid extraction from whole blood samples. Following detection, further sequence analysis and phylogenetic evaluation of the various strains were planned to be conducted by Sanger sequencing. Although initial and repeated nucleic acid extractions were successful during the diagnostic tests, amplification of longer nucleic acid segments, by multiple methods, failed from every blood sample, therefore the sequence analysis was also unsuccessful. A possible cause could be the very low viral copy numbers in the samples, and, probably, the fragmentation or damage of the nucleic acid.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	1
2. Bevezetés.....	3
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. Hepadnavírusok.....	6
3.1.1. Történet	6
3.1.2. Morfológia, felépítés	7
3.1.3. Replikációs ciklus	8
3.2. Hepatitis B megbetegedés	9
3.2.1. Történet	9
3.2.2. Fertőződés, terjedés	10
3.2.4. Kórfejlődés	11
3.2.5. Klinikum.....	11
3.2.6. Ko-infekció a HIV-vel	12
3.2.3. Védekezés, megelőzés.....	12
3.3. Orthohepadnavírusok	13
3.3.1. Kisemlősök hepadnavírusai.....	13
3.3.1.1. Woodchuck hepatitis virus (WHV).....	13
3.3.1.2. Ground squirrel hepatitis virus (GSHV); arctic squirrel hepatitis virus (ASHV)	13
3.3.1.3. Chinese shrew hepatitis B virus (CSHBV)	14
3.3.2. Újvilági majmok hepadnavírusai	14
3.3.2.1. Woolly monkey hepatitis B virus (WMHBV)	14
3.3.2.2. Capuchin monkey hepatitis B virus (CMHBV)	15
3.3.3. Denevér hepadnavírusok	16
3.3.3.1. Jelentőség	16
3.3.3.2. Long-fingered bat hepatitis B virus (LBHBV)	16
3.3.3.3. További vírusok.....	17
3.3.3.4. Zoonotikus potenciál	17
3.3.4. Macska hepadnavírusterzsek.....	17
3.3.4.1. Ausztrál eredmények.....	18
3.3.4.2. Olasz eredmények	20
3.3.4.3. Thaiföldi eredmények	21
3.3.4.4. Maláj eredmények	21
3.3.4.5. Brit eredmények	22
3.3.4.6. Japán eredmények	22
3.3.4.7. Amerikai eredmények	23

3.3.5. Kutya hepadnavírus törzsek	23
4. Anyag és módszer	25
4.1. Mintagyűjtés	25
4.2. A nukleinsav kinyerése	25
4.3. Polimeráz-lánreakció	26
4.3.1. Jelentőség	27
4.3.2. Vizsgálható minták, mintaelőkészítés	27
4.3.4. Lépések.....	28
4.3.5. Módszerek	29
4.3.5.1. Hagyományos PCR módszer.....	29
4.3.5.2. Real-time (RT) PCR módszer	30
4.3.6. Olvadási görbe analízis	31
4.4. Saját PCR-vizsgálat	31
4.5. Szekvenálás	33
4.5.1. Sanger-féle szekvenálás	33
4.5.2. Saját szekvenálási kísérletek	33
5. Eredmények.....	36
6. Megbeszélés	40
7. Összefoglalás.....	42
8. Irodalomjegyzék.....	43
9. Köszönetnyilvánítás	49

1. Rövidítések jegyzéke

ALKP - alkalikus-foszfátáz	FeLV - feline leukemia virus
ALT - alanin amino-transzferáz	FIV - feline immunodeficiency virus
ASHV - arctic squirrel hepatitis virus	FNA - fine needle aspiration
AST - aszparaginsav-transzamináz	GSHV - ground squirrel hepatitis virus
ÁTE - Állatorvostudományi Egyetem	HBHBV - horseshoe bat hepatitis B virus
BHBV - bluegill hepatitis B virus	HBsAg - hepatitis B s antigénje, spike fehérje
bp - bázispár	HBV - hepatitis B virus
BtHV - bat hepatitis virus	HCC - hepatocelluláris carcinoma
CD - cluster of differentiation	HHBV - heron hepatitis B virus
cDNS - komplementer	HIV - human immunodeficiency virus
dezoxiribonukleinsav	IHC - immunohistochemistry
CH - krónikus hepatitis	kb - kilobázis
CH - krónikus hepatitisz	LBCL - large B-cell lymphoma
CHBV - crane hepatitis B virus	LBHBV - long-fingered bat hepatitis B virus
CMHBV - capuchin monkey hepatitis B virus	NiV - Nipah virus
cRNS - cirkuláris ribonukleinsav	NTCP - nátrium-taurokolát kotranszporter polipeptid
CSHBV - chinese shrew hepatitis B virus	ORF - open reading frame
DCH - domestic cat hepadnavirus	PCR - polymeeráz lánc reakció
DCHBV - domestic cat hepatitis B virus	PHBV - parrot hepatitis B virus
ddNTP - didezoxiribonukleotid-trifoszfát	RBHBV - roundleaf bat hepatitis B virus
DHBV - duck hepatitis B virus	RGHBV - Ross' goose hepatitis B virus
DNS - dezoxiribonukleinsav	RIA - radioimmunoassay
dNTP - dezoxiribonukleotid-trifoszfát	RNS - ribonukleinsav
dsDNS - dupla szálú dezoxiribonukleinsav	RT - reverz transzkriptáz
EBLV - european bat lyssavirus	SARS-CoV-2 - severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
EBOV - Zaire ebolavirus	ssDNS - szimpla szálú dezoxiribonukleinsav
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay	STHBV - stork hepatitis B virus
EM - elektronmikroszkóp	
ER - endoplazmatikus retikulum	
EtBr - etidium-bromid	

SUDV - Sudan ebolavirus

T_a - annealing temperature

Taq polimeráz - termostabil DNS-
dependens DNS-polimeráz

TBHBV - tent-making bat hepatitis B virus

TFHBV - tibetan frog hepatitis B virus

T_m - melting temperature

WHO - World Health Organization

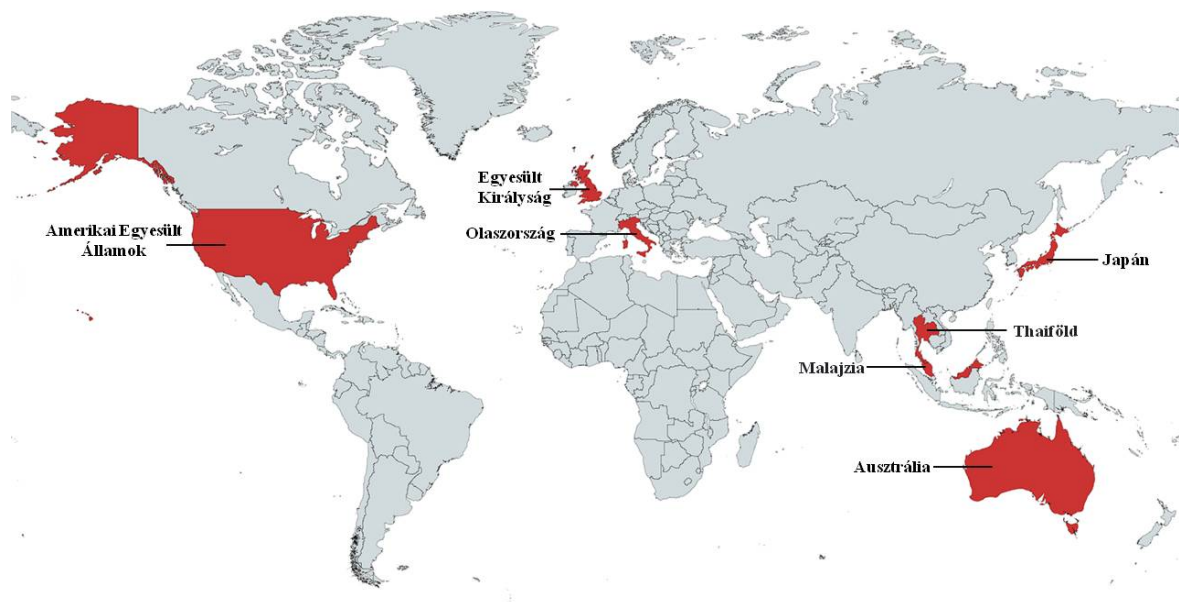
WHV - woodchuck hepatitis virus

WMHBV - woolly monkey hepatitis B
virus

WSHBV - white sucker hepatitis B virus

2. Bevezetés

A házi macskából (*Felis catus*) először Ausztráliában mutattak ki – a humán hepatitis B vírushoz (HBV) hasonló – hepadnavírust (domestic cat hepadnavirus, DCH) egy tumoros elváltozásból (large B-cell lymphoma, LBCL) származó mintából. Az eredmények publikálására 2018 májusában került sor, ez volt az első alkalom, amikor egy ragadozóból (*Carnivora*) hepadnavírust izoláltak [1]. A kórokozó első kimutatását követően a világ számos országában felmérő vizsgálatokat végeztek, amelyek során pozitív eseteket tártak fel Ausztráliában [1], Olaszországban [2], Thaiföldön [3], Malajziában [4], az Egyesült Királyságban [5], Japánban [6], valamint az Amerikai Egyesült Államokban [7] (1. ábra).

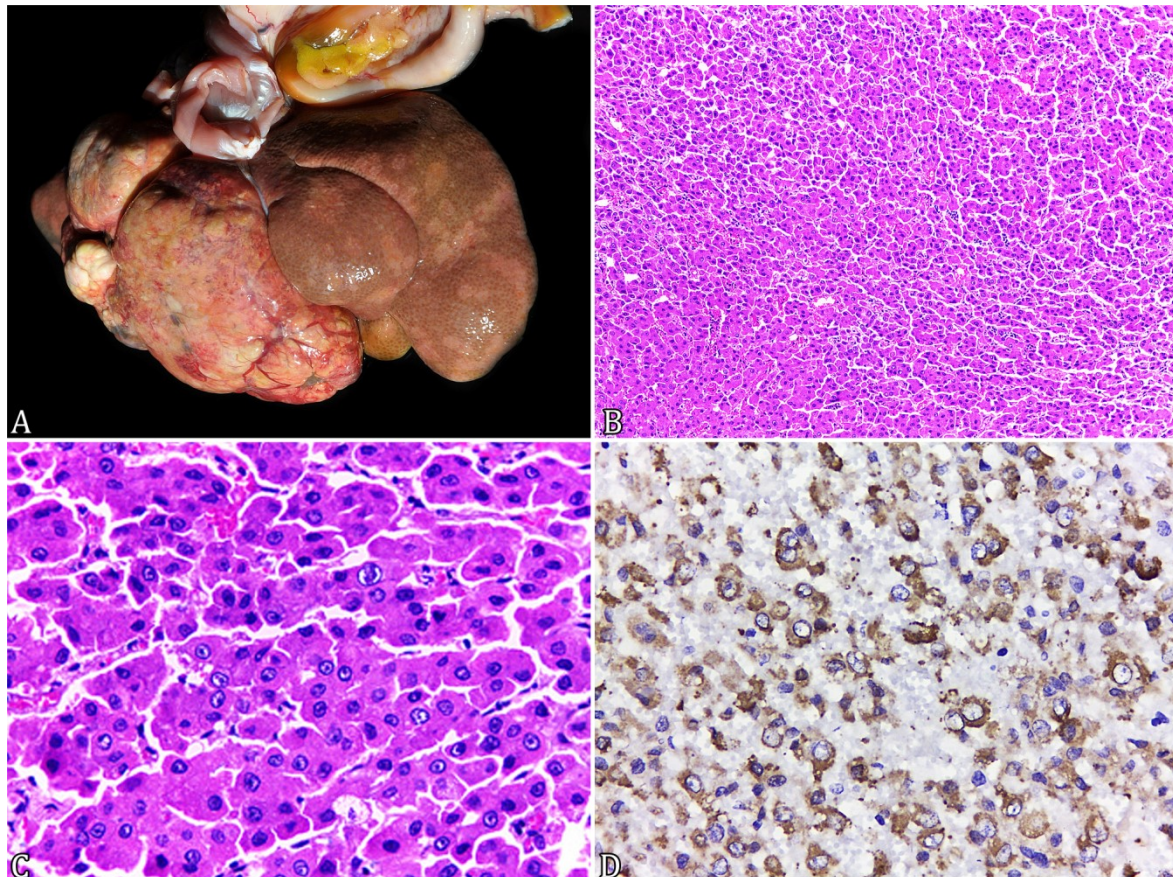


1. ábra: A DCH földrajzi elterjedése; pirossal jelöltük azon országokat, ahol már kimutatták a vírus jelenlétét

A DCH első izolálását követő további molekuláris biológiai vizsgálatok segítségével megállapították, hogy az említett faj a *Hepadnaviridae* család, *Orthohepadnavirus* nemzetségébe tartozó vírus.

A *Hepadnaviridae* családba tartozó vírusokat napjainkra már minden gerinces osztályból izoláltak, ekképpen az emlősöket (*Orthohepadnavirus* nemzetség), a madarakat (*Avihepadnavirus* nemzetség), a kétélűeket és a hüllőket (*Herpetohepadnavirus* nemzetség), valamint a halakat (*Metahepadnavirus* és *Parahepadnavirus* nemzetségek) fertőző kórokozók egyaránt ismertek [8]. A család prototípus fajának a humán hepatitis B vírus tekinthető, amiről régóta ismert, hogy növeli a különböző daganatos májbetegségek kockázatát,

mint például a májcirrhosis és hepatocelluláris carcinoma (HCC) [9]. Ebből következően nem véletlen, hogy a hepadnavírus-fertőzéssel érintett egyedekben a tumoros elváltozások szignifikánsan magasabb prevalenciával fordulnak elő, mint a vírussal nem fertőzött egyedekben [10]. Az eddigi szakirodalmi eredmények alapján feltételezik, hogy a DCH-val érintett macskákban hasonló patológiai májelváltozások fordulhatnak elő (2. ábra), mint a HBV-vel érintett emberekben, de ez egyelőre nem bizonyított [5].



2. ábra: A macskák hepatocelluláris carcinomájának makro- és mikroszkópos patológiai, valamint immunhisztokémiai vonatkozásai [11]

A: Nagyméretű, fehéres színű, vörös és sárgás területekkel tarkított szövetszaporulat a máj lobus quadratusán, ráterjedve a jobb mediális és laterális májlebenyekre.

B: Tömötten helyeződő hepatocyták neoplasztikus proliferációja. HE, 100×.

C: Mérsékelten pleomorfn hepatocyták. HE, 400×.

D: Intenzív anti-Hep Par-1 festődés a neoplasztikus májsejtek citoplazmájában. IHC, DAB, 400×.

Kutatásunk célja a korábban megkezdett hazai prevalencia-vizsgálat kiterjesztése nagyobb elemszámmal, valamint a vérmintákból kimutatott macska hepnavírus törzsek filogenetikai jellemzése. Ezen felül vizsgáljuk a DCH-fertőzött macskák klinikai állapotát, vérlabor vizsgálati paramétereit, a potenciális májváltozásra utaló leleteket, továbbá a retrovírusokkal való esetleges együttes fertőzést is.

3. Irodalmi áttekintés

A hepatitis alatt a máj gyulladással járó megbetegedést értjük, amely toxikus anyagok, autoimmun betegségek, valamint fertőző kórokozók következtében alakulhat ki. A vírusok okozta májgyulladások (virális hepatitisek) olyan fertőző megbetegedések, amelyeknél a vírus vagy elsősorban a májsejtekben szaporodik (hepatotróp) és azokat megbetegíti, vagy olyan szisztémás fertőzést okoz, amelynek a májgyulladás csak egy részjelensége. Hepatitis vírusoknak a hepatotróp vírusokat nevezzük, amelyek közös jellemzője, hogy a szaporodásuk elsődlegesen a májsejtekben történik, viszont taxonómiaiilag egyébként egymástól távol állnak [12].

3.1. Hepadnavírusok

3.1.1. Történet

A *Hepadnaviridae* család nevének első tagja a családba tartozó vírusok hepatocytotropizmusára, míg második tagja a részben szimplaszálú, részben duplaszálú DNS genomra utal. A víruscsaládba 5 nemzetség 19 vírusfaja tartozik, amelyek világszerte széles körben előfordulnak. A család tagjai főként rágcsálókból, madaraktól és halakból izolálhatók, de egyes fajok gazdájának a denevérek, a békák, valamint a főemlősök, így nem utolsósorban az ember tekinthető [8]. A két legjelentősebb nemzetség az *Avihepadnavirus* genus és az *Orthohepadnavirus* genus.

Az *Avihepadnavirus* nemzetségbe madarakat fertőző hepadnavírusok tartoznak. A kacsahépatitisz B vírus (duck hepatitis B virus, DHBV) főként a Távol-Keleten fordul elő és akut hepatitiszt, valamint HCC-t okoz kacsákban, ebből következően többnyire gazdasági jelentőséggel bír. Napjainkban a DHBV-t használják legszélesebb körben modellként a különféle in vitro vizsgálatok során a hepadnavírusok replikációjának tanulmányozására [13]. A nemzetségbe tartozó további fajok többnyire természetvédelmi jelentőséggel bírnak, úgy mint a gólyákat (stork hepatitis B virus, STHBV), a darvakat (crane hepatitis B virus, CHBV), a kócsagokat (heron hepatitis B virus, HHBV), a vadludakat (Ross' goose hepatitis B virus, RGHVB) és a papagájokat (parrot hepatitis B virus, PHBV) fertőző avihepadnavírusok [14].

Az *Orthohepadnavirus* nemzetségbe tartozó vírusok többségében rágcsálókat, főemlősöket és denevéreket fertőznek. Az utóbbi két csoportban megfigyelhető a hepadnavírusok cirkulációja is, ebből következően feltételezhető, hogy az orthohepadnavírusok tekintetében a különböző főemlős és denevér fajok jelentik a legfőbb vírus-rezervoárokat. A hepadnavírusok kevés kivételtől eltekintve szűk gazdaspektrumú (stenoxen) vírusok. Az orthohepadnavírusok közül kizárólag egyes denevér hepadnavírusok

zoonotikusak úgy, mint a long-fingered bat hepatitis B vírus (LBHBV), míg kizárólag a HBV volt átvihető csimpánzokra [15] [16] [17].

A különféle kisemlősökből orthohepadnavírusokat csak a mókusfélék (*Sciuridae*) családjának három fajából (erdei mormota, kaliforniai ürge, sarki ürge), valamint a cickányfélék (*Soricidae*) családjának tagjaiból mutattak ki. A főemlősök esetében a legtöbb orthohepadnavírust emberszabásúakból izolálták, beleértve az embert, a csimpánzt, a gorillát, a gibbont és az orángután. Természetes orthohepadnavírus fertőzést kimutattak már újvilági majomfajokból is, úgy, mint a gyapjas majmok (woolly monkey hepatitis B vírus, WMHBV) és a csuklyásmajmok (capuchin monkey hepatitis B vírus, CMHBV) képviselőiből [18].

A közelmúltban három új vírust is azonosítottak halakban és békákban: bluegill hepatitis B vírus (BHBV), white sucker hepatitis B vírus (WSHBV), tibetan frog hepatitis B vírus (TFHBV) [19].

3.1.2. Morfológia, felépítés

A *Hepadnaviridae* családba tartozó vírusok DNS vírusok, amelyek a Baltimore VII-es csoportba tartoznak, így részben szimplaszálú (ssDNS), részben duplaszálú (dsDNS) cirkuláris DNS-genommal rendelkeznek. Sajátosságuk, hogy egy teljes, negatív irányultságú és egy rövidebb, pozitív irányultságú DNS-szállal rendelkeznek. A genetikai állományuk körülbelül 3200 bázispár (bp) hosszúságú [20].

A *Hepadnaviridae* családba tartozó vírusok felépítése nagyon hasonló, bár nem teljesen azonos. Az *Orthohepadnaviridae* nemzetség vírusai sokkal inkább hasonlítanak egymásra, mint az *Avihepadnaviridae* családba tartozók [21].

A hepadnavírusok ikozaéder kapsziddal rendelkeznek, ezen felül burkos vírusok, amiből következik, hogy ellenálló-képességük alacsony (például savas kémhatásra és detergensekre is igen érzékenyek). A zsírtermészetű anyagokból (lipidek) felépülő burkuk képi a külső felületüket, ehhez a kapcsolódnak a vírus neutralizáló antigének.

A hepadnavírusok virionjai igen kis méretűek, megközelítőleg 42–47 nm átmérőjűek, gömbölydedek. Két részből tevődnek össze, egyrészt egy elektronokban gazdag, megközelítőleg 22–35 nm átmérőjű gömb alakú belső magból és az azt körülvevő külső, mintegy 7–15 nm vastagságú burokból. A belső mag tartalmazza a virális DNS-t, a virális mag antigént, a DNS-polimeráz és protein-kináz enzimeket. A DNS-polimeráz enzim felelős az egyszálú régiók javításáért a DNS-ben, míg a protein-kináz (HBV, WHV, GSHV esetében) a belső mag fő vírusspecifikus genom polipeptidjének foszforilációjáért [20].

A HBV kapcsán három antigént szoktak említeni (HBsAg, HBcAg, HBeAg). A HBsAg (hepatitis B s antigénje, spike fehérje) ellen képződnek a védettséget adó ellenanyagok (protektív antigén), ebből következően, ha kimutatható, akkor az a fertőzöttségre utal. A HBcAg (core antigén) és a HBeAg (envelope fehérje) jelenléte pedig aktív vírusszaporodásra utal [12].

Részben szimplaszálú, részben duplaszálú cirkuláris DNS-genommal rendelkeznek. A DNS-szintézis a rövid szál 3' végéről indul és az 5' végéig tart, ennek eredményeképpen a hosszú szál nem alkot teljes kört, hanem megközelítőleg 300 bp-ra az 5' végétől egy bevágás szakítja meg [22].

Az orthohepadnavírusok genomja négy olyan nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) tartalmaz, amelyekről a vírus strukturális (C, felületi L, M, S) és nem strukturális (P, X) fehérjéi íródnak át. Az orthohepadnavírusok négy ORF-je a magfehérjét (C), a felületi szerkezeti fehérjéket (felületi L, M, S), a polimerázt (P) és az X-proteint kódolja [22]. Az avihepadnavírusok genomja mindössze három ORF-t tartalmaz, mivel hiányzik az X-proteint kódoló szakaszuk [21].

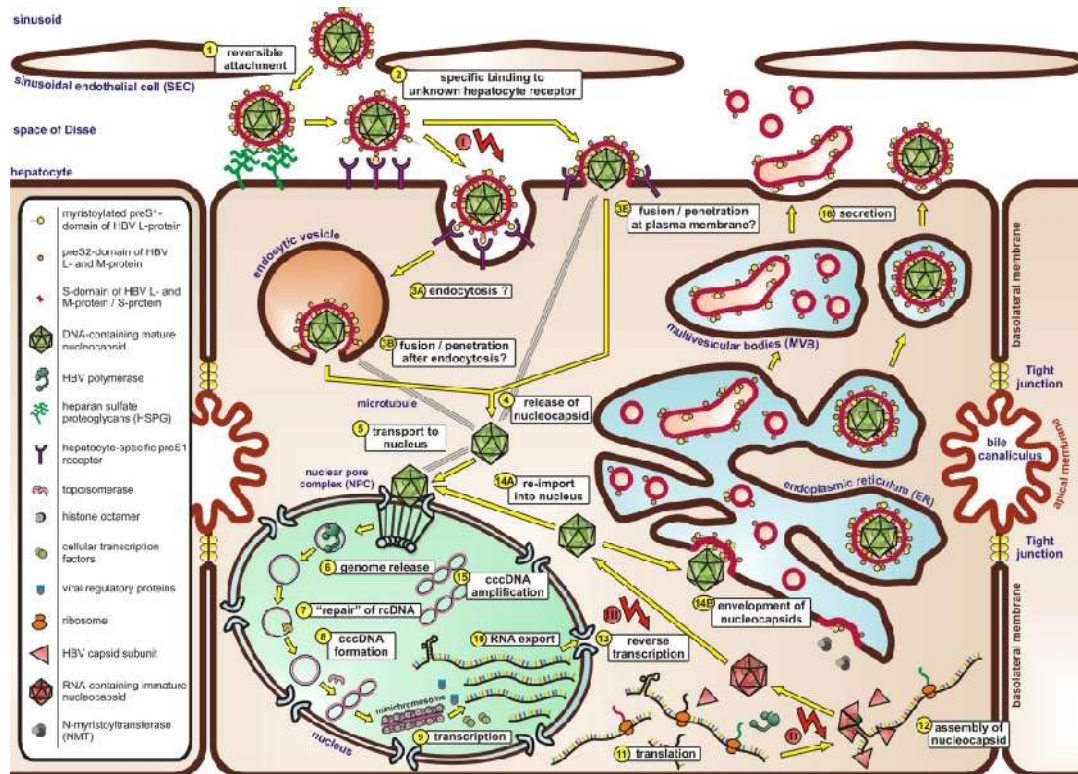
3.1.3. Replikációs ciklus

A DNS vírusok esetében a replikáció során a genom átírása a fertőzött sejt sejtmagjában történik, míg a strukturális (C, felületi L, M, S) és nem strukturális fehérjék (P, X) a fertőzött sejt citoplazmájában termelődnek. Ebből következően miután a vírus bejutott a májsejtbe, a genetikai örökítőanyagát a sejtmagba juttatja, és ezzel kezdetét veszi a replikáció [22].

A hepadnavírusok esetében a genetikai állomány replikációja a virális eredetű, RNS-függő DNS-polimeráz (reverz transzkriptáz, RT) enzim segítségével történik az úgynevezett reverz transzkripció folyamata során. Ezen enzim lényege, hogy egy RNS-szárlól képes komplementer DNS-szálat készíteni. Ezt a folyamatot csak a retrovírusok és a hepadnavírusok alkalmazzák replikációjuk során.

A hepadnavírusok esetében a DNS-genom replikációja rendhagyó a más DNS-vírusok esetében megfigyelhetőekhez képest, hiszen egy RNS-intermedier segítségével történik (**3. ábra**). A folyamat lényege, hogy először a májsejt DNS-függő RNS-polimeráz enzime által egy, az eredeti DNS-genomnál hosszabb, pozitív irányítottágú RNS-szál képződik. Ezt követően a cirkularizáció során az RNS-szál cirkuláris RNS-t (cRNS) hoz létre. A replikáció következő szakaszában a gazdasejt citoplazmájában termelődött fehérjék körülveszik a cRNS-t, majd a virális RT leképez belőle egy negatív szálú DNS-t, aztán az RNS-t lebontja [23].

Ezt követően a májsejt DNS-függő DNS-polimeráz enzimének segítségével pozitív szálú (komplementer) DNS-szál szintetizálódik, viszont a szintézis folyamata egy ponton megáll. Mégpedig akkor, amikor a vírus az endoplazmatikus retikulumon (ER) áthaladva (bimbózás) felveszi annak lipidtartalmú burkát, amelybe már előzetesen beékelődtek a felületi fehérjék. Ennek eredményeképpen jön létre a hepadnavírusokra jellemző részben szimplaszálú, részben duplaszálú cirkuláris DNS-genom, majd a komplett virion kilép a májsejtől [22].



3. ábra: A hepatitis B vírus replikációs ciklusa [23]

3.2. Hepatitis B megbetegedés

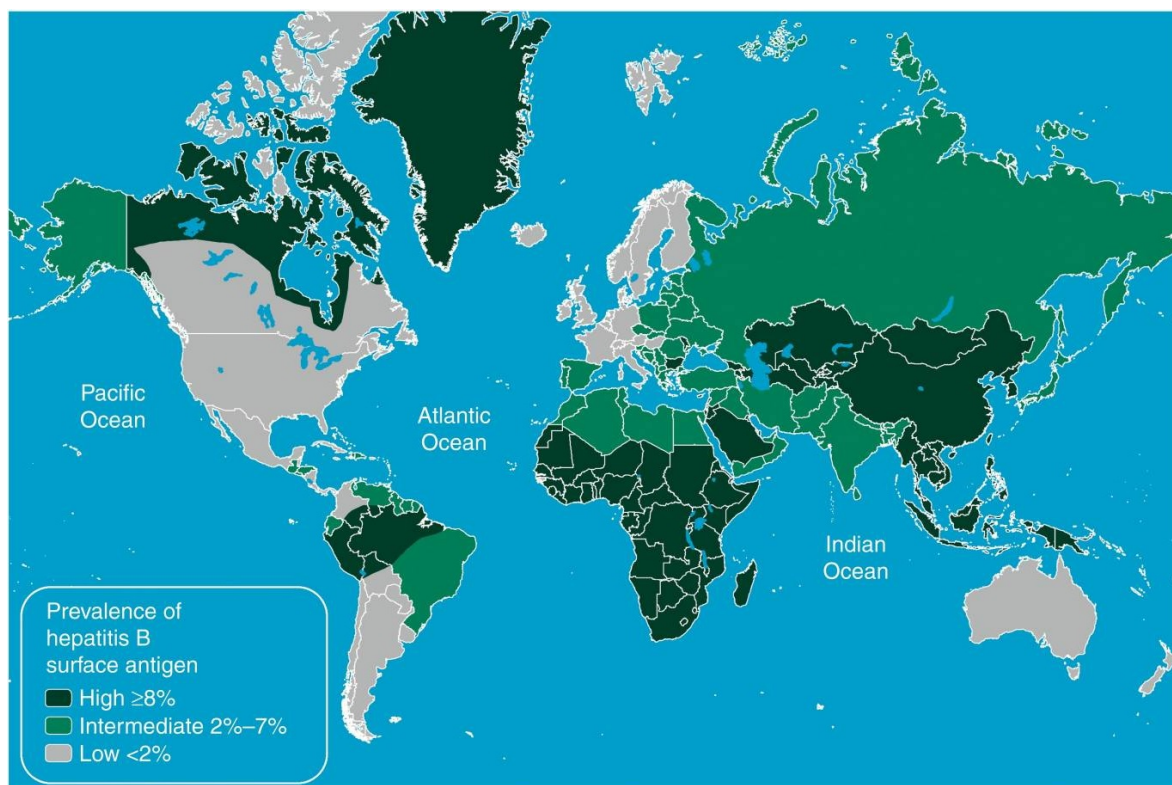
3.2.1. Történet

Napjainkban a „klasszikus” humán (hepatotróp) hepatitis vírusok között a hepatitis A–E vírusokat tartjuk számon. A humán egészségügyből ismert hepatitis B vírus (HBV) a *Hepadnaviridae* család, *Orthohepadnavirus* nemzetségének tagja. A májat támadó vírus által kiváltott betegség (hepatitis B) mind heveny, mind krónikus megbetegedés formájában jelentkezhet.

A hepatitis B vírus felszíni antigénjét először Baruch Blumberg és munkatársai írták le (1965), majd David Dane figyelte meg először elektronmikroszkóp (EM) segítségével a 42 nm-es részecskét (1970).

A vírus világszerte elterjedt, az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) hivatalos becslése alapján 2019-ben közel 296 millió élt együtt krónikus hepatitis B-fertőzéssel. A fertőzöttek száma nagyjából 1,5 millió fővel emelkedik évente. 2019-ben megközelítőleg 820 ezer ember vesztette életét a krónikus hepatitis B fertőzés következményeiben, a legtöbb esetben májcirrózis és HCC következtében [24].

A krónikus hepatitis B-fertőzés előfordulása, azaz a vírus felszíni antigénjének (HBsAg) prevalenciája alapján a Föld magas (> 8% HBsAg prevalencia), közepes (2–7%) és alacsony (< 2%) kockázatú területekre osztható (**4. ábra**) [10]. Magyarországon a HBV-hordozás az átlagpopulációban kevesebb, mint 2% [25].



4. ábra: A krónikus hepatitis B-fertőzés földrajzi eloszlása, a HBsAg prevalenciájában kifejezve [10]

Hatalmas tudományos mérföldkőnek számított az első HBV elleni vakcina előállítása, mivel azáltal, hogy megakadályozta a HCC kialakulását, a legelső „rákmegelező” vakcinaként tekintünk rá [26].

3.2.2. Fertőződés, terjedés

A HBV horizontálisan vérrel, vércszítményekkel, valamint szexuális úton terjed. A vírus a vérben, valamint a különböző testnedvekben (pl. vizelet, hüvelyváladék, ondó) igen nagy koncentrációt érhet el, így a fertőződés már ezek minimális mennyiségével is

bekövetkezhet. A fejlett országokban a vérdonorok szűrésének (HBsAg) bevezetése óta (Magyarországon 1982 óta) a vérátömlesztéssel és vérkészítmények útján történő átvitel minimálisra csökkent. A fejlődő országokban a HBV horizontálisan elsősorban szexuális úton, míg vertikálisan fertőzött anyáról gyermekére terjed [22].

A fertőzés szempontjából rizikócsoporthoz tartoznak az intravénás droghasználók, a promiszkuatív szexuális életmódot folytatók, a nem kellő higiénával tetováltak, a testékszereket viselők, a dializáltak, a transzfundáltak, az egészségügyi dolgozók és a fertőzöttek rokonai (pl. hordozó anyák újszülöttjei, illetve hordozó egyének házastársai) [22].

3.2.4. Kórfejlődés

A HBV nem citopatogén vírus, ebből következően a máj károsodását nem közvetlen virális tevékenység, hanem a CD8+ citotoxikus T-sejtek okozzák, amelyek a fertőzött hepatocytákat pusztítják [12].

Abban az esetben, ha a HBV-vel való fertőződés az élet korai szakaszában következik be, akkor rendszerint egy egész életen át tartó (perzisztens) vírushordozással járó, krónikus fertőzés alakul ki. Az élet későbbi szakaszában bekövetkező fertőződés legtöbbször heveny, öngyógyuló betegséget idéz elő, míg egyes esetekben súlyos májelégtelenség alakul ki [12].

3.2.5. Klinikum

A HBV-fertőzöttek mintegy kétharmadában szubklinikai vagy enyhe tüneteket okozó megbetegedés alakul ki, aminek következtében a betegség rendszerint nem kerül diagnosztizálásra. A fertőzöttek körülbelül harmadában alakulnak ki a májelégtelenségre és májgyulladásra jellemző tünetek úgymint a rossz közérzet, étvágytalanság, bágyadtság, szédülés, hányásinger, laboratóriumi májparaméterek eltérései (például májenzimek aktivitásának megemelkedése), súlyosabb esetekben sárgaság, vérfestékvizelés. Fulmináns hepatitis kialakulását – az előző tüneteken túlmenően – láz, akut hasi fájdalom, hányás, majd zavartság, kóma kíséri. A klinikai tünetekben megnyilvánuló forma kialakulásához jellemzően 2–3 hónap szükséges és a tünetek mintegy 1–6 hónapig fennállnak. A hepatitis B kórjelzésében széles körben alkalmazzák HBsAg, valamint a HBV nukleinsavának kimutatását [27].

Krónikus hepatitis B fertőzésről akkor beszélünk, ha a fertőzött személy véréből 6 hónapos túl is kimutatható a HBsAg. A krónikusan fertőzött személyek többsége tünetmentes vagy nem specifikus tünetekkel (például letargia, fáradékonyság, étvágytalanság, hasi diszkomfort) rendelkezik. Súlyosabb esetekben sárgaság, lépmeagnagyobbodás, valamint

előrehaladott májcirrózis esetén hasvízkór, perifériás ödémák, idegrendszeri tünetek (encephalopathia), emésztőszervi és testtájéki vérzések jelentkezhetnek. A krónikus hepatitis B fertőzésben szenvedő betegek megközelítőleg 25%-a a vírus krónikus szövődményeinek következtében hal meg [28].

A HBV-vel fertőzött betegek megközelítőleg 1–10%-ában jelentkezik a megbetegedés ún. extrahepatikus formája. Feltételezhetően a magas HBV antigénszintek következményeként kialakuló nagyszámú immunkomplex áll az extrahepatikus hepatitis B-fertőzés mellett kialakuló kórképek (serum sickness-like reaction, akut nekrotizáló vasculitis, glomerulonephritis, Gianotti-Crosti szindróma) hátterében [27].

3.2.6. Ko-infekció a HIV-vel

A HBV és a HIV (human immunodeficiency virus) közötti ko-infekcióval kapcsolatban már számos publikáció megjelent. Rogers és munkatársai vizsgálata alapján az Amerikai Egyesült Államokban a HIV-pozitív személyek körében a HBV infekció hétszer gyakoribb, mint az átlagpopulációban [29]. Világviszonylatban a HBV-fertőzöttek nagyjából 10%-ánál fordul elő retrovírus ko-infekció, míg a szubszaharai Afrikában – ahol a legtöbb HIV-fertőzött él – az együttes fertőzések mértékét kb. 36%-ra becsülik [30]. A ko-infekciót egyrészt az magyarázza, hogy a két vírus terjedési módja megegyezik. Másrészt a HIV-fertőzöttek elvesztik a HBV-vel szemben védő antitestjeiket az immunszuppresszió következtében. Harmadrészt a HIV-fertőzött személyek gyakrabban válnak HBV-hordozókká [31].

3.2.3. Védekezés, megelőzés

A hepatitis B-vel szembeni aktív védelem kialakításához számos hatékony és biztonságos vakcina áll rendelkezésre, amelyek rekombináns úton előállított HBsAg-t tartalmaznak. A rekombináns HBV vakcinák a világ számos országában, így 1998 óta hazánkban is a gyermekkori kötelező oltások közé tartoznak. Utóbbi célja, hogy a fiatal korosztály még a szexuálisan aktív életszakaszának elérése előtt immunitást szerezzen. A HBV-vel szemben passzív immunizálásra is van lehetőség, amely hiperimmun γ -globulinnal lehetséges. A hordozó édesanyák újszülöttjeit a születést követő 12 órán belül aktív és passzív módon is immunizálják [12].

3.3. Orthohepadnavírusok

3.3.1. Kisemlősök hepadnavírusai

3.3.1.1. Woodchuck hepatitis virus (WHV)

A HBV felfedezését követően az első emlősökben leírt, természetben előforduló orthohepadnavírus az erdei mormotákban (*Marmota monax*) krónikus fertőzést okozó woodchuck hepatitis virus (WHV) volt.

Az erdei mormoták hepatitis vírusa hepatitist és következményes májkárosodást, májcirrhosist és HCC-t okoz a mormotákban. Robert Synder a '60-as években kezdte vizsgálni a vírust az Amerikai Egyesült Államokban, miután azt a megfigyelést tette, hogy a philadelphiai állatkert mormotái többségében a HBV által emberekben előidézett májelváltozások kialakulása mellett pusztulnak el. A WHV leírására csak később került sor [32], amikor is a vírus izolálását követően azt a megfigyelést tették, hogy a WHV morfológiai felépítése hasonlóságot mutat a HBV felépítésével [33].

3.3.1.2. Ground squirrel hepatitis virus (GSHV); arctic squirrel hepatitis virus (ASHV)

A WHV felfedezése után számos kutatási projekt indult annak érdekében, hogy más rágcsálók közül is kimutassanak - a HBV-hez hasonló - vírusokat. Marion és munkatársai Kalifornia állam (USA) három különböző pontján (Point Lobos, Stanford University campus, Santa Barbara) gyűjtöttek vérmintákat szívpunkcióval egészségesnek tűnő kaliforniai ürgékből (*Otospermophilus beecheyi*) 1980-ban. A szérummintákat számos módszerrel vizsgálták, többek között szerológiai vizsgálatot (radioimmunoassay, RIA), elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatot, nukleinsav-izolálást, továbbá restriktív endonukleáz analízist és gélelektroforézist végeztek. A vizsgálataik során a minták közel 50%-ából tudtak kimutatni egy addig ismeretlen hepadnavírust, amelyet ground squirrel hepatitis virusnak (GSHV) neveztek el. Megállapították, hogy a HBV és a GSHV morfológiája nagymértékben hasonlít egymásra, viszont utóbbi átmérője valamivel nagyobb; továbbá a két vírus felszíni antigénjei között részleges keresztreakció figyelhető meg [34].

A GSHV felfedezését követően azt is sikerült bizonyítani, hogy mind a WHV, mind a GSHV által okozott fertőzés hajlamosító tényezőként szerepet játszik a HCC kialakulásában [35].

Testut és munkatársai Alaszkában izoláltak egy új hepadnavírust sarki ürgék (*Uroditellus parryi*) májmintáiból (arctic squirrel hepatitis virus, ASHV) nukleinsav-hibridizáció segítségével 1996-ban. A filogenetikai elemzés során megállapították, hogy a vírus közelebbi rokonságban áll a GSHV-val, mint a WHV-val. A vizsgálatok folyamán azt

tapasztalták, hogy az idősebb egyedek kb. harmadában különféle patológiás májelváltozások (pl. egyenetlen felület, kiscseppes (mikrovezikuláris) elzsírosodás, hepatocelluláris adenoma és carcinóma) voltak detektálhatók [36].

3.3.1.3. Chinese shrew hepatitis B virus (CSHBV)

A cickányok kicsi, egér-/vakondszerű emlősök, amelyek világszerte elterjedtek. Míg a rágcsálókat (*Rodentia*) manapság már számos zoonotikus jelentőségű kórokozó gazdájaként ismerjük (pl. koronavírusok, hantavírusok, rhabdovírusok, leptospirák, yersiniák, stb.), addig a cickányok szerepe viszonylag kevésbé ismert a vírusok terjedésével kapcsolatosan. A közelmúltban viszont számos vírust (pl. arenavírusok, koronavírusok, hantavírusok, rotavírusok) fedeztek fel a cickányokban is [37] [38].

A cickányokból elsőként Kínában sikerült kimutatni hepadnavírust. 2013 és 2018 között 4 különböző cickányfajból származó, összesen 449 májszövet-mintát vizsgáltak meg, amelyeket a kínai Hubei tartományban befogott cickányból gyűjtöttek. A 449-ből 8 minta (1,8%) vizsgálata során sikerült a kutatóknak egy új hepadnavírust izolálni, amelyet chinese shrew hepatitis B virusnak (CSHBV) neveztek el [39]. A PCR-pozitív minták 3 különböző cickányfajból, a kínai vakondcickányból (*Anourosorex squamipes*), az ázsiai szürke cickányból (*Crocidura attenuata*), valamint az ussuri fehérfogú cickányból (*Crocidura lasiura*) származtak [40].

3.3.2. Újvilági majmok hepadnavírusai

3.3.2.1. Woolly monkey hepatitis B virus (WMHBV)

1998-ban Lanford és munkatársai egy fulmináns hepatitisben szenvedő gyapjas majomból (*Lagothrix lagotricha*) mutatták ki elsőként a woolly monkey hepatitis B virusnak (WMHBV) elnevezett hepadnavírust hagyományos PCR eljárással az Amerikai Egyesült Államokban. A Louisville-i Állatkert majmának szérummintájából izolált vírus filogenetikai vizsgálata azt mutatta, hogy a vírus különbözik az humán HBV-től, viszont a nagyfokú genetikai hasonlóság alapján feltételezik, hogy egyike lehet az emberi törzsek elődjének. Az első izolációt követően öt amerikai állatkert gyapjas majom populációinak szérummintáit vizsgálták a vírus jelenlétére és azt tapasztalták, hogy az kizárólag a Louisville-i Állatkert majmaiban volt megtalálható. Később mesterséges fertőzéssel azt is igazolták, hogy a gyapjas majmok legközelebbi rokona, a Geoffroy-pókmajom vagy másik nevén az ékes pókmajom (*Ateles geoffroyi*) szintén fogékony a WMHBV-re. A mesterséges fertőzési kísérletek során

vizsgált másik faj, a közönséges csimpánz (*Pan troglodytes*) esetében mindössze néhány replikációs ciklus lejátszódását tudták igazolni [18].

A vírus, valamint a Geoffroy-pókmajom fogékonyságának felfedezése megteremtette a lehetőségét egy új modellállat alkalmazásának a krónikus HBV-fertőzések antivirális kezelésének kutatásában [18]. Korábban az utóbbi vizsgálatokhoz a csimpánzokat használták a legszélesebb körben világszerte, viszont a kimagasló intelligenciájuk, a testméretük, valamint korlátozott elérhetőségük, továbbá az állatvédelem és a különböző in vivo (pl. transzgénikus egerek), illetve in vitro kísérleti modellek fejlődése miatt, ma már kizárólag a nélkülözhetetlen kísérletekben veszik igénybe őket. Korábban próbálkoztak a kacsák, valamint az ürgék modellként való alkalmazásával is, viszont ezen állatok hepadnavírusai (DHBV, GSHV) jelentősen eltérnek a HBV-től, valamint az ember és az utóbbi fajok között számottevő metabolikus eltérések vannak, emiatt a vizsgálatokban való használhatóságuk meglehetősen limitált [41].

3.3.2.2. Capuchin monkey hepatitis B virus (CMHBV)

Souza és munkatársai 2012 és 2016 között 10 különböző brazíliai majomfajból, összesen 124 szérummintát vizsgáltak molekuláris és szerológiai módszerekkel egy új hepadnavírus kimutatása érdekében. Egy nőstény arany mellű csuklyásmajomból (*Sapajus xanthosternos*) sikerült kimutatniuk a később capuchin monkey hepatitis B virusnak (CMHBV) elnevezett vírust, míg másik négy állatból a vírus ellen termelt (CMHBV-specifikus) ellenanyagokat. A PCR-pozitív egyed 6 hónappal a mintavételt követően általános klinikai tüneteket (pl. lesoványodás, letargia, étvágytalanság, enyhe dehidráció) kezdett mutatni, majd rövidesen elpusztult [42].

A vizsgálatok során megállapították, hogy mind a CMHBV, mind a WMHBV az NTCP-vel (nátrium-taurokolát kotranszporter polipeptid) való kölcsönhatásuk révén képes megfertőzni a hepatocytákat, hasonlóan a HBV-hez [42]. Az NTCP egy többszörös transzmembrán-fehérje, amely a hepatocyták bazolaterális (vér felőli) oldalán expresszálódik. Az emlősállatok szervezetében a portális vérből (szinuszoidokból) a májsejtekbe történő epesav-felvételért felelős, tehát az egyik kulcsfontosságú transzportere az enterohepatikus körforgásnak [39].

3.3.3. Denevér hepadnavírusok

3.3.3.1. Jelentőség

A *Chiroptera* rendbe tartozó különféle denevérfajok napjainkban egyre több feltörekvő és újra felbukkanó vírussal hozhatók összefüggésbe, amelyek közül számos jelentős közegészségügyi vonatkozású. Ezek között említhetők lyssavírusok (pl. EBLV, european bat lyssavirus), ebolavírusok (pl. EBOV, Zaire ebolavirus; SUDV, Sudan ebolavirus), henipavírusok (pl. NiV, Nipah virus; Hendra virus), coronavírusok (pl. SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) [43] [44] [45].

Számos olyan tényező ismert, mint például a hosszú élettartam, a vándorlási szokások, a nagy egyedszámú és -sűrűségű populációk, valamint a szoros szociális interakció, amelyek predisponálják a denevéreket, hogy tökéletes természetes rezervoárjai legyenek a különféle vírusoknak [46].

A denevéreknek a zoonózisok járványtanában betöltött egyre kiemeltebb jelentőségét kellőképpen alátámasztja, hogy fajonként több zoonózis természetes rezervoárjai, mint a *Rodantia* rendbe tartozó különféle rágcsálók. Hiszen amíg a denevérekben azonosított zoonotikus potenciállal rendelkező vírusok száma (61) alacsonyabb, mint a különféle rágcsálófajokban (68), addig a rágcsálófajok száma megközelítőleg kétszerese a denevérfajoknak [47].

Korábban csak feltételezték, hogy bizonyos emlős orthohepadnavírus-fertőzések forrásai a denevérek lehetnek [18]. A legújabb filogenetikai vizsgálatok alapján ugyanakkor napjainkban már úgy fogalmazhatunk, hogy meglehetősen valószínű, hogy a főemlősök orthohepadnavírusai a denevérek vírusaiból származnak [43].

A denevérek orthohepadnavírusai (bat hepatitis virus, BtHV) nagyfokú genetikai változatossággal rendelkeznek, amelynek hátterében nagy valószínűséggel az áll, hogy a különféle denevérfajok között a hepadnavírusok folyamatos cirkulációja figyelhető meg. Természetes úton képesek megfertőzni számos (77) denevérfajt, legalább öt különböző denevércsaládból. Ez a jelenség hosszútávú vírus-gazdafaj társulásra utal [39].

3.3.3.2. Long-fingered bat hepatitis B virus (LBHBV)

He és munkatársai 2013-ban egy átfogó kutatás során a különféle denevérfajokban előforduló hepadnavírusokat tanulmányozták Délkelet-Ázsiában (Myanmar). A *Miniopterus fuliginosus* denevérfajból izolált vírus (long-fingered bat hepatitis B virus, LBHBV) genomszerkezetének vizsgálata során azt tapasztalták, hogy megtalálható benne a hepadnavírusokra jellemző részben szimplaszálú, részben duplaszálú cirkuláris DNS-genom,

valamint a négy ORF régió is, sőt genommérete (megközelítőleg 3200 bp) hozzávetőleg megegyezik a HBV genomhosszúságával [15]. A jó néhány hasonlóság következtében az utóbbi időben a BtHV-ok a figyelem középpontjába kerültek annak érdekében, hogy a kutatók jobban megértsék a HBV különböző aspektusait.

3.3.3.3. További vírusok

Szintén 2013-ban publikálták Drexler és munkatársai azon kutatásuk eredményét, melyben összesen 3080 denevérből származó mintát (199 májmintát és 2881 szérummintát) tanulmányoztak PCR-vizsgálattal a HBV-hoz hasonló genomszekvenciákat tartalmazó vírusok után kutatva. A mintákat 2002 és 2011 között, világszerte (Panama, Brazília, Gabon, Ghána, Németország, Pápua Új-Guinea és Ausztrália) gyűjtötték. A különböző minták 11 denevércsalád, 54 eltérő denevérfajából származtak. A 3080 mintából 10-ben azonosítottak a HBV-hoz hasonló genomszekvenciákat. A pozitív minták három különböző fajból (*Uroderma bilobatum*, *Hipposideros cf. ruber*, *Rhinolophus alcyone*) származott. A filogenetikai vizsgálatok során megállapították, hogy az ezen fajokban talált - addig ismeretlen - vírusok genetikailag különbözőek. Az *U. bilobatum* fajból izolált vírus a tent-making bat hepatitis B vírus (TBHBV), a *H. cf. ruber* fajból izolált a roundleaf bat hepatitis B vírus (RBHBV), a *R. alcyone* fajból izolált pedig a horseshoe bat hepatitis B vírus (HBHBV) nevet kapta [16].

3.3.3.4. Zoonotikus potenciál

Egyes denevér hepadnavírusokról már bizonyították zoonotikus tulajdonságukat, úgy, mint a LBHBV esetében [16], míg más vírusok esetében (TBHBV) in vitro vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy képesek a humán májsejt-vonalakat – az újvilági majmokhoz hasonlóan – az NTCP-vel való kölcsönhatásuk révén megfertőzni [39].

3.3.4. Macska hepadnavírusterzsek

A világon először 2018-ban mutattak ki hepadnavírust (domestic cat hepadnavirus, DCH) házi macskából Ausztráliában [1]. Az első kimutatást követően a világ számos pontjáról jelentették a vírus jelenlétét [48]. Ausztráliában 6,5%, Olaszországban 10,8%, Thaiföldön 12,4%, Malajziában 12,3%, az Egyesült Királyságban 3,08%, Japánban 0,78%, míg az Amerikai Egyesült Államokban 0,2% volt a DCH-fertőzés prevalenciája (**1. táblázat**).

1. táblázat: A DCH-pozitív eseteket jelentő országok, a mért prevalenciák, a klinikai megfigyelések és a kapcsolódó társfertőzések összefoglalása

No	Ország	Publikáció dátuma	Prevalencia	Megfigyelés típusa	Klinikai megfigyelés	Kapcsolódó társfertőzés	Referencia
1	Ausztrália	2018	6,5%	kórházi vizsgálat	lymphoma	FIV	Aghazadeh et al., 2018
2	Olaszország	2019	10,8%	egyetemi vizsgálat	virémia	FIV és/vagy FeLV	Lanave et al., 2019
		2022	4,2%	egyetemi vizsgálat	emelkedett ALT-aktivitás	-	Scavone et al., 2022
		2022	9,8% és 25%*	egyetemi vizsgálat	DCH szeropozitivitás	-	Fruci et al., 2022
3	Thaiföld	2020	12,4%	kórházi vizsgálat	virémia	FIV és/vagy FeLV	Piewbang et al., 2020
4	Malajzia	2021	14,9%	egyetemi vizsgálat	emelkedett ALT-aktivitás	FeLV	Anpuanandam et al., 2021
5	Egyesült Királyság	2021	3,08%	kórházi vizsgálat	uveitis	-	Jeanes et al., 2022
6	Japán	2022	0,78%	egyetemi vizsgálat	emelkedett ALT-aktivitás	-	Takahashi et al., 2022
7	Amerikai Egyesült Államok	2022	0,2%	egyetemi vizsgálat	virémia	-	Stone et al., 2022

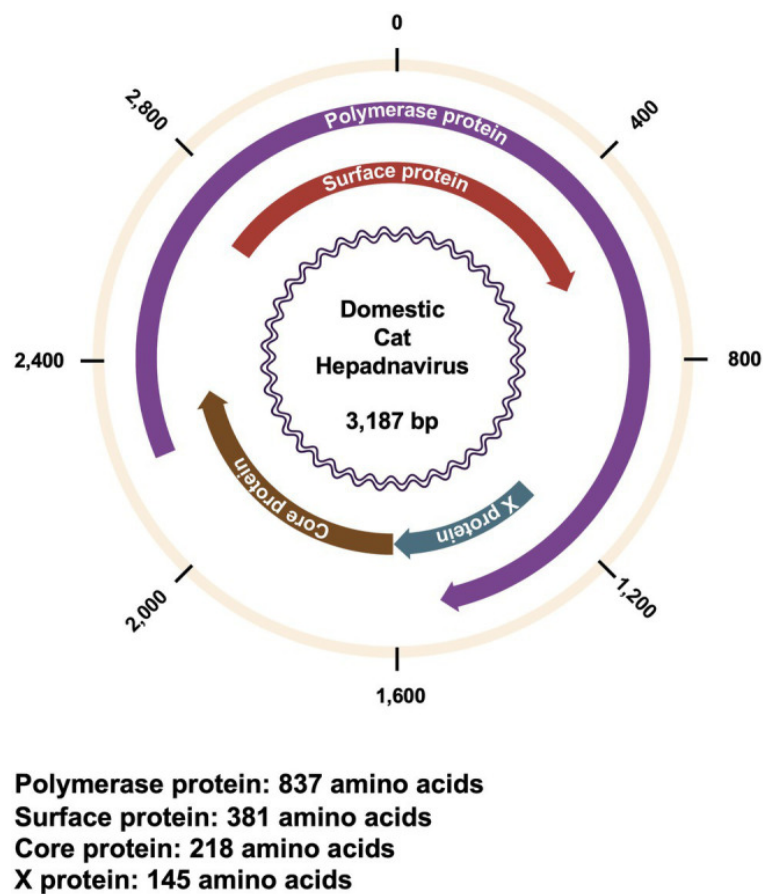
*Szeroprevalencia

3.3.4.1. Ausztrál eredmények

2016-ban egy 7 éves, ivartalanított kandúr európai rövidszőrű macska került be a sydney-i egyetem (University of Sydney) állatorvos-tudományi karának klinikájára. Az állat tulajdonosai krónikus fogyásra, illetve rendszeres rosszullétekre, valamint hányásra panaszkodtak. A macska fizikális vizsgálata során egy viszonylag nagyméretű, tömött tapintatú képletet figyeltek meg az állat hasüregében. Az említett hasúri képletből vékonytű aspirációval (fine needle aspiration, FNA) citológiai mintát vettek. A minta vizsgálata során nagy B-sejtes lymphomát (LBCL) állapítottak meg. A vizsgálat során végzett szerológiai teszt (Witness FIV/FeLV, Zoetis) pozitív eredményt adott a macskák immunhiányos kórképét okozó vírusra (feline immunodeficiency virus, FIV) való fertőzöttséggel kapcsolatban. A kilátástalan kórjóslat miatt az állat tulajdonosai annak eutanáziája mellett döntöttek és a tetem kórbonctani és kórszövettani vizsgálatát kérték. A kórszövettani vizsgálat multicentrikus, nagysejtes, high-grade, B-sejtes lymphomát állapított meg immunhisztokémiai vizsgálat (IHC) segítségével a formalinnal fixált, paraffinba ágyazott hisztopatológiai mintából. A szerológiai vizsgálat eredményét a kórbonctani vizsgálat során PCR vizsgálattal is megerősítették [1].

A lymphomából készült, lefagyasztott kórszöveti mintát később egy vírus-kimutatósi projektben használták fel Aghazadeh és munkatársai (2018). A vizsgálataik során nyolc HBV-re jellemző szekvenciát találtak a minta genetikai vizsgálata során. Az új vírus azonosítása érdekében újabb vizsgálatokat végeztek, amelyek során a *Hepadnaviridae* családra jellemző négy ORF régiót keresték, majd detektálták azokat. A 2018 májusában publikált eredmények alapján az *Orthohepadnavirus* nemzetség egy új taggal (domestic cat hepatitis B virus, DCHBV) bővült [1].

A vírus első izolálását követően olyan felmérő vizsgálatot végeztek teljes vérmintákból PCR segítségével, amely a hepadnavíruson kívül a FIV-re is kiterjedt. A vizsgálat pozitivitást mutatott 60-ból 6 (10%) FIV-fertőzött és 63-ból 2 (3,2%) FIV-mentes macskából származó minta esetében, így az összesített prevalencia 6,5%-nak (8/123) adódott. Az eredmények tehát azt mutatták, hogy magasabb prevalenciával volt kimutatható a hepadnavírus a FIV-vel egyaránt fertőzött macskákból. Később azt is megállapították, hogy a vírus genomja 3187 bp méretű (**5. ábra**), valamint - a többi orthohepadnavírushoz hasonlóan - négy egymást átfedő ORF-t kódol a polimeráz (P), a felszíni (S), a mag (C) és az X fehérjék számára [1].



5. ábra: A DCH genomjának sematikus ábrája az egyes vírusfehérjék helyzetének és orientációjának, valamint az egyes vírusfehérjék hosszának feltüntetésével [48]

3.3.4.2. Olasz eredmények

2019-ben Lanave és munkatársai 390 macskától származó szérummintában keresték RT-PCR segítségével a DCH-t, amely a minták 10,8%-ából (n=31) volt kimutatható, még hozzá szignifikánsan magasabb prevalenciával (17,8%) a klinikailag fertőző betegség tüneteit mutató egyedek mintáiból. Több, a DCH-ra pozitív állat esetében a biokémiai laboratóriumi vizsgálatok során májparaméter emelkedést tapasztaltak. Figyelemre méltó eredménynek számított, hogy a pozitív minták közel felében (n=14/31, 45,2%) retrovírus (FIV és/vagy FeLV; feline leukaemia virus) ko-infekció volt kimutatható. A vírussal való fertőzöttség nemek, illetve korcsoportok szerinti eloszlásával kapcsolatban nem tapasztaltak szignifikáns eltéréseket [2].

Capozza és munkatársai két DCH-pozitív macska hosszú távú (4,5 és 11 hónapos) megfigyelésével és rendszeres PCR-vizsgálatával bizonyították 2021-ben, hogy a humán HBV-fertőzéshez hasonlóan a DCH okozta fertőzés is képes krónikus megbetegedést előidézni. Az egyik állat a krónikus májelégtelenség egyes klinikai tüneteit (letargia, sárgaság, emelkedett ALT szérumaktivitás) is mutatta a vizsgálatok alatt. Mindenképpen meglepő eredménynek számított, hogy a DCH-val fertőzött macskák megfigyelése során a szájüregi-, a kötőhártya-, a preputiális és a rektális tamponok többszöri ismételt PCR-vizsgálata minden esetben negatívnak bizonyult [49].

Scavone és munkatársai 2022 őszén publikálták azon retrospektív vizsgálatuk eredményét, melyben 96 olyan macskáktól származó vérszérumot vizsgáltak, amelyeknél legalább az ALT (alanin amino-transzferáz) vagy az ALKP (alkalikus-foszfataz) szérumaktivitását megmérték a diagnosztikai vizsgálat kezdetén. A vérbiokémiai eredmények alapján a májbetegség valószínűsége szerint kategorizálták (nincs, alacsony, közepes, magas) a betegeket, majd RT-PCR, valamint szekvenálás segítségével próbálták kimutatni a DCH jelenlétét. A vizsgálat során összességében 44 macskánál figyeltek meg potenciális májkárosodásra utaló elváltozásokat, gondolva itt az alacsony (n=14), a közepes (n=10) és a magas (n=20) kategóriákba besorolt állatokra. Négy macskából származó minta (4,2%) volt DCH-pozitív, ebből kettő az alacsony, egy a közepes, míg szintén egy a nincs kategóriába tartozott. Érdekes, hogy a DCH-t nem mutatták ki egyetlen olyan macskából sem, amelyet korábban a magas kategóriába soroltak. A vizsgálatok alapján elmondható, hogy bár a DCH patogenitását még tisztázni kell, viszont ezek az eredmények mindenesetre azt sugallják, hogy a DCH-vizsgálatokat nem szabad kizárólag a májbetegségekkel potenciálisan összeegyeztethető biokémiai elváltozások jelenlétére alapozni [50].

Fruci és munkatársai 256 - életkor szerint kategorizált - macska szérummintáját vizsgálták a DCH rekombináns magantigénjén (DCHc) alapuló ellenanyag-kimutató ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) teszttel. A vizsgálatok során mind a szeropozitív, mind a szeronegatív egyedektől származó mintákból RT-PCR segítségével próbálták kimutatni a vírus DNS-ét. Az eredményeiket 2022 szeptemberében publikálták, miszerint a specifikus ellenanyagokat (IgG és IgM anti-DCHc) a vizsgált minták 25,0%-ából (64/256) tudták kimutatni. Mindenképpen szemet szűrő eredménynek számít, hogy a vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a szeropozitív macskák 35,9%-a (23/64), a szeronegatívak pedig 1,0%-a (2/192) volt PCR-pozitív. Az a megfigyelés, hogy a szeronegatív macskák mindössze egyharmadából lehetett kimutatni a vírus DNS-ét arra utalhat, hogy a DCH-fertőzés az esetek egy részében szubklinikai (inapparens) formában játszódik le [51].

3.3.4.3. Thaiföldi eredmények

2020-ban a DCH thaiföldi előfordulását 209 véletlenszerűen kiválasztott, valamint 15 májkárosodással diagnosztizált macska szérum- és májszövet-mintájának PCR-vizsgálatával mérték fel. Piewbang és munkatársai azt tapasztalták, hogy a DCH-fertőzés prevalenciája magasabb volt a májszövet-mintákban, mint a vérmintákban. A véletlenszerűen kiválasztott szérumminták 12,4%-a (26/209), míg a májkárosodással diagnosztizált macskák szérum- és májszövetmintáinak 20%-a (3/15) volt PCR-pozitív. Továbbá a thaiföldi kutatócsoport is megerősítette, hogy összefüggést találtak az immunszuppresszív hatású retrovírusok okozta fertőzések, valamint a DCH-fertőzés között. A DCH-pozitív minták közül 57,7% volt FIV-pozitív, 11,5 % volt FeLV-pozitív, míg 3,8% volt pozitív mindkét retrovírusra. A kutatás során egy feltételezhetően rekombináns DCH törzset is felfedeztek, ami a rekombináció lehetőségének szerepére utal a vírus evolúciójában. Továbbá a vizsgálataik alkalmával kimutatták a DCH jelenlétét a májtól eltérő szervekben (pl. szív, tüdő, lép, vesék, belek), valamint ezen szervek szisztémás gyulladással elváltozásait (pl. hepatitiszt, májfibrózist, glomerulonefritist, limfocitocitát enteritist, hisztiocitát limfadenitist) IHC segítségével [3].

3.3.4.4. Maláj eredmények

Anpuanandam és munkatársai 253 egyedből származó májszövet-mintát vizsgáltak, ebből 87 esetben párosított májszövet- és vérminta állt rendelkezésre. A vizsgált minták 12,3 %-a (n=23) bizonyult DCH-pozitívnak. A vizsgálat során több érdekességre derült fény. Egyrészt, az emelkedett ALT értékkel rendelkező macskák szignifikánsan nagyobb

valószínűséggel voltak DCH-pozitívak (52,2%, $p=0.012$). Másrészt, a kimutatási arány szignifikánsan magasabb volt a társállatként tartott macskák ($n=24/145$, 16,6%), mint a menhelyi macskák esetében ($n=7/108$, 6,5%). Harmadrészt, azon macskákban, amelyek májszövetéből izolálható volt a DCH, nem feltétlenül volt jelen virémia, sőt – a thaiföldi kutatáshoz hasonlóan [3] – a májszövet-minták esetében magasabb volt a DCH kimutatási arány a vérmintákhoz képest ($n=13/87$, 14,9%). A teljes genom szekvencia elemzésből az derült ki, hogy a malajziai DCH-törzs – amelynek a genommérete 3184 bp – 98,3 és 97,5 %-os nukleotid azonossággal rendelkezik az ausztrál, valamint az olasz törzsekkel [4].

3.3.4.5. Brit eredmények

2019-ben Pesavento és munkatársai publikálták azon kutatásuk eredményét, melyben a DCH-fertőzés, valamint a macskák krónikus hepatitis (CH) és hepatocelluláris carcinómája (HCC) közti összefüggést vizsgálták négy országból (Amerikai Egyesült Államok, Egyesült Királyság, Ausztrália, Új-Zéland) származó formalin-fixált májbiopsziás minták felhasználásával. A PCR-vizsgálatok során a CH-val diagnosztizált macskákból származó minták 42,9%-ából (6/14), míg a HCC-ben szenvedő egyedek mintáinak 27,6%-ából (8/29) tudták kimutatni a DCH jelenlétét. A vizsgálatuk eredménye összefüggést mutatott ki a DCH-fertőzés, valamint – a humán hepatitis B megbetegedéssel kapcsolatban leírt elváltozások – a CH, illetve a HCC között [5].

Korábban már beszámoltak róla, hogy a HBV és a hepatitis C vírusok közötti ko-infekció növeli az uveitis kockázatát az emberekben [52]. Jeanes és munkatársai (2022) 65 endogén uveitisben szenvedő, illetve 43 egészséges kontroll macskától származó vérmintát vizsgált RT-PCR-rel a DCH jelenlétének kimutatása céljából. Az endogén uveitisben szenvedő macskák vérmintái közül 3,08% (2/65) volt PCR-pozitív, míg a kontroll csoportban nem tudták kimutatni a vírus jelenlétét. A vizsgálatok során nem tapasztaltak szignifikáns eltérést a két csoport eredményei között [53].

3.3.4.6. Japán eredmények

Egy közelmúltban végzett, PCR-alapú vizsgálat alkalmával 139 lakásban tartott macska vérmintájának felhasználásával 1 DCH-fertőzött egyedet (0,78%) azonosítottak Japánban. A pozitív minta egy 17 éves nőtény macskából származott, akinél akut neuropátiát és tartósan emelkedett ALT-aktivitást állapítottak meg az elhullását megelőzően. A PCR-vizsgálat előtt 1 évvel splenectomiát végeztek az állatnál, majd hízósejtes daganattal (mastocytoma) diagnosztizálták, ami miatt CCNU (lomustine) terápiában részesült. Az ALT-aktivitás krónikus emelkedésének okaként nem zárható ki a kemoterápia, viszont az is lehetséges, hogy azt a DCH-fertőzés idézte elő. Az is előfordulhat, hogy a kezelés okozta

immunszuppresszió hozzájárult a fertőzés kialakulásához. A macska kórelőzménye alapján az állat az országban született, korábban nem voltak egészségügyi problémái, illetve nem utazott a tengerentúlra. Ezen túlmenően a filogenetikai vizsgálat során, az X-fehérje szekvencia-elemzése kimutatta, hogy a vírus genetikailag különbözött a más országokban előforduló törzsektől. Az utóbbi információk arra utalnak, hogy az állat nagy valószínűséggel Japánban fertőződött a DCH-val. A korábbi publikációkkal ellentétben ezzel az esettel kapcsolatban nem volt igazolható FIV- és/vagy FeLV-társfertőzés [6].

3.3.4.7. Amerikai eredmények

Stone és munkatársai 2022 szeptemberében publikálták kutatásuk eredményét, miszerint az Amerikai Egyesült Államok macskapopulációjában - az ausztrál és olasz eredményekhez képest - egy meglehetősen alacsony (0,2%) DCH-prevalenciát állapítottak meg. A vizsgálatuk során a rendelkezésre álló 496 mintából mindössze egyetlen minta bizonyult pozitívnak a DCH-ra, mind hagyományos, mind real-time PCR-rel vizsgálva. Az alacsony prevalencia pontos oka nem ismert, viszont a szerzők feltételezik, hogy a különböző régiók eltérő tenyésztési eljárásai, állatorvosi gyakorlata, valamint a macskák viselkedésében tapasztalt különbségek fontos szerepet játszhatnak a krónikus DCH-fertőzés prevalenciájában tapasztalt területi különbségekben. Mindenképpen kiemelendő, hogy az 56 májlymphomával diagnosztizált állatból származó egyetlen májszövetmintából sem tudták izolálni a DCH-t, valamint a retrovírusokkal való ko-infekció sem volt igazolható, annak ellenére, hogy a vizsgálat során 58 FIV- és 57 FeLV-fertőzött állatból származó mintát is vizsgáltak. A teljes genomszekvencia-elemzés során megállapították, hogy a vizsgálat során izolált törzs közelebbi rokonságban áll a HBV-vel, mint a denevérek hepadnavirusaival. Ennek köszönhetően valószínűtlen - az a korábbi feltételezés -, hogy a DCH egy gazdaváltás során került a denevérekről a macskákra. További érdekes felfedezés volt, hogy az izolált vírus egy olyan deléciós mutáns volt, ami a deléció során – az epsilon-szekvencia kiesése miatt – valószínűleg elvesztette replikációs képességét [7].

3.3.5. Kutya hepadnavírusterzsek

Diakoudi és munkatársai feltételezték, hogy - a házi macskákhoz hasonlóan - a házi kutyák (*Canis lupus familiaris*) is hordozhatnak hepadnavírusokat, így kutatásuk során összesen 635 kutyától származó szérummintában vizsgálták a víruscsalád jelenlétét Olaszországban. A vizsgálataikhoz szükséges mintaanyagot két, Puglia régióban található állatorvosi diagnosztikai laboratórium bocsátotta a rendelkezésükre. Az eredményeiket

2022-ben publikálták, miszerint a vizsgált szérumminták 6,3%-ából (40/635) volt kimutatható egy új hepadnavírus RT-PCR segítségével, ami - az izolációt követően - a domestic dog hepadnavírus (DDH) nevet kapta. A filogenetikai vizsgálatok során megállapították, hogy az izolált törzs szoros genetikai rokonságban áll mind az olasz (98%-os nukleotid-azonosság), mind az ausztrál (96,9%-os nukleotid-azonosság) referencia DCH-törzsekkel (ITA/2018/165-83 és Sydney 2016 törzs). A DDH-fertőzött egyedek 96%-a (38/40) volt idősebb egy, míg 57%-a (23/40) hét évesnél, továbbá 70%-a (28/40) kan volt. Mindössze 23 PCR-pozitív kutyából álltak rendelkezésre széleskörű hematológiai és biokémiai vizsgálati eredmények, amelyek elemzéséből kiderült, hogy 47,8%-uk (11/23) esetében emelkedett ALT és/vagy AST (aszparaginsav-transzamináz), valamint 60,8%-uk (14/23) esetében emelkedett ALKP aktivitást mértek. A kutatás során annak lehetőségét is vizsgálták, hogy a kutyák egyik potenciálisan immunszuppresszív állapota, a *Leishmania spp.* okozta fertőzés összefüggésbe hozható-e a DDH-fertőzéssel, úgy, mint ahogy azt az immunszuppresszív hatású retrovírusokkal kapcsolatban megfigyelték az emberek és a macskák esetében [4]. Utóbbival kapcsolatban viszont azt az eredményt kapták, hogy közel megegyező arányban rendelkeznek *Leishmania*-specifikus ellenanyagokkal a DDH-fertőzött egyedek (12/40; 30%), mint a vizsgált populáció tagjai (170/635; 26,7%). A szerzők felvetik a hepadnavírusok gazdafajok közti átvitelének lehetőségét a ragadozók (*Carnivora*) között, viszont ennek a hipotézisnek a bizonyítása további vizsgálatokat igényel [54].

Nem sokkal az első izolációt követően, 2022-ben Choi és munkatársai is publikálták kutatási eredményeiket, melyben a DDH szerepét vizsgálták a kutyák idiopathicus krónikus májgyulladásának (CH) és hepatocelluláris karcinómájának (HCC) kóroktanában. 501 kutyából gyűjtött teljes vérmintát, valamint 101 – vagy CH-val (47/101) vagy HCC-vel (54/101) diagnosztizált egyedekből származó – májbiopsziás mintát vizsgáltak meg Hong Kongban. Míg a vérminták mindössze 0,4%-ából (2/501) tudták kimutatni a DDH jelenlétét RT-PCR segítségével, addig egyetlen bioptátumból sem sikerült izolálni a vírust [55].

Az eddigi vizsgálatok alapján elmondható, hogy annak eldöntése, hogy a kutyákban milyen jelentőséggel bír a DDH-fertőzöttség minden bizonnyal további vizsgálatokat igényel, mindenesetre az eddigi eredmények alapján valószínűsítik, hogy a kutyák esetében a CH és a HCC kóroktanában nem játszanak szerepet a hepadnavírusok [55].

4. Anyag és módszer

4.1. Mintagyűjtés

A vizsgálataink tárgyát képező mintaanyag gyűjtése 2020 májusa és 2021 augusztusa között történt. A kutatásunk során vizsgált házi macskapopulációt a fenti mintagyűjtési időszak alatt az Állatorvostudományi Egyetem (ÁTE) Kisállatklinikájára érkező beteganyag képezte. Ezen időszak alatt összesen 305 olyan EDTA-val alvadásban gátolt, teljes vérmintát bocsátottak rendelkezésünkre az ÁTE Kisállatklinikájának munkatársai, amelyek megfelelőek voltak a vizsgálatainkhoz.

A vizsgált populációból a kutatásunkhoz kizárólag azon macskák vérmintáinak maradványát használtuk fel, amelyek esetében a betegellátás, valamint a differenciál-diagnosztika során a laboratórium széleskörű hematológiai és biokémiai vérvizsgálatokat végzett (a vérkép-vizsgálat mellett legalább az alap májparaméterek vizsgálata is megtörtént).

A mintagyűjtési időszak alatt levett teljes vérmintákat az ÁTE Kórélettani és Onkológiai Tanszékének laboratóriumában 1–3 napig 4°C-on tárolták. Ezt követően a vizsgálatainkhoz megfelelő minták átkerültek a laboratóriumból az ÁTE Patológiai Tanszékére. A tanszékre való beérkezésüket követően, a mintákat a későbbi beazonosíthatóság, illetve nyomon követhetőség érdekében feliratozták és sorszámozták, majd az általunk végzett vizsgálatokig mélyfagyasztással, -80°C-on tárolták.

A vizsgálatainkhoz szükséges vérvizsgálati eredményeket, valamint az egyedek kórelőzményi adatait, a fizikális és kiegészítő vizsgálati eredményeit az ÁTE Kisállatklinikájának praxisnyilvántartó programjából (Doki For Vets) kerestük ki.

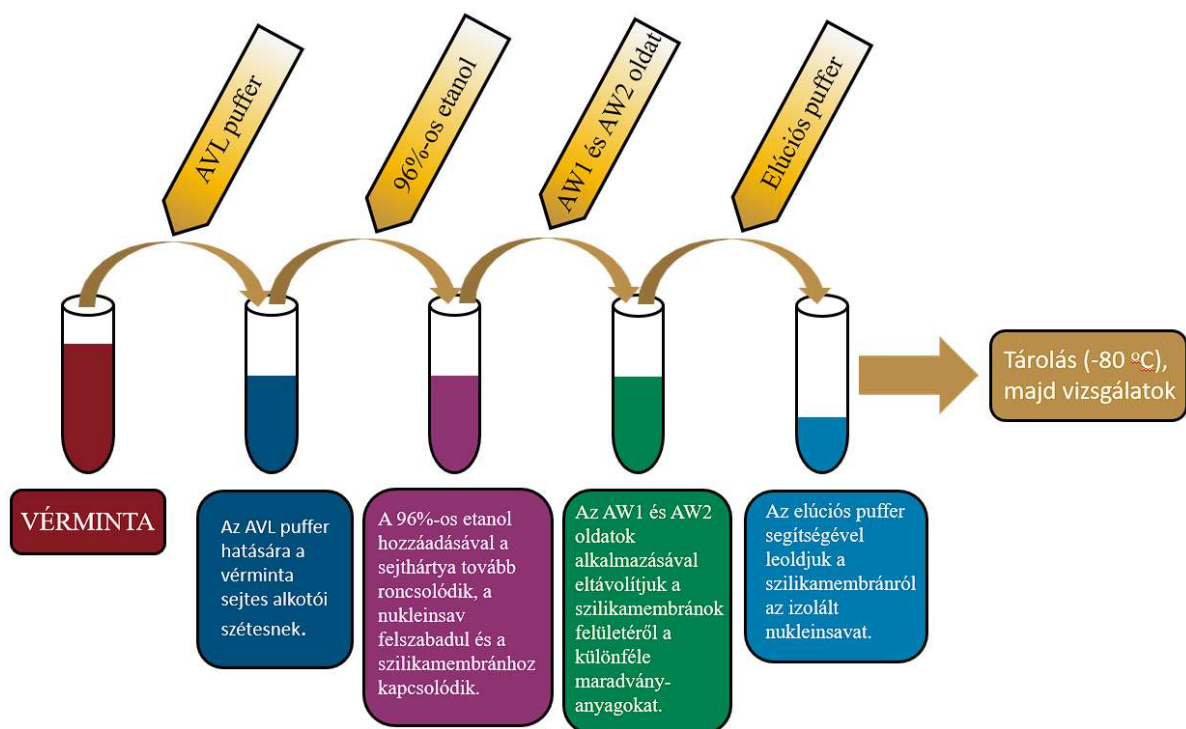
4.2. A nukleinsav kinyerése

A minta-előkészítés során a rendelkezésünkre bocsátott összes minta esetében a nukleinsav extrakcióját végeztük el. A kinyeréshez a QIAamp cador Pathogen Mini Kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk, amely jelentősen leegyszerűsíti a virális RNS, DNS és bakteriális DNS izolálását az állati minták széles spektrumából, akár a hígítatlan teljes vér-, szérum-, tampon- és szövetmintáknál is [56].

A mintákat QIAcube Connect automata (Qiagen) dolgozta fel, amely beépített tizenkét mintahelyes ultracentrifugával, illetve keverő termosztáttal (thermo shaker) rendelkezik. A berendezésben sokféle, szilika membrán alapú, spin oszlop rendszerű, nukleinsav (DNS, RNS), valamint fehérje izolálására alkalmas kit helyezhető el. Az izolált nukleinsavak az

extrakciót követően szekvencia, illetve génexpressziós analízisre, továbbá genotipizálásra, az izolált fehérjék pedig proteomikai analízisre használhatóak [57].

A teljes nukleinsav-kinyerési folyamat négy fő lépésből áll (**6. ábra**). Az extrakció kezdetén a vérmintáinkhoz AVL puffert adtunk, aminek hatására - a benne lévő proteináz K segítségével - az inkubáció alatt a vérmintában lévő sejtes alkotóelemek szétesnek. Ezt követően a nukleinsav megfelelő kinyerésének érdekében, a sejthártya további roncsolását a vérmintáinkban, tömény (96%-os) etil-alkohol hozzáadásával értük el. Az utóbbi eljárás következtében a felszabaduló nukleinsav a szeparáló oszlop szilika membránjához kapcsolódott. A kinyerés harmadik szakasza a mosási fázis volt, melynek folyamán AW1 és AW2 oldatok alkalmazásával eltávolítottuk a különféle maradványanyagokat – amelyek fals eredményeket idézhetnének elő a reakció során – a szilika membránok felületéről. Befejezőképpen a szilika membránról elúciós puffer segítségével Eppendorf csövekbe oldottuk az izolált nukleinsavat, amelyet ilyen formában -80°C -on tároltunk a további vizsgálatokig.



6. ábra: A nukleinsav kinyerési folyamat sematikus áttekintése

4.3. Polimeráz-lánreakció

A polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction, PCR) a molekuláris biológia egyik legszélesebb körben alkalmazott eljárása, amelyet a DNS egy kis darabjának (target

DNS szekvencia) enzimatisus amplifikálására használnak analízis céljából. Maga a target DNS szakasz lehet egy nem kódoló régió, de akár egy gén vagy annak egy részlete is, amely méretét tekintve rendszerint kisebb, mint 10 kilobázis (kb) [58].

4.3.1. Jelentőség

A molekuláris biokémiai módszerek alkalmazásának sokféle célja van az állat-egészségügyben. Lehetővé teszik a változatos biológiai mintákból a különféle patogének örökítőanyagának (DNS, RNS) közvetlen detektálását. Segítséget nyújtanak a kórokozó mikroorganizmusok virulens és avirulens törzseinek differenciációjában. Megteremtik a lehetőségét a különféle látens fertőzések (pl. herpeszvírusok esetében), illetve a gazdaállat genomjába integrálódott provírusok (pl. retrovírusok esetében) kimutatásának. Biztosítják a nukleotid sorrend meghatározása révén a vírustörzsek és -típusok azonosítását, illetve rokonsági fokának megállapítását. Mindezeket összegezve elősegítik a járványtani nyomozást.

A PCR eljárás legfőbb előnyei többek között annak gyorsasága, nagyfokú szenzitivitása és specificitása, valamint a több minta egyidejű feldolgozásának lehetősége, továbbá a folyamat teljes automatizálásának lehetősége. A módszer hátránya annak nagyfokú érzékenységből adódik, amely tulajdonsága miatt a kontamináció elkerülésére mindig fokozottan ügyelni kell a téves eredmények megelőzése érdekében. További hátrányként említhető az eljáráshoz használt berendezések magas ára, illetve a szakképzett munkaerő szüksége.

4.3.2. Vizsgálható minták, mintaelőkészítés

A módszer szinte minden biológiai minta vizsgálatára alkalmazható, úgy, mint a vér- (alvadásban gátolt vagy nem gátolt), tampon- (orr-, légcső-, kloákatampon), szerv- (máj, lép, vese, tüdő, agyvelő, magzatburok-, stb.), magzat-, bélsár-, vizeletminta, stb.

Bizonyos minták (pl. szövetek, szervek) esetében a vizsgálatok megkezdése előtt elengedhetetlen azok homogenizálása. Vérminták esetében erre nincs szükség. A homogenizálást napjainkban már legtöbbször automata homogenizáló robottal végzik, korábban a dörzsmozsár és kvarchomok segítségével történő kézi homogenizálást részesítették előnyben. A minta megfelelő részéből kimetszett kb. borsónyi darabkát olyan Eppendorf-csőbe helyezik, amelyben acélgolyók vannak. A berendezés az acélgolyókra kifejlesztett kavitáció segítségével roncsolja, majd homogenizálja a mintákat.

4.3.3. Szükséges anyagok

A PCR-reakció lejátszódásához számos anyagra van szükségünk. Elsőként a PCR-csőbe kell töltenünk a mintánkból kivont templát DNS-t, amelyet amplifikálni szeretnénk. Ehhez hozzá kell adnunk nagy feleslegben a primereket, azaz a két olyan oligonukleotidot (rövid, egyszálú DNS-darabot), amelyek közrefogják az amplifikálni kívánt templát DNS-t, mivel megegyeznek annak elejével (5' vég) és végével (3' vég), így meghatározzák azt. A reakcióelegyhez kell adnunk azon dezoxiribonukleotid-trifoszfátokat (dNTP), amelyekből az újonnan szintetizált DNS-lánc felépül, valamint azt a termostabil DNS-dependens DNS-polimeráz enzimet (Taq polimeráz), amely magát a szintézist elvégzi. Ezen felül egy speciális pufferre is szükségünk van, ami az enzim megfelelő működését biztosító kémiai környezetet biztosítja. A puffer főleg Mg^{2+} -ionokat - amelyek az enzim működéséhez, valamint a dNTP-k stabilizációjához elengedhetetlenek –, illetve vizet – amely a legtöbb kémiai folyamat (pl. a kondenzáció) végbemeneteléhez nélkülözhetetlen - tartalmaz [58].

Az izolált nukleinsavak összemérése a PCR-reakcióhoz szükséges eleggyel történhet kézzel vagy automata pipettázó robot segítségével. A vizsgálataink során a reakcióelegy összemérését manuálisan végeztük.

4.3.4. Lépések

A folyamat egy PCR készülékben zajlik. Ez a berendezés valójában egy speciális termosztátként fogható fel, ami a vizsgálatot végző személy által előre beállított paramétereknek megfelelően szabályozza az eljárás különböző szakaszainak hőmérsékletét és időtartamát az egyes ciklusokon belül. A polimeráz láncreakció alapvetően három, különböző hőmérséklet és idő paraméterekkel rendelkező lépés, ciklikus ismétlődésével halad előre.

A különböző vizsgálatok során leggyakrabban 25–45 ciklus lejátszódásával amplifikálják a target DNS szakaszt. Ennek segítségével exponenciális növekedést lehet elérni (pl. a 25. ciklus végén kb. $3,36 \times 10^7$ -szeres), mivel minden egyes ciklusban megkétszereződik a vizsgált DNS mennyisége [58].

A berendezés először kb. 94–96°C-ra melegíti fel a reakcióelegyet, aminek hatására - a DNS-szálakat összekapcsoló hidrogén-hidak felbomlása miatt - megtörténik a kétszálú templát DNS denaturációja, egyszálú DNS-láncokká.

Ezután következik a kapcsolódási (annealing) lépés, amikor a készülék kb. 45–60°C-ra (ún. hibridizációs hőmérséklet) hűti vissza a reakcióelegyet, aminek következtében megkezdődik a szétvált DNS-szálak ismételt összekapcsolódása a komplementaritás elve szerint. Ebben a fázisban nyílik lehetőség arra, hogy a vizsgálatok során használt primerek a

templát DNS velük komplementer szakaszához kapcsolódjanak. A kapcsolódási hőmérséklet (T_a , annealing temperature) pontos értéke az alkalmazott primerek szekvenciájától függ, általánosságban elmondható, hogy a legtöbb esetben kb. 5°C -kal azok olvadási hőmérséklete (T_m , melting temperature) alatt található. Ha a beállított hőmérséklet túl magas, úgy a primerek nem képesek a templát DNS-hez kötődni, ha pedig túl alacsony, akkor viszont nem specifikus helyekre is bekötődhetnek, aminek következtében fals termékeket hozhatnak létre.

Végül a berendezés ismét emeli a hőmérsékletet, kb. 72°C -ra, mivel ez a hőmérséklet az optimális a Taq polimeráz működéséhez. Ennek következtében ebben a szakaszban történik a DNS-szintézis, azaz az elongáció. Utóbbi folyamat az annealing fázisban bekapcsolódott primernél kezdődik, majd végigmegy a DNS-szálon.

Az utolsó lépést követően a készülék ismét kb. $94\text{--}96^\circ\text{C}$ -ra melegíti fel a reakcióelegyet és a ciklus kezdődik előlről.

Amennyiben a vizsgált kórokozó nukleinsava RNS (az RNS vírusok esetében), úgy a PCR-reakció előtt el kell végezni az RNS átírását komplementer DNS-sé (cDNS) reverz transzkriptáz enzim segítségével. Ilyen esetekben a PCR-reakció során az átírás eredményeként kapott cDNS alkalmazható templátként. Napjainkban már elérhetőek úgynevezett One-Step PCR kettek, amelyek használatával egy lépésben elvégezhető mind az átírás, mind a PCR-reakció.

4.3.5. Módszerek

4.3.5.1. Hagyományos PCR módszer

A hagyományos PCR eljárás esetében, a megfelelő számú ciklus lezajlását követően, a termékek (az amplifikált target DNS szakaszok) detektálásához agaróz gélelektroforézist használunk. A módszer lényege, hogy mivel a DNS-molekulák negatív töltésűek, emiatt elektromos térben a pozitív pólus irányába vándorolnak. A gélben a különböző molekulák eltérő sebességgel futnak a méretüktől függően, ennek következtében az eltérő molekulatömegű molekulák más és más távolságot tesznek meg a gélben a futtatás során.

Az eredmények kiértékeléséhez egyrészt a DNS-molekulákat speciális interkaláló, fluoreszcens festékekkel (pl. etidium-bromid, EtBr) kezeljük, aminek hatására ultraibolya (UV) fényben láthatóvá válnak. Másrészt szükségünk van ismert molekulatömegű (marker) DNS-molekulákra (pl. egy pozitív kontrollra), amik segítségével hozzávetőlegesen meg tudjuk határozni a reakció során kapott termékek méretét [58].

4.3.5.2. Real-time (RT) PCR módszer

A valós idejű (real-time) PCR eljárás esetében a termékek detektálásához különféle – a fluoreszcencia mértékét kvantitatív módon mérő – fluorometriás eljárásokat követően, olvadási görbe analízist használunk. Ennek a lehetőségét az teremti meg, hogy a DNS-molekula olvadáspontja vagy olvadási hőmérséklete (T_m) arányos egyrészt annak hosszával, másrészt annak nukleotid összetételével (G-C arányával) [59].

A módszerhez szükségünk van vagy egy interkalálódó, fluoreszcens festékre (pl. SYBR Green) vagy pedig egy hibridizációs próbára (pl. TaqMan próba), amik segítségével (a fluoreszcencia mérése segítségével) valós időben tudjuk detektálni a reakcióelegyben jelenlévő - a PCR reakció termékeként keletkező - dsDNS (duplaszálú DNS, double stranded DNS) mennyiségét. Ennek következtében a PCR-reakcióval egy időben (valós időben) követhetjük az eredményeket [60].

A SYBR Green nem specifikus módon interkalálódik, azaz „beleköt” a dsDNS-be, míg a ssDNS-hez (szimplaszálú DNS, simple stranded DNS) nem képes hozzákapcsolódni. A dsDNS-be kötődve monokróm (530 nm hullámhosszúságú), fluoreszcens fényt emittál. Az így létrejövő fluoreszcenciát mérni tudjuk, a fluoreszcens jel mértéke pedig arányos a reakció termékeként keletkezett dsDNS mennyiségével [61].

A hibridizációs próbák során egy hibridizáló (próba) primert adunk a reakcióelegyhez a két hagyományos primer mellé. A hibridizáló primer a másik kettő között kötődik a ssDNS-hez a számára megfelelő szakaszon. A primer végeihez jelzések kapcsolódnak, egyik végéhez egy fluorokróm festék (reporter), míg másik végéhez egy kioltó (quencher) molekula. Abban az esetben, ha ez a két jelzés egymáshoz közel helyezkedik el (ép a próba), akkor a kioltó elnyeli a fluorokróm által emittált fényt, aminek következtében nem detektálható fluoreszcencia. A 3' végen módosított hibridizációs primert a Taq polimeráz nem tudja meghosszabbítani, helyette 3'→5' exonukleázként szétbontja, aminek következtében a kioltó eltávolodik a fluorokrómtól, így bekövetkezik a fluoreszcencia [62] [58].

Általánosságban elmondható, hogy a nem specifikus, interkalálódó festékekre épülő RT-PCR vizsgálati módszerek kevésbé specifikus eredményt adnak, mint a hibridizációs próbák segítségével működők.

Mindezeket összefoglalva kijelenthető, hogy a RT-PCR módszer előnye a hagyományos módszerrel szemben, hogy kvantitatív, azaz mennyiségi eredményt ad, továbbá specifikusabb és érzékenyebb, valamint nagyobb mintaszámok kezeléséhez ideálisabb, illetve könnyen automatizálható.

4.3.6. Olvadási görbe analízis

Az olvadási görbe analízishez a PCR-reakciót követően a reakcióelegyet a berendezés – a reakció első lépéséhez hasonlóan – kb. 95°C-ra melegíti. Ennek hatására a termék, azaz a dsDNS szálai denaturálódnak, aminek hatására a szálak közé bekötődött fluoreszcens festékmolekulák kiszabadulnak. Az utóbbi folyamat következtében a fluoreszcencia mértékében egy csökkenő tendencia figyelhető meg, amit detektálni tudunk. Ha a reakcióelegyben a specifikus termékek mellett nem-specifikus termékek is találhatóak, akkor – az eltérő olvadáspont-értékek miatt – az analízis során számos fluoreszcencia csökkenés látható. Ezzel szemben, ha az elegyben kizárólag a specifikus termék található, akkor egyetlen hirtelen fluoreszcencia-csökkenés tapasztalható [59].

Egy adott DNS-molekula olvadáspontjának (T_m) azt a hőmérsékleti értéket tekintjük, ahol a DNS-molekulák 50%-a már denaturálódott (szétvált). Ennek pontos értéke számos tényezőtől függ (pl. molekula mérete, bázisok aránya, egyéb szekvenciális különbségek), viszont jellemző az adott termékre [59].

Az analízis során az egyes olvadáspontok összehasonlításával meghatározhatjuk, hogy a vizsgált kórokozó nukleinsava benne volt-e a mintánkban. A módszer a különféle patogének örökítőanyagának közvetlen detektálásán kívül számos egyéb vizsgálatra is lehetőséget biztosít (pl. genotípus meghatározása, alacsony és magas patogenitású törzsek elkülönítése, stb.).

A görbének az ún. exponenciális fázisában vagyunk képesek megmérni a mintákban lévő DNS-mennyiségek közötti relatív különbséget. Ezen fázis meghatározásához egy küszöbérték beállítására van szükségünk, amelyet megtehetünk manuálisan vagy használhatjuk a berendezés szoftvere által automatikusan javasolt értékét [58].

A küszöbérték alatt azt a pontot értjük, ahol a minta által leadott fluoreszcencia (fluoreszcens jel) intenzitása meghaladja a háttérét. Ennek segítségével az analízis során meghatározható az ún. Ct érték, ami azt a ciklusszámot jelenti, ahol az adott mintához tartozó olvadási görbe eléri a küszöbértéket. Ha egy ismert kópiaszámú mintából standard hígítási sort készítünk, majd megvizsgáljuk a hozzá tartozó Ct értékeket, akkor a mintában lévő specifikus termékhez tartozó kópiaszámot is meghatározhatjuk [58] [61].

4.4. Sajás PCR-vizsgálat

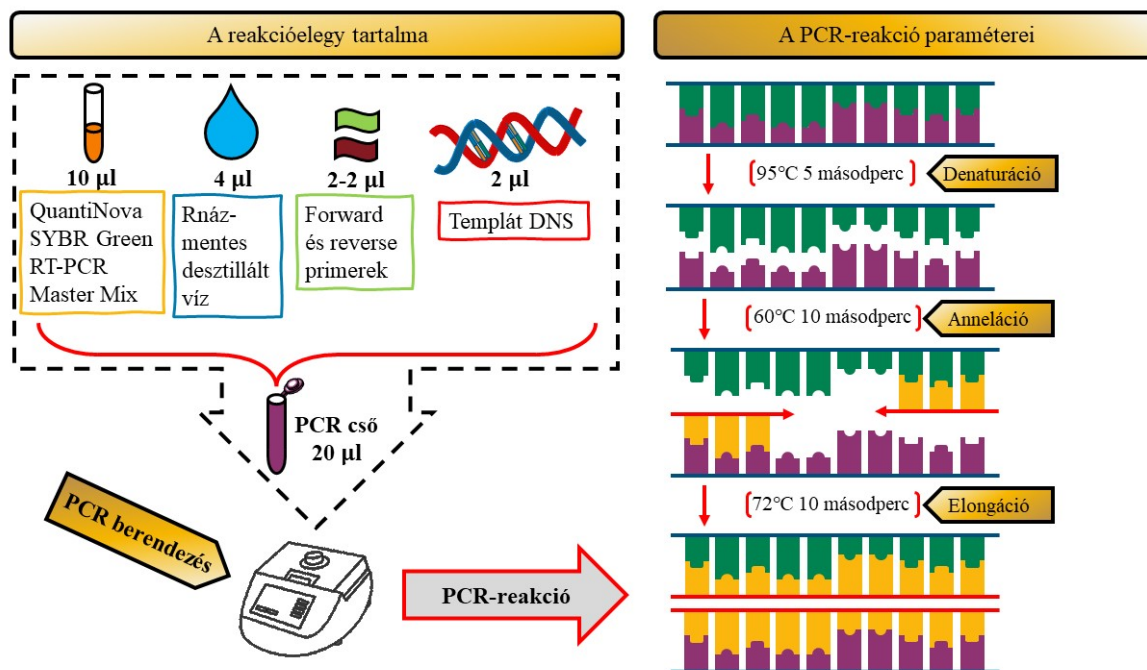
A vizsgálataink során RT-PCR segítségével mutattuk ki a rendelkezésünkre bocsátott vérmintákból a DCH jelenlétét. A reakció során a Qiagen által fejlesztett QuantiNova SYBR

Green RT-PCR kit segítségével vizsgáltuk a mintákból kivont virális eredetű DNS-t, a cég Rotor-Gene Q PCR berendezésével [63] [64].

A reakcióelegyünk tervezése során a gyártói utasításban szereplő receptúrát vettük figyelembe. Az általunk összeállított reakcióelegy mintánként 10 µl QuantiNova SYBR Green RT-PCR Master Mixet, 4 µl RNáz-mentes desztillált vizet, 2–2 µl forward és reverz primert tartalmazott minden csőben, amihez 2 µl templátot adtunk, így az elegy végtérfogata minden csőben 20 µl volt (7. ábra). A vizsgálataink során az Aghazadeh és munkatársai publikációjában (2018) szereplő primereket alkalmaztuk: Hgap-forward (5'-GTGCTCTGATAACCGTATGCTC-3') és Hgap-reverse (5'-CTAGAATGGCTACATGGGGTTAG-3') [1].

Az amplifikáció során a berendezés elsőként 95°C-ra melegítette a reakcióelegyet 5 percig, aminek hatására bekövetkezett a dsDNS denaturációja. Az első lépést követően 40 cikluson keresztül alkalmazta az alábbi hőmérséklet és időparamétereket: 95°C 5 másodpercig, 60°C 10 másodpercig, 72°C 10 másodpercig. Utolsó lépésként 72°C 5 percig.

Minden egyes reakciónál alkalmaztunk pozitív, valamint negatív kontrollt. A PCR-vizsgálatok során használt pozitív kontrollt Dénes Lilla, az ÁTE Patológia Tanszékének PhD-hallgatója tervezte, míg a negatív kontroll esetében templátként RNáz-mentes desztillált vizet alkalmaztunk. A pozitív kontroll tervezése során a GénBank adatbázisában megtalálható DCH szekvenciákat használtuk fel.



7. ábra: A vizsgálatok során alkalmazott RT-PCR reakcióelegyének tartalma, valamint a reakció paraméterei

4.5. Szekvenálás

A kutatásunk befejezéseként a feldolgozott mintákból izolált különféle DCH vírustörzsek szekvenálását, valamint filogenetikai jellemzését kívántuk elvégezni. Az izolált törzsek genomjának Sanger-féle szekvenálása során több módszert is kipróbáltunk.

4.5.1. Sanger-féle szekvenálás

A nukleotidok azonosításához a Sanger-féle (láncterminációs vagy dideoxi-) szekvenálás során kapilláris elektroforézist használunk, a DNS-szekvencia amplifikálását követően. A módszer alapvető lényege, hogy a DNS-ben fiziológiásan megtalálható dNTP-k mellé fluorokrómmal jelölt, ún. didezoxiribonukleotid-trifoszfátokat (ddNTP) is adunk a reakcióelegyhez, amelyek a 3' helyen lévő szénatomon csak egy hidrogént tartalmaznak a hidroxil-csoport helyett. Ennek következtében, ha a ddNTP-k beépülnek a DNS-be, akkor megakadályozzák annak további szintézisét [65]. A szekvenálás és a PCR-vizsgálat közötti legfőbb különbség, hogy míg a PCR során kettő, addig a szekvenálás során egyetlen primert használnak.

A szekvenálás eredményeként kapott nyers szekvenciát, analizáló programok segítségével lehet alkalmassá tenni a további vizsgálatokhoz. Az ún. FASTA formátum használatával könnyen összevethetjük a szekvenciánkat a vizsgált kórokozó referencia genomjával.

4.5.2. Saját szekvenálási kísérletek

Az első próbálkozás alkalmával az Aghazadeh és munkatársai által publikált cikkben (2018) leírtak alapján jártunk el **(2. táblázat)** [1]. A vizsgálathoz a Qiagen által fejlesztett AllTaq PCR Core Kit 1000 bp alatti standard protokollját alkalmaztuk, igazítva a primerek olvadáspontjához, így az első futások alkalmával az alábbi paramétereket használtuk: 95°C 2 perc, majd 40 ciklus (95°C 5 másodperc, 57°C 15 másodperc, 72°C 10 másodperc), végül 72°C 10 perc, 10°C tárolás, viszont ezekkel a beállításokkal nem értünk el eredményt.

A második próbálkozás során változtattunk a beállításokon, az amplifikációs ciklusoknál alkalmazott 57°C-ot 52°C-ra csökkentettük, továbbá a 72°C-hoz tartozó időparamétert 10 másodpercről 50 másodpercre növeltük, de így sem jártunk sikerrel.

A harmadik próbálkozásnál az amplifikációs ciklusok során az alábbi paramétereket alkalmaztuk: 95°C 15 másodperc, 50°C 15 másodperc, 72°C 60 másodperc, megpróbálva hátha így a primerek jobban kötődnek.

2. táblázat: A DCH teljes genomjának amplifikálásához használt primerek [1]

Primerek	Szekvencia	Méret (bp)	T _m (°C)
Cir5-F	5'-TTGGCACCTGGATTTCGCA-3'	1400	57
Cir4-R	5'-AGATGTTCCACTCTTAGCC-3'		
Cir8-F	5'-TTGGCACCTGGATTTCGCA-3'	900	58
Cir7-R	5'-CGTAGACGAAGGACACGTC-3'		
Cir7-F	5'-CCATCGATTTACACACTTCCCA-3'	950	57
Cir5-R	5'-TGCGAATCCAGGTGCCAA-3'		
Cir1-R	5'-ATAACCGTATGCTCCGGAAG-3'	1000	55
Hgap-F	5'-GTGCTCTGATAACCGTATGCTC-3'	230	55
Hgap-R	5'-CTAGAATGGCTACATGGGGTTAG-3'		

A kezdeti sikertelenséget követően lecseréltük a primereinket és az Anpuanandam és munkatársai által publikált cikkben (2021) leírtakhoz igazítottuk a vizsgáltunkat (**3. táblázat**) [4]. Az új primerek eltérő olvadáspontja miatt a következő futásoknál már az alábbi protokollt használtuk: 95°C 1 perc, majd 40 amplifikációs ciklus (95°C 15 másodperc, 55°C 15 másodperc, 72°C 10 másodperc), végül 72°C 5 perc, 10°C tárolás. Sajnálatos módon az új primerekkel és beállításokkal sem értünk el eredményt.

3. táblázat: Újratervezett primerek a DCH teljes genomjának amplifikálásához [4]

Primerek	Szekvencia	Méret(bp)	(T _a ; °C)
DCH A	F: 5'-TGGGCAACATTACCTCAGGTCC-3' R: 5'-GGAACAAAAGAGAACGCACAGG-3'	1700	56
DCH B	F: 5'-GGTCTGACGCCAGGTTATG-3' R: 5'-ACCACGAGTCTGCACTCTGC-3'	1700	56
DCH C	F: 5'-CTCAGGTCTTTGCCCACTCA-3' R: 5'-AGCTGACTCCTCCCACCAAGT-3'	1155	55
DCH D	F: 5'-AACTAAGCATGAACTCCGCC-3' R: 5'-TGGGCCAACAGGTGCAATTT-3'	1173	55

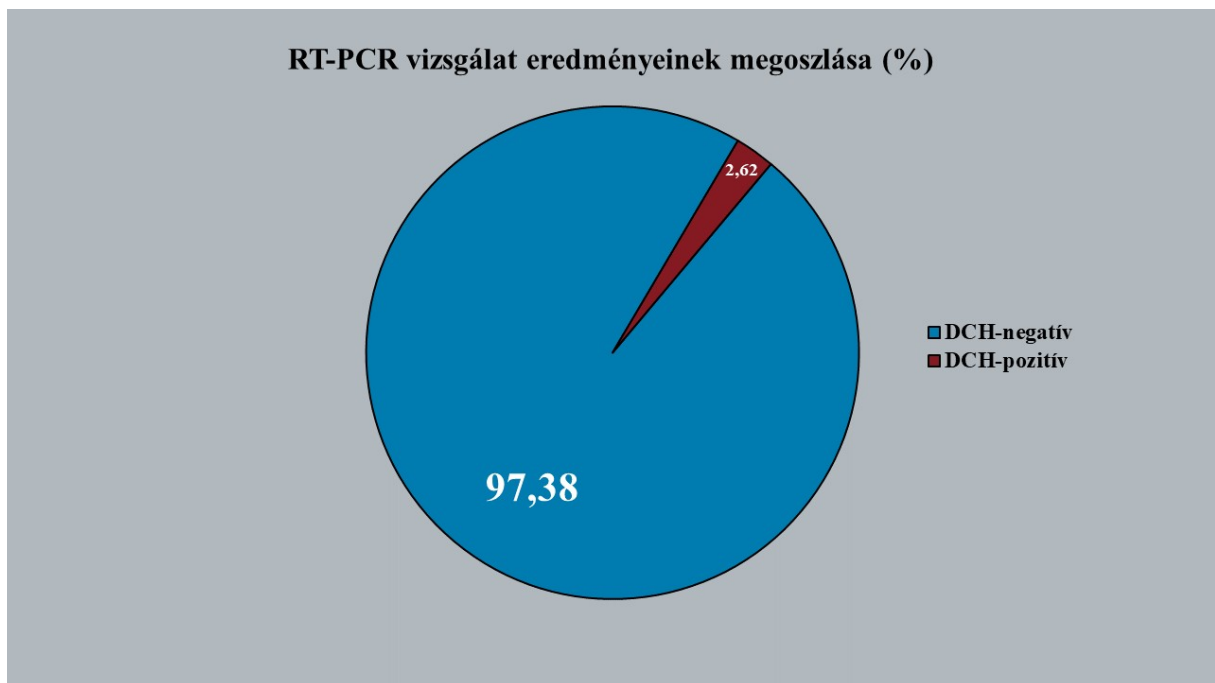
Az általunk összeállított reakcióelegyek mintánként 5 μl Master Mixet, 11,34 μl RNáz-mentes desztillált vizet, 1–1 μl forward és reverz primert, valamint 0,16 μl tracet tartalmaztak minden csőben, amihez 2,5 μl templátot adtunk, így az elegyek végtérfogata minden csőben 21 μl volt.

Az eredménytelen próbálkozások miatt a vérminták újraizolálását is elvégeztük, viszont ennek ellenére sem működött egyik reakció sem.

5. Eredmények

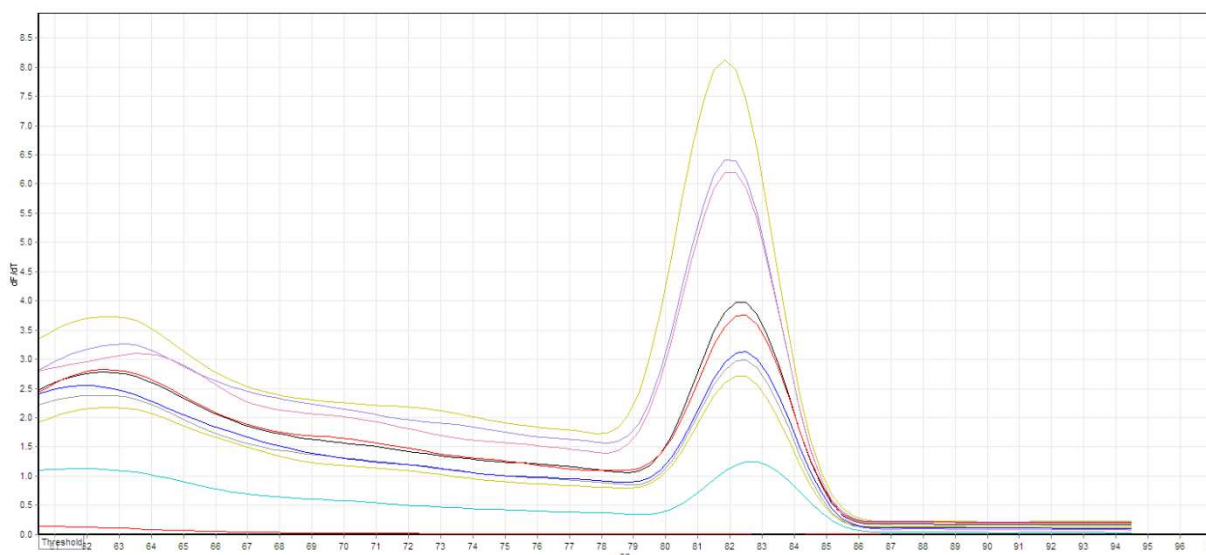
A 2020 májusa és 2021 augusztusa között tartó mintagyűjtési időszak során összesen 305, a vizsgálatainkhoz megfelelő, EDTA-val alvadásban gátolt, teljes vérmintát bocsátottak rendelkezésünkre az ÁTE Kisállatklinikájának munkatársai. A kutatásunkhoz azon macskák vérmintamaradékát használtuk fel, amelyek kivizsgálása során a laboratórium széleskörű hematológiai és biokémiai vérvizsgálatokat végzett.

A vizsgálataink során feldolgozott, és RT-PCR-rel vizsgált 305 vérmintából 8 lett DCH-pozitív, míg 297 DCH-negatívnak bizonyult (**8. ábra**), így a hazai macskapopulációban 2,62%-os prevalenciát találtunk a vírusra nézve. Az általunk kapott előfordulási arány összhangban áll a különböző független kutatócsoportok által világszerte publikált szakirodalmi eredményekkel [48].

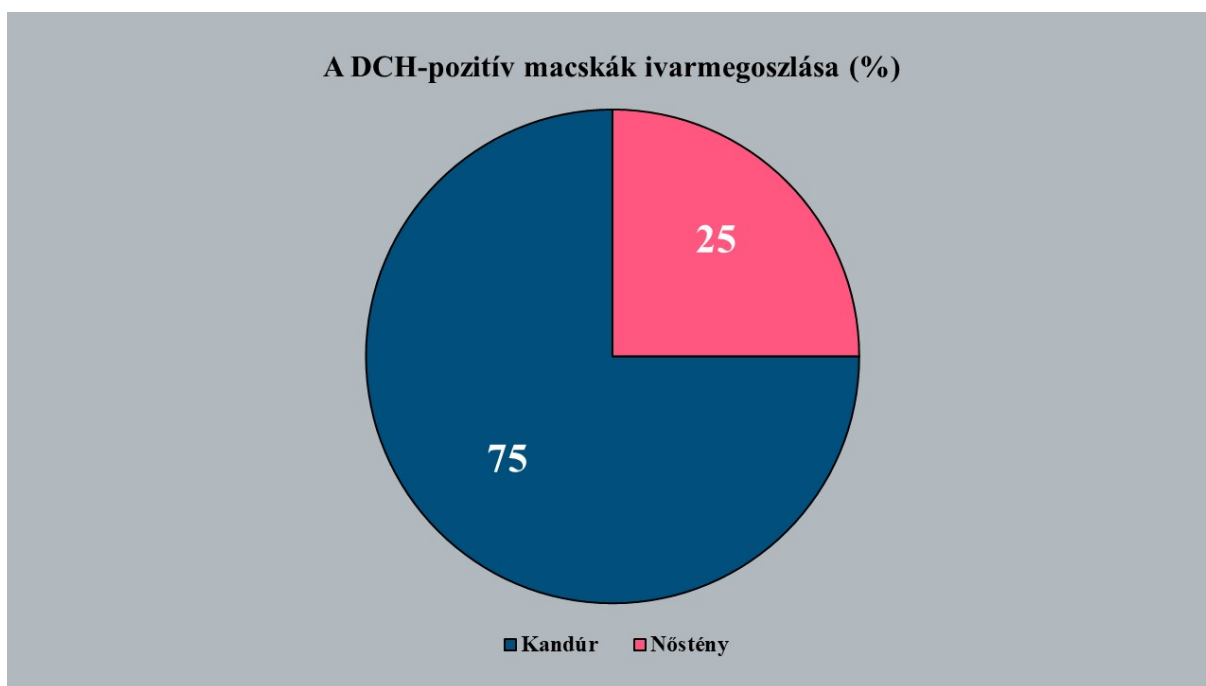


8. ábra: A kutatásunk során végzett PCR-vizsgálat eredményeinek %-os megoszlása

A vizsgálatainknál fluorometriás módszerként SYBR Green interkalálódó, fluoreszcens festéket használtunk a RT-PCR eljárásnál, majd olvadási görbe analízist végeztünk (**9. ábra**) az eredmények kiértékelése során. A kutatásunk alkalmával 163 kandúr (53,44%) és 142 nőstény (46,56%) macskától származó vérmintát vizsgáltunk meg, ennél fogva elmondható, hogy a két ivar képviselői közel azonos arányban voltak reprezentálva a vizsgálatainkban. A DCH-pozitív egyedek közül 6 kandúr (75,0%), míg 2 nőstény (25,0%) volt (**10 ábra**).



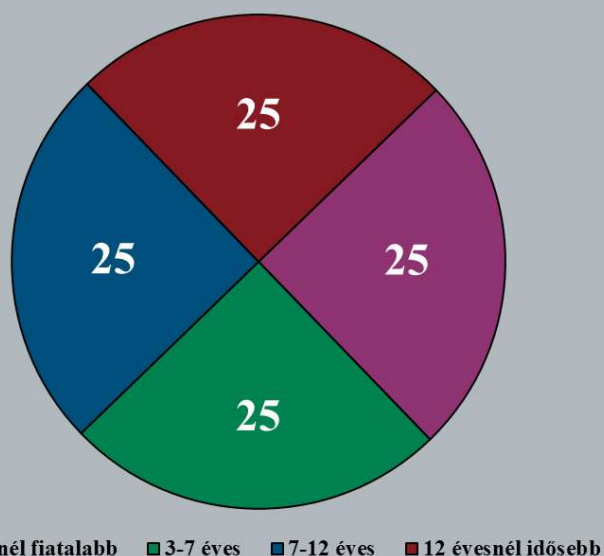
9. ábra: A RT-PCR futások eredménye; a DCH-pozitív minták, valamint a pozitív és negatív kontroll minták olvadási görbéi



10. ábra: A vizsgálataink alapját képező macskapopuláció %-os ivarmegoszlása

A vizsgálataink során a macskákat az életkoruk alapján négy csoportba osztottuk: 3 évesnél fiatalabb, 3–7 éves, 7–12 éves, 12 évesnél idősebb. A DCH-pozitív egyedek esetében az eredmények kiértékelésénél megközelítőleg azonos koreloszlást figyeltünk meg, hiszen kettő-kettő macska tartozott mind a négy általunk kialakított csoportba (**11. ábra**).

A DCH-pozitív macskák kormegoszlása (%)



11. ábra: A vizsgálataink alapját képező macskapopuláció %-os kormegoszlása

A 4. táblázatban a DCH-pozitív egyedek kórelőzményi adatait, valamint laboratóriumi paramétereit mutatjuk be. A PCR-pozitív macskák változatos kórelőzményi adatokkal érkeztek az ÁTE Kisállatklinikájára. A DCH-fertőzött egyedek egyikénél sem detektáltak májenzim-aktivitás emelkedést a laboratóriumi vizsgálatok során.

4. táblázat: A DCH-pozitív egyedek kórelőzményi adatai, májparamétere

DCH-pozitív minta sorszáma	Egyed ivara	Egyed kora a vizsgálat időpontjában (év)	Vizsgálat oka	Diagnózis	Májparaméterek	
					ALT (ref.: <60)	ALKP (ref.: 40-190)
#1	kandúr	1,5	Általános tünetek	Macskák fertőző hashártyagyulladás (FIP)	50	45
#2	kandúr	6	Idegrendszeri tünetek	Epilepszia, Feline hyperaesthesia syndrome (FHS)	54	31
#3	nőstény	16	Kontrollvizsgálat	Pajzsmirigy tumor	51	34
#4	kandúr	14	Fogászati kezelés	Fogkövesség	59	94
#5	kandúr	8	Éves kivizsgálás	Policisztás vesebetegség (PKD)	40	56
#6	kandúr	1	Ivartalanítás	Kasztráció	37	19
#7	nőstény	11	Fogászati kezelés	Fogkövesség	49	55
#8	kandúr	4	Traumás beteg	Os ilium fractura et fragmentatio	34	25

A kórelőzményi adatok elemzése során megállapítottuk, hogy egyelőre nem tudjuk bizonyítani azt a korábbi hipotézist, hogy a DCH a HBV-hez hasonló klinikai tüneteket, vérbiokémiai eltéréseket, valamint makro- és mikroszkópos patológiai elváltozásokat idéz elő macskákban.

A korábban megkezdett hazai prevalencia-vizsgálat alkalmával vizsgálták a retrovírusokkal (FIV és/vagy FeLV) való ko-infekciót is, viszont mivel akkor nem találtak összefüggést, így a kutatásunk során nem vizsgáltuk tovább a társfertőzések jelenlétét.

A sikeres nukleinsav extrakciót és RT-PCR-rel történő detektálást követően, az általunk izolált különféle törzseket szekvenciaelemzés és filogenetikai jellemzés céljából Sanger-féle szekvenálással kívántuk vizsgálni. A kutatásunkhoz az Aghazadeh és munkatársai (2018), valamint az Anpuanandam és munkatársai (2021) által publikált cikkekben alkalmazott primereket, valamint beállításokat használtuk. Abból kifolyólag, hogy az említett kutatócsoportok által kidolgozott primerekkel más vizsgálatoknál is értek el eredményeket, így nagy valószínűséggel nem a primerek tervezésénél lépett fel probléma. Emiatt a kezdeti sikertelenségeket követően a vérminták újraizolálásával, valamint a szekvenálási paraméterek megváltoztatásával is próbálkoztunk, viszont ezek sem vezettek eredményre. Ennek okán ellenőriztük a vérmintákban lévő vírus kópiaszámot, ami nagyon alacsonynak bizonyult, utóbbi pedig nem kedvez a hosszú szekvenciák amplifikálásának.

A szekvenálási kísérletünkkel kapcsolatban összességében elmondható, hogy a diagnosztikai vizsgálatok során a hosszabb nukleinsav szegmenseket nem sikerült amplifikálni semelyik vérmintából sem, annak ellenére, hogy több módszerrel is próbálkoztunk. Ennek következtében a kutatásunk részeként szekvencia-analízist sem tudtunk végezni. Véleményünk szerint a vérmintákban található igen alacsony vírus kópiaszám, valamint esetleg a nukleinsav töredezettsége, avagy sérülése állhat annak hátterében, hogy a szekvenálási próbálkozásaink nem lettek eredményesek.

6. Megbeszélés

Az Egészségügyi Világszervezet 2019-es évi becslése szerint megközelítőleg 296 millió ember élt együtt a humán hepatitis B vírus (HBV) okozta krónikus fertőzéssel a Földön, valamint közel 820 ezer ember vesztette életét egy év alatt a megbetegedés következményeiben. A halálesetek hátterében a legtöbb esetben májcirrózis és hepatocelluláris carcinoma, valamint azok következményei álltak [24]. Az 1965 óta ismert vírus jelenleg a *Hepadnaviridae* család, *Orthohepadnavirus* nemzetségének tagja. A családba kisméretű, - részben szimplaszálú, részben duplaszálú - cirkuláris genommal rendelkező, hepatotróp DNS-vírusok tartoznak, amelyeket napjainkra már minden gerinces osztályból izoláltak már [8].

A közelmúltban egy addig ismeretlen, a HBV-hez hasonló hepadnavírust (DCH) mutattak ki Ausztráliában egy nagy B-sejtes lymphomában (LBCL) szenvedő, retrovírus-társfertőzés (FIV) következtében immunkompromittált macskából [1]. Az első izolációt követően a világ számos pontján végzett párhuzamos molekuláris vizsgálatok során 0,2–12,5% közötti prevalenciát mutattak ki vérmintákban és akár 14,0%-ot májszövetmintákban [48].

A filogenetikai vizsgálatok során megállapították, hogy a vírus az Orthohepadnavirus nemzetségbe sorolható [1], valamint a különböző országokban izolált törzsek egymással szoros rokonságban állnak (96,4–99,7%-os nukleotid-azonosságot mutatnak) [48]. Nemrégiben egy feltételezhetően rekombináns DCH törzset is jelentettek Thaiföldről, ami a rekombináció lehetőségének szerepére utal a vírus evolúciójában [3]. Ezen felül azt is megállapították, hogy a DCH genomja megközelítőleg 3,2 kb hosszú, valamint - a többi orthohepadnavírushoz hasonlóan - négy egymást átfedő ORF-t kódol a polimeráz (P), a felszíni (S), a mag (C) és az X fehérjék számára [1].

A különböző vizsgálati eredmények alapján feltételezik a DCH-fertőzés, valamint a macskák krónikus májgyulladás és hepatocelluláris carcinomája közötti összefüggést [5], viszont egyes kutatócsoportok ennek ellenkezőjét tapasztalták [7] [50]. Az ellentmondásos eredmények miatt elmondható, hogy a DCH patogenitásának tisztázásához minden bizonnyal további vizsgálatokra van szükség. A májon kívül a DCH örökítőanyagának jelenlétét más szervekben (pl. szív, tüdő, lép, vesék, belek) is kimutatták RT-PCR segítségével [1] [2] [3] [4], valamint a HBcAg expressziót is igazolták IHC segítségével [3]. Az IHC a különböző szervekben szisztémás gyulladással elváltozásokat is kimutatott (pl. hepatitiszt, májfibrózist, glomerulonefritist, limfocitocitás enteritist, hisztiocitás limfadenitist) [3].

A HBV-vel ellentétben, – amely főként vérrel, szexuális, illetve maternális úton terjed [22] – a DCH esetén kizárólag a vérrel történő terjedést tekintik valószínűnek, mivel a DCH-val fertőzött macskák hosszú távú megfigyelése során a szájüregi-, a kötőhártya-, a preputiális és a rektális tamponok többszöri ismételt PCR-vizsgálata minden esetben negatívnak bizonyult [49].

Számos független kutatócsoport vizsgálata alapján egyre több bizonyíték utal arra, hogy a macskákban előforduló retrovírus-fertőzések (FIV, FeLV) okozta immunszupresszió hozzájárulhat a DCH-fertőzés megeredéséhez [1] [2] [3] [4]. Tekintettel arra, hogy az ilyen irányú kutatásoknál ennek ellentmondó eredmények is születtek, további vizsgálatok szükségesek a retrovírusok okozta ko-infekció hatásainak tisztázása érdekében [6] [7].

A vizsgálataink eredménye alapján elmondható, hogy a DCH hazánkban is jelen van, a kutatásunk során a rendelkezésünkre bocsátott vérmintákból RT-PCR segítségével mért 2,62%-os prevalencia összhangban áll az eddig megjelent szakirodalmi eredményekkel. A kutatásunk kiértékelésekor azt tapasztaltuk, hogy a kandúr macskákban magasabb arányban fordul elő a fertőzöttség, viszont az eredményeink egyelőre nem szignifikánsak. Ezen felül nem találtunk összefüggést a fertőzéssel leginkább érintett korosztály kérdésében, mivel megközelítőleg azonos koreloszlást figyeltünk meg. A korelóményi adatok elemzése során nem tudtuk igazolni, hogy a DCH a HBV-hoz hasonló tüneteket, eltéréseket, illetve elváltozásokat okozna macskákban.

A kutatásunk alkalmával a nukleinsav extrakcióját, valamint annak RT-PCR-rel történő kimutatását követően, az izolált törzsek genomjának Sanger-féle szekvenálása során több módszert, valamint beállítást is kipróbáltunk. Minden próbálkozásunk ellenére a diagnosztikai vizsgálatok során a hosszabb nukleinsav szegmenseket nem sikerült amplifikálni semelyik vérmintából sem. Arra az álláspontra jutottunk, hogy ennek hátterében a vérmintákban található igen alacsony vírus kópiaszám, valamint esetleg a DNS töredezettsége állhatott.

Mindenképpen további vizsgálatok szükségesek a vírussal való fertőződés lehetséges módjainak, valamint kockázati tényezőinek felderítésében annak érdekében, hogy a DCH-fertőzés terjedése megelőzhető legyen – többek között – a macskák tenyésztése során. A DCH-val kapcsolatos további molekuláris diagnosztikai, valamint járványtani vizsgálatok, illetve egy – a retrovírusok okozta fertőzések diagnosztikájában használt teszthez hasonló – szerológiai gyorseszteszt kifejlesztése nagyban hozzájárulnának a megelőzési stratégiák kialakításához, ezáltal a macskák egészségének megőrzéséhez.

7. Összefoglalás

A világon elsőként Aghazadeh és munkatársai (2018) mutattak ki hepadnavírust egy házi macska (*Felis catus*) daganatos elváltozásának (LBCL) kórszöveti mintájából [1]. A kutatásunk során RT-PCR segítségével megállapítottuk, hogy a DCH hazánkban is jelen van, az általunk vizsgált 305 vérmintából 8 esetben tudtuk kimutatni a vírust, ezáltal a hazai macskapopulációban 2,62%-os prevalenciát találtunk a DCH-ra nézve. A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a kandúr macskákban magasabb arányban fordul elő a fertőzöttség, valamint megközelítőleg azonos koreloszlást figyeltünk meg, viszont az eredményeink egyelőre nem szignifikánsak. Az eddigi szakirodalmi adatok alapján feltételezik, hogy a vírus a humán hepatitis B megbetegedéshez hasonló vérbiokémiai és immunológiai eltéréseket, valamint makro- és mikroszkópos patológiai elváltozásokat idéz elő macskákban [5], viszont a kórelőzményi adatok elemzése során megállapítottuk, hogy ezt egyelőre nem tudjuk igazolni. A továbbiakban a mintaszám emelésével, valamint a DCH-pozitív egyedek utókövetésével lehetséges a korábban felmerült hipotézisek, illetve kérdések eldöntése és megválaszolása. A sikeres nukleinsav extrakciót és RT-PCR-rel történő detektálást követően, az általunk izolált különféle törzseket szekvenciaelemzés és filogenetikai jellemzés céljából Sanger-féle szekvenálással kívántuk vizsgálni. Minden próbálkozásunk ennek ellenére a hosszabb nukleinsav szegmenseket nem sikerült amplifikálnunk semelyik vérmintából sem, annak ellenére, hogy több módszerrel is próbálkoztunk. Véleményünk szerint a vérmintákban található igen alacsony DCH kópiaszám, illetve a nukleinsav töredezettsége, avagy sérülése állhatott annak hátterében, hogy a szekvenálási próbálkozásaink nem lettek eredményesek.

8. Irodalomjegyzék

1. Aghazadeh M, Shi M, Barrs VR, McLuckie AJ, Lindsay SA, Jameson B, Hampson B, Holmes EC, Beatty JA (2018) A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia. *Viruses* 10:E269. <https://doi.org/10.3390/v10050269>
2. Lanave G, Capozza P, Diakoudi G, Catella C, Catucci L, Ghergo P, Stasi F, Barrs V, Beatty J, Decaro N, Buonavoglia C, Martella V, Camero M (2019) Identification of hepadnavirus in the sera of cats. *Sci Rep* 9:10668. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47175-8>
3. Piewbang C, Wardhani SW, Chaiyasak S, Yostawonkul J, Chai-in P, Boonrungsiman S, Kasantikul T, Techangamsuwan S (2020) Insights into the genetic diversity, recombination, and systemic infections with evidence of intracellular maturation of hepadnavirus in cats. *PLOS ONE* 15:e0241212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241212>
4. Anpuanandam K, Selvarajah GT, Choy MMK, Ng SW, Kumar K, Ali RM, Rajendran SK, Ho KL, Tan WS (2021) Molecular detection and characterisation of Domestic Cat Hepadnavirus (DCH) from blood and liver tissues of cats in Malaysia. *BMC Vet Res* 17:9. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02700-0>
5. Pesavento PA, Jackson K, Hampson TSTTB, Munday JS, Barrs VR, Beatty JA (2019) A Novel Hepadnavirus is Associated with Chronic Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Cats. *Viruses* 11:E969. <https://doi.org/10.3390/v11100969>
6. Takahashi K, Kaneko Y, Shibantai A, Yamamoto S, Katagiri A, Osuga T, Inoue Y, Kuroda K, Tanabe M, Okabayashi T, Naganobu K, Minobe I, Saito A (2022) Identification of domestic cat hepadnavirus from a cat blood sample in Japan. *J Vet Med Sci* 84:648–652. <https://doi.org/10.1292/jvms.22-0010>
7. Stone C, Petch R, Gagne RB, Nehring M, Tu T, Beatty JA, VandeWoude S (2022) Prevalence and Genomic Sequence Analysis of Domestic Cat Hepadnavirus in the United States. *Viruses* 14:2091. <https://doi.org/10.3390/v14102091>
8. Magnius L, Mason WS, Taylor J, Kann M, Glebe D, Dény P, Sureau C, Norder H, ICTV Report Consortium (2020) ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae. *J Gen Virol* 101:571–572. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001415>
9. Seeger C, Mason WS (2015) Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* 479–480:672–686. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.031>
10. MacLachlan JH, Cowie BC (2015) Hepatitis B virus epidemiology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5:a021410. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021410>
11. Argenta FF, Mello LS, Caprioli RA, Pavarini SP, Driemeier D, Sonne L (2020) Pathological and immunohistochemical aspects of primary hepatobiliary neoplasms in cats. *Pesqui Veterinária Bras* 40:46–54. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6071>

12. Malikné D. Á (2012) Perzisztens fertőzést okozó hepatitis vírusok molekuláris vizsgálatai. Doktori (Ph.D.) értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola
13. Weber OF, Protzer U (2008) Comparative hepatitis. Birkhäuser, Basel ; Boston
14. Littlejohn M, Locarnini S, Yuen L (2016) Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. Cold Spring Harb Perspect Med 6:a021360. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021360>
15. He B, Fan Q, Yang F, Hu T, Qiu W, Feng Y, Li Z, Li Y, Zhang F, Guo H, Zou X, Tu C (2013) Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar. Emerg Infect Dis 19:638–640. <https://doi.org/10.3201/eid1904.121655>
16. Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Müller MA, Adam A, Klose SM, Borges Carneiro AJ, Stöcker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C (2013) Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. Proc Natl Acad Sci 110:16151–16156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308049110>
17. Trepo C (2014) A brief history of hepatitis milestones. Liver Int Off J Int Assoc Study Liver 34 Suppl 1:29–37. <https://doi.org/10.1111/liv.12409>
18. Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, Rico-Hesse R (1998) Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. Proc Natl Acad Sci U S A 95:5757–5761. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5757>
19. Dill JA, Camus AC, Leary JH, Di Giallonardo F, Holmes EC, Ng TFF (2016) Distinct Viral Lineages from Fish and Amphibians Reveal the Complex Evolutionary History of Hepadnaviruses. J Virol 90:7920–7933. <https://doi.org/10.1128/JVI.00832-16>
20. Trépo C, Chan HLY, Lok A (2014) Hepatitis B virus infection. Lancet Lond Engl 384:2053–2063. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60220-8)
21. Robinson WS, Marion PL, Miller RH (1984) The hepadna viruses of animals. Semin Liver Dis 4:347–360. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040664>
22. N. Szomor K (2009) Hepatitiszt okozó vírusok molekuláris vizsgálata. Doktori (Ph.D.) értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem
23. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J (2010) The replication cycle of hepatitis B virus. J Hepatol 52:282–284. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.10.031>
24. Hepatitis B. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
25. Takács M, Dencs Á, Barcsay E, Hettmann A, Tresó B, Csépai MM, Rusvai E, Győri Z (2009) Hepatitis és HIV-markerek vizsgálata magyarországi börtönökben. Egészségtudomány 53:23–31

26. Pattyn J, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P (2021) Hepatitis B Vaccines. *J Infect Dis* 224:S343–S351. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa668>
27. Liang TJ (2009) Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatol Baltim Md* 49:S13-21. <https://doi.org/10.1002/hep.22881>
28. Yuen M-F, Chen D-S, Dusheiko GM, Janssen HLA, Lau DTY, Locarnini SA, Peters MG, Lai C-L (2018) Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primer* 4:18035. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.35>
29. Rogers AS, Lindsey JC, Futterman DC, Zimmer B, Abdalian SE, D'Angelo LJ (2000) Serologic Examination of Hepatitis B Infection and Immunization in HIV-Positive Youth and Associated Risks. *AIDS Patient Care STDs* 14:651–657. <https://doi.org/10.1089/10872910050206577>
30. Burnett RJ, Francois G, Kew MC, Leroux-Roels G, Meheus A, Hoosen AA, Mphahlele MJ (2005) Hepatitis B virus and human immunodeficiency virus co-infection in sub-Saharan Africa: a call for further investigation. *Liver Int* 25:201–213. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01054.x>
31. Bodsworth NJ, Cooper DA, Donovan B (1991) The Influence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection on the Development of the Hepatitis B Virus Carrier State. *J Infect Dis* 163:1138–1140. <https://doi.org/10.1093/infdis/163.5.1138>
32. Summers J, Smolec JM, Snyder R (1978) A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4533–4537. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4533>
33. Tennant BC, Gerin JL (2001) The Woodchuck Model of Hepatitis B Virus Infection. *ILAR J* 42:89–102. <https://doi.org/10.1093/ilar.42.2.89>
34. Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS (1980) A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:2941–2945. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2941>
35. Rivkina MB, Cullen JM, Robinson WS, Marion PL (1994) State of the p53 gene in hepatocellular carcinomas of ground squirrels and woodchucks with past and ongoing infection with hepadnaviruses. *Cancer Res* 54:5430–5437
36. Testut P, Renard CA, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L, Tekaiia F, Degott C, Blake J, Boyer B, Buendia MA (1996) A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* 70:4210–4219. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.7.4210-4219.1996>
37. Witkowski PT, Klempa B, Ithete NL, Auste B, Mfunne JKE, Hoveka J, Matthee S, Preiser W, Kruger DH (2014) Hantaviruses in Africa. *Virus Res* 187:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.039>
38. Li R, Zanin M, Xia X, Yang Z (2018) The tree shrew as a model for infectious diseases research. *J Thorac Dis* 10:S2272–S2279. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.12.121>
39. Jacquet S, Pons J-B, De Bernardo A, Ngoubangoye B, Cosset F-L, Régis C, Etienne L, Pontier D (2019) Evolution of Hepatitis B Virus Receptor NTCP Reveals Differential

Pathogenicities and Species Specificities of Hepadnaviruses in Primates, Rodents, and Bats. *J Virol* 93:e01738-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01738-18>

40. Nie F-Y, Tian J-H, Lin X-D, Yu B, Xing J-G, Cao J-H, Holmes EC, Ma RZ, Zhang Y-Z (2019) Discovery of a highly divergent hepadnavirus in shrews from China. *Virology* 531:162–170. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.03.007>
41. Guo W-N, Zhu B, Ai L, Yang D-L, Wang B-J (2018) Animal models for the study of hepatitis B virus infection. *Zool Res* 39:25–31. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2018.013>
42. de Carvalho Dominguez Souza BF, König A, Rasche A, de Oliveira Carneiro I, Stephan N, Corman VM, Roppert PL, Goldmann N, Kepper R, Müller SF, Völker C, de Souza AJS, Gomes-Gouvêa MS, Moreira-Soto A, Stöcker A, Nassal M, Franke CR, Rebello Pinho JR, Soares M do CP, Geyer J, Lemey P, Drosten C, Netto EM, Glebe D, Drexler JF (2018) A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses. *J Hepatol* 68:1114–1122. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.029>
43. Lei S-C, Xiao X, Liu J-W, Han H-J, Gong X-Q, Zhao M, Wang L-J, Qin X-R, Yu X-J (2019) High prevalence and genetic diversity of hepatitis B viruses in insectivorous bats from China. *Acta Trop* 199:105130. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105130>
44. Dawes BE, Freiberg AN (2019) Henipavirus infection of the central nervous system. *Pathog Dis* 77:ftz023. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftz023>
45. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, Li B, Huang C-L, Chen H-D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shen X-R, Wang X, Zheng X-S, Zhao K, Chen Q-J, Deng F, Liu L-L, Yan B, Zhan F-X, Wang Y-Y, Xiao G-F, Shi Z-L (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
46. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T (2006) Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 19:531–545. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
47. Luis AD, Hayman DTS, O’Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JRC, Mills JN, Timonin ME, Willis CKR, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JL, Webb CT (2013) A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci* 280:20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
48. Shofa M, Kaneko Y, Takahashi K, Okabayashi T, Saito A (2022) Global Prevalence of Domestic Cat Hepadnavirus: An Emerging Threat to Cats’ Health? *Front Microbiol* 13:938154. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.938154>
49. Capozza P, Lanave G, Diakoudi G, Stasi F, Ghergo P, Ricci D, Santo G, Arena G, Grillo I, Delle Donne E, Di Lisio F, Zini E, Callegari C, Valente L, Camero M, Di Martino B, Beatty J, Barrs VR, Buonavoglia C, Martella V (2021) A longitudinal observational study in two cats naturally-infected with hepadnavirus. *Vet Microbiol* 254:108999. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.108999>

50. Scavone D, Lauzi S, Stranieri A, Tramontano G, Ratti G, Paltrinieri S (2022) Evaluating the presence of domestic cat hepadnavirus viraemia in cats with biochemical alterations suggestive of liver disease. *Vet Rec* 191:e1626. <https://doi.org/10.1002/vetr.1626>
51. Fruci P, Di Profio F, Palombieri A, Massirio I, Lanave G, Diakoudi G, Pellegrini F, Marsilio F, Martella V, Di Martino B (2022) Detection of antibodies against domestic cat hepadnavirus using baculovirus-expressed core protein. *Transbound Emerg Dis* 69:2980–2986. <https://doi.org/10.1111/tbed.14461>
52. Tien P-T, Lin C-J, Tsai Y-Y, Chen H-S, Hwang D-K, Muo C-H, Lin J-M, Chen W-L (2016) RELATIONSHIP BETWEEN UVEITIS, DIFFERENT TYPES OF VIRAL HEPATITIS, AND LIVER CIRRHOSIS: A 12-Year Nationwide Population-Based Cohort Study. *Retina Phila Pa* 36:2391–2398. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000001103>
53. Jeanes EC, Wegg ML, Mitchell JA, Priestnall SL, Fleming L, Dawson C (2022) Comparison of the prevalence of Domestic Cat Hepadnavirus in a population of cats with uveitis and in a healthy blood donor cat population in the United Kingdom. *Vet Ophthalmol* 25:165–172. <https://doi.org/10.1111/vop.12956>
54. Diakoudi G, Capozza P, Lanave G, Pellegrini F, Di Martino B, Elia G, Decaro N, Camero M, Ghergo P, Stasi F, Cavalli A, Tempesta M, Barrs VR, Beatty J, Bányai K, Catella C, Lucente MS, Buonavoglia A, Fusco G, Martella V (2022) A novel hepadnavirus in domestic dogs. *Sci Rep* 12:2864. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06842-z>
55. Choi YR, Chen M-C, Carrai M, Rizzo F, Chai Y, Tse M, Jackson K, Martella V, Steiner J, Pesavento PA, Beatty JA, Barrs VR (2022) Hepadnavirus DNA Is Detected in Canine Blood Samples in Hong Kong but Not in Liver Biopsies of Chronic Hepatitis or Hepatocellular Carcinoma. *Viruses* 14:1543. <https://doi.org/10.3390/v14071543>
56. QIAcube. <https://www.qiagen.com/media/product-tools/qiacube-web/index.html>
57. QIAamp cador Pathogen Mini Kit. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-cador-pathogen-mini-kit/>
58. Barna J, Lengyel K, Takács V. K, Billes V, Sigmond K. T, Varga M, Horváth P, Ari E, Vellai T (2013) *Genetikai gyakorlatok*. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest
59. Radvánszky J, Resko P, Pálffy R, Batová M (2006) Olvadásgörbe analízis a specifikus PCR végtermékek kiértékelésében. Comenius Egyetem, Természettudományi kar, Molekuláris Biológia tanszék
60. Singh C, Roy-Chowdhuri S (2016) Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1392:161–176. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_15
61. Dorak MT (2006) *Real-time PCR*. Taylor & Francis, New York
62. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J (2015) Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 439:231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>

63. QuantiNova RT-PCR Kits. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/probe-based-one-step-qrt-pcr/quantinova-rt-pcr-kits/>
64. Rotor-Gene Q. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/epigenetics/dna-methylation/methylation-specific-pcr/rotor-gene-q/>
65. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, Clement T, Toohey-Kurth K (2020) Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc* 32:767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Szilasi Annának, akihez bármikor fordulhattam tanácsért, segítségért egyetemi tanulmányaim alatt és a szakdolgozatom elkészítése során is.

Köszönettel tartozom az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájának munkatársainak, akik munkájukon felül külön mintagyűjtéssel segítették a szakdolgozatom elkészültét. Köszönöm a Patológiai Tanszék munkatársainak, különösen Schönhardt Kittinek a mintakezelésben való részvételt.

Köszönetet és hálát érzek szüleim, testvéreim, és nagymamám iránt, akiknek támogató szeretetében bízhattam egyetemi tanulmányaim alatt is, s akik elviseltek és támogattak a vizsgaidőszakok során.

Köszönöm a barátaimnak, hogy kölcsönösen számíthatunk egymásra, segítettek, kiegészítettük és minden helyzetben támogattuk, bátorítottuk egymást.

S végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Dr. Szabó Géza Antalnak, hogy türelmes mentorként állt mellettem, így akár szakmai, akár gyakorlati kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzá.

Köszönet minden állatnak, amiért önként vagy sem, de majd rám bízzák magukat.

*„Be van fejezve a nagy mű, igen.
A gép forog, az alkotó pihen.
Év-millióig eljár tengelyén,
Míg egy kerékfogát ujítani kell.
Fel hát, világim véd-nemtői, fel,
Kezdjétek végtelen pályátokat.
Gyönyörködjem még egyszer bennetek,
Amint elzúgtok lábaim alatt.”
/Madách Imre: Az ember tragédiája/*

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: HONICS MARCELL
 Elérhetőség (e-mail cím): honicsm2013@gmail.com
 A feltöltendő mű címe: Magyarországban itoldalt maoska
hepadnanibus tomsek filozofetkai jellemzése
 A mű megjelenési adatai: Budapest, 2022
 Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:



engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,



az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,



a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,



csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

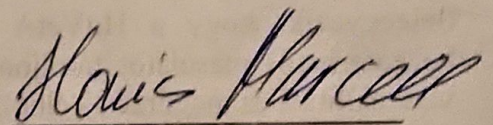


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2022. év november hó 17. nap



aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*