

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

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

PhD értekezés tézisei

Dr. Forgách Petra

2010

Témavezető és témabizottsági tagok:

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

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

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

.....
dr. Forgách Petra

BEVEZETÉS

A hepatitis E vírus (HEV) 32-34 nm átmérőjű, burok nélküli, ikozaéder szimmetriájú, pozitív szimplaszálú RNS vírus. A kapszidban lévő 7,5 kb hosszúságú vírusgenom három nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) kódol, amelyek egymással részleges átfedésben vannak (Emerson és Purcell, 2003). Jelenleg a „rendbe nem besorolt vírusok” csoportján belül a Hepeviridae család Hepevirus genusába sorolják (ICTV, 2009). A világ különböző országaiban kimutatott vírus-változatok négy genocsoportba sorolhatók, melyek közül a 3. és a 4. csoport vírusai embereket és állatokat is fertőzni képesek.

Az enterális úton terjedő, hepatitis E vírus okozta fertőzés emberekben heveny, önkorlátozó, sárgasággal járó, átlagosan 1% mortalitású májgyulladás okoz. A humán hepatitis E járványtanában endémiásnak nyilvánították a világ elmaradott környezeti higiéniajú területeit (Anderson *et al.*, 2002; Schlauder *et al.*, 2003), ahol a szeroprevalencia átlagosan 15%, és jellemző a betegség járványos előfordulása. A fejlett országokban, melyeket „nem endémiás”-nak tekintenek, a hepatitis E szörványosan fordul elő: az esetek többségében „importált” fertőzésről van szó, leírtak már azonban olyan emberi fertőzéseket is, amikor a kórokozó az adott („nem endémiás”) területről, esetleg a rezervoárként szereplő állatokból származhatott (Yazaki *et al.*, 2003; Widdowson *et al.*, 2003; Wichmann *et al.*, 2008). Habár ez idáig klinikai tünetekkel járó fertőzést állatokban nem figyeltek meg, a HEV fertőzéssel szembeni szerokonverziót számos állatfajban leírták. Genetikai és járványtani vizsgálatok mellett kísérleti fertőzések is a HEV gazdafajok közötti terjedésének lehetőségét igazolták. A HEV-fertőzés állatokban tünetmentes, a főbb rezervoár fajoknak a házi sertés mellett a vaddisznó, illetve különböző vadon élő kérődző-fajok bizonyultak (Meng *et al.*, 2005).

Az emberi és állati eredetű HEV törzsek szoros genetikai rokonságban állnak egymással, mely alátámasztja a feltételezéseket a vírus zoonózis jellegéről. A feltételezések szerint állatok is szerepet játszanak a fertőzés fenntartásában és terjesztésében; az állatok fertőzöttsége nemcsak élelmiszer-higiéniai, hanem munkaegészségügyi kockázatot is jelent (Galiana *et al.*, 2008).

A KUTATÁS CÉLJAI

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

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

2. A HEV-fertőzés lefolyásának vizsgálata sertésstelepeken

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

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

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

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

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

5. Egy magyarországi vírus teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése

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

ANYAG ÉS MÓDSZER

A HEV hazai, állatokban való elterjedtségének felmérése során olyan minták gyűjtésére törekedtünk, melyekből a fertőzés szervezetbeni lefolyása alapján nagy valószínűséggel kimutatható a HEV nukleinsava. A kutatások során 717 mintát vizsgáltunk meg, melyeket a főbb rezervoár fajokon (sertés, vaddisznó, őz, szarvas) és házi kérődzőkön (szarvasmarha, juh, kecske) kívül a fertőzés fenntartásában feltételezeten részt vevő kisemlősökből (egér, patkány, cickány, hörcsög) származtak. A házi sertés máj- és bélsár minták elhullott állatokból, valamint a kutatást mintaküldéssel támogató sertéstelepekről származnak. A vaddisznó és őz máj mintákat vadhús-feldolgozó üzemből gyűjtöttük. A kérődző bélsár minták különböző telepekről származó, parasitológiai vizsgálatra szánt vagy saját gyűjtésű bélsárminták voltak. Takarmány, patkány és egér minták sertéstelepekről, a hörcsög és cickány minták más kutatócsoportokkal való együttműködésből származtak. A szerológiai vizsgálatokhoz Graz (Ausztria) környékén gyűjtött, archivált humán savómintákat használtunk, melyek sertésekkel kapcsolatos foglalkozást űző emberektől származtak.

A vizsgálatokban alkalmazott RT-PCR előkészítése során a szerv- és bélsár mintákból homogenizálás után vírus nukleinsavat vontunk ki. A homogenizálást követően a mintákat, illetve a tisztított vírus RNS-t mikrocentrifuga csövekben $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A pozitív minták kiszűrését az ORF2 régióra tervezett, 197 bp hosszú terméket előállító „diagnosztikai” primerpárral, az eredmény megerősítését az ORF1 régióra tervezett, 417 bp hosszú terméket adó primerpárral végeztük (Schlauder *et al.*, 1999; van der Poel *et al.*, 2001). A teljes genomszekvencia meghatározásában 17, egymással átfedő terméket amplifikáló primerpáron alapuló RT-PCR-t fejlesztettünk ki. A nukleinsav-kivonáshoz, és az RT-PCR reakcióhoz a QiAmp Viral RNA és a OneStep RT-PCR kitet (Qiagen, Düsseldorf, Németország) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően.

Az RT-PCR eredményeit agarózgél-elektroforézissel ellenőriztük. A szekvenálás előkészítéséhez a specifikus PCR terméket alacsony olvadási hőmérsékletű (low melting) agaróz gélben való elektroforézis után Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit segítségével kitisztítottuk, és a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont (Gödöllő) laboratóriumában, illetve a Bécsi

Állatorvos-tudományi Egyetem Klinikai Virologia Tanszékén ABIPrism 310 automata szekvenátorral szekvenáltattuk, majd BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) segítségével azonosítottuk.

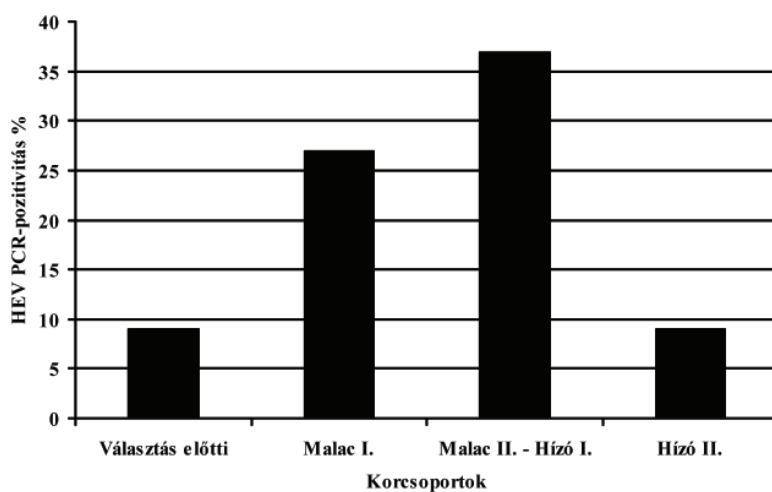
A szekvencia-elemzést és filogenetikai vizsgálatot a GenBank-ban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) elérhető teljes és részleges HEV szekvenciák felhasználásával, AlignPlus4, ClustalX, TreeView és PHYLIP programok segítségével végeztük. A törzsfá megbízhatóságát leíró bootstrap értékeket a SEQBOOT program használatával, 1000-szer megismételt „újramintázási” elemzéssel határoztuk meg. A teljes genomszekvenciák egyes szakaszai variabilitásának grafikus megjelenítését a SimPlot 3.5.1. programmal végeztük.

Az immunoblot vizsgálatot a recomBlot HEV IgG/IgM[®] diagnosztikai kittel végeztük. Minden savóminta esetében megvizsgáltuk mind az IgG, mind az IgM típusú anti-HEV ellenanyagok jelenlétét. A vizsgálatot és az eredmények értékelését a kit használati utasításában leírtaknak megfelelően végeztük. Az immunoblot vizsgálatban pozitívnak vagy gyenge pozitívnak talált savókat, illetve néhány negatívnak talált savót ELISA módszerrel is teszteltük. A vizsgálatot a *recomWell* HEV IgG[®] és *recomWell* HEV IgM[®] ELISA kitekkel végeztük. Az optikai denzitás (OD) értékeket a Genesis Lite 3.03 szoftverrel jelenítettük meg. A vizsgálat és a teszt eredményeinek elbírálása a kit használati utasításának megfelelően történt.

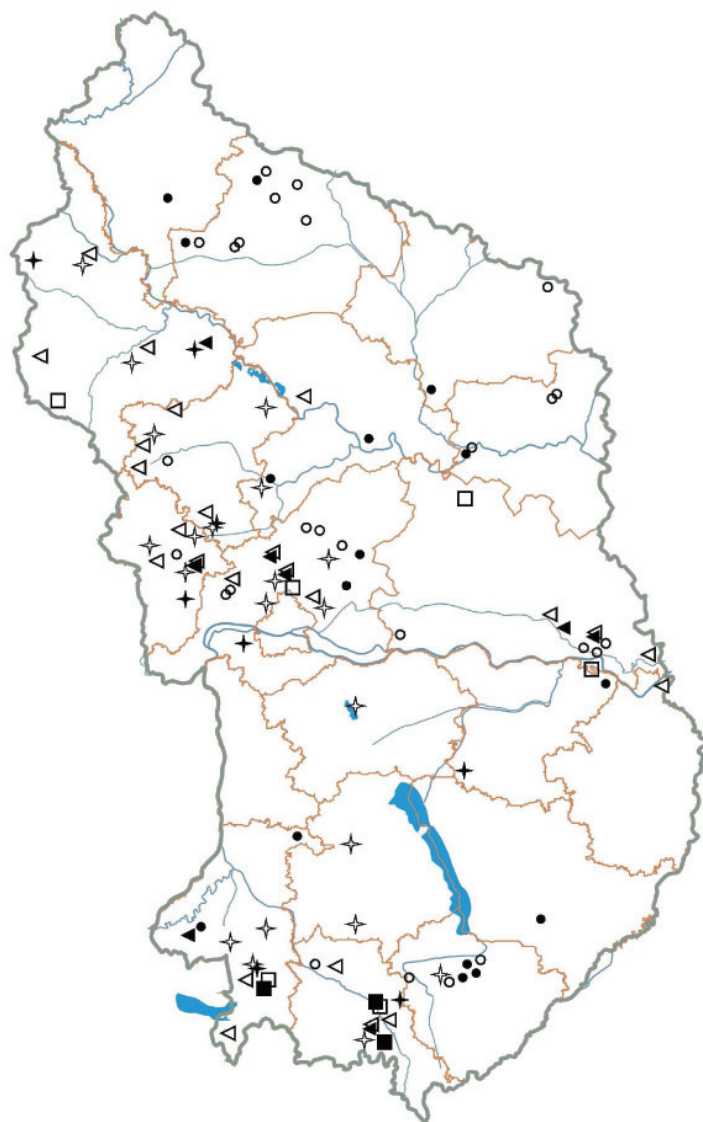
Az immunoblot tesztben IgM-pozitívnak talált savókból az állati eredetű mintákkal azonos módon nukleinsavat vontunk ki, és az ORF2 régióra tervezett „diagnosztikai” primerpár alkalmazásával, RT-PCR segítségével mutattunk ki HEV nukleinsavat. A PCR termékek detektálását, azonosítását, a szekvenálásra kiválasztott PCR termékek szekvenciáinak meghatározását is a fentebb leírtaknak megfelelően végeztük.

EREDMÉNYEK

A házi sertés mintákat 41 magyarországi sertéstelepről gyűjtöttük, melyek között 16 (39%) olyan telepet találtunk, ahol molekuláris biológiai módszerrel igazoltuk a HEV jelenlétét. A 251 vizsgált házi sertés közül 62 sertésből (25%) mutattuk ki a HEV nukleinsavat: 45 májmintából 14 (31%), 248 bélsárból 52 (21%) pozitív mintát találtunk. A vizsgált sertések közül 204 állat életkoráról állt rendelkezésünkre adat. Ezen állatokat a fertőzés korcsoportonkénti megoszlásának vizsgálatához 4 korcsoportba osztottuk. A választás előtti (1-28 nap, 1-9 kg -os) korcsoport 9%-át, a malac I. (5-10 hét, 10-19 kg) korcsoport 27%-át, a malac II. - hízó I. korcsoport (11-16 hét, 20-50 kg) 37%-át, míg a hízó II. (véghízó, 17 hét után, 50 kg felett) korcsoport 9%-át találtuk pozitívnak (1. ábra). A sertésekben párhuzamosan vizsgált máj- és bélsár minták pozitivitása között a sertések fertőzöttségének megállapítása szempontjából nem találtunk különbséget.



1. ábra A vírusürítés megoszlása különböző korú sertések körében.



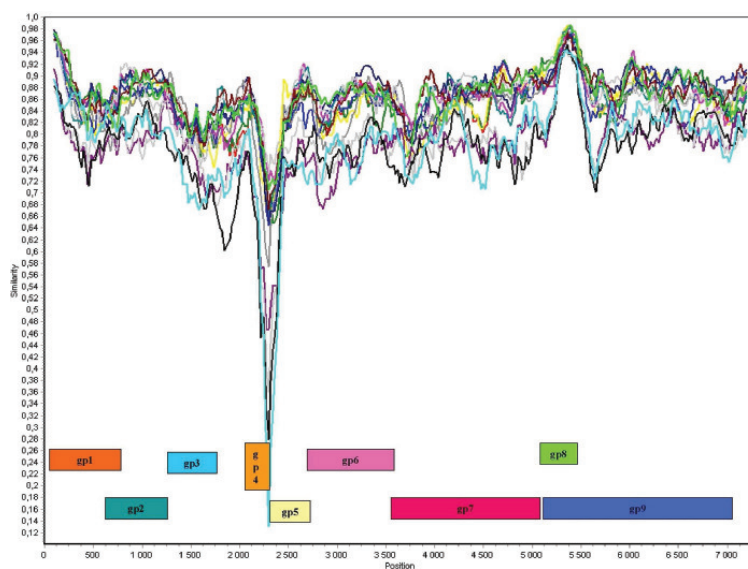
2. ábra A vizsgált minták származási helyei. Jelmagyarázat: ○ - sertéstelep, △ - vaddisznó, ✦ - őz, □ - szarvas. A negatív mintákat üres, a pozitív mintákat kitöltött alakzatokkal jelöltük.

A vizsgált vaddisznók 9%-a, az őzek 22%-a és a szarvasok 10%-a bizonyult HEV fertőzöttnek. A házi kérődzőkből (szarvasmarha, juh, kecske) gyűjtött bélsár minták mindegyike HEV negatívnak bizonyult. A járványtani szempontokból vizsgált egyéb állatfajokból (egér, patkány, hörcsög, cickány) gyűjtött máj- és bélsár mintákban, illetve a sertéslepeken gyűjtött takarmány mintákban nem lehetett kimutatni a HEV jelenlétét. A minták földrajzi eredete alapján kimutattuk, hogy a HEV állatokban Magyarország teljes területén megtalálható (2. ábra).

Immunoblot módszerrel vizsgált minták eredményei szerint az átlagnál magasabb a szerokonverzió aránya a sertéslepei és sertésvágóhídi dolgozók esetében, míg az állatorvosok és a vadászok körében az átlag körüli, a baromfi-vágóhídi dolgozók és a városiak körében pedig átlag alatti a szeropozitivitás. Az ELISA vizsgálatokban a szeropozitivitás mértéke eltérő az immunoblot vizsgálatban talált eredménytől. Ebben az esetben a szeropozitivitás gyakorisága az egyes foglalkozási csoportokban nem korrelál a sertésekkel való kapcsolatba kerülés feltételezett gyakoriságával.

A pozitív minták közül törzsfa-rekonstrukciós vizsgálat céljára kiválasztott 29 minta ORF2s1-ORF2a1 primerrel előállított termékének, illetve öt minta ORF1s1-ORF1a1 primerrel előállított termékének nukleotid-szekvenciáját határoztuk meg. A BLAST elemzés alapján mindegyik szekvencia HEV szekvenciának bizonyult, a filogenetikai elemzés pedig kimutatta, hogy a Magyarországon állatokban előforduló hepatitis E vírusok a HEV 3. genocsoportján belül „a”, „e” és „h” alcsoportba tartozó, különböző országokban kimutatott, állati és emberi eredetű vírusokkal mutatják a legnagyobb hasonlóságot (3. ábra). A Magyarországon kimutatott vírusok vizsgált szekvenciáinak eltéréseit pontmutációk okozzák, melyek többsége néma mutáció. Eredményeink szerint Magyarországon állatokat fertőző hepatitis E vírusok genetikailag rendkívül sokfélék.

Egy minta (HEV072) esetében a teljes genomból egy 7189 nt hosszú egybefüggő szakasz nukleotidsorrendjét sikerült meghatározni. Nukleotid szinten a magyar vírus szekvenciája 80-89% hasonlóságot mutat a 3. genocsoportba tartozó, más országokban kimutatott állati és emberi eredetű vírusok genomszekvenciáival. Aminosav szinten a hasonlóság mindhárom ORF esetében 90% feletti: 90-94% az ORF1 régióban, 96-98% az ORF2 régióban és 90-97% az ORF3 régióban. SimPlot analízissel a genom 2 jellegzetes régióját azonosítottuk. A 2125-2500 nt pozíciók között (polyproline hinge (PPH) régió vagy hipervariábilis régió (HVR)) a 3. genocsoportba tartozó vírusok szekvenciái nagyon különbözőek, nukleotid szinten a hasonlóság ezen a genomszakaszon mindössze 14-78%. Ezzel szemben az 5250-5500 nt pozíciók között (putative capsid protein, PCP régió) a 3. genocsoportba tartozó vírusok szekvenciái nukleotid szinten nagyfokú, 92-98% hasonlóságot mutatnak (4. ábra). Aminosav szinten a hasonlóság a HVR régióban 64-80% míg a PCP régióban 91-99% a 3. genocsoportba tartozó vírusok szekvenciái között.



4. ábra A 3. genocsoportba tartozó vírusok SimPlot analízise. Az egyes vírusok szekvenciáit eltérő színekkel jelöltük.

MEGBESZÉLÉS

A vizsgálat eredményei alapján magyarországi sertéstelepek HEV-fertőzöttsége (39%) az irodalmi adatokkal összehasonlítva közepesnek mondható (Fernandez-Barredo *et al.*, 2006 és 2007; Rutjes *et al.*, 2007; Di Bartolo *et al.*, 2008). A fertőzés telepi lefolyásának vizsgálatával kapott eredmények szerint a sertés telepi fertőzés fenntartásában a választás előtti korú sertések esetében az esetlegesen vírusürítő kocáknak, a későbbiekben a vírustartalmú bélsárral való érintkezésnek és a fertőzött és fogékony sertések egy falkába csoportosításának van jelentősége. Ennek megfelelően a választás előtti korcsoportban alacsony (9%) fertőzöttséget mutattunk ki, mely a választási stressz és a fogékony és vírusürítő sertések összecsoportosítása következtében az 5-10 hetes korosztályban 27%-ra növekedett. A legnagyobb mértékű vírusürítést a 11-16 hetes korcsoportban tapasztaltuk (37%), ami megfelel a szakirodalomban leírtaknak. Ez az átlag alatti fejlettségű, esetleg fertőzött sertések fiatalabb korosztályba való visszacsoportosításával, illetve, a fertőzés lefolyásával, az egyes egyedekben a fertőződést követően a vírusürítés kezdetének és csúcsának időpontjával magyarázható. A vágóhidra kerülő sertések fertőzöttsége (9%) ételmszer-higiéniai okokból, a kereskedelmi forgalomba kerülő sertés hús és máj fertőzöttségének, ezáltal a fogyasztók fertőzött hússal való érintkezése lehetőségének szempontjából nem elhanyagolható.

Habár saját vizsgálatainkban nem tudtuk egyértelműen alátámasztani, hogy a sertésekkel és egyéb rezevoár fajokkal kapcsolatos foglalkozást űzők HEV-fertőzöttsége a kontrolcsoportokhoz viszonyítva nagyobb, a szakirodalomban több vizsgálat eredménye is felhívja a figyelmet az állatok HEV-fertőzöttségének munka-egészségügyi kockázataira. Kutatásaink eredményei alapján azonban megállapítottuk, hogy az alkalmazott immunoblot vizsgálati módszer az teszt szubjektív elbírálása miatt nem ad megbízható eredményt, illetve, hogy a felhasznált archív minták hosszú tárolási ideje negatívan befolyásolta a savóminták vizsgálhatóságát.

Élő vagy elhullott sertés vizsgálata esetén, esetleg ételmszer-higiéniai vizsgálatok esetén megfelelő minta kiválasztásának szempontjai a vizsgálat (mintavétel) körülményeitől függ. A párhuzamosan vizsgált sertés

máj és bélsár minták eredményei szerint mindkét minta vizsgálata megbízható eredményt ad a sertések vagy sertés állományok fertőzöttségének vizsgálatában.

Vizsgálataink eredményei szerint a HEV hazai vadon élő állatállományokban is elterjedt. A vaddisznó máj minták vizsgálati eredményei szerint a magyarországi vaddisznók fertőzöttsége más országokban végzett vizsgálatok eredményeivel összehasonlítva közepesnek mondható (Michitaka *et al.*, 2007; Martelli *et al.*, 2008; de Deus *et al.*, 2008; Kaba *et al.*, 2009; Schielke *et al.*, 2009). A HEV-fertőzés elterjedtségét vadon élő kérődző rezervoár fajok (őz, szarvas) esetében nem vizsgálták olyan mélységekben, mint a sertések és vaddisznók fertőzöttségét. A szakirodalomban fellelhető adatokkal összehasonlítva a magyarországi őz- és szarvas állományok HEV-fertőzöttsége magasabb, mint más országokban (Takahashi *et al.*, 2004). A vadon élő állatok HEV-rezervoár szerepét állatorvosi-járványtani és élelmiszer-higiéniai vonatkozásokban további vizsgálatokkal kell pontosítani.

A HEV-fertőzés sertéstelepeken és természetes élőhelyeken való fenntartásában feltételezéseink szerint rágcsálók és kisemlősök is részt vehetnek, hiszen irodalmi adatok szerint ezek az állatok is fogékonyak a HEV-fertőzésre. A patkányokban és nyulakban kimutatott hepatitis E vírusok a szakirodalmi adatok szerint kisebb mértékű hasonlóságot mutatnak a sertés- és emberi eredetű törzsekkel (Zhao *et al.*, 2009; Johne *et al.*, 2010). Ezek az adatok és kutatásaink, melyben a vizsgált rágcsálókban és kisemlősökben nem lehetett kimutatni a sertések és emberek körében fertőzést okozó HEV-variánsokat, megkérdőjelezi a rágcsálók és kisemlősök fertőzés-közvetítő szerepét az állat- és közegészségügyi szempontból fontos hepatitis E vírusok esetében, azonban ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Vizsgálataink eredménye szerint a Magyarországon kimutatott vírusok mindegyike a HEV 3. genocsoportjába, ezen belül 3 alcsoportba sorolható. Az egyes vírusok genetikai hasonlóságának mértéke nem függ a vírusok izolálási helyének földrajzi távolságától. Egymástól néhány kilométerre fekvő sertéstelepeken kimutatott vírusok nukleotid-szekvenciái nagyobb mértékben különbözhetnek egymástól, mint az egymástól nagyobb távolságban vizsgált, esetleg különböző fajú állatokból kimutatott vírusok

nukleotid-szekvenciái. Egy sertésstelepen kb. másfél év alatt a HEV több genetikai variánsa is kialakulhat, továbbá egy időben különböző nukleotid-szekvenciájú vírusok is jelen lehetnek az adott sertésállományban. A Magyarországon kimutatott, állati eredetű vírusok nukleotid-szekvenciáinak emberi eredetű vírusok szekvenciáival való hasonlósága is alátámasztja a vírus zoonózis jellegét.

Egy Magyarországon kimutatott vírus csaknem teljes genomszekvenciájának elemzése során a HEV-RNS több régióját is részletesen vizsgáltuk. A genomban kódolt 3 ORF közül legkonzervatívabbnak a strukturális fehérjéket kódoló ORF2 régiót találtuk, míg a vírus replikációjához szükséges fehérjéket kódoló ORF1 változatosságát a genom e területén megtalálható hipervariábilis régióval magyarázhatjuk. A genom elemzése alapján a filogenetikai vizsgálatokon alapuló genotipizálásra a teljes genomszekvencia, az ORF1 régió, valamint a diagnosztikai vizsgálatokban alkalmazott ORF2s1-ORF2a1 primerpár által amplifikált genomszakaszt találtuk megfelelőnek. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy a genotipizálás eredményének pontosságához és a kimutatott vírusok rokonsági viszonyainak megállapításához elengedhetetlen, hogy minél több, a korábbi vizsgálatokban különböző alcsoportba sorolt vírus szekvenciáját bevonjuk az elemzésbe. A 3. genocsoport vírusai esetében a hipervariábilis régió szekvenciái felhasználhatók járványtani nyomozásokban, azonban a variabilitás okát és a deléciók/inzerciók kialakulásának körülményeit és azok járványtani következményeit további vizsgálatokkal kell tisztázni. A genom legkonzervatívabb szakaszát diagnosztikai RT-PCR vizsgálatokban felhasználható primerek tervezésére nem találtuk alkalmasnak, azonban a genom e szakasza más vizsgálatokban, pl. *in situ* hibridizáció esetében probe tervezésére megfelelő lehet.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Felmérő vizsgálataink során elsőként mutattuk ki a HEV nukleinsavának jelenlétét Magyarországon házi sertésekben. A felmérés során felderítettük a magyarországi sertésletelek HEV fertőzöttségének mértékét (39%).

2. Megállapítottuk, hogy a vágóhídra kerülő sertések HEV fertőzöttsége élelmiszer-biztonsági kockázatot jelenthet. A sertésekben párhuzamosan vizsgált máj- és bélsár minták pozitivitása alapján kijelenthetjük, hogy mindkét minta vizsgálata alkalmas a sertések HEV-fertőzöttségének kimutatására.

3. Vizsgálataink során elsőként mutattuk ki a HEV hazai jelenlétét vadon élő állatokban (vaddisznó, őz, szarvas). A minták földrajzi eredete alapján kimutattuk, hogy a HEV állatokban – az emberi fertőzésekhez hasonlóan (OEK, 2009b) Magyarország teljes területén megtalálható.

4. Filogenetikai vizsgálataink eredményei szerint Magyarországon a HEV 3. genocsoportjába tartozó vírusok vannak jelen. A kimutatott vírusok nagyfokú diverzitást mutatnak, a 3. genocsoport „a”, „e” és „h” alcsoportjába tartoznak, és rokonságban állnak magyarországi, és más országokban kimutatott, emberi eredetű vírusokkal.

5. Egy magyarországi HEV törzs csaknem teljes genomszekvenciájának meghatározásával megállapítottuk, hogy a HEV evolúciójában a pontmutáció és a genom egy meghatározott szakaszán inzerció/deléción játsza a fő szerepet. Két, a genetikai rokonságot nagymértékben meghatározó genomrégiót ismertünk fel.

6. A genom egészének és 7 további szakaszának filogenetikai analízisével vírusok genotípusának meghatározására alkalmas genomrégiókat határoztunk meg.

7. Két szerológiai módszer (immunoblotot és ELISA-t) összehasonlításával megállapítottuk, hogy minták minősége és tesztek szubjektív elbírálása negatívan befolyásolhatja a vizsgálatok eredményeinek értékelhetőségét.

Kutatásaink eredményei kiindulási pontot jelenthetnek jövőbeni élelmiszer-higiéniai, állategészségügyi, járványtani és közegészségügyi vizsgálatok elvégzéséhez.

IRODALOMJEGYZÉK

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

Bányai K., Forgách P., Erdélyi K., Martella V., Bogdán A., Hocsák E., Havasi V., Melegh B., Szűcs Gy.: **Identification of the novel lapine rotavirus genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry**, *Virus Res.* 113(2). 73-80, 2005.

Bányai K., Martella V., Bogdán A., Forgách P., Jakab F., Meleg E., Bíró H., Melegh B., Szűcs Gy.: **Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains**, *J. Gen. Virol.* 89(2). 534-539, 2008.

Bányai K., Matthijssens J., Szűcs Gy., Forgách P., Erdélyi K., van Ranst M., Lorusso E., Decaro N., Elia G., Martella V.: **Frequent rearrangement may explain the structural heterogeneity in the 11th genome segment of lapine rotaviruses**, *Acta Vet. Hung.* 57(3). 453-461, 2009.

de Deus N., Peralta B., Pina S., Allepuz A., Mateu E., Vidal D., Ruiz-Fons F., Martin M., Gortazar C., Segales J.: **Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain**, *Vet. Microbiol.* 129. 163-170, 2008.

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

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

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

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

Galiana C., Fernández-Barredo S., García A., Gómez M.T., Pérez-Gracia M.T.: **Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers**, Am. J. Trop. Med. Hyg. 78(6). 1012-1015, 2008. **Kingdom, Vet. Rec.** 154(8). 223-227, 2004.

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

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

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

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

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

Matthijssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S.M., Palombo E.A., Iturriza-Gómara M., Maes P., Patton J.T., Rahman M.,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

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

Reuter G., Fodor D., Forgách P., Kátai A., Szűcs Gy.: **Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary**, J. Clin. Virol. 44. 277-281, 2009.
IF (2008): 3.320

Forgách P., Nowotny N., Erdélyi K., Boncz A., Zentai J., Szűcs Gy., Reuter G., Bakonyi T.: **Detection of Hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary**, Veterinary Microbiology. In Press, Corrected Proof, Available online 18 November 2009.
doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.004 IF (2008): 2.370

Forgách P., Boncz A., Erdélyi K., Lőrincz M., Molnár B., Zentai J., Szűcs Gy., Reuter G., Bakonyi T.: **A Hepatitis E vírus - irodalmi áttekintés és hazai helyzet állatorvos szemmel**, Magyar Állatorvosok Lapja.132(4). 237-248, 2010.
IF (2008): 0.088

Kongresszusi kiadványokban megjelent, egy oldal terjedelmű előadás/poszter összefoglalók

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Tudományos munkám anyagi- és infrastrukturális feltételeinek maradéktalan biztosításában, a kutatás menetének irányításában, a kapott eredmények értékelésében, a publikációim kéziratainak lektorálásában nyújtott segítségéért, szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Dr. Bakonyi Tamás egyetemi docensnek. Hálás vagyok a Szent István Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék és Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék, jelenlegi és volt dolgozóinak szakmai támogatásáért és barátságukért. Köszönöm a Bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem Klinikai Virologia Tanszék munkatársai, különösen Dr. Norbert Nowotny segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Lőrincz Mártának és Dr. Molnár Beátának, Dr. Boncz Attilának, Dr. Zentai Jánosnak, Dr. Erdélyi Károlynak, Dr. Gyuranecz Miklósnak, Dr. Csörgő Tibornak és Dr. Jakab Ferencnek az állati eredetű minták gyűjtését és rendelkezésemre bocsátását, illetve Dr. Annika Haagsmannak, Dr. Szügyi Dezsőnek és Dr. Kiss Gergőnek, hogy a minták feldolgozásában és a szakirodalmi adatok gyűjtésében segítségemre voltak.

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

Köszönöm Dr. Szűcs Györgynek, Dr. Reuter Gábornak és Dr. Bányai Krisztiánnak az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat Dél-dunántúli Regionális Intézete Regionális Virologiai Laboratórium, Gasztroenterális Vírusok Nemzeti Referencialaboratóriuma munkatársainak szakmai segítségét, és az EVENT projektben való részvételi lehetőséget.

Köszönöm szeretteimnek és barátaimnak türelmüket, áldozatvállalásaikat és támogatásukat, mellyel lehetővé tették számomra, hogy minél több időt fordíthassak kutatásaimra.

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