

Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Hepatitis E vírus direkt és indirekt kimutatása kutyákban

Készítette: Aranyosi Réka Anna
állatorvostan hallgató

Témavezető: Dr. Lőrincz Márta
ÁTE, Járványtani és Mikrobiológia Tanszék, egyetemi adjunktus

Második témavezető: dr. Földi Dóra
ÁTE, Járványtani és Mikrobiológia Tanszék, tanársegéd

Budapest, 2024

Tartalomjegyzék

1.	ABSZTRAKT	3
2.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
3.	BEVEZETÉS	5
4.	SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
4.1	A hepatitis E vírus felfedezése	7
4.2	A vírus morfológiája és replikációja	8
4.3	A vírus taxonómiája	9
4.4	A hepatitis E vírus előfordulása.....	11
4.5	Hepatitis E vírus járványtana	12
4.6	Klinikai tünetek	14
4.7	Hepatitis E vírus fertőzés állatokban, a zoonózis veszélye	15
4.7.1	Hepatitis E sertésben és vaddisznóban.....	15
4.7.2	Hepatitis E szarvasokban	16
4.7.3	Hepatitis E egyéb állatokban.....	16
4.7.4	Hepatitis E kutyákban és macskákban	17
5.	CÉLKITŰZÉS.....	20
6.	ANYAG ÉS MÓDSZER	21
6.1	Mintagyűjtés.....	21
6.2	Mintafeldolgozás	22
6.2.1	Az RNS kivonása a bélsármintákból	22
6.2.2	RT-PCR	22
6.2.3	A szérum minták előkészítése	25
6.2.4	ELISA	25
7.	EREDMÉNYEK	27
8.	MEGBESZÉLÉS.....	29
9.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	31
10.	IRODALOMJEGYZÉK.....	32
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	40

1. ABSZTRAKT

A hepatitis E vírus (HEV) az emberben főként akut májgyulladást okozó patogén, amely világszerte előfordul. A HEV több genótipusa közt vannak zoonótikus potenciállal rendelkezők is. Eddig úgy vélték, hogy ezekkel a genótipusokkal az emberek főként a sertés és a vaddisznó révén fertőződnek. Azonban az esetszámok gyors növekedése a HEV epidemiológiájának változására utal, ami új, eddig még nem ismert rezervoár fajok lehetőségét veti fel. A világjárvány alatt jelentősen megnőtt a kutya örökbefogadások száma, illetve a kutyatartás minősége is megváltozott, ami által több lehetőség nyílik az állatok és különféle váladékaik, illetve az emberek közötti érintkezésre. Számos tanulmány vizsgálta már a kutyák szeropozitivitását, melyek eltérő eredményekkel zárultak, viszont eddig még nem találtak bizonyítékot arra, hogy a kutyák fertőzési forrást jelentenének az emberek számára. Ez a szakdolgozat a kutyák szeropozitivitásának vizsgálata mellett arra is megpróbál bizonyítékot találni, hogy társállataink képesek megfertőzni az embert. A kutatásunk során 141 db szérumot és 45 db bélsármintát gyűjtöttünk különböző egészségi állapotú kutyákból. A vizsgálatok során 1,42%-os szeroprevalenciát találtunk, viszont a vírus bélsárral történő ürülését nem tudtuk bizonyítani.

Hepatitis E virus (HEV) is a worldwide pathogen that causes mainly acute hepatitis in humans. HEV has several genotypes, some of which have zoonotic potential. Until now, it was thought that people were mainly infected with these genotypes through pigs and wild boar. However, the rapid increase in the number of cases suggests a change in the epidemiology of HEV, raising the possibility of new reservoir species that have not yet been identified. The number of dog adoptions has increased considerably during the pandemic, and the quality of dog ownership changed, allowing more opportunities for contact between animals and their various exudate and people. Several studies have investigated the seropositivity of dogs with varying results, but no evidence has yet been found that dogs are a source of infection for humans. In addition to examining the seropositivity of dogs, this dissertation also attempts to find evidence that our companion animals can infect humans. In our study, 141 serum samples and 45 faecal samples were collected from dogs of various health conditions. The results showed a seroprevalence of 1.42%, but no evidence of virus shedding in faeces.

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

DNS	deoxiribonuclein acid	deoxiribonukleinsav
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	deoxiribonukleotid-trifoszfát
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat
HEV	Hepatitis E virus	Hepatitis E vírus
ICTV	International Committe on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PBS	phosphate buffered saline	foszfátsókkal pufferolt fiziológias sóoldat
RNS	ribonucleic acid	ribonukleinsav
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
Taq enzim	thermostable DNA polymerase enzyme	hőstabil DNS polimeráz enzim
WHO	World Health Organization	Egészségügyi Világszervezet

3. BEVEZETÉS

A hepatitis E vírus (HEV) világszerte előforduló, az emberekben legtöbbször akut májgyulladást okozó patogén. A világ népességét tekintve körülbelül 939 millió HEV esettel számolhatunk [1]. Kiemelkedő közegészségügyi jelentőségét az adja, hogy a HEV az egyetlen a hepatitis vírusok (Hepatitis A, B, C és D) között, amelynek egyes genotípusai rendelkeznek zoonótikus képességgel [2]. Az állatról emberre való terjedésben az emlősökben előforduló hepatitis E vírusoknak van szerepe. Bár a fő rezervoárnak a sertést tartják, nem elhanyagolható a vaddisznók, szarvasok, nyulak és rágcsálók jelentősége sem a vírus közvetítésében. A fertőzött állatokkal való érintkezés, a belőlük származó nyers vagy nem megfelelő hőkezeléssel készült hústermékek, illetve a fertőzött állatok bélsarával kontaminált élelmiszerek fogyasztása a HEV emberre való terjedésének kockázatát jelenthetik [3, 4]. Háziállataink nagy részében, például kutyákban, macskákban és kérődzőkben is bizonyították már a HEV fertőzöttséget, viszont a vírus emberre történő átvitelében a szerepük nem olyan megalapozott, mint a sertéseknél. Ezen információk birtokában kimondhatjuk, hogy még nem áll rendelkezésünkre a vírus összes rezervoárjának ismerete, de érdemes fokozott figyelmet fordítanunk a házikedvencek és az emberek szoros kapcsolatára [5], mert a jelenleg is növekvő esetszámokra nem adnak magyarázatot a korábban említett fertőzési források.

Napjainkban sokkal ritkábban fordul elő, hogy generációk éljenek együtt egy háztartásban, viszont az emberek ettől függetlenül igénylik a társaságot, amit egyre gyakrabban egy házikedvenc biztosít a számukra. A fejlett országokban a kisállattartók száma egy folyamatosan növekvő tendenciát mutat már régóta, de a COVID-19 pandémia alatt ez a növekedés ugrásszerűvé vált. Magyarországon 2019-ben, a világjárvány kitörése előtt 2.050.000 kutya volt nyilvántartva, ami azt jelenti, hogy minden harmadik háztartás volt kutyatartó. Ez a szám 2022-re 2.800.000-re nőtt [6]. A kutyatartók számának a növekedése mellett, az állatok tartási körülményeiben is jelentős változások következtek be az elmúlt években. A fentebb említett okok miatt, a kutyákat sokan már családtagnak tekintik, nem is kiskedvencnek, de gyakori az is, hogy fiatal párok gyerek helyett inkább kutyát tartanak. Ezek a gazdák gyakran együtt alszanak társállataikkal, illetve az sem ritka, hogy a kutya az asztalnál eszik vagy tányérból, evőeszközükről kap falatokat a tulajdonos ebédjéből. Egyre jobban terjed az a trend is, hogy főként ölebeket csak bent tartanak a házban vagy lakásban, ami azt jelenti, hogy a vizeletet és a bélsarat is oda üríti az állat. Mindemellett

a pandémia alatt gazdához került nagy számú kutya jelentős része ismeretlen előéletű, menhelyi állat volt, ami szintén járványtani aggályokat vethet fel.

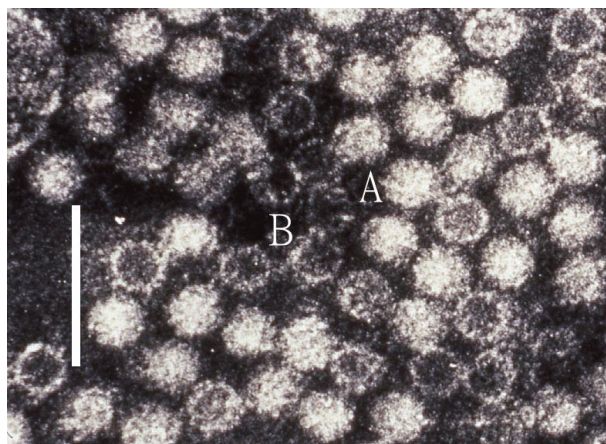
A kutyatartók számában történt jelentős emelkedés, az állattartás minőségében bekövetkezett változás és a jelenleg még magyarázat nélküli HEV esetszám növekedés a COVID-19 alatt a kutyára, mint esetleges rezervoár fajra tereli a figyelmet. A szakdolgozatom is erre a felvetésre alapszik.

4. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 A hepatitis E vírus felfedezése

Jelentős mérföldkő volt a vírusos májgyulladás kutatási területén a hepatitis E vírus felfedezése, amelyet először egy indiai járvány során ismertek fel. Az 1978-as kasmíri sárgaság járványt, amely 52.000 icterusos beteget és 1700 halálesetet okozott, Dr. Mohammad S Khuroo vizsgálta. A betegek főleg 15 és 45 év közötti felnőttek voltak, akikben a vírus egy önkorlátozó fertőzést okozott, krónikus hepatitis, cirrhosis és vireamia nélkül. Figyelemre méltó volt viszont a terhesség és a betegség kapcsolata. A megbetegedett terhes nőknek súlyosabb tünetei voltak, illetve sokuk belehalt a fertőzésbe. Emellett megfigyelték azt is, hogy a vírus képes a vertikális terjedésre, átjut a placentán és így magas magzati, illetve születés körüli halálozást okozott [7]. A betegeket szerológiai vizsgálatok alá vetették, de a hepatitis A-ra és hepatitis B-re érzékeny tesztek, egyik fertőzést sem igazolták.[8]. Ezek alapján azt feltételezték, hogy egy eddig ismeretlen, enterálisan terjedő hepatitis vírus okozza a járványt, amit non-A non-B hepatitisnek (NANBH) nevezetek el [7].

Afganisztánban is beszámoltak NANBH kitörésről, ahol orosz katonák voltak érintettek. Ennek a járványnak az epidemiológiája hasonló volt a kasmíriéhoz. Azért, hogy válaszokat kapjon, Dr. Mihail S Balayan önkísérletbe kezdett, amelynek során 9 beteg ember székletkivonatát juttatta a szervezetébe szájon át. A bevétel után 36 nappal, emelkedett májértékekkel és sárgasággal kísért súlyos, heveny hepatitis alakult ki nála, illetve a 28. napi székletmintájából már vírusszerű partikulák (virus-like particules, VLP) voltak kimutathatóak elektronmikroszkóppal (**1. ábra**) [7, 9].



1. ábra: Székletmintából származó hepatitis E elektronmikroszkópos képe. Látható a virion (A) és az üres kapszid (B). (Forrás: Purdy et al., (2022): ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022, Journal of General Virology, (2022) 103:001778)

A vírust megpróbálták klónozni, de ez sokáig nem sikerült, mert nem állt rendelkezésre elegendő VLP. Később, 1990-ben Reyes és munkatársai részlegesen klónozták a vírust [10], majd egy évvel később, 1991-ben Tam és munkatársai a teljes HEV genomot szekvenálták [11]. Ezáltal bizonyították, hogy a NANBH járványok hátterében egy új hepatitis vírus áll, amelynek az enterális úton történő terjedése miatt, a hepatitis E nevet adták [7].

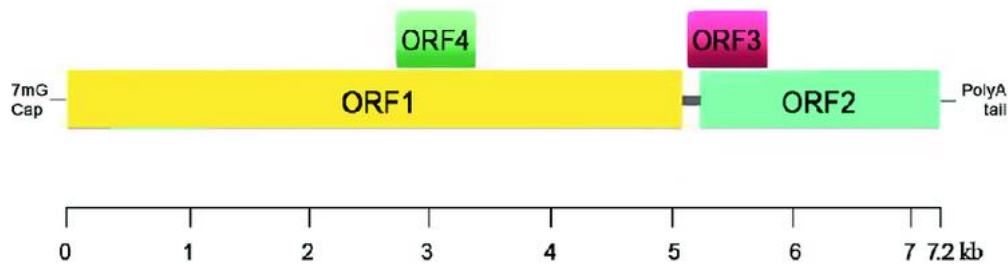
4.2 A vírus morfológiája és replikációja

A hepatitis E egy kis méretű, 32-42 nm átmérőjű, ikozaéder alakú, burok nélküli vírus. Pozitív, szimplaszálú RNS genomja (**2. ábra**) körülbelül 7,2 kilobázispár hosszúságú, ami három egymást fedő nyitott olvasási keretet (open reading frame, ORF) tartalmaz, nevezetesen az ORF1-et, az ORF2-t és az ORF3-at [12, 13]. Ez a három ORF minden genotípusban megtalálható, viszont a HEV 1-es genotípusában azonosítottak egy új nyitott olvasási keretet, az ORF1-be ágyazódva, amit ORF4-nek neveztek el. Úgy gondolják, hogy a HEV többi genotípusa nem kódolja az ORF4-et [14].

Az ORF1 régió szerepe a nem strukturális fehérjék kódolása, mint például az RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp), az RNS-helikáz vagy metil-transzferáz. Az ORF2 kódolja az ellenanyagok célpontjául szolgáló antigént, a kapszid fehérjéjét. Az ORF3 szerepe a multifunkcionális fehérjék, foszfoproteinek, ioncsatornák kódolása, melyeknek a vírus morfogenezisében, illetve a gazdasejtől való kijutásában van szerepük [12, 13]. Ez utóbbi két régió egymással átfedésben van, de az ORF1-gyel nincsenek. Az ORF4 fokozza az RdRp aktivitását, és így a HEV replikációját [14].

Amikor a vírus bejut a gazdasejtbe, az RdRp a teljes pozitív, szimplaszálú genomot, negatívvá írja át. Ebből a negatív irányultságú genomból ismét pozitív, szimplaszálú RNS-ek képződnek oly módon, hogy kialakul egy teljes genomhosszúságú átirat, amely az utódvirionokba kerül, és egy kisebb, szubgenomikus RNS is, amely pedig az ORF2 és ORF3 régiót foglalja magába. A HEV kapszid fehérjéje, ami majd a sejtől történő kijutásához szükséges, a szubgenomikus RNS-ből fog transzlálódni, de ezen lépések számos aspektusa még ismeretlen számunkra [15, 16].

Habár az ismereteink egyre bővülnek a HEV replikációjával kapcsolatban, még mindig nem ismert a teljes mechanizmusa, ami nehezíti a megfelelő hatékonyságú terápiák kifejlesztését.



2. ábra: A HEV genomszerkezete (Forrás: Jinyong Wang, Yu Wang, Baocheng Deng, 2022)

4.3 A vírus taxonómiája

Korábban úgy gondolták, hogy a HEV hasonlít a hepatitis A vírushoz (HAV), ezért először a Picornaviridae családba sorolták, viszont ahogy bővültek az ismereteink a HEV morfológiájáról és genomszerkezetéről, kiderült, hogy ez a besorolás nem állja meg a helyét. Ezután azt feltételezték, hogy a HEV a norovírusokhoz hasonlít és így bekerült a Caliciviridae családba, de kiderült, hogy a calicivírusokhoz képest jelentős szekvenciakülönbséggel rendelkezik, ezért ebből a családból is kivették, majd besorolták a „hepatitis E-szerű vírusok” közé [7, 17]. A HEV taxonómiája 2021-ben jelentősen megváltozott. Jelenleg a HEV a *Hepeviridae* családba tartozik, melyen belül két alcsaládot különböztetünk meg [18]. A *Parahepevirinae* alcsaládban, azon belül a *Piscihepevirus* nemzetségben egy pisztrángokat fertőző fajt különböztetünk meg, a *Piscihepevirus heenan-*t. Az *Orthohepevirinae* alcsaládon belül további négy nemzetség van, a *Paslahepevirus*, az *Avihepevirus*, a *Rocahepevirus* és a *Chirohepevirus*. A *Paslahepevirus* nemzetség tagja a *Paslahepevirus balayani*, ami korábban az *Orthohepevirus A* nevet viselte, illetve a *Paslahepevirus alci* is. A *Paslahepevirus balayani*, nyolc genotípusból áll, melyek gazdafajai egyes szárazföldi emlősök és az ember. Az *Avihepevirus* nemzetség madarakat fertőző vírusfajokat foglal magába, míg a *Rocahepevirus* nemzetség tagjai patkányokat, vadászgörényeket és mezei egereket fertőznek. A *Chirohepevirus* nemzetségbe tartozó fajok pedig a denevérekben fordulnak elő [17–19]. A pontos taxonómiát az **1. táblázat** szemlélteti.

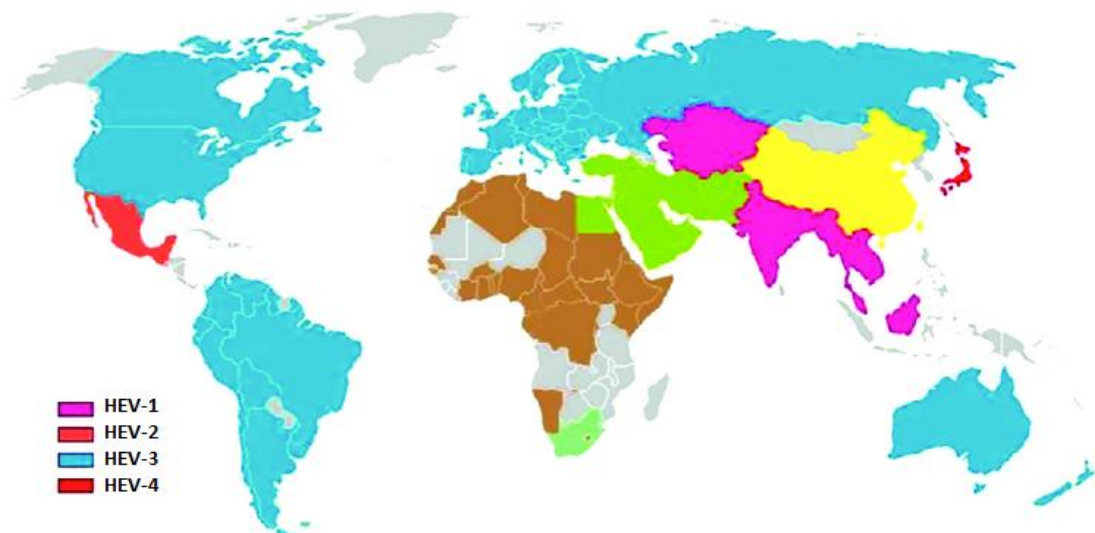
1. táblázat: A hepatitis E taxonómiája

Család	Alcsalád	Nemzettség	Faj	Genotípus	Gazdafajok
<i>Hepeviridae</i>	<i>Orthohepevirinae</i>	Paslahepevirus	balayani	HEV-1	ember
				HEV-2	ember
				HEV-3	ember , sertés, vaddisznó, nyúl, szarvas, indiai menyét, mongúz
				HEV-4	ember , sertés, vaddisznó
				HEV-5	vaddisznó
				HEV-6	vaddisznó
				HEV-7	egypúpú teve
				HEV-8	kétpúpú teve
		Avihepevirus	alci		jávorszarvas
			magniiecur		házityúk, veréb
			egretti		kis kócsag
		Rocahepevirus	ratti	HEV-C1	patkány, ember
				HEV-C2	vadászgörény
				HEV-C3	mezei egér
		Chirohepevirus	eothernomi		hörcsög
			eptesici		denevérek
			rhinolophi		patkósdenevér
			desmodi		denevérek
	<i>Parahepevirinae</i>	Piscihepevirus	heenan		pisztráng

4.4 A hepatitis E vírus előfordulása

A HEV világszerte előforduló, évente körülbelül 20 millió megbetegedést okozó patogén, melynek számos faja közül kiemelendő a Paslahepevirus balayani, és annak 8 genotípusa (HEV1-8) [20]. Ezen genotípusok földrajzi előfordulásai és gazdafajai is eltérőek egymástól, de valamennyi zoonótikus potenciállal rendelkezik [5, 17].

A HEV földrajzi előfordulását tekintve négy zónát különböztetünk meg. Az úgynevezett hiperendémiás zónába tartozik többek között India, Banglades, Pakisztán, Burma, Indonézia, Thaiföld, Kazahsztán, Észak-, Kelet- és Nyugat-Afrika bizonyos területei és néhány észak-amerikai ország, például Mexikó. Ezekben az országokban a HEV-1 és HEV-2 járványokat okoznak [2, 7]. Az endémiás zónákban járványok nem fordulnak elő, de sporadikus akut hepatitisszel találkozhatunk. Ide tartozik a Közel-Kelet számos országa, illetve Délkelet-Ázsia és Dél-Amerika egyes régiói. A jellegzetes mintázatú zónába Egyiptom tartozik, ahol a HEV-1 okoz megbetegedést fiatal korban, de a terhes nők esetében enyhe vagy tünetmentes a fertőzés. A fejlett országok a sporadikus zónába tartoznak, ahol a HEV-3 és a HEV-4 okozza a megbetegedéseket. Évente átlagosan 50-100 HEV esetet jelentenek ezekből az országokból, de a szeroprevalencia adatok alapján arra lehet következtetni, hogy a tényleges esetszám jóval nagyobb. Ennek oka, hogy a fertőzés lehet tünetmentes, illetve előfordulnak téves diagnózisok [7]. A HEV genotípusainak földrajzi megjelenéseit a **3. ábra** mutatja be.



3. ábra A hepatitis E genotípusainak földrajzi előfordulása (Forrás: Jinyong Wang, Yu Wang, Baocheng Deng, 2022)

4.5 Hepatitis E vírus járványtana

A HEV-1 és a HEV-2-ről úgy vélik, hogy csak az embert képesek megbetegíteni, de számos tanulmány bizonyítja, hogy egyes főemlősök, például a rhesusmajmok (*Macaca mulatta*), csimpánzok (*Pan troglodytes*), mókusmajmok (*Saimiri sciureus*) is fogékonyak a fertőzésre [5]. Ezen genotípusok főként horizontális, fekál-orál úton terjed a szennyezett ivóvizek révén, de fertőzési forrást jelent még a kontaminált, nem megfelelően hőkezelt vagy nyers sertés-, illetve vadhúskészítmények fogyasztása is. A járványok általában árvizek vagy heves esőzések után alakulnak ki, mert ilyenkor nagyobb eséllyel szennyeződnek az ivóvizek fekáliával, de a vízáramlások csökkenése is megnöveli a kontamináció kockázatát [2, 3, 16]. A HEV vertikálisan is fertőz a placentán keresztül, illetve vértranszfúzió útján [2, 16]. A hiperendémias országokban, a véradók esetén 7,8-45%-os prevalenciát jelentettek, ami jelentősen növeli a HEV vérkészítménnyel történő fertőzésének kockázatát [21, 22]. Más enterálisan terjedő kórokozóktól eltérően, a HEV emberről emberre terjedése ritka, általában súlyosabb járványok esetén, családtagok között fordul elő [2]. A HEV járványok lehetnek rövidek vagy hosszúak, akár egy évig elhúzódóak is, de általában nagyméretűek és több ezer embert érintenek. A járványok súlyosságát mutatja az is, hogy például 2005-ben 20 millió ember fertőződött meg, 3,4 millió esetet jelentettek, melyből 70000 halálessettel végződött, illetve 3000 halvaszületés is volt [7]. Egy tanulmány szerint, 2010-ben a teljes évre vetített incidencia 64/1000 ember volt ezekben az országokban [23]. A járványokban főleg 15-40 év közötti fiatal felnőttek érintettek, akik körében a fertőzési arány 3-30%, míg a gyermekek körében ez a szám csak 0,2-10%. Érdekes, hogy egy enterális úton terjedő kórokozó esetén, amilyen a HEV is, arra számíthatnánk, hogy a gyerekek nagyobb kockázatnak vannak kitéve, de általában náluk a vírus szubklinikai fertőzést okoz, míg a fiatal felnőttekben tapasztalhatunk súlyos tünetekkel járó akut májgyulladást, májleállást. Emellett kifejezetten veszélyeztetettek a terhes nők, akik körében igen magas a fertőzési- és halálozási arány (akár 30-100%), illetve a vetélések száma [16, 24]. Ennek pontos okát még maig kutatják, de azt tudjuk, hogy nagyban befolyásolja a fertőzés kimenetelét a terhesség alatt létrejövő számos hormonális és immunológiai változás (folsavhiány, oxidatív stressz) [20], illetve a szteroid hormonok szintje, ami elősegítheti a HEV replikációját, valamint a májsejtek megfelelő működését is gátolja, ezáltal fertőzés esetén hajlamosabbak lesznek a terhes nők a halálhoz vezető májelégtelenségre, májleállásra [24].

A fejlett országokban jelen lévő zoonótikus HEV-3 és a HEV-4 genotípusok széles gazdaspektrummal rendelkeznek. A HEV-3 sertést, vaddisznót, szarvast, nyulat és embert is fertőz, míg a HEV-4 főként sertésben, vaddisznóban és emberben található meg [12], de

izolálták már többek között szarvasmarhából [25], szamárból [26], juhból, kecskéből és rhesus majomból is [27]. Különböző országokban eltérő szeroprevalenciával (5% és 50% között) fordul elő a vírus, melynek okai, hogy sokszor nem nyilvánul meg klinikai tünetekben a megbetegedés, emellett ritkán kérnek HEV-re specifikus vizsgálatokat az orvosok [7, 28]. A legmagasabb szeroprevalenciával rendelkező országok Franciaország (52,5%), Lengyelország (49,6%) és Hollandia (akár 31%). Vannak viszont olyan országok is, ahol ezek a számok nem érik el a 10%-ot, például Új-Zéland (9,7%), Ausztrália (6%) és Írország (5,3%). Olaszországban több tanulmányt is készítettek, melynek eredményei igen nagy szórást mutattak (8,7-49%-os szeropozitivitás), aminek oka a különböző régiók eltérő étkezési szokásai [1, 29]. Magyarországon, egy 2007-es felmérésben 10,5%-os szeroprevalenciát mutattak ki [30]. Bár a különböző országokban eltérő esetszámokat és szeropozitivitást tapasztalhatunk, mindegyikükre igaz, hogy az esetszámok évről évre nőnek, aminek okát egyelőre nem találják. A HEV terjedhet akár fertőzött, nem megfelelően hőkezelt hússal és húskészítménnyel [5, 28], amit számos tanulmány bizonyít. Franciaországban és Ausztráliában sertéshúsból eredő megbetegedést írtak le [31, 32], míg Spanyolországban vaddisznóhús által fertőződtek emberek [33]. Emellett a transzfúzió is a HEV fertőzés kockázatával jár, amit jól mutat, hogy vizsgálatok szerint Svájcban a véradók 20,4%-a [34], Franciaországban az 56,1%-a volt szeropozitív [35]. Azonban ezek a fertőzési források még mindig nem magyarázzák azt a nagy arányú esetszámnövekedést, amit az utóbbi években tapasztalunk. Magyarországon 2021-ben 250 eset volt, de 2022-ben már 333-ra nőtt ez a szám [36]. 2023-ban 455 [37], 2024. 40. hetéig pedig már 271 esetet jelentettek [38]. A növekvő esetszámok miatt egyre nagyobb figyelem fordul az állati rezervoárok felé. Több kutatás foglalkozik a vírus zoonótikus képességének felderítésével, többek között vizsgálják a különböző, folyamatos állati kontaktust igénylő foglalkozási körökben megjelenő fertőzöttséget is az emberekben. Úgy vélik, hogy főleg a sertéssel kapcsolatba kerülő személyek vannak kitéve a kórokozónak, de a kutatások kimutatták, hogy nem csak ők lehetnek veszélyeztetettek. Franciaországban és Németországban a sertéstelepen dolgozóknál tapasztalható magas szeropozitivitás, de Portugáliában a juhtenyésztőknél (29,3%) is magasabb szeropozitivitást tapasztaltak. Kínában még emellett a szarvas- (40,2%) és nyércstenyésztőknél (31,8%) is kiemelkedő értékek voltak. A hentesek és a vágóhídi dolgozók körében is magasabb a HEV szeropozitivitás Németországban (41,7%) és Portugáliában (29,7%) egyaránt. Norvégiában és Ausztriában azt találták, hogy a sertéssel foglalkozó állatorvosok kétszer nagyobb valószínűséggel voltak szeropozitívak, mint mások, viszont a kisállatokkal foglalkozó állatorvosok esetén is magasabb volt a

szeropozitivitás. Finnországban majdnem kétszer magasabb a szeroprevalencia az állatorvosok körében (10,2%), ezen belül is a kisállatokkal foglalkozók esetén a legmagasabb (17,8%) [39]. Ezen információk arra biztatnak minket, hogy további kutatásokat végezzünk a lehetséges rezervoár fajok után és jobban feltérképezzük a vírus állat és ember közötti terjedésének lehetőségeit.

4.6 Klinikai tünetek

A HEV klinikai tünetekben főleg a hiperendémiás országokban nyilvánul meg. A lappangási ideje átlagosan 40 nap, de 2 héttől 2 hónapig is terjedhet ez az intervallum, amit egy viraemia követ. Ez a viraemia a klinikai tünetek megjelenésével, mint az enyhe láz, anorexia, hányinger, hasmenés, hasi diszkomfort, sárgaság és hepatomegália, megszűnik. A fertőzött emberekben főként akut májgyulladás, májelégtelenség alakul ki, amely súlyos esetben fulmináns hepatitist okozhat, és így jelentősen rontja a beteg prognózisát [3, 40]. A HEV fertőzött terhes nők, főként a második és harmadik trimeszterben, fokozottan veszélyeztetettek, így esetükben az akut májelégtelenség, a vetélések és a halálos kimenetelű fertőzés esélye jóval nagyobb [40]. Az újszülöttekben is kialakulhat hepatitisz, valamint hipoglikémia a vertikális terjedés következtében [2, 3].

A fejlett országokban megbetegedést okozó HEV-3 és HEV-4 valószínűleg kisebb patogenitással rendelkeznek, így általában szubklinikai fertőzést, vagy egy hosszantartó viraemiával járó, krónikus hepatitist okoznak. Ez utóbbit főként immunhiányos betegek esetén tapasztalták, mint például szervátültetésen átesetteknél vagy humán immundeficiencia vírussal (HIV) fertőzötteknél. Ezeknek a betegeknek általában csak enyhe tünetek vannak, mint az étvágycsökkenés, fogyás, illetve a májgyuladást jelző vércép értékek emelkedése, viszont 2-3 éven belül a vírus akár májfibrózist, illetve májcirrózist okozhat [2, 3, 40]. Ezekben az országokban a terhes nők kapcsán még csak HEV-3-mal történő megbetegedésről van információnk, amely nem okozott heveny májelégtelenséget az anyában, illetve szülészeti szövődményekkel sem járt [2].

Bár a HEV egy hepatotrop vírus, kimutatták, hogy képes extrahepatikus szövetekben is szaporodni és elváltozásokat okozni, ezáltal kialakíthat többek között akut pancreatitist, glomerulonephritist, autoimmun pajzsmirigygyuladást, illetve vörsejteket érintő betegségeket. A vesében és a gastrointestinalis traktusban történő szaporodás révén, a vírus ürülhet a vizelettel és a széklettel is. A HEV képes az idegrendszerben is szaporodni és neurológiai tüneteket okozni, körülbelül a fertőzések 5%-ában. A fertőzés kialakíthat

encephalitist, perifériás vagy brachialis neuropátiát, Guillain-Barre-szindrómát vagy Bell-bénulást is [2, 4].

A HEV fertőzés kimenetelét és súlyosságát számos tényező befolyásolja, többek között függ a vírus genotípusától, a gazdaszervezet immunállapotától és esetleges társfertőzésektől is.

4.7 Hepatitis E vírus fertőzés állatokban, a zoonózis veszélye

A zoonótikus HEV-3 és HEV-4 rezervoárjait már az 1990-es évek óta kutatják. Ennek eredményeképpen az elmúlt évtizedekben számos házi-, és vadonélő állatból kimutatták a kórokozót, de a rezervoár fajok listája még mindig nem teljes [12, 41].

4.7.1 Hepatitis E sertésben és vaddisznóban

A HEV-3 és HEV-4 fő rezervoárjainak a sertést és a vaddisznót tartják, ezért számos kutatás irányul a közvetítőszerepük pontos megismerésére. 1990-ben Baleyan és munkatársai egy kísérlet keretein belül sertéseket fertőztek meg humán HEV-3-mal így bizonyítva azok rezervoár szerepét. [5] Ezt követően, 1997-ben az Egyesült Államokban sertésekből kimutatták a sertéshepatitis E vírust (sertés HEV), illetve a sertésállományok 3 hónapos vagy annál idősebb egyedeiben nagy arányú szeropozitivitást fedeztek fel. [42] A sertés HEV nem csak az Egyesült Államokban fordul elő, világszerte jelen van a legtöbb sertéstelepen. Bár a fertőzöttség országonként és telepenként is eltérő, fontos, hogy a gazdaságokban törekedjenek a vírusterhelés csökkentésére. [43] Nehézséget jelent, hogy a vírussal természetesen fertőzött állatok nem mutatnak klinikai tüneteket, csak boncolás során felfedezhető, hepatitisre utaló elváltozásokat, viszont a vírus genomja 80%-os azonosságot mutat a HEV-vel, illetve reagál a HEV ellen képződő ellenanyagokkal [42]. A vírus ezen tulajdonságai is arra utalnak, hogy a vírus átvitele gyakori sertések és emberek között.

A vírust főként szájon át veszik fel a sertések a korai életkorban, de érintkezés útján is terjedhet a kórokozót [43, 44]. Ezután egy lappangási időszak következik, amely átlagosan 1-2 hétig tart, de ennek hosszát befolyásolja többek között a felvett vírus mennyisége, illetve esetleges egyéb betegségek, melyek terhelik az állat szervezetét. A maternális immunitás csökkenésével, a 2-3 hónapos sertésekben viraemia alakul ki, melynek következtében bélsárral és vizelettel elkezdik üríteni a vírust [43, 45]. Idősebb állatokban a vírusürítés mértéke csökken az ellenanyagok megjelenésével, így a vágóhídra kerülő állatokból és állati

termékekből a vírus örökítőanyaga kisebb prevalenciával mutatható ki, de a hús, máj, máspástétom és egyéb máj alapú termékek 3-30%-ában megtalálható a vírus RNS-e. Ez aggodalomra adhat okot élelmiszerbiztonsági szempontból [44].

Bár tudjuk, hogy a vaddisznók fontos szerepet töltenek be a HEV-3 és HEV-4 terjesztésében, mégis a kutatások nagyrésze inkább a házi sertésekre irányul [46]. Azt biztosan tudjuk, hogy a vaddisznók képesek megfertőzni a házi sertéseket fekál-orál úton, ha tartástechnológiai hiba miatt érintkezhetnek egymással. [44] Emellett az ember számára is potenciális fertőzési források. Nem csak a rosszul hőkezelt állati termékek elfogyasztásával, hanem kontaktus útján is fertőződhetünk vaddisznóktól. Valószínűleg ez az oka annak, hogy magasabb ellenanyag szintet mértek vadászok és erdészeti dolgozók körében is [3, 46].

4.7.2 Hepatitis E szarvasokban

A szarvasok szerepe a vírus terjesztésében nagyrészt ismeretlen, de annyi bizonyos, hogy a vadhúsok, köztük a szarvashús fogyasztása is szerepet játszik az emberi megbetegedésekben [28]. Felmérések alapján ugyan a szarvasmájban kisebb valószínűséggel és mennyiségben található vírus RNS, mint a vaddisznómájban, tehát nem jelent akkora veszélyt a fogyasztásuk, mégis számos emberi fertőzést tudnak összekötni szarvashús fogyasztásával [44]. Több olyan megbetegedésről is beszámoltak, amelyeket nyers szarvashús fogyasztásával hoztak összefüggésbe [47]. Japánban vadhús okozta HEV fertőzést először 2003-ban írtak le, melyet sika szarvasból készült, nyers húst tartalmazó sushi okozott [5]. Aggodalomra ad okot az is, hogy több felmérés során is magas szeroprevalenciát mutattak ki különböző szarvasfélékben. Mexikóban a fehér farkú szarvasok 62,7%-ából, Japánban a yezo szarvasok 35%-ából mutattak ki ellenanyagot [3]. Ezek az esetek és adatok arra figyelmeztetnek minket, hogy a nyers szarvashús fogyasztása nem veszélytelen.

4.7.3 Hepatitis E egyéb állatokban

A potenciális rezervoár fajok közül a nyulak kiemelendők, mert nem csak a fertőzés közvetítésében, hanem állatmodellként is fontos szerepet töltenek be, mert HEV-4 kísérleti fertőzés esetén, az embereknél is látható, akut és krónikus hepatitisz jelei figyelhetők meg náluk [3, 48]. Nyulakból a vírust először Kínában mutatták ki, majd később további 7 ország is detektálta a nyúl HEV-et (rHEV), melyet a nukleotid szekvenciája alapján a

3. genotípushoz soroltak [48]. Az rHEV genomját tekintve, a többi genotípustól sem mutat nagy eltérést, emiatt képes reakcióba lépni sertések, patkányok, emberek és madarak HEV ellenanyagával is. Mindemellett egy kísérlet során sertéseket és főemlősöket fertőztek rHEV-el [48, 49], illetve azt is felfedezték, hogy képes replikálódni emberi sejtvonalakon [50]. Ezen ismereteinkből arra következtethetünk, hogy az rHEV magas zoonótikus kockázattal rendelkezik.

A rágsálók minden ember életében jelen vannak, akár nagyvárosban, akár vidéken járunk, ezért fontos szerepük lehet a HEV terjesztésében [12]. Ennek megfelelően több országban vizsgáltak városi és vidéki patkányokat, melyek 44-90%-ánál találtak szeropozitivitást [51]. Nemrég az Egyesült Államokban kimutattak egy új patkány HEV törzset, melyet a 3. genotípusba soroltak [52]. Korábban Németországban detektáltak HEV patkánytörzset, melynek genomszekvenciája 59,9%-ban és 49,9%-ban azonos volt az emberi, illetve a madár HEV törzsekkel. Az újonnan felfedezett patkány HEV és a vírus genomjának variabilitása zoonótikus potenciált jelent [12].

4.7.4 Hepatitis E kutyákban és macskákban

A kutyák és a macskák szerepét a HEV terjesztésében jelenleg még nem ismerjük, viszont egyre nagyobb figyelem irányul rájuk, mivel egyre több háztartásban élnek már családtagként. Egy 2020-as felmérés alapján, Európában nagyjából 195 millió kutya és macska él, ami azt jelenti, hogy a háztartások 25%-a kutya- vagy macskatartó [53]. Az emelkedő létszám mellett viszont a tartási körülmények és célok is rohamosan változnak. A legtöbb állattartó igen szoros kapcsolatban él kutyájával vagy macskájával, mivel teljes értékű családtagnak tekinti őket [54]. A túl szoros ember-állat kapcsolat viszont könnyebb terjedést biztosít számos zoonótikus vírusnak, baktériumnak, parazitának és gombának [55]. Ezen kórokozók széles palettájából kiindulva érdemes foglalkozni a kutyák és macskák HEV közvetítő szerepével. Az elmúlt évtizedekben egyre több országban kerestek bizonyítékokat arra vonatkozóan, hogy ezek az állatok szerepet játszanak a vírus terjedésében. Elsőként 2001-ben, Indiában tudták kimutatni kutyák szérummintáiból a HEV ellenanyagot [56]. Ezt követően más országokban is próbálkoztak az ellenanyagkimutatással, illetve néhány esetben bélsárminta gyűjtés is történt, melyben a HEV örökítőanyagát keresték, hogy bizonyítékot szolgáltatassanak a kutyák és macskák esetleges rezervoár szerepére. A kutatások során gyűjtött mintákat, azok számát és az eredményeket a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat: A különböző országokban végzett HEV szeropozitivitás feltérképezése kutyák és macskák körében

	Kutya			Macska			Bélsár- minta
	Szérum- minta (db)	Pozitív minta (db)	Százalék (%)	Szérum- minta (db)	Pozitív minta (db)	Százalék (%)	
India (2001) [56]	44	10	22,7				NEM
Egyesült Királyság (2015) [57]	247	2	0,8%				IGEN
Kína (2017) [58]	4490	1641	36,55				NEM
Svájc (2020) [59]	84	32	38				NEM
Hollandia (2020) [60]	162	30	18,52	47	7	14,89	IGEN
Spanyol- ország (2021) [53]	152	15	9,9	144	4	2,8	NEM
Német- ország (2023) [61]	124	12	10	119	7	6	NEM
Lengyel- ország (2023) [62]	82	0	0	90	0	0	NEM
Bulgária (2023) [63]	90	19	21,1	90	16	17,7	NEM

A táblázat alapján látható, hogy az elmúlt pár évben igen nagy hangsúlyt kapott a kutyák és a macskák HEV fertőzöttségének vizsgálata. Valószínűleg ez a növekvő humán esetszámoknak köszönhető. Már 2020-ban is több kutatás irányult az ellenanyag kimutatására szérumból, de itt még csak kutyákból származó mintákat vizsgáltak. A tavalyi évben újabb három ország próbálta felmérni a szeroprevalenciát már nem csak kutyákban, hanem macskákban is.

A különböző országok eredményei között jelentős eltérések vannak, de többek között a Kínában és Svájcban tapasztalható magas szeroprevalencia kutyák körében arra enged következtetni, hogy szerepük lehet a HEV terjesztésében. Mivel a szeropozitivitás önmagában még nem igazolja a kutyák rezervoár szerepét, ezért voltak próbálkozások a HEV örökítőanyagának kimutatására bélsármintákból. Az Egyesült Királyságban végzett felmérés során 248, Hollandiában pedig 19 bélsármintát vizsgáltak meg PCR segítségével, de mindegyik negatív eredményt hozott [57, 60]. Az aktív fertőzés kimutatása nélkül, jelenleg nem bizonyított a kutyák rezervoár szerepe, azonban az átlagosnál magasabb szeropozitivitást tapasztalunk olyan emberek esetében, akik munkájuk vagy életvitelük miatt többet érintkeznek kutyákkal.

A macskák körében is változatos szeropozitivitást hoztak a kutatások, illetve a kutyákhoz hasonlóan náluk sem tudták kimutatni a HEV örökítőanyagát, így az aktív fertőzést [58]. Bár nem tudjuk bizonyítani, hogy a kutyák, illetve a macskák szerepet játszanak a HEV közvetítésében, nem is zárhatjuk ki őket a rezervoárok listájáról.

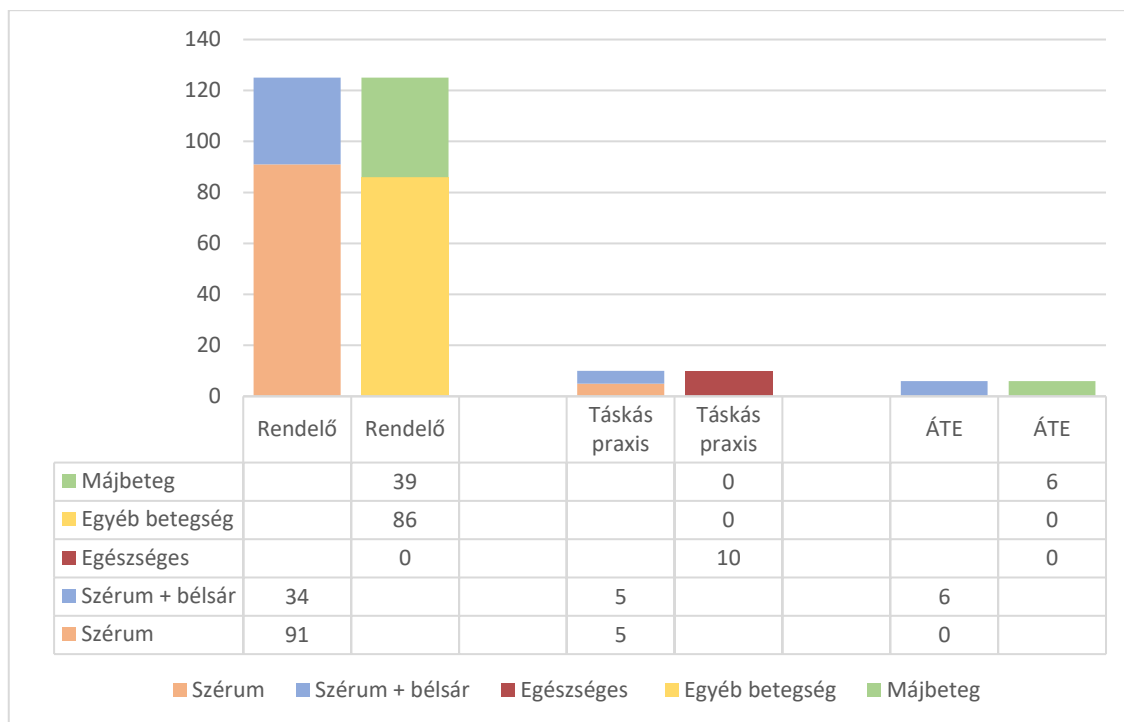
5. CÉLKITÚZÉS

A szakdolgozatom során a kutyák szerepét kerestük az emelkedő számú HEV esetek hátterében. Megpróbáltuk kimutatni, hogy képesek-e a kutyák olyan mértékű HEV ürítésre, ami miatt potenciális fertőzési forrásként szolgálnának a velük érintkező emberekre nézve. Ehhez bélsárból próbáltuk PCR segítségével kimutatni a vírust. Pozitív víruskimutatás esetén pedig szeretnénk volna izolálni is a kórokozót. Emellett ELISA-val szerológiai vizsgálatokat is végeztünk, melyekhez szérum mintákat gyűjtöttünk ellenanyagkimutatás céljából. Magyarországon még nem történt olyan felmérés, ami a kutyák szeroprevalenciáját vizsgálta volna, annak ellenére, hogy a kutyák száma, illetve a kutyatartás módja hazánkban is drasztikusan változik. Szerettünk volna olyan kutyát találni, amely nem csak szeropozitív, hanem a fertőzés aktív szakaszában van, tehát vírusürítő is, ezért a mintagyűjtést májenzim emelkedett, idiopatikus májgyulladásban szenvedő kutyákból is végeztük, nem csak egészséges állatokból. Mindamellelt kutatásunk arra is irányult, hogy információt nyerjünk az itthoni kutyapopuláció szeroprevalenciájáról.

6. ANYAG ÉS MÓDSZER

6.1 Mintagyűjtés

A kutatásunk során az ellenanyagokat szérumból, a vírust pedig bélsárból próbáltuk kimutatni. Összesen 141 db szérumból, amelyek közül 45 darabhoz bélsárminta is társult. Ezek nagyrészt kisállatrendelőkből gyűjtötték, de kaptunk mintát tászkás praxisból, illetve az Állatorvostudományi Egyetem (ÁTE) Kisállatklinikájáról is. Abból a 45 mintából, amikor bélsár és szérumból együttesen érkezett, 34 esetben az aminotranszferáz (ALT) legalább négyszeresére emelkedett az élettani értékhez képest és/vagy az epesav 40 $\mu\text{mol/l}$ feletti volt. Illetve kizárták a prehepatikus, hemolitikus icterust, tehát idiopátikus májgyulladás állt fent. Emellett további 5 db szérumból érkezett, amelyek követték ezt a protokollt. A többi minta egészséges vagy olyan kutyákból származott, melyeknek nem volt májenzim és/vagy epesav érték emelkedése vagy csak minimális, és emellett más betegség miatt kerültek állatorvoshoz. (4. ábra) A mintákat steril vércsővekben, illetve az erre a célra gyártott bélsárgyűjtő téglékben tárolták $+4^{\circ}\text{C}$ -on a laborba érkezésig, ahol ezután a bélsárminták -80°C -os, a szérumból pedig -20°C -os fagyasztószekrénybe kerültek a feldolgozásig.



4. ábra: A kutyák egészségi állapota és a kapott minták eredete.

6.2 Mintafeldolgozás

6.2.1 Az RNS kivonása a bélsármintákból

A bélsármintákból történő nukleinsav kivonáshoz a Zymo Research Quick-DNA/RNA Viral Kit-et (Catalog Nos. D7020 & D7021) használtunk a gyártó útmutatóját követve. Első lépésben egy zöldborsónyi bélsarat áttettünk egy eppendorf csőbe, amihez hozzáadtunk 400 µl fiziológiás foszfátpuffert (PBS). Ezt vortex segítségével alaposan elkevertük, amíg homogén nem lett. Ezután az elegyet 12000 g fordulatszámon, 30 másodpercig centrifugáltuk, hogy a szilárd részeket leüleptsük. A keletkezett felülúszóból 200 µl-t átpipettáztunk egy eppendorf csőbe, majd ehhez hozzámértünk 100 µl DNA/RNA Shield-et, melyet vortex-szel alaposan összekevertük. Ehhez aztán hozzámértünk 400 µl Viral DNA/RNA Buffer-t, majd ismét egy keverési fázis következett. Az így keletkezett 600 µl mintát két részletben átmértük egy szűrővel rendelkező Zymo-Spin IIC-XL Column csőbe, amit pedig beletettünk egy gyűjtőcsőbe. Ez követően 10000 g fordulatszámon, 2 percig centrifugáltuk annak érdekében, a szűrőre kitapadjon a nukleinsav. A nukleinsav mentes folyadékot, ami a gyűjtőcsőben összegyűlt, kiöntöttük. A következő lépésben a szűrőn lévő mintára 500 µl Viral Wash Buffer-t mértünk, majd újra 10000 g fordulatszámon, 30 másodpercig centrifugáltuk. A gyűjtőcsőbe került folyadékot ismét kiöntöttük, majd a folyamatot megismételtük. Ezt követően 500 µl 97%-os etanolt pipettáztunk a szűrőre és az előbbi fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk. Az etanol teljes eltávolítása érdekében 12000 g fordulatszámon további 1 perces centrifugálás következett. Ezután a gyűjtőcsövet eltávolítottuk és kidobtuk, a szűrővel ellátott csövet pedig steril eppendorf csőbe helyeztük és ráértünk 50 µl DNáz/RNáz mentes, steril vizet. Ezt a lépést egy újabb 30 másodperces centrifugálás követte az előbbi fordulatszámon. A teljes folyamat 45 µl nukleinsavat eredményezett, melyet -80 °C-on tároltunk a további felhasználásig.

6.2.2 RT-PCR

A bélsárminták vizsgálata során a vírus kimutatásához reverz transzkripciós polimeráz láncreakciót (RT-PCR) alkalmaztunk. Ennek első lépéseként, a már korábban kivont RNS-t kellett komplementer DNS-re (cDNS) átírni. Erre a célra a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kitet (ThermoFischer, katalógus szám: K1651) használtuk a gyártó utasításai szerint. A rendelkezünkre álló komponensekből, először egy elegyet készítettünk egy eppendorf csőbe, melyből később 15 µl-t kevertünk 5 µl RNS mintához.

A reagensek hőérzékenysége miatt, a reagensek összemérését jégen végeztük el. A reakcióelegy pontos összetételét 1 db mintára nézve a **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat: Az RNS átíráshoz szükséges reakcióelegy összetétele

Reagensek	Mennyiség
RNS	5 µl
Random hexamer primer	1 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
Nukleáz mentes víz	8 µl
5X RT Buff	4 µl
Maxima H Minus Enzyme Mix	1 µl
Összesen	20 µl

A 200 µl térfogatú PCR csövekben lévő 5 µl RNS kivonatokhoz 15 µl reagens keveréket adtunk, majd pipetta segítségével alaposan összekevertük őket. A centrifugálást követően a mintákat betettük a PCR gépbe, amely 10 percig 25 °C-on, utána pedig 30 percig 50 °C-on inkubálta azokat. Ezt követően a kapott cDNS-eket -20 °C-on tároltuk a felhasználásukig.

A következő lépéshez a DreamTaq Green DNA polymerase enzimet és a hozzá tartozó puffert (EP0713), illetve dNTP-t (R0182) használtuk, melyekhez még hozzáadtunk két, a SIGMA-céggel szintetizáltatott primert is (ORF2-F: 5'GACAGAATTRATTCCTCGGCTGG 3' és ORF2-R: 5'CTTGTTTCRTGYTGGTTRTCATAATC 3'). A reagenseket az előbbiekhöz hasonlóan összekevertük egy eppendorf csőbe, majd 48 µl-t pipettáztunk belőle a korábban előállított 2 µl cDNS-hez. A reakcióelegy pontos összetétele 1 db mintára nézve a **4. táblázatban** látható.

4. táblázat: A PCR-hez szükséges reakcióelegy összetétele

Reagensek	Mennyiség
cDNS	2 μ l
10x-es hígítású DreamTaq puffer	5 μ l
25 μM forward primer	1 μ l
25 μM reverse primer	1 μ l
5 U/μl Taq enzim	0,2 μ l
10 mM dNTP,	1 μ l
nukleázmentes, steril MQ-víz	48 μ l-ig, a cDNS nélkül
Összesen	50 μl

A PCR-hez szükséges pozitív kontroll egy humán minta volt, amit a Magyar Honvédség Egészségügyi Központ Honvédkórházából kaptunk. A negatív kontroll csak a reagensek elegyét tartalmazta a cDNS nélkül.

A PCR elvégzéséhez a Biometra TGradient gépet használtuk. A folyamat során három lépés követte egymást ciklikusan. Először a kétszálú DNS szétválása, más néven denaturációja történt meg 95 °C-on. Ezt követően a folyamat 55 °C-on folytatódott, ahol a primerek hozzátapadtak a velük komplementer DNS-szálak szakaszaihoz. Az utolsó lépésben 72 °C-on pedig a DNS szintézise történt meg. A három lépés összesen 40-szer ismétlődött, majd -20°C-ra történő áthelyezésig a gép +4°C-on tárolta a kész DMS termékeket.

Az értékeléshez gélelektroforézist használtunk, melyhez 2 m/m%-os agaróz gél készítettünk. Ennek elkészítéséhez 40 ml TAE pufferhez (40mM Tris, 20 mM ecetsav, 1 mM etilén-diamino-tetraecetsav) hozzámértünk 8 g SeaKem LE Agarose port, amit az összekeverés után oldódásig hevítettünk. Ezt követően kézmeleg hőmérsékletre hűtöttük vissza, majd 2 μ l GR Safe DNA I (Life Science Technologies) festéket tettünk bele, annak érdekében, hogy később az UV fény alatt le tudjuk olvasni az eredményeket. Ezután a keveréket műanyag kádba öntöttük és 15 percig hűlni hagytuk. Amikor az agaróz gél kellően megdermedt, a zsebekbe pipettáztunk minden mintából 10 μ l-t, illetve minden sor elejére került egy negatív és pozitív kontroll, valamint egy GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo

Scientific, katalógus száma: SM0311) DNS létrából 3 µl, ami a minták hosszának meghatározásához szükséges. A mintákat ezután 110V-on 20 percig futtattuk, majd UV fényénél leolvastuk az eredményeket.

6.2.3 A szérum minták előkészítése

A kutyákból nyert szérumok egy része eppendorf csövekben, egy része pedig vérvételi csövekben, centrifugálva érkezett. Az utóbbi esetében, ha a szérum szeparálása megfelelő volt, akkor átpipettáztuk azt egy steril eppendorf csőbe. Ha viszont úgy ítéltük meg, hogy nem megfelelő mértékű a szérum szeparációja, akkor 3000-es fordulatszámon 4 percig centrifugáltuk a vérmintát és csak ezután mértük át őket a steril eppendorf csőbe. Ezt követően a mintákat -20°C-on tároltuk.

6.2.4 ELISA

A szérumok ellenanyagszint méréséhez enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálatot (ELISA) végeztünk. Ehhez az ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species Kit-et használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. Első körben előkészítettük a mosófolyadékot. Ehhez a 20-szoros koncentrációjú mosóoldatot (Concentrated Wash Solution 20X) 1:20 arányban desztillált vízzel kellett hígítanunk. A folyamat során összesen hat mosást kell végrehajtani két részletben. Egy mosáshoz 300 µl mosófolyadék szükséges, vagyis a 96 lyukú lemez esetén, a teljes folyamatra vetítve ez 172,8 ml-t jelent. Ennek megfelelően, az esetleges veszteségekkel is számolva, 200 ml mosófolyadékot kevertünk be minden lemez esetén. Ehhez 10 ml 20-szoros koncentrációjú mosóoldatot 190 ml desztillált vízzel kevertünk össze egy steril, zárható üvegedényben. Ezt követően az ELISA-hoz szükséges konjugátumot készítettük elő. Ehhez a 10-szeres koncentrációjú konjugátum koncentrátumot (Concentrated Conjugate 10X) 1:10 arányban kevertük a Dilution Buffer 3-mal. Tehát 10 ml konjugátumhoz 1 ml koncentrátumot és 9 ml Dilution Buffer 3-mat kevertünk össze egy steril centrifugacsőben. A kikevert reagenseket a felhasználásukig félretettük.

Az első lépésben 190 µl Dilution Buffer 2-t mértünk minden lyukba. Ezt követően az A1, A2, valamint a B1 és B2 lyukakba 10 µl negatív kontroll mintát mértünk, majd ugyanennyi pozitív kontroll mintát pipettáztunk a C1, C2, valamint a D1 és D2 cellákba is. Az összes többi lyukba pedig párhuzamosan kimértünk 10-10 µl szérum mintát.

Ezt követően szobahőmérsékleten 45 ± 4 perc inkubáció következett, melyhez a tesztet lefedtük. Az idő letelte után a lyukakban lévő folyadékot kiöntöttük és háromszor átmostuk azokat a korábban előállított mosóoldattal. Egy mosás alkalmával $300 \mu\text{l}$ mosófolyadékot pipettáztunk egy lyukba, amit utána kiöntöttük. Ezt a folyamatot ismételtük meg a szükséges számban. Az utolsó adag mosófolyadék kiöntése után $100 \mu\text{l}$ konjugátumot mértünk a lyukakba, majd ismét lefedtük a lemezt és inkubáltuk 30 ± 3 percig. Ezt követően ismét egy mosási fázis következett, melyet az előbb leírt módon végeztünk el. A következő lépésben $100 \mu\text{l}$ Substrate Solution-t adtunk a mintákhoz, majd lefedve a tesztet, ismét inkubáltuk azt 15 ± 2 percig. Végezetül pedig a folyamat leállításához, $100 \mu\text{l}$ Stop Solution-t mértünk minden lyukba. Az eredmények értékeléséhez abszorbancia mérést végeztünk 450 nm -es hullámhosszon.

A kapott értékekből számolásokat végeztünk. Először ellenőriztük a tesztek érvényességét az alábbi képlet alapján: $\text{net OD} = \text{OD}_{\text{even well}} - \text{OD}_{\text{odd well}}$, tehát ugyanazon minta jobb oldali oszlopban látható értékét ki kell vonni a bal oldali értékből. Ennek az eredménynek a pozitív kontroll esetén nagyobbnak kell lennie $0,350$ -nél. Ezt követően a pozitív és negatív kontroll értékét is össze kell hasonlítani, melyhez a következő képletet használtuk: $\text{net OD}_{\text{PC}} / |\text{net OD}_{\text{NC}}|$. Tehát az előző képlet alapján a net OD értéket kiszámítjuk mind a pozitív, mind a negatív kontroll esetén, majd a pozitív kontroll értékét elosztjuk a negatív kontroll értékének abszolútértékével. Ennek eredményeképpen $3,5$ -nél nagyobb számot kell, hogy kapjunk. Végezetül pedig minden minta S/P% értékét ki kell számolni, mert ez adja meg, hogy az adott minta negatív, kétes vagy pozitív. Az S/P%-ot az alábbi képlet alapján számoljuk: $\text{net OD}_{\text{sample}} / \text{net OD}_{\text{PC}} \times 100$, vagyis minden minta net OD értékét kiszámoljuk a legelsőként ismertetett képlet alapján, majd ezt elosztjuk a pozitív kontroll net OD értékével, végül pedig megszorozzuk százszal. Az értékelést az **5. táblázat** alapján végeztük.

5. táblázat: Az ELISA értékelésére szolgáló táblázat

Eredmény	Státusz
$\text{S/P}\% \leq 60\%$	negatív
$60\% < \text{S/P}\% < 70\%$	kétes
$\text{S/P}\% \geq 70\%$	pozitív

7. EREDMÉNYEK

A kutatásunkhoz összesen 141 db szérum és 45 db bélsárminta gyűlt össze. A minták nagy része budapesti rendelőkől (125 db szérum, 34 db bélsár) érkezett, kisebb része pedig budapesti táskás praxisból (10 db szérum, 5 db bélsár), illetve az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájáról (6 db szérum, 6 db bélsár) érkezett. Bár a rendelők a fővárosban találhatók, ennek ellenére egyes minták vidéki kutyáktól származtak.

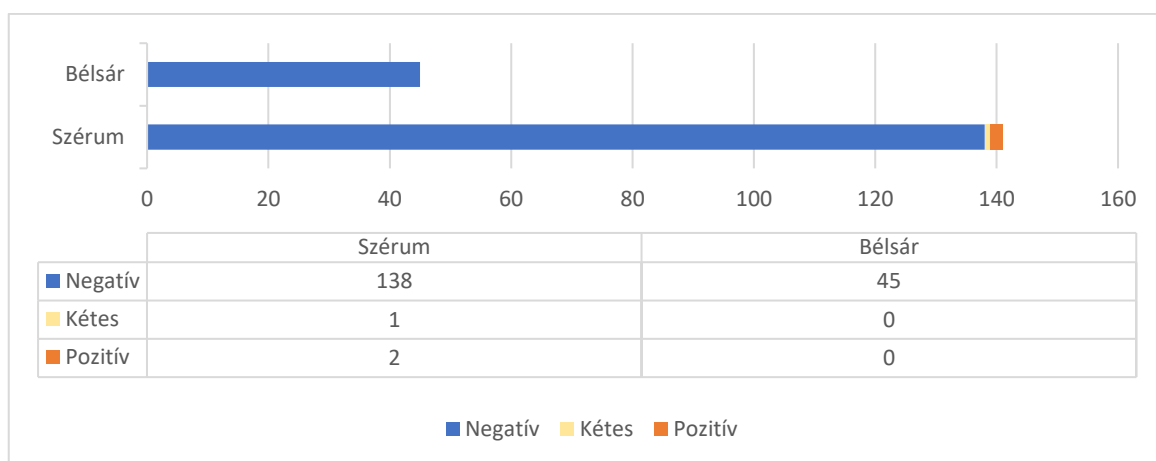
A PCR vizsgálatot a 45 bélsármintából egyszerre végeztük el, melyek eredménye minden esetben negatív lett, tehát nem tudtuk kimutatni a vírus örökítőanyagát.

Ezzel szemben a szerológiai vizsgálat eredményesnek bizonyult. A 141 szérum minta ELISA eredménye az alábbiak szerint alakult: 2 db pozitív, 1 db kétes és 138 db negatív. A két pozitív szérumhoz ugyan nem érkezett bélsárminta, de annyit tudunk ezekről a kutyákról, hogy nem volt diagnosztizált májat érintő betegségük, de mind a ketten daganatos megbetegedésben szenvedtek, és a mintavételt követő héten elhullottak. Szerettünk volna utólagosan bélsármintát gyűjteni tőlük, de sajnos erre már nem volt lehetőségünk. A kétes eredményt mutató állat esetében volt bélsárminta is, melynek a PCR eredménye korábban már ismertetve lett. A két pozitív mintát tartalmazó lemez optikai denzitás (OD) értékeit a **6. táblázat** mutatja be.

6. táblázat: Az ELISA lemez OD értékei, melyben kék színnel a negatív kontroll, pirossal a pozitív kontroll van jelölve, illetve félkövérrel, aláhúzva láthatóak a pozitív minták.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0851	0,0859	0,1074	0,1146	0,1209	0,1216	0,1000	0,1833	0,1453	0,1539	0,1054	0,1089
B	0,1263	0,9224	0,2478	0,4350	0,1864	0,1936	0,1448	0,1719	0,1293	0,1314	0,1049	0,1003
C	0,1384	0,1444	0,1789	0,2786	0,0872	0,1264	0,1023	0,0964	0,1222	0,1325	0,1698	0,1519
D	0,0995	0,1291	0,1175	0,3583	0,1810	0,1832	<u>0,1172</u>	<u>1,2103</u>	0,0645	0,2419	0,0748	0,0696
E	0,1285	0,1645	0,2010	0,2144	0,1052	0,1207	0,2560	0,3324	0,1262	0,1304	0,0967	0,1447
F	0,1441	0,1232	0,6821	0,7881	0,1133	0,1931	0,1287	0,0941	0,1779	0,1874	0,1727	0,1379
G	0,1022	0,0839	0,1149	0,1341	0,1597	0,1648	0,1031	0,0878	0,0833	0,0663	0,0993	0,0892
H	0,1115	0,1255	0,2452	0,3775	0,1361	0,1356	<u>0,1107</u>	<u>1,2882</u>	0,1550	0,1479	0,1722	0,1591

Bár a mintaszám elenyésző, mégis pozitív eredménnyel zárult a vizsgálat, tehát érdemes lehet a későbbiekben hangsúlyt fektetni a magyarországi kutyák szeroprevalenciájának feltérképezésére. Az általunk gyűjtött minták alapján azt mondhatjuk, hogy 1,42%-os a szeroprevalencia a kutyák körében. Mindamellett, hogy ez a szám elég alacsony, egy nagyobb mintaszámú vizsgálat során valószínűleg nőne ez az érték, főleg ha még több májenzim és/vagy epesav emelkedést mutató, idiopátikus májgyulladásban szenvedő kutya mintáját vizsgálnák. Az eredményeket az **5. ábra** foglalja össze.



5. ábra: A PCR és ELISA vizsgálatok eredményei

8. MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt években számos fejlett országban tapasztalható a hepatitis E vírus okozta emberi megbetegedések számának, illetve a szeroprevalencia mértékének növekedése [29]. Annak ellenére, hogy sokszor nem diagnosztizálják a megbetegedést, így nem is jelentik [7], mégis jól látható esetszám növekedés tapasztalható Magyarországon is. 2023-ban 455 esetet jelentettek [37], míg az előző évben csak 333-at [36]. Ez majdnem 1,5-szeres növekedést jelent. Közegészségügyi szempontból nem elhanyagolandó, hogy a fejlett országokban a HEV-3 és HEV-4 vannak jelen, melyek zoonótikus potenciállal bírnak. Mindkét genotípust számos állatfajból kimutatták már, de fő rezervoárnak a sertést tartják [12]. Annak ellenére, hogy Európában csökkenő tendenciát mutat a sertéstartás, illetve a sertéshús termelés- és fogyasztás, tehát a potenciális rezervoárral való érintkezés, az esetszámok folyamatosan nőnek [64].

A sertések mellett fontos szerepet játszanak a HEV közvetítésében a vaddisznók, szarvasok, nyulak, illetve a patkányok is. Több olyan esetet is jelentettek, melyek során nyers vaddisznó- vagy szarvashús okozott emberben megbetegedést [46, 47]. Mindemellett kimutatták, hogy a szeroprevalencia magasabb az erdészeti dolgozók és a vadászok körében is [46]. A nyulak is potenciális fertőzési forrást jelenthetnek, mert a belőlük kimutatott rHEV szoros rokonságban áll az emberi HEV-vel [48]. Hasonló a helyzet a patkányok esetén is, amelyek HEV vírusának genomja ugyan kisebb hasonlóságot mutat az emberi HEV-hez képest, de ugyanakkor sokkal nagyobb az esély arra, hogy rágcسالókkal érintkezzünk a mindennapok során, lakhelytől függetlenül [12]. Bár a felsorolt állatfajok mindegyike fontos közvetítője lehet a HEV-nek, szerepüket csak ritkán tudjuk bizonyítani, így nem magyarázzák az esetszámok ilyen mértékű növekedését.

Az emberek életében egyre fontosabb szerepet töltenek be a kutyák és a macskák. A legtöbb tulajdonos családtagként tekintenek házikedvencére, amivel együtt jár az is, hogy megosztják velük az otthonukat, az alvóhelyüket és az ételüket is [54], ami komoly járványtani kérdéseket vet fel. Mindemellett az egy háztartásra jutó állatok száma is folyamatosan növekszik. Ez a tendencia Magyarországon is megfigyelhető, ahol három év leforgása alatt 750.000-rel nőtt a nyilvántartott kutyák száma [6]. Nem véletlen, hogy a kutyák HEV szeroprevalenciájának feltérképezésére már számos országban volt kezdeményezés. Az adatokat összevetve láthatjuk, hogy az emberek és a kutyák szeropozitivitása között összefüggés figyelhető meg. Kínában a kutyák körében 36,5%-át

szeroprevalenciát találtak [58], míg emberek körében ez a szám 23,17% [65]. Indiában 22,7%-os szeropozitivitás figyeltek meg a kutyák körében [56], míg az emberek esetén ez 15% [66]. Hollandiában az emberek akár 31%-a [29], míg a kutyák 18,52%-a rendelkezik ellenanyaggal [60]. Ezek alapján a kutyák esetleges közvetítő szerepét nem hagyhatjuk figyelmen kívül.

Több országban próbálkoztak már vírus kimutatással kutyák bélsármintáiból, mindeddig sikertelenül. ezért kutatásunk során, igyekeztünk olyan mintákat gyűjteni, melyeknek emelkedettek voltak a májenzim, illetve epesav értékei. Bár szakirodalmi adatok nem állnak rendelkezésünkre, hogy a fertőzés milyen elváltozásokat okoz kutyákban, feltételeztük, hogy hepatotróp vírusról lévén szó, ilyen kritérium mellett nagyobb sikerrel járhatunk. A 45 mintából 34 olyan kutyából származott, melyek megfeleltek a kiszabott feltételeknek, ennek ellenére vírust nem tudtunk detektálni. Az eredményeink, illetve a szakirodalmi adatok alapján, a bélsárból való víruskimutatás valószínűleg sokkal nehezebb feladat, mint azt gondoljuk.

Más országok kutatásai alapján azt mondhatjuk, hogy kutyák körében az ellenanyagok jelenléte nem ritka. Ezt alátámasztja az is, hogy még az általunk végzett alacsony mintaszámú ELISA-val történő vizsgálat esetén is találtunk pozitív mintát. A 141 db szérumból 2 esetében kaptunk pozitív eredményt, melyből 1,42%-os szeroprevalenciára következtetünk. Ez összefügg egy 2007-es magyarországi felméréssel, mely szerint az emberek 10,5%-a szeropozitív [30]. Valószínűsíthetően átfogó, országsszintű felmérések esetén mindkét szám növekedést mutatna.

A pontosabb szeroprevalencia meghatározásához, az állatorvosok összefogásával történő, ország szintű felmérésre lenne szükség. Érdekes lenne májproblémákkal küzdő kutyákból szérumot és bélsarat venni nagy mintaszámban, hogy nagyobb esélyünk legyen detektálni a vírust. Mindemellett az egészséges vagy más betegségben szenvedő állatoktól gyűjtött szérumok is segítenek a felmérésben, illetve a bélsárminta gyűjtése esetükben sem elhanyagolandó, mert a HEV fejlett országokban jelen lévő genotípusai sokszor tünetmentes fertőzést okoznak. Tekintve, hogy eddig több vírus kimutatási kísérlet is sikertelen volt, az orvosokkal történő összefogással, érdemes lehet olyan emberek kutyáit vizsgálni, akik HEV-vel fertőztek. Mindazonáltal előfordulhat, hogy a vírus bélsárból történő kimutatása majd csak laboratóriumi fertőzés során lesz megvalósítható, de mindenképpen foglalkoznunk kell a kutyák vizsgálatával és potenciális rezervoárként kell rájuk tekintenünk.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A hepatitis E vírus (HEV) a *Hepeviridae* családba, azon belül az *Orthohepevirinae* alcsaládba tartozó, emberi megbetegedésért felelős kórokozó. Számos genotípusa közül, a Paslahepevirus balayani 8 genotípusa emlősöket, köztük az embert fertőzi. A HEV-1 és HEV-2 a fejlődő országokban fordulnak elő, ahol fekál-orál fertőzés révén jut be az emberi szervezetbe. A fejlett országokban, az általában nem megfelelően hőkezelt élelmiszerrel terjedő HEV-3 és HEV-4 vannak jelen, melyek képesek állatról emberre áterjedni. Ez a négy genotípus főként akut májgyulladást okoz emberekben, de az 1-es és 2-es genotípus esetében magas halálozási arány tapasztalható terhes nőknél és immunszupresszált egyéneknél. A zoonótikus HEV-3 és HEV-4 fő rezervoárjának a sertést tartják, de kimutatták már a vírust vaddisznóból, szarvasból, nyúlból és rácsálókból is.

Az elmúlt években a HEV általi megbetegedések száma növekszik, viszont a potenciálisan fertőzési forrásként szolgáló élelmiszereken végzett vizsgálatok nem magyarázzák a nagy esetszámot. Ennek következtében számos kutatás irányult arra, hogy feltérképezzék a HEV eddig még ismeretlen rezervoár fajait. Az ember közvetlen környezetében élő kutyák ekkor merültek fel, mint lehetséges közvetítők.

A kutatásunk során kutyák bélsarából próbáltuk kimutatni a HEV örökítőanyagát PCR vizsgálat segítségével. Ehhez 45 db mintát gyűjtöttünk rendelőkől, táskás praxisból és az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájáról, melyekből végül nem sikerült detektálni a vírus RNS-ét, annak ellenére, hogy májproblémákkal küzdő kutyáktól is származtak minták. Bár a kutyák bélsárral történő vírus ürítését nem tudtuk igazolni, azonban 141 szérumból is gyűjtöttünk, melyeket ELISA segítségével vizsgáltunk, és amelyek közül 2 pozitívnak bizonyult. Ez 1,42%-os szeroprevalenciának számít.

Az eredmények alapján a későbbiekben érdemes lenne olyan kutatásba kezdeni, mely során az ország minden pontjáról érkezne nagyszámú szérumból és bélsármintából. A szeroprevalencia meghatározásához akár randomizált módon is lehetne mintákat venni, míg a vírus bélsárból történő kimutatásához inkább májproblémákkal küzdő kutyák vizsgálata lenne célravezető. Annyi bizonyos, hogy egyre szorosabb kapcsolat alakul ki a kutyák és az emberek között, aminek révén a kutyáról emberre terjedő, zoonótikus kórokozók száma egyre nő. Ebből kifolyólag a továbbiakban is foglalkoznunk kell a kutyák hepatitis E vírus terjedésében betöltött szerepével.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Li P, Liu J, Li Y, Su J, Ma Z, Bramer WM, Cao W, de Man RA, Peppelenbosch MP, Pan Q (2020) The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver International* 40:1516–1528. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
2. Pérez-Gracia MT, García M, Suay B, Mateos-Lindemann ML (2015) Current Knowledge on Hepatitis E. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 3:117. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00009>
3. Yugo DM, Meng X-J (2013) Hepatitis E Virus: Foodborne, Waterborne and Zoonotic Transmission. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10:4507–4533. <https://doi.org/10.3390/ijerph10104507>
4. Renou C, Afonso A-MR, Pavio N (2014) Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus from Raw Pork Liver Sausage, France. *Emerg Infect Dis* 20:1945–1947. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140791>
5. Ahmed R, Nasheri N (2023) Animal reservoirs for hepatitis E virus within the *Paslahepevirus* genus. *Veterinary Microbiology* 278:109618. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109618>
6. Vetter Szilvia, Vizi Veronika, Ózsvári László, A magyarországi kutyatartási szokások a COVID-19- vilájárványban – 2021-es országos reprezentatív felmérés előzetes eredményei, *Magyar állatorvosok lapja*, 144/ 3-12.
7. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS (2016) Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J Gastroenterol* 22:7030–7045. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.7030>
8. Khuroo MS (1980) Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 68:818–824. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(80\)90200-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(80)90200-4)
9. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF (2008) Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *Intervirology* 20:23–31. <https://doi.org/10.1159/000149370>

10. Reyes GR, Purdy MA, Kim J, Luk K-C, Young LM, Fry KE, Bradley DW (1990) Isolation of a cDNA from the Virus Responsible for Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis. *Science* 247:1335–1339. <https://doi.org/10.1126/science.2107574>
11. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang C-C, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR (1991) Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185:120–131. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90760-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90760-9)
12. Pavio N, Meng X-J, Renou C (2010) Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 41:46. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010018>
13. Agrawal S, Gupta D, Panda SK (2001) The 3' End of Hepatitis E Virus (HEV) Genome Binds Specifically to the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp). *Virology* 282:87–101. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0819>
14. Yadav KK, Boley PA, Fritts Z, Kenney SP (2021) Ectopic Expression of Genotype 1 Hepatitis E Virus ORF4 Increases Genotype 3 HEV Viral Replication in Cell Culture. *Viruses* 13:75. <https://doi.org/10.3390/v13010075>
15. LeDesma R, Nimgaonkar I, Ploss A (2019) Hepatitis E Virus Replication. *Viruses* 11:719. <https://doi.org/10.3390/v11080719>
16. Aggarwal R, Krawczynski K (2000) Hepatitis E: An overview and recent advances in clinical and laboratory research. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15:9–20. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02006.x>
17. Family: Hepeviridae | ICTV. <https://ictv.global/report/chapter/hepeviridae/hepeviridae>. Letöltés dátuma: 2024. november 26.
18. Ferrara G, Pagnini U, Improda E, Ciarcia R, Parisi A, Fiorito F, Della Valle G, Iovane G, Montagnaro S (2024) Detection of anti-HEV antibodies but no molecular positivity in dogs in the Campania region, southern Italy. *One Health* 18:100724. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100724>
19. (2024) (PDF) Chirohepevirus from Bats: Insights into Hepatitis E Virus Diversity and Evolution. ResearchGate. <https://doi.org/10.3390/v14050905>

20. Luo Q, Chen J, Zhang Y, Xu W, Liu Y, Xie C, Peng L (2024) Viral hepatitis E: Clinical manifestations, treatment, and prevention. *Liver Research* 8:11–21. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2024.01.001>
21. Hepatitis E virus: the current scenario - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971212013197>. Letöltés dátuma: 2024. november 26.
22. Khuroo MS, Kamili S, Yattoo GN (2004) Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 19:778–784. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03437.x>
23. Labrique AB, Zaman K, Hossain Z, Saha P, Yunus M, Hossain A, Ticehurst JR, Nelson KE (2010) Epidemiology and Risk Factors of Incident Hepatitis E Virus Infections in Rural Bangladesh. *American Journal of Epidemiology* 172:952–961. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq225>
24. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis - Navaneethan - 2008 - *Liver International* - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x>. Letöltés dátuma: 2024. november 26.
25. Go H-J, Park B-J, Ahn H-S, Lyoo E-L, Kim D-H, Lee J-B, Park S-Y, Song C-S, Lee S-W, Choi I-S (2019) Identification of Hepatitis E Virus in Bovine and Porcine Raw Livers. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 29:2022–2025. <https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10059>
26. Detection of hepatitis E virus genotypes 3 and 4 in donkeys in northern China - Rui - 2020 - *Equine Veterinary Journal* - Wiley Online Library. <https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.13203>. Letöltés dátuma: 2024. november 26.
27. Huang F, Yu W, Hua X, Jing S, Zeng W, He Z (2011) Seroepidemiology and Molecular Characterization of Hepatitis E Virus in Macaca Mulatta from a Village in Yunnan, China, where Infection with this Virus Is Endemic. *Hepatology* 11:745–749. <https://doi.org/10.5812/kowsar.1735143X.730>
28. Boadella M (2015) Hepatitis E in wild ungulates: A review. *Small Ruminant Research* 128:64–71. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.03.007>

29. Capai L, Falchi A, Charrel R (2019) Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Review of Literature. *Viruses* 11:84. <https://doi.org/10.3390/v11010084>
30. Haagsman A, Reuter G, Duizer E, Nagy G, Herremans T, Koopmans M, Szűcs G (2007) Seroepidemiology of hepatitis E virus in patients with non-A, non-B, non-C hepatitis in Hungary. *Journal of Medical Virology* 79:927–930. <https://doi.org/10.1002/jmv.20869>
31. Guillois Y, Abravanel F, Miura T, Pavio N, Vaillant V, Lhomme S, Le Guyader FS, Rose N, Le Saux J-C, King LA, Izopet J, Couturier E (2016) High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clinical Infectious Diseases* 62:351–357. <https://doi.org/10.1093/cid/civ862>
32. Yapa CM, Furlong C, Rosewell A, Ward KA, Adamson S, Shadbolt C, Kok J, Tracy SL, Bowden S, Smedley EJ, Ferson MJ, Sheppeard V, McAnulty JM (2016) First reported outbreak of locally acquired hepatitis E virus infection in Australia. *Medical Journal of Australia* 204:274–274. <https://doi.org/10.5694/mja15.00955>
33. Rivero-Juarez A, Frias M, Martinez-Peinado A, Risalde MA, Rodriguez-Cano D, Camacho A, García-Bocanegra I, Cuenca-Lopez F, Gomez-Villamandos JC, Rivero A (2017) Familial Hepatitis E Outbreak Linked to Wild Boar Meat Consumption. *Zoonoses and Public Health* 64:561–565. <https://doi.org/10.1111/zph.12343>
34. Fontana S, Ripellino P, Niederhauser C, Widmer N, Gowland P, Petrini O, Aprile M, Merlani G, Bihl F (2023) Epidemiology of HEV Infection in Blood Donors in Southern Switzerland. *Microorganisms* 11:2375. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102375>
35. Capai L, Hozé N, Chiaroni J, Gross S, Djoudi R, Charrel R, Izopet J, Bosseur F, Priet S, Cauchemez S, Lamballerie X de, Falchi A, Gallian P (2020) Seroprevalence of hepatitis E virus among blood donors on Corsica, France, 2017. *Eurosurveillance* 25:1900336. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.1900336>
36. Nemzeti Népegészségügyi Központ, Járványügyi és Infekciókontroll Főosztály, Heti tájékoztató (2021. 52. hét) URL: https://www.antsz.hu/data/cms100982/2021_52_honlapheti.pdf, letöltés dátuma: 2024. november 26.

37. 2023_52_honlapheti.pdf Nemzeti Népegészségügyi Központ, Járványügyi és Infekciókontroll Főosztály, Heti tájékoztató (2023. 52. hét) URL: https://www.antsz.hu/data/cms109711/2023_52_honlapheti.pdf, letöltés dátuma: 2024. november 26.
38. 2024_40_honlapheti.pdf Nemzeti Népegészségügyi Központ, Járványügyi és Infekciókontroll Főosztály, Heti tájékoztató (2024. 40. hét) URL: https://antsz.hu/data/cms113680/2024_40_honlapheti.pdf, letöltés dátuma: 2024. november 26.
39. Mrzljak A, Balen I, Barbic L, Ilic M, Vilibic-Cavlek T (2021) Hepatitis E virus in professionally exposed: A reason for concern? *World J Hepatol* 13:723–730. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i7.723>
40. Hepatitis E. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>. Letöltés dátuma: 2024. november 26.
41. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N (2016) Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses* 8:270. <https://doi.org/10.3390/v8100270>
42. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus | PNAS. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.94.18.9860>. Letöltés dátuma: 2024. november 26.
43. Meester M, Tobias TJ, Bouwknecht M, Kusters NE, Stegeman JA, van der Poel WHM (2021) Infection dynamics and persistence of hepatitis E virus on pig farms – a review. *Porc Health Manag* 7:16. <https://doi.org/10.1186/s40813-021-00189-z>
44. Pavio N, Doceul V, Bagdassarian E, John R (2017) Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Vet Res* 48:78. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0483-9>
45. Salines M, Andraud M, Rose N (2017) From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Vet Res* 48:31. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0436-3>

46. Fanelli A, Tizzani P, Buonavoglia D (2022) A systematic review and meta-analysis of hepatitis E virus (HEV) in wild boars. *Research in Veterinary Science* 142:54–69. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.11.015>
47. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S (2003) Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *The Lancet* 362:371–373. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14025-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14025-1)
48. Wang L, Liu L, Wang L (2018) An overview: Rabbit hepatitis E virus (HEV) and rabbit providing an animal model for HEV study. *Reviews in Medical Virology* 28:e1961. <https://doi.org/10.1002/rmv.1961>
49. Cossaboom CM, Córdoba L, Sanford BJ, Piñeyro P, Kenney SP, Dryman BA, Wang Y, Meng X-J (2012) Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J Gen Virol* 93:1687–1695. <https://doi.org/10.1099/vir.0.041509-0>
50. Lhomme S, Dubois M, Abravanel F, Top S, Bertagnoli S, Guerin J-L, Izopet J (2013) Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. *Journal of Clinical Virology* 58:357–362. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.02.006>
51. Kabrane-Lazizi Y, Fine JB, Elm J, Glass GE, Higa H, Diwan A, Gibbs CJ, Meng XJ, Emerson SU, Purcell RH (1999) Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.331>
52. Lack JB, Volk K, Van Den Bussche RA (2012) Hepatitis E Virus Genotype 3 in Wild Rats, United States. *Emerg Infect Dis* 18:1268–1273. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120070>
53. Caballero-Gómez J, Rivero-Juarez A, Jurado-Tarifa E, Jiménez-Martín D, Jiménez-Ruiz E, Castro-Scholten S, Ulrich RG, López-López P, Rivero A, García-Bocanegra I (2022) Serological and molecular survey of hepatitis E virus in cats and dogs in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 69:240–248. <https://doi.org/10.1111/tbed.14437>
54. Komjáti S. L. (2021) Magyarország állattartási kultúrája, Állatorvostudományi Egyetem, Állatvédelmi Jogi, Elemző- és Módszertani Központ, Központvezető, Szakdolgozat

55. Tan JS (1997) Human Zoonotic Infections Transmitted by Dogs and Cats. Archives of Internal Medicine 157:1933–1943. <https://doi.org/10.1001/archinte.1997.00440380035003>
56. Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM, Gandhe SS, Chobe LP, Rautmare SS, Mishra AC, Padbidri VS (2001) Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. Journal of Viral Hepatitis 8:223–227. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2001.00290.x>
57. McElroy A, Hiraide R, Bexfield N, Jalal H, Brownlie J, Goodfellow I, Caddy SL (2015) Detection of Hepatitis E Virus Antibodies in Dogs in the United Kingdom. PLOS ONE 10:e0128703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128703>
58. Zeng MY, Gao H, Yan XX, Qu WJ, Sun YK, Fu GW, Yan YL (2017) High hepatitis E virus antibody positive rates in dogs and humans exposed to dogs in the south-west of China. Zoonoses and Public Health 64:684–688. <https://doi.org/10.1111/zph.12377>
59. Seroprevalence of hepatitis E virus in dogs in Switzerland - Veronesi - 2021 - Zoonoses and Public Health - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/zph.12779>. Letöltés dátuma: 2024. október 24.
60. Hepatitis E virus seroprevalence in pets in the Netherlands and the permissiveness of canine liver cells to the infection | Irish Veterinary Journal | Full Text. <https://irishvetjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13620-020-00158-y>. Letöltés dátuma: 2024. november 26.
61. Wolski A, Knoop E, Mader M, Kling L, Wagner A, Horvatits T, Stiller J, Krohn B, Groschup M, Wiesch J zur, Eiden M, Pischke S (2023) Anti-HEV seroprevalence varies largely in dogs, cats, and horses in Germany. In: Zeitschrift für Gastroenterologie. Georg Thieme Verlag, p P5.18
62. Turlewicz-Podbielska H, Ruszkowski JJ, Wojciechowski J, Pomorska-Mól M (2024) No evidence of hepatitis E virus (HEV) infection among pet cats and dogs, and low seroprevalence of hepatitis E virus among pet rabbits in Poland. Vet Res Commun 48:597–602. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10223-w>

63. Tsachev I, Gospodinova K, Pepovich R, Takova K, Kundurzhiev T, Zahmanova G, Kaneva K, Baymakova M (2023) First Insight into the Seroepidemiology of Hepatitis E Virus (HEV) in Dogs, Cats, Horses, Cattle, Sheep, and Goats from Bulgaria. *Viruses* 15:1594. <https://doi.org/10.3390/v15071594>
64. Mateos GG, Corrales NL, Talegón G, Aguirre L (2024) Pig meat production in the European Union-27: current status, challenges, and future trends. *Anim Biosci* 37:755–774. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0496>
65. Cao K, Wu X, Yang M, Chen C, Zhang X, Jiang D, Du Y, Chen M, You Y, Zhou W, Qi J, Chen D, Yan R, Miao Z, Yang S (2023) Prevalence of hepatitis E virus in China from 1997 to 2022: a systematic review and meta-analysis. *Front Public Health* 11:. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1243408>
66. Gopinath R, Sundaram ALM, Dhanasezhian A, Arundadhi M, Thangam GS (2023) Seroprevalence of Various Viral Diseases in Tamil Nadu, India. *Journal of Global Infectious Diseases* 15:144. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_101_23

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani a két témavezetőmnek, Dr. Lőrincz Mártának és dr. Földi Dórának, akik szakértelmükkel, hasznos tanácsaikkal és végtelen türelmükkel segítettek és irányították a munkámat. Nélkülük ez a kutatás és a szakdolgozatom nem valósulhatott volna meg. Köszönettel tartozom továbbá a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék munkatársának, Herbák Józsefné Irénnek, a laboratóriumi munka során nyújtott segítségért.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Sterczer Ágnesnek és az egyetemi Kisállatklinikának, továbbá Dr. Répánszky Ádámnak, Dr. Schindler Nikolettnek és Dr. Varga Józsefnek, akik a mindennapi munkájuk mellett a szakdolgozatom megvalósulásához szükséges minták gyűjtésére is időt szakítottak.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni a családomnak és a barátaimnak, hogy türelemmel fordultak felém és támogattak, hogy a szakdolgozatom megvalósulhasson.



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: ARANYOSI REKA ANNA

Neptun-kódja: EORLGS

A témavezető neve és beosztása: DR. HORVÁTH MÁTYÁS, egyetemi tanársegéd

Tanszék: JÁRVÁNYTANI ÉS MIKROBIOLOGIAI TANSZÉK

A diplomadolgozat címe: Hepatitis E vírus direkt és indirekt kimutatása kutyákban

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2024	02	22	Félévi tesztbenélése Munkafeldolgozás I.	R / Lónna
2.	2024	03	13	Munkafeldolgozás II.	R / Lónna
3.	2024	05	09	RT-PCR I.	R / Lónna
4.	2024	05	16	RT-PCR II.	R / Lónna
5.	2024	05	29	PCR pozitív és negatív értékelése	R / Lónna

Érdemjegy az első félév végén: 5

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2024	09	12	Szakdolgozat tartalmával megbeszélés	R / Lónna
2.	2024	09	19	ELISA I.	R / Lónna
3.	2024	09	26	ELISA II.	R / Lónna
4.	2024	10	02	Érdemjegyek értékelése	R / Lónna
5.	2024	11	05	Szakdolgozat értékelése	R / Lónna

Érdemjegy a második félév végén: 5

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: Aranyos Réka
Tanszéki előadó aláírása: [Signature] Átvétel dátuma: 2024. 11. 26.

[Signature]
témavezető aláírása

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!