



Állatorvostudományi Egyetem

Patológiai Tanszék

Macska hepadnavírus prevalenciája Magyarországon

Készítette: Varga Zoltán

Témavezető: dr. Szilasi Anna, egyetemi tanársegéd

Budapest

2020

1.Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	1
2. Rövidítések jegyzéke.....	3
3. Bevezetés.....	4
4. Irodalmi áttekintés.....	6
4.1. Hepadnavírusok.....	6
4.1.1. Történet.....	6
4.1.2. Felépítés.....	6
4.1.3. Replikáció.....	7
4.2. Hepatitis B vírus.....	8
4.2.1. Humán egészségügyi vonatkozás.....	8
4.2.2. Fertőződés.....	8
4.3. A hepatitis B klinikuma.....	9
4.3.1. Az akut hepatitis.....	9
4.3.2. A krónikus hepatitis.....	9
4.3.3. Extrahepatikus hepatitis B-fertőzés.....	10
4.4. Orthohepadnavírusok.....	11
4.4.1. Történet.....	11
4.4.2. Rágcsáló vírusok.....	11
4.4.3. Denevér vírusok.....	12
5. Anyag és módszer.....	15
5.1. Mintagyűjtés.....	15
5.2. Nukleinsav kinyerése.....	15
5.3. Polimeráz láncreakció.....	16
5.4. Real-time PCR.....	17
5.5. SYBR Green.....	17

5.6. Olvadási görbe analízis.....	17
5.7. Saját PCR vizsgálat	18
5.8. FeLV-FIV PCR.....	18
6. Eredmények.....	20
7. Megbeszélés	25
8. Összefoglalás.....	27
9. Summary	28
10. Irodalomjegyzék.....	29
11. Köszönetnyilvánítás	32

2. Rövidítések jegyzéke

ALT- alanin amino-transzferáz

ÁTE - Állatorvostudományi Egyetem

bp - bázispár

BtHV - bat hepatitis virus

CT – computer tomographia

db - darab

DCH - domestic cat hepadnavirus

DCHBV - domestic cat hepatitis B virus

DHBV - duck hepatitis B virus

DNS - deoxiribonukleinsav

dNTP - deoxyribonucleotide triphosphate

dsDNS - dupla szálú deoxiribonukleinsav

FIP- feline infectious peritonitis

FIV - feline immunodeficiency virus

GGT - gamma-glutamil-transzferáz

GSHV - ground squirrel hepatitis virus

HBV - hepatitis B virus

HCC - hepatocellularis carcinoma

HIV - human immunodeficiency virus

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

LFBHV- long-fingered bat hepatitis virus

mRNS - messenger ribonukleinsav

NTCP - Na⁺/taurokolát kotranszporter

ORF - open reading frame

PCR - polimeráz láncreakció

RNáz - ribonukleáz

RNS - ribonukleinsav

RT-PCR - reverz transzkripció polimeráz láncreakció

SHBV - shrew hepatitis B virus

SSLR - serum sickness-like reaction

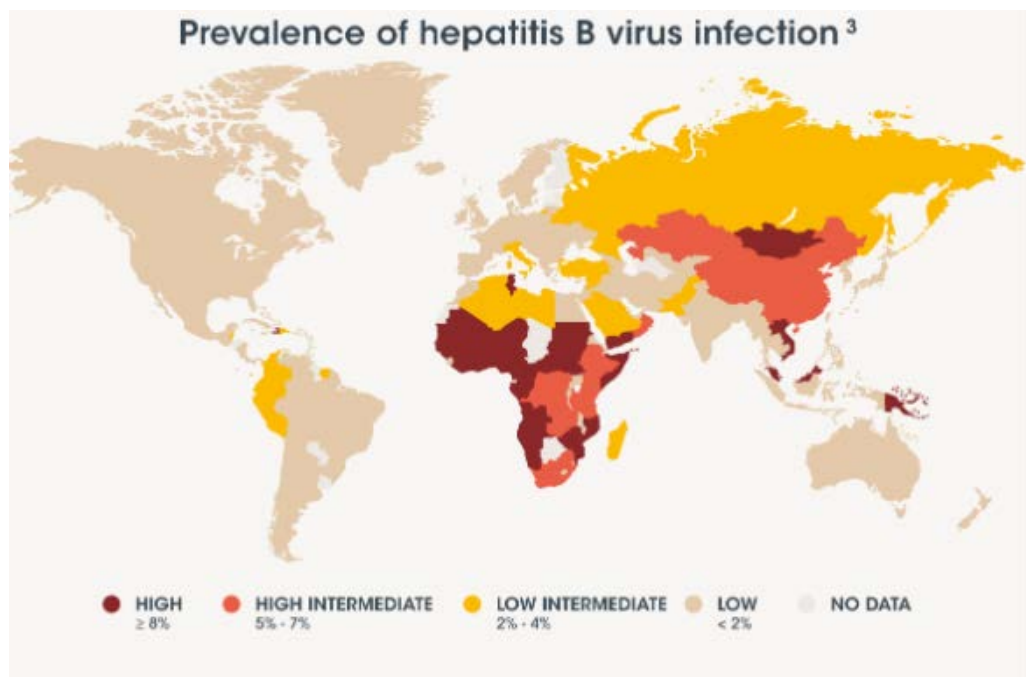
TBHBV- tent-making hepatitis B virus

WHO - World Health Organization

WHV - woodchuck hepatitis virus

3. Bevezetés

A világon először 2018 májusában mutattak ki és publikáltak házi macska lymphoma eredetű mintájából hepadnavírust (domestic cat hepadnavirus, DCH) Ausztráliában. A vírus nem csak humán vonalon, de az állatokban is ismert, izolálták már főemlősökből, denevérekből, rágcsálókból, kacsákból, halakból és békákból is, amelyeknél a tumoros elváltozások szignifikánsabb megjelenést mutattak, mint nem fertőzött társaikban. A vizsgált ausztráliai macska populációt a hepadnavíruson kívül a macskák immunhiányos kórképét okozó FIV-re (feline immunodeficiency virus) is tesztelték, és az eredmények alapján látható volt, hogy magasabb arányban (3,2–10%) mutatták ki a hepadnavírust azokban az egyedekben, amelyek a FIV vírusával is fertőzöttek voltak. A humán egészségügyből ismert hepatitis B vírus (HBV) is hepadnavírus, amivel 2015-ben körülbelül 257 millió ember volt fertőzött (**1. ábra**), és évente 887.000 halálos áldozattal járt, amit legtöbb esetben májcirrózis és hepatocellularis carcinoma okozott (WHO, 2020).



1. ábra: Hepatitis B vírus okozta fertőzés prevalenciája világszerte (Schweitzer et al., 2015)

Kutatásunk célja, hogy felderítsük a hepadnavírus jelenlétét magyarországi macskapopulációkban, illetve megvizsgáljuk azokat a feltevéseket, miszerint a DCH és a HBV között hasonlóság mutatkozik a biokémiai paraméterekben okozott eltérések, illetve a retrovírusokkal (FIV, FeLV – feline leukemia virus) való ko-infekciós hajlam vonatkozásában.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Hepadnavírusok

4.1.1. Történet

A hepatitis évszázadokon át rejtélyes betegség volt. Az első írásos bizonyítékot egy sumér agyagtáblán (i.e. 3000) találták a sárgaság tüneteivel, ezt tekintjük az első orvosi könyvnek. A klinikai jellemzőit először Hippocrates írta le, és egy beteg kezelését is közölte, amely víz és méz adását jelentette. Az icterus kifejezést is a Hippocrates Corpusban olvashatjuk először (Trépo, 2013).

A *Hepadnaviridae* családot hivatalosan 1990. 08. 29 -én jegyezte be a Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses) Berlinben. A család nevének egyik fele a vírus sejtropizmusára utal, hiszen a hepatocytákat támadja, míg a második fele a duplaszálú DNS genomra vonatkozik. Az első hepadnavírust 1960-ban fedezték fel mormotákban (*Marmota monax*) az Egyesült Államokban (Robinson et al., 1984). Azóta a *Hepadnaviridae* családba tartozó vírusokat a világ számos pontján kimutatták. Az 5 nemzetséget, összesen 18 fajt tartalmazó család főként rágcsálókban, madarakban, halakban van jelen, de főemlősökben, békákban és emberben is megtalálható. Napjainkban két nagyobb vírustörzset különböztetünk meg, az *Avihepadnavirus* és az *Orthohepadnavirus* törzset.

Az *Orthohepadnavirus* genus tagjai főként rágcsálókat, denevéreket és majmokat megbetegítő vírusok. Ezek közül egyedül a denevér hepadnavírusok zoonotikusak (LFBHV - long-fingered bat hepatitis virus) (Drexler et al., 2013; He et al., 2013). Az orthohepadnavírusok közül pedig egyedül a HBV volt átvihető csimpánzokra (Trépo, 2013).

Nemrég további két vírust azonosítottak halakban és békákban, amelyek még besorolásra várnak (Nie et al., 2017).

4.1.2. Felépítés

A hepadnavírusok burkos vírusok. A lipidet tartalmazó burok alkotja a vírus felszínét, amihez a vírus neutralizáló antigének kapcsolódnak. Morfológiailag ez egy ikozaéder kapszid. Részben dupla szálú DNS (dsDNS) vírus, amely hozzávetőlegesen 3200 bázispárt (bp) tartalmaz (Trépo et al., 2014). A hepadnavírusok különlegessége, hogy egy teljes negatív irányultságú szál és egy rövidebb, pozitív irányultságú szál tartalmaznak. A DNS replikációja RNS transzkriptáz segítségével történik (Urban et al., 2010). A hepadnavírus

virionjai gömbölyű partikulákból állnak, amelyek nagyjából 42–47 nm átmérőjűek. Ezeket egy elektronokban sűrű gömb alakú belső mag alkotja, amely hozzávetőlegesen 22–25 nm átmérőjű, és egy külső héj vagy burok, aminek a becsült vastagsága 7 nm. A belső mag partikulák, amelyek detergens anyagokkal felszabadíthatóak, hordozzák a virális mag antigént, és tartalmazzák a virális DNS-t, a DNS-polimerázt és protein-kinázt, ami foszforilálja a mag fő vírusspecifikus-genom polypeptidjét. Ez az egy polypeptid megtalálható a woodchuck hepatitis virus (WHV), a HBV és a ground squirrel hepatitis virus (GSHV) magjában is. A főbb ismert állati és a HBV ultrastruktúrája nagyon hasonló, bár nem azonos. Az emlős vírusok sokkal inkább hasonlítanak egymásra, mint a madaraké. Több tanulmány foglalkozott a hepadnavírusok közötti kapcsolatok kutatásával, habár a kapott eredmények nem összehasonlíthatók, mivel eltérő módszereket használtak különböző laboratóriumokban. A WHV, GSHV és duck hepatitis B vírusok (DHBV) egyszálú régiókat tartalmaznak, amelyek körülbelül 15–60%-át teszik ki a cDNS-nek különböző molekulákban.

A DNS-polimeráz javítja az egyszálú régiókat a DNS-ben, hogy teljes dupla szálú molekulákat alkosson. A DNS szintézis a rövid lánc 3' végéről kezdődik. Az átírás akkor fejeződik be, amikor a rövid szál 5' végét eléri. A hosszú szál nem zárt kör, egy bevágás szakítja meg mintegy 300 bázispárra az 5' végtől a rövid szálon. A hepadnavírusok DNS-ben megtalálható open reading frame (ORF) szakaszok túlnyomóan hasonló pozícióban helyezkednek el a teljes vagy a hosszú DNS szálon (Robinson et al., 1984).

Az orthohepadnavírusok genomja is tartalmaz négy ORF-t, amivel kódolja a vírus polimerázt (P), a magfehérjét (C), a felszíni szerkezeti fehérjéket és az X proteint, míg az avihepadnavírusokból hiányzik az ORF X fehérjét kódoló szakasza.

4.1.3. Replikáció

A DNS vírusok genomjának átírása a gazdasejt magjában történik. A replikációhoz a vírusnak szüksége van a gazdasejt polimeráz és egyéb enzimeire, hogy egy mRNS-t létre tudjon hozni. A strukturális és nem strukturális fehérjék (P, X) a sejt cytoplazmájában termelődnek (Szomor, 2009).

A vírusgének átírását egy speciális DNS-kötő fehérje szabályozza a virális genomban. A hepadnavírusok replikációja abban különbözik más DNS vírusoktól, hogy egy, a genomnál hosszabb, pozitív RNS-szál képződik a sejt DNS-függő RNS-polimeráza által, majd ez egy

kört zár be. A vírusfehérjék körülveszik az RNS-t, egy vírus által kódolt RNS-függő DNS-polimeráz (reverz transzkriptáz) a vírusban létrehoz egy negatív szálú DNS-t, majd az RNS-t enzimatikusan lebontja. Egy polimeráz elkezd az új pozitív szálú DNS szintézisét, de megáll, amikor a genom és mag felveszi a burkát. Így jön létre a részben kettős szálú körkörös DNS genom (Patrick et al., 2016).

4.2. Hepatitis B vírus

4.2.1. Humán egészségügyi vonatkozás

A legismertebb hepadnavírus a hepatitis B vírus (HBV), amely az *Orthohepadnaviridae* családba tartozik a WHV (woodchuck hepatitis virus), GSHV (ground squirell hepatitis virus), DCHBV (domestic cat hepatitis B virus) mellett. A vírust az 1960-as években fedezte fel Baruch Blumberg és Alfred Prince, és 1970-ben David Dane azonosította a híres 42 nm-es részecskét. A hepatitis B azonosítása egy olyan mérföldkő volt, amivel forradalmasították nem csak az orvostudományt, de a közegészségügyet is. A HBV felfedezése hozta el az első olyan vakcinát, amit nem szövettenyészetten, hanem közvetlenül vérplazmából állítottak elő. Nem sokkal később már az első olyan oltás volt, amit géntechnológiával készítettek. A HBV vakcina ezen kívül az első „rákellenes” oltásnak bizonyult, mivel megakadályozta a hepatocelluláris carcinoma (HCC) kialakulását, és gyakorlatilag felszámolta a betegség gyermekkortól való kialakulását Tajvanon. Az oltás hatékonyságát mutatja még, hogy Tajvanon és Szingapúrban a 20 év alattiak körében a hepatitis B antigén hordozók száma 9,1%-ról 2,7%-ra, a HCC-ban szenvedőké pedig 27%-ról 17%-ra csökkent. Jelenleg a világon kétmilliárd ember fertőzött HBV-vel, és 350 millió ember krónikus hordozója a vírusnak (Trépo, 2014). Körülbelül 500,000–1,2 millió ember haláláért felelős, elfoglalva ezzel a 10. helyet a világ vezető halálokainak rangsorában (He et al., 2016).

4.2.2. Fertőződés

Azokban az országokban, ahol a HBV előfordulása magas arányú, a fertőzés általában az élet korai szakaszában következik be, amely egész életen át tartó krónikus fertőzéshez és a vírus hordozásához vezet. Az élet későbbi szakaszában a fertőződés általában akut, öngyógyuló betegség, melyet vírusürítés követ, illetve ritkább esetben májelégtelenség léphet fel. A HBV átviteli útja elsősorban a véren és a testváladékokon keresztül zajlik, és magában foglalja a perinatális és a korai csecsemőfertőzést (anyáról gyermekekre), valamint a nemi és

parenterális módokat is. A vírus a fejlődő országokban leggyakrabban szexuális úton terjed (horizontális átvitel) (Kondili et al., 2006).

Magyarországon a HBV-vel fertőzöttek száma a teljes populációnak kevesebb mint 2%-át teszik ki (Takács et al., 2009).

4.3. A hepatitis B klinikuma

4.3.1. Az akut hepatitis

Körülbelül a HBV fertőzöttek kétharmadának csak enyhe tünetei vannak, vagy aszimptomatikus és szubklinikai a fertőzés, amely így általában felderítetlen marad. Körülbelül a HBV-pozitív felnőttek 1/3-ánál alakulnak ki a hepatitisre jellemző tünetek, amelyek a hányinger, a sárgaság és néha heveny májelégtelenség. A klinikai kórkép kialakulásához általában 2–3 hónap szükséges, és a tünetek a jelentkezésük után 1–6 hónapig is fennmaradhatnak. Tapasztalatok alapján elmondható, hogy a lappangási idő korrelál a fertőződés mértékével. Akut HBV-nél a szérum alanin amino-traszferáz (ALT) szintje megemelkedik, és magas HBsAG és HBV DNS szint detektálható. A preictericus szakasz néhány naptól akár több hétig is eltarthat, amelyet sárgaság és sötét vizelet megjelenése követ. A fulmináns hepatitis kialakulását jellemzően láz, hasi fájdalom, hányás és a sárgaság hirtelen megjelenése, majd dezorientáció, zavartság és kóma követ (Liang, 2009).

4.3.2. A krónikus hepatitis

A kezeletlen krónikus hepatitisben szenvedő betegek 25%-a a HBV szövődményeibe és/vagy HCC következtében hal meg, és ez a szám 50%-ra nő, ha csak a férfi populációt tekintjük (Yuen et al., 2018). A krónikus hepatitisben szenvedő betegek prognózisa általában közvetlenül összefügg a betegség lefolyásának súlyosságával. Az 5 éves túlélési arány kb. 50% krónikus hepatitisben és májchirrosisban szenvedők esetében. Ezen betegek közül sokan tünetmentesek vagy nem specifikus tüneteik vannak, mint a fáradtság, illetve hasi diszkomfort érzés. Súlyosabb esetekben sárgaság, perifériás stigmák, tenyér erythema, splenomegalia és bűzös lehelet, valamint izzadság jelenhetnek meg. Előrehaladottabb májchirrosisban ascites, perifériás ödéma, encephalopathia és emésztőszervi vérzés figyelhető meg.

A krónikus HBV betegek egyharmadánál végső soron a betegség szövődményei okozzák a halált, mint a májcirrhosis (**2. ábra**), végstádiumú májelégtelenség és a hepatocelluláris carcinoma kialakulása (Liang, 2009).



2. ábra: Májcirrhosis makroszkópos megjelenése humán páciensben (Martin M. Rotker - Science Photo Library)

4.3.3. Extrahepatikus hepatitis B-fertőzés

A hepatitis B extrahepatikus megjelenése 1–10% a fertőzöttek között. A betegség kiváltója lehet a serum sickness-like reaction-nek (SSLR), akut nekrotizáló vasculitisnek, membranous glomerulonephritisnek és az ún. Gianotti-Crosti szindrómának. Bár a rendellenességek patogenezise nem tisztázott, feltételezzük, hogy az immunkomplex által közvetített kórképek a magas HBV antigénszint jelenlétéhez kapcsolódnak (Liang, 2009).

4.4. Orthohepadnavírusok

4.4.1. Történet

Az erdei mormota hepatitis vírusa (WHV) volt az első hepadnavírus, amely egy, a főemlősök rendjébe tartozó fajban fordult elő. Ezt a vírust már az 1960-as években is tanulmányozta Robert Synder, aki azt vette észre, hogy a philadelphiai állatkertben élő mormoták leggyakrabban hepatocellularis carcinomában pusztulnak el, amit hepatitis, májsejt pusztulás és regeneráció követ. 1978-ban Summer és munkatársai izolálták a HBV-szerű vírust, amiben hasonlóan körkörös és részlegesen duplaszálú DNS-t azonosítottak (Robinson et al., 1984).

4.4.2. Rágcsáló vírusok

4.4.2.1. *Ground squirrel hepatitis virus - GSHV*

A WHV felfedezését követően számos új fajt izoláltak. 1980-ban Marion és munkatársai számoltak be a GSHV (ground squirrel hepatitis virus) sikeres izolálásáról, miközben HBV-szerű vírusokat kerestek a kaliforniai mormota rokonainál (kaliforniai ürge, *Otospermophilus beecheyi*). A Stanford Egyetem kampuszáról vett minták 50%-ában találtak olyan vírust, amelynek ultrastruktúrája és antigén tulajdonságai nagyon hasonlóak voltak a HBV-hoz. Ezeket a virion DNS-polimeráz aktivitásának vizsgálatával állapították meg (Marion et al., 1980). A kutatási eredmények azt is feltételezték, hogy a tesztek nem elég specifikusak ahhoz, hogy kimutassanak egy alacsony fertőzöttségi szintet, így elképzelhető, hogy a kapottnál jóval magasabb volt a valós fertőzöttségi arány. Mivel az állatokat visszaengedték a vadonba, és további vizsgálatokat nem végeztek, így a hepatocellularis carcinomával és egyéb májváltozásokkal nem tudták összefüggésbe hozni a vírus jelenlétét. Későbbi vizsgálatok viszont egyértelműen kimutatták, hogy mind a GSHV, mind a WHV hajlamosító oknak bizonyul a HCC kialakulásában (Rivkina et al., 1994).

4.4.2.2. *Chinese shrew hepatitis virus - CSHV*

2013 és 2018 között 449 cickányt vizsgáltak meg a kínai Hubei és Zheijang tartományokból, valamint Longwan körzetből (Jacquet et al., 2018). Összesen négy fajt vizsgáltak három családból, és a májszövetből vett mintákban három cickányfajnál bukkantak rá egy új hepadnavírusra, amit shrew hepatitis B virusnak (SHBV) neveztek el. A SHBV genomstruktúrája megegyezett a többi orthohepadnavíruséval, de erősen divergens volt a

nemzetség bármely ismert tagjához képest, amit a körülbelüli 50%-os nukleotid eltérés magyaráz.

A korábban felfedezett, denevérekben megtalálható orthohepadnavírusoknál azt a javaslatot hozták, hogy a 20%-nál nagyobb genomdivergenciával rendelkező vírusok és egy új gazdafaj szükséges ahhoz, hogy új vírushozzánk létre. A fenti tanulmányban leírt vírus genetikailag eléggé különböző ahhoz, hogy az *Orthohepadnavirus* nemzetség új fajának lehessen tekinteni (Nie et al., 2014).

4.4.3. Denevér vírusok

Az orthohepadnavírusok közül a főemlősök és a denevérek jelentik a fő vírus rezervoárokat. A bat hepatitis vírus (BtHV) nagyon változékony, és természetes úton több mint 77 denevér fajból mutatták ki, legalább 5 eltérő családból, amely tartós vírushordozásra utal (Jacquet et al., 2018). Törzsfajlódási kutatások eredményei alapján feltételezhető, hogy a főemlősök hepadnavírusai a denevér hepadnavirusaiból származtathatók (Lei et al., 2019).

4.4.3.1. Long-fingered bat hepatitis B virus - LBHBV

2013-ban Myanmarban 6 denevér faj (*Miniopterus fuliginosus*, *Hipposideros armiger*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Myotis chinensis*, *Megaderma lyra*, *Hipposideros fulvus*) egyedeit vizsgálva egyedül a *Miniopterus fuliginosus*-ban találtak egy olyan, eddig ismeretlen vírust, amely genomjának hosszúságában (3200 bp) közel áll a főemlős hepatitis vírusához, de kisebb volt, mint a rácsáló hepatitis vírusok (3300 bp). A genomszerkezetet vizsgálva az eredmények azt mutatták, hogy a BtHV-k tartalmazzák ugyanazt a körkörös és kompakt genomot, mint más orthohepadnavírusok, és megtalálható bennük a hepadnavírusokra jellemző 4 ORF régió is (He et al., 2013). A következő években számos ország denevér fajait vizsgálták (Panama, Myanmar, Kína, Gabon) (He et al., 2014) és szinte minden országban újabb hepadnavírus került leírásra. A 2013-ban leírt TBHBV (tent-making bat hepatitis B virus) képes volt *in vitro* emberi hepatocytákat fertőzni, humán NTCP (Na⁺-taurkolát kotranszporter) segítségével (Jacquet et al., 2018).

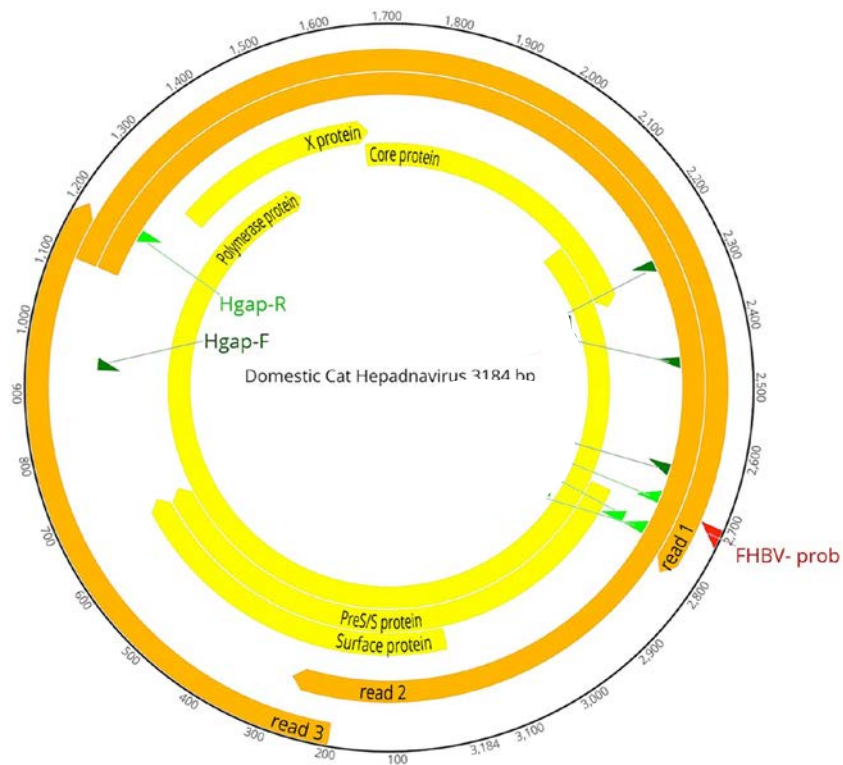
Összegzésképpen elmondható, hogy a széles genetikai diverzitással rendelkező BtHV-k az orthohepadnavírusok új csoportja, melyek segítséget nyújthatnak jobban megérteni a HBV terjedését, valamint megelőzésének lehetőségeit.

4.4.4. Domestic cat hepatitis B virus

2018 májusában Aghazadeh és munkatársai egy hét éves, ivartalanított kandúr macskát vizsgáltak, aminél súlyos testtömegcsökkenést és hányást tapasztaltak. A fizikális vizsgálat során egy tömött képletet találtak a hasüregben. Az idegen képletből vékonytű aspirációval citológiai mintát vettek, amely nagy sejtes lymphomának felel meg. Az állat euthanáziája után a tulajdonosok beleegyeztek a tetem kórbonctani és kórszövettani vizsgálatába. A polimeráz láncreakciós (PCR) és szerológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a macska FIV-pozitív volt. A vírus pontos azonosítása és genetikai vizsgálata során 8 HBV-re jellemző szekvenciát is találtak. Az új hepadnavírus jelenlétének bizonyítására a lefagyasztott neoplastikus szövetmintából újabb vizsgálatot végeztek, aminél kifejezetten a hepadnavírusokra jellemző ORF régiókat keresték. Az eredmények alapján bizonyították, hogy az *Orthohepadnaviridae* családon belüli új vírust izoláltak (**3. ábra**) (Aghazadeh et al., 2018).

További molekuláris vizsgálatokat végeztek felnőtt macskák teljes véréből Ausztráliában és Olaszországban. Az eredmények alapján feltehető hasonlóság mutatkozik a humán megbetegedésekkel, ahol a HIV (human immunodeficiency virus) mellett a HBV mint társzórokozó feltűnik (Aghazadeh et al., 2018; Lanave et al., 2019)

Egy 2019-es publikációban 4 országból vizsgáltak meg macska máj mintákat. Az eredmények alapján a krónikus hepatitisben érintett egyedek mintáinak 43%-ban találtak DCH DNS-t, és a carcinomák (**4. ábra**) esetében 28%-ban volt DCH-pozitív a minta (Pesavento et al., 2019).



3. ábra: A DCH genomszerkezete

A teljes genom 3184 bp hosszúságú. Sárgával a strukturális fehérjéket jelöltük (polimeráz, magprotein, X protein, felszíni és S fehérje). Zöld színnel tüntettük fel a vizsgálatunk során használt primerek pozícióját (Hgap-F és Hgap-R) (Lanave et al., 2019).



4. ábra: Hepatocellularis carcinoma macskában

Ebben az esetben még nem történt DCH-fertőzésre irányuló vizsgálat.

5. Anyag és módszer

5.1. Mintagyűjtés

A kutatásunk alapjául szolgáló vérmintákat a budapesti Állatorvostudományi Egyetem (ÁTE) Kórélettani és Onkológiai Laboratóriuma biztosította az ÁTE Kisállatklinikájának beteganyagából. 2020 májusa és szeptembere között történt a mintagyűjtés a klinikára változatos kórelőzménnyel érkezett macskákból. Vizsgálataink során csak ún. surplus materialt (minta maradékot) használtunk fel, a vérvételekre kizárólag egyéb okból került sor a klinikán. Csak azokat a vérmintákat vizsgáltuk, amikből viszonylag széleskörű hematológiai és biokémiai vizsgálatokat végeztek (a vérkép mellett minimum szerepeltek az alap májparaméter értékek). A teljes vérmintákat 1–3 napig 4°C-on tárolták, majd átkerültek a Patológiai Tanszékre, ahol a további vizsgálatokig -80°C-on tároltuk őket.

A négy hónap alatt összesen 145 vérminta érkezett be az ÁTE Kisállatklinikájáról. Korábbi tanulmányokban megfigyelték, hogy a mintákban, a DCH vírussal fertőződött egyedekben, bizonyos májparaméterek (ALT, GGT - gamma-glutamil-transzferáz) szignifikánsan megemelkedtek. Továbbá a DCH-pozitív macskák jelentős részénél elvégzett FIV-FELV teszt, FIV-pozitív eredménnyel zárult (Aghazadeh et al. ,2018; Lanave et al., 2019). Így a hepatitiszrel fertőzött macskák véréből FIV-FeLV PCR vizsgálatot is végeztünk.

5.2. Nukleinsav kinyerése

A vizsgálatunk első lépése a nukleinsav extrakciója, amit QIAcube automatában (Qiagen, Hilden, Németország) végeztünk, QIAmp cador Pathogen Mini Kit (Qiagen) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A folyamat elején a vérmintához AVL puffer kerül, majd inkubáció során a sejtes alkotóelemek szétesnek, feltárva ezzel a sejteket. Ezután a mintához 96%-os etil-alkohol kerül, hogy a sejtmembránok további károsításával kijusson a nukleinsav, ami egy speciális szeparáló oszlop szilika membránjára kötődik. Az extrakció utolsó lépése a mosási fázis, ami során AW1 és AW2 oldatokkal lemossuk a membránokon lévő maradványanyagokat, és végül egy elúciós puffer hozzáadásával a nukleinsavat eppendorf csőbe oldjuk a membránról. A felhasználásig ezt az elegyet -80°C-on lehet tárolni.

5.3. Polimeráz láncreakció

A PCR-t a molekuláris biológia számos területén alkalmazzák 1985 óta. Felhasználható rokoni viszonyok megállapítására, evolúciós vizsgálatokra, genetikai betegségek kimutatására, patogén vírusok és baktériumok felderítésére, és különböző fertőző ágensek megkülönböztetésére. Több fajta PCR módszert ismerünk. A leggyakrabban használt PCR típusok: a standard PCR, amit néhány nukleotid változás, illetve pontmutációk felderítésére használunk; multiplex PCR, amit egyes génszakaszok párhuzamosan történő amplifikációjára és kimutatására használunk, long PCR-rel a hagyományos PCR termékeknél nagyobb termékeket tudunk amplifikálni, és a kvantitatív vagy valósídejű PCR, ahol a mintában lévő örökítő anyag mennyiségi meghatározása válik lehetővé (Balogh et al., 2011).

A PCR eljárás lényege, hogy a mintában jelenlévő nukleinsav szekvenciát egy polimeráz enzim segítségével, a megfelelő adalék anyagok és a megfelelő hőmérséklet periodikus változtatásának biztosításával, amplifikáljuk. Minden egyes ciklus végén a DNS mennyisége megkétszereződik, így a 30. ciklus végén 10^9 -szerese a DNS mennyisége a kezdetihez képest. A PCR reakció komponensei az izolált nukleinsav templát, ami a keresett nukleinsav szekvenciát tartalmazza pozitív esetben. A következő a DNS-dependens DNS-polimeráz, amely lemásolja a megfelelő szakaszt. Szükséges két primer is, melyek meghatározzák az amplifikálandó szakasz elejét és végét. A puffer a megfelelő kémiai reakcióközeget szolgáltatja a polimeráz számára. A puffer feladata a Mg^{2+} ion koncentráció (ami a T_{aq} -polimeráz enzim működését biztosítja), az optimális pH és az adalékanyagok megfelelő sűrűségének biztosítása. Végül pedig nukleotidok (dNTP) is szükségesek, amelyekből a polimeráz felépíti a DNS-t.

A PCR reakció első lépése a DNS szál szétválasztása, ami magas hőmérsékleten történik, majd az ideális hőmérsékletre való lehűtése után a primerek be tudnak kapcsolódni a nukleinsav komplementer szakaszához. Ezt követően egy újabb felmelegítési stádium következik $70-80^{\circ}C$ közé, amikor a polimeráz enzim, aminek ezen a hőmérsékleten a legmagasabb a nukleotid átviteli száma, a dNTP beépítésével a beépült oligonukleotid primerek utáni szekvenciát meghosszabbítja. A PCR folytatása ezen három folyamat repetitív ismétléséből áll.

5.4. Real-time PCR

A real-time vagy valós idejű PCR-t az 1990-es évek óta használjuk. Az akkoriban kifejlesztett fluorometriás mérő eljárás lehetővé tette a PCR reakciók valós idejű kiértékelését. A fluorometriás eljárás lényege, hogy fluoreszcens molekulák fluoreszcenciáját kvantitatív úton tudjuk vizsgálni. Általában olyan fluoreszcens festékeket használunk, amelyek a kettős szétvált DNS szálakhoz nem specifikusan kötődnek (Dorak, 2006). A SYBR Green I, YO-PRO-1, BEBO, SYTO9, EvaGreen (Radvánszky et al., 2006) ilyen festékek. Valós idejű PCR-nél a detektálást fluorofórral végezzük, ami a nukleotidlánchoz kötődik, ezáltal fényt bocsájt ki, amit mérni tudunk. A hagyományos PCR eljárásban a kapott amplikonokat a reakció befejezése után végpont analízissel mérik, míg a real-time PCR-rel minden ciklus után a keletkező termék mennyisége/jelenléte meghatározható. Ezen kívül az amplifikáció és a detektálás egy lépésben valósul meg, kevesebb templátot igényel, a reakció érzékenysége lényegesen magasabb, továbbá felbontó képessége duplája a hagyományos PCR-nek (Nagy, 2014).

5.5. SYBR Green

A SYBR Green festéket a korábban említett real-time PCR-nél használják. A fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkező festék bekapcsolódik a hibridizált DNS kettős spiráljához, és a kapcsolódást fényfelvillanás követi. Ezt tudjuk detektálni a PCR-ben történő ciklikus reakciókkal párhuzamosan. A fény erőssége egyenes arányban áll a reakcióban jelenlévő DNS-ek számával. Mivel egy mintában általában a keresett nukleinsav kópiaszáma minimális, így 30–40 ciklus kell ahhoz, hogy az ismétlődő reakcióban ez a szám feldúsuljon, így a felvillanások mérhetőek legyenek (Dorak, 2006). SYBR Green szabad festékmolekuláinak fluoreszcenciája elenyésző a festék és a DNS összekapcsolódott fluoreszcenciájához képest, így nem ad aspecifikus jeleket.

5.6. Olvadási görbe analízis

Az olvadási görbe analízisre a PCR vizsgálat ciklusai után kerül sor. A reakcióelegyet lassan 95°C-ra melegítik, így a korábban már összekapcsolódott DNS szálak denaturálódnak. Ennek eredménye, hogy a korábban beépült fluoreszcens festék kiszakad a nukleotidból, és az elegy elveszíti fluoreszcens tulajdonságát, amit detektálni lehetne. A cDNS szál olvadáspontja nagyban függ annak hosszától, illetve az azt alkotó bázispároktól, főleg a guanin-citozin kapcsolódások számától (Radvánszky et al., 2006). Mivel a reakcióelegyben a specifikus

termékek és a nem-specifikus termékek olvadási pontja eltérő, így az olvadási görbe kiértékelésekor számos meredek fluoreszcencia csökkenés tapasztalható. Viszont, ha csak a specifikus PCR termékünk található a mintában, úgy a fluoreszcenciában releváns visszaesést észlelünk.

5.7. Saját PCR vizsgálat

A nukleinsavat tartalmazó reakcióelegy készítéséhez QuantiNova SYBR Green RT-PCR kiten (Qiagen) használtunk. Az elegy tartalmaz 2 µl templátot, 10 µl QuantiNova SYBR Green RT-PCR Master Mixet, összesen 2-2 µl forward és reverz primert, 4 µl RNáz mentes tisztított vizet. A végtérfogat egy-egy csőben 20 µl volt. Ezután a real-time PCR reakció Rotor-Gene Q (Qiagen) készülékben futott. Az elegyet először 95°C-ra melegíti 5 percen át, ekkor történik a denaturáció két szimpla szálú DNS lánccá. A következő 40 ciklusból álló folyamat során ciklusonként váltakozik 95°C 5 másodpercig (amikor a reverz transzkripció folyamata zajlik), majd 60°C 10 másodpercig (ekkor történik a végleges lánccépzés). A protokoll ismétlése során az elongáció során a képződött DNS számát ezzel a képlettel tudjuk kiszámolni: $n \times x^{2a}$. Az általunk használt primerek: Hgap-forward 5'-GTGCTCTGATAACCGTATGCT-3' és Hgap-reverse 5'-CTAGAATGGCTACATGGGGTTAG-3' (Aghazadeh et al., 2018). Minden vizsgálat során használtunk pozitív és negatív kontroll mintákat, amivel biztosítottuk a teszt technikai helyességét. A pozitív kontrollt a Patológiai Tanszék munkatársa, Dénes Lilla tervezte a jelenleg a GénBankban fellelhető macska hepadnavírus szekvenciák összevetésével. Negatív kontrollként RNáz-mentes vizet használtunk templátként.

5.8. FeLV-FIV PCR

A korábban kivont nukleinsav mintákból a DCH jelenlétére irányuló PCR vizsgálatot követően a retrovírusok jelenlétét is vizsgáltuk a DCH-pozitív minták esetén. A FIV end-point PCR előkészítéshez TopTaq Master Kit-et (Qiagen) használtunk a gyártó utasításai alapján a következő paraméterekkel: 25 µL master mix (összkoncentráció: 1× puffer, 200 µM mindegyik dNTP-ből, 1,25 egység DNS-polimeráz/reakció), 0,5 µL forward és reverz primerek (40 µM, végső koncentráció: 0,2 µM), 5 µl CoralLoad koncentrátum (végső koncentráció: 1×), 18 µL RNáz-mentes víz és 1 µl templátot kevertünk össze minden mintához. A hot-start PCR-hez a Genesy PCR Thermal Cyclert (Tianlong) használtuk a következő protokollal: 95°C 15 percig az első szakaszban; 95°C 45 másodpercig és 60°C szintén 45 másodpercig és 72°C 1 percig a második szakaszban (40 ciklus) végül 72°C 15

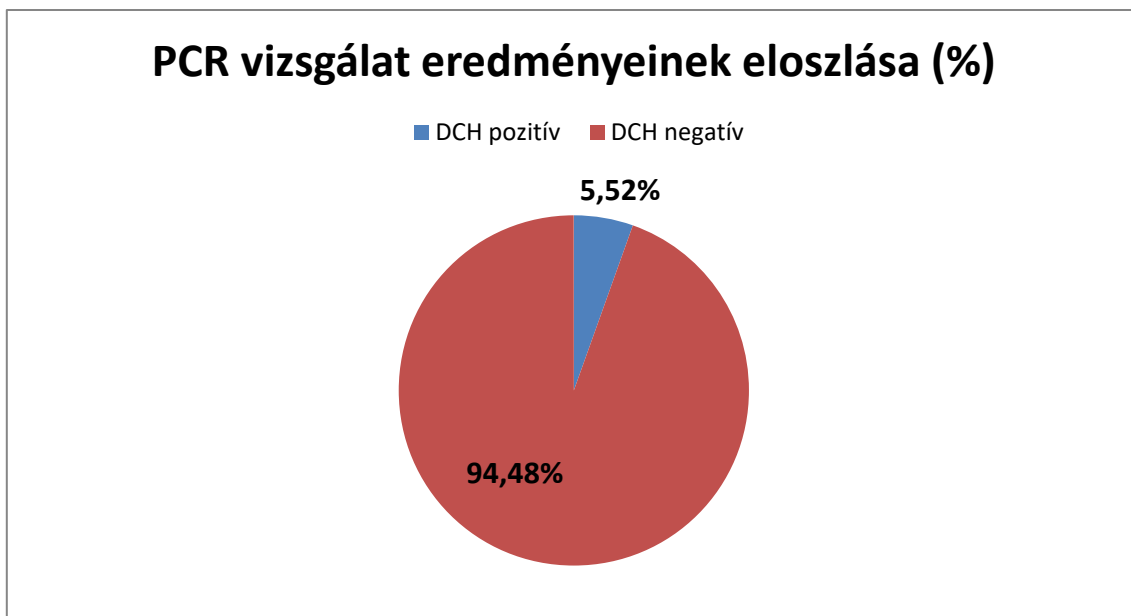
percig a 3. szakaszban. A FIV kimutatásához használt primerek a következők voltak: LTR-sense 5'-GCGCTAGCAGCTGCCTAACCGCAAACCAC-3' és LTR-antisense 5'-GTATCTGTGGGAGCCTCAAGGGAGAACTC-3' (Sutton, 2007).

FeLV kimutatására One Step RT-PCR-t (Qiagen) használtunk, szintén a gyártó utasításai szerint. 5,7 µl RNáz-mentes vizet és 2 µl 5× puffert (végső koncentráció: 1×), 0,4 µl dNTP-keveréket (végső koncentráció: 400 µM/dNTP-ből), 0,4 µl enzimkeveréket, 0,1 µl RNáz inhibitor (végső koncentráció: 5 egység/reakció), 0,2 µl forward és revers primert (40 µM, végső koncentráció: 0,6 µM) kevertünk minden csőben, amihez 0,5 µl templátot adtunk a végén. Termikus körülmények: 50°C 30 percig és 94°C 3 percig a reverz transzkripció szakaszában és kezdeti denaturálás alatt; 95°C 15 másodpercig, 60°C 1 percig és 72°C 1 percig a 2. szakaszban (45 ciklus); 72°C 10 percig az utolsó szakaszban, melyet a 4°C-ra hűtés követett. A FeLV-primerek az alábbiak: LTR-sense 5'-AACAGCAGAAGTTTCAAGGCC-3' és LTR-antisense 5'-TTATAGCAGAAAGCGCGCG-3' (Tandon et al., 2005). Az amplikonok 163 bázispár (FIV) és 150 bp (FeLV) hosszúak voltak. A PCR-termékeket elektroforézissel tettük láthatóvá 1,5% -os agarózgélben.

6. Eredmények

2020 májusától négy hónapon keresztül gyűjtöttünk mintákat az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájáról. A feldolgozott 145 mintából 8 vérminta lett pozitív DCH jelenlétére (5,52%), 137 pedig negatív lett PCR vizsgálattal (**5. ábra**). A pozitív minták a következő kórelőzményi adatokkal érkező macskákból származtak.

- A 9-es számmal jelölt állatot egy hetes étvágytalanság panaszával hozták az ambulanciára. A fizikális vizsgálat során súlyos dehidrátságot, icterust és erősen kitled, unduláló hasat írtak le. Differenciáldiagnózisként a macskák fertőző hashártyagyulladás (FIP) volt feltüntetve. Az állat pár napon belül elhullott a kezelések ellenére.
- A 10-es számmal jelölt egyed idegrendszeri tüneteket mutatott. Nem ismerte fel a gazdáját, szédelgett, imbolygott, azonban minden tünete epizodikus volt. A kezelőorvosa további neurológiai kivizsgálást javasolt.
- A 15-ös számmal jelölt beteg már 2020 januárja óta kezelés alatt állt. A tünetek és vérlaborvizsgálat alapján pajzsmirigy tumort diagnosztizáltak az állatnál. Állapota romlott májusra.
- A 17-es számmal jelölt macskáról nem rendelkezünk pontos kórelőzményi adatokkal, fogászati beavatkozásra érkezett.
- A 28-as számmal jelölt macska általános állapota kiváló volt beérkezéskor, éves általános vizsgálatra hozták. A hasi ultrahang vizsgálat során több cisztát találtak meg az állat jobb és bal veséjén egyaránt.
- A 31-es számmal jelölt állatot ivartalanításra és általános kivizsgálásra hozták. Befogadott állat, egy többmacskás kolóniában él.
- A 32-es számmal jelölt macskával fogászati kezelésre érkeztek súlyos fokú fogkövesség miatt.
- A 33-as számmal ellátott egyed egy hete szenvedett balesetet a vérvizsgálat előtt. A CT (computer tomographia) felvétel alapján a bal csípőlapáttól ventrolateralisan csontfragmentum volt észlelhető, illetve a bal glutealis régiót érintő, feltehetően traumás eredetű, hematoma/abscessus volt látható.

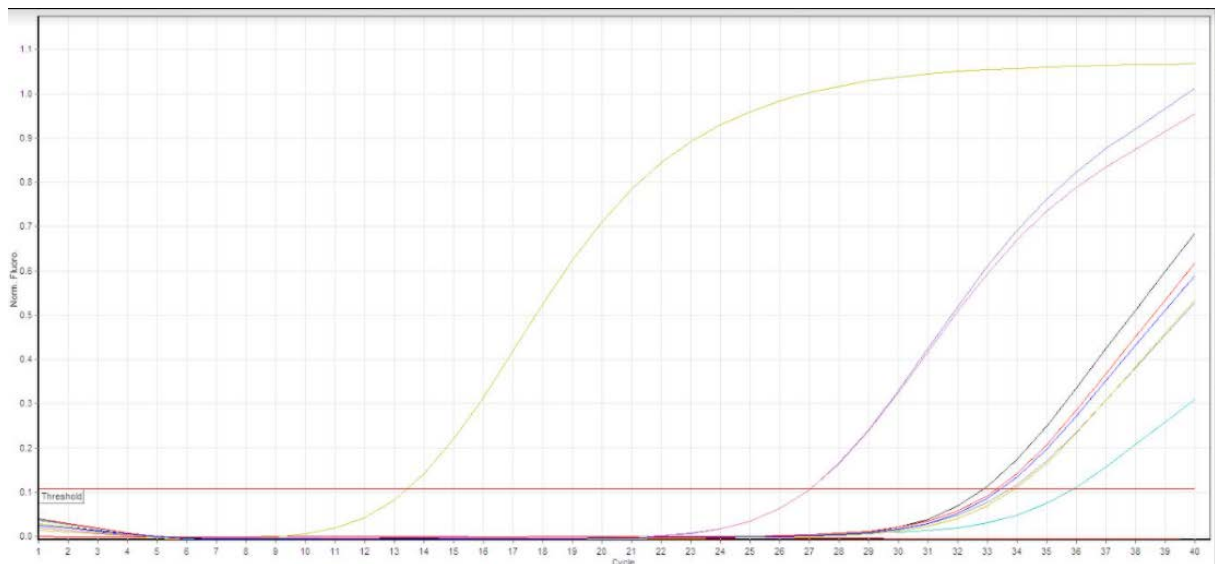


5. ábra: A PCR vizsgálat eredményeinek százalékos eloszlása

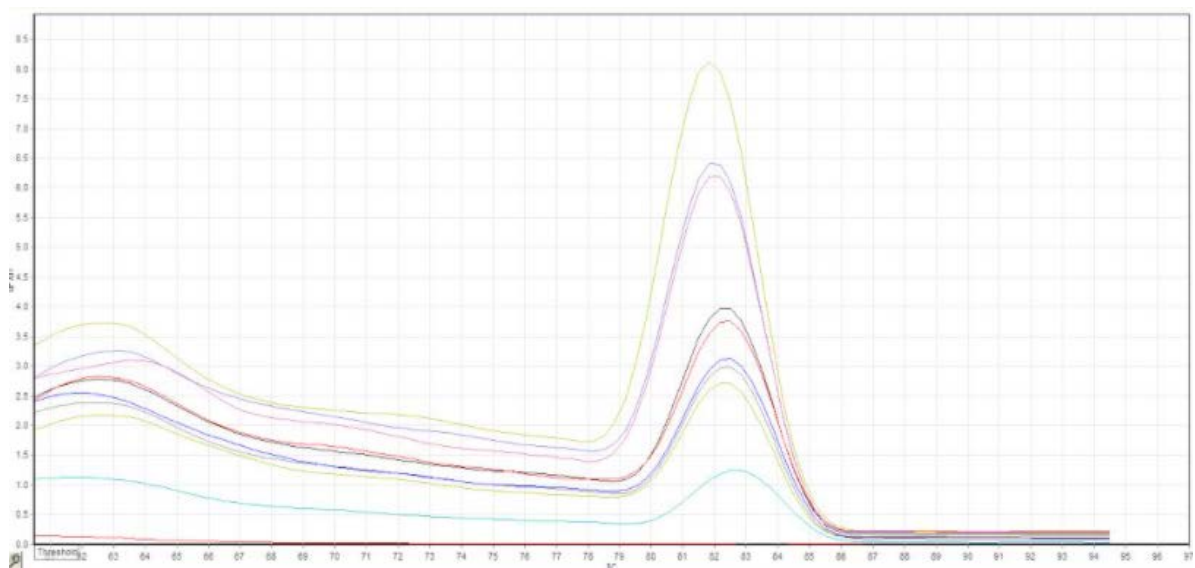
DCH: domestic cat hepadnavirus

A real-time PCR vizsgálatról látható egy logisztikus görbe (**6. ábra**), valamint egy olvadási görbe (**7. ábra**; mindkét esetben a pozitív és negatív kontroll minták jelenlétében). A mintagyűjtés során kizárólag arra voltunk tekintettel, hogy a levett vérminták laborvizsgálata során megtörtént-e a hematológiai és alap biokémiai vizsgálat, beleértve a főbb májparaméterek mérését. Emiatt igen heterogén lett a vizsgált populáció. Az alábbiakban néhány összefüggésre kerestünk választ, ezen eredményeket mutatjuk be.

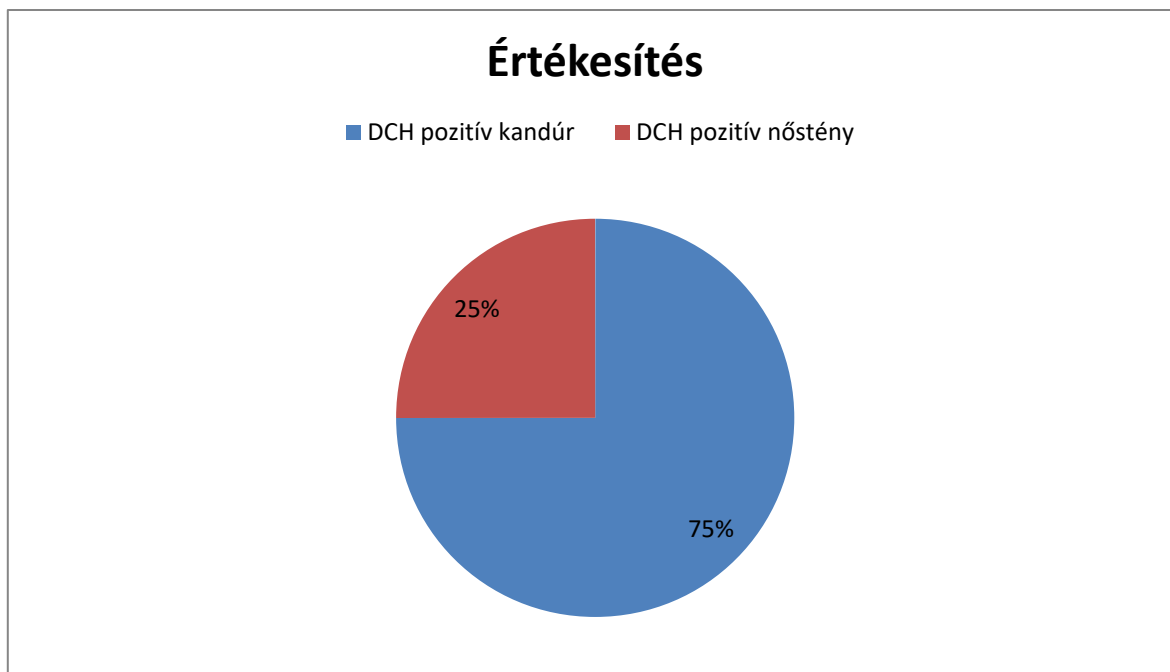
A vizsgált állományban 71 kandúr (48,97%) és 74 nőstény (51,03%) volt, így a nemek megoszlása ideálisnak mondható (**8. ábra**). A 8 PCR-pozitív egyedből 6 (75%) volt kandúr és 2 (25%) nőstény. Az összes mintából 1 macska volt bizonyítottan FeLV-pozitív (de ugyanez az egyed nem volt fertőzött hepadnavírussal), míg a DCH-pozitív állományból PCR vizsgálattal nem volt kimutatható sem FIV, sem FeLV jelenléte. A macskák közül 67 egyednél volt megfigyelhető az ALT emelkedése, és 1 egyednél találtunk GGT emelkedést. A nőstények közül 39, míg a hímeknél 28 esetben detektáltunk emelkedett ALT értéket, és csupán egy kandúrnál tapasztaltunk GGT emelkedést. A hepadnavírussal fertőzött macskáknál nem találtunk májparaméter eltérést a csatolt vérlabor eredmények alapján.



6. ábra: A DCH-pozitív minták ábrázolása logisztikus görbén, real-time PCR vizsgálat



7. ábra: A DCH-pozitív minták ábrázolása olvadási görbével, real-time PCR vizsgálat



8. ábra: A DCH-pozitív macskák ivari százalékos megoszlása

DCH: domestic cat hepatitis virus

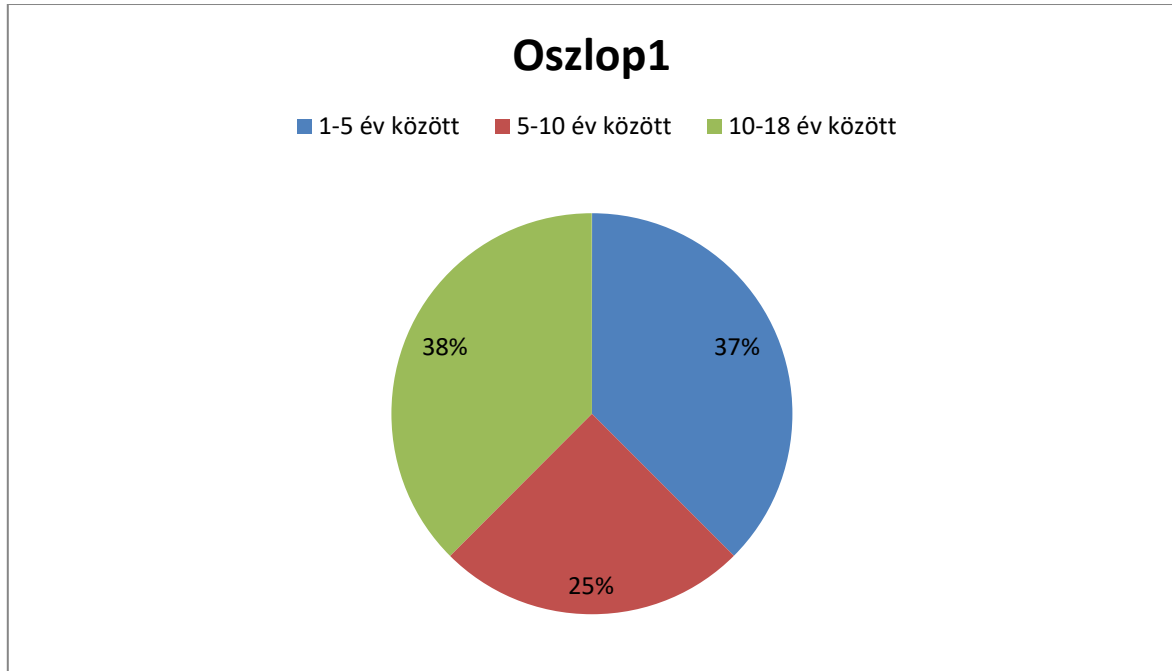
Az alábbi táblázatban (**1. táblázat**) a fontosabb hematológiai és biokémiai paramétereket mutatjuk be abban a 8 macskában, amelyek eredménye pozitív lett real-time PCR-rel.

1. táblázat: A DCH-pozitív macskák fontosabb vérvételi paraméterei

Piros színnel jelöltük azokat a paramétereket, amelyek a referenciaértéktől eltérést mutattak (minden esetben a referenciánál magasabbak voltak).

Azonosító	Ivar	Kor (év)	Hematokrit (PCV) 0,3-0,45 (l/l)	Fehérvérsejt (WBC) 6,0-15,0 (G/l)	Összfehérje (TP) 60-80 (g/l)	ALT <60 (U/l)	ALKP 40-190 (U/l)	Kreatinin 50-160 (μmol/l)
9	hím	1,5	0,15	7,6	55,5	50	45	38
10	hím	6	0,46	11,6	71	54	31	126
15	nőstény	16	0,21	15,9	69,3	51	34	434
17	hím	14	0,39	11,4	76,3	59	94	169
28	hím	8	0,37	7,3	68	40	56	168
31	hím	~1	0,34	28,7	77	37	19	116
32	nőstény	11	0,47	9,1	84	49	55	145
33	hím	4	0,23	9,7	68	34	25	94

A **9. ábra** mutatja a DCH-pozitív macskák korbeli megoszlását. Közülük 3 állat volt 1–5 éves kor között, 2 volt 5–10 éves kor között és 3 10–17 éves kor között.



9. ábra: A DCH-pozitív egyedek közötti százalékos kormegoszlás

DCH: domestic cat hepadnavirus

7. Megbeszélés

A humán hepatitis B vírussal körülbelül 257 millió ember fertőzött világszerte, és 887.000 halálos áldozatot követel a megbetegedés évente (WHO, 2020). A fertőzés által okozott főbb elváltozások között említhetjük a hepatocelluláris carcinomát és a májdystrophiát, májcirrhosist. A HBV a *Hepadnaviridae* család *Orthohepadnavirus* nemzetségébe tartozó vírus, amit 60 éve fedezték fel az állatvilágban, mormotáknál. Azóta izolálták főemlősökből, denevérekből, rágcsálókból és madarakból. 2018-ban Auszáliában egy lymphomás macska szövetszaporulatából kimutattak egy addig ismeretlen vírust, a további PCR vizsgálatok azonban megerősítették, hogy az állatban található kórokozó szintén a *Hepadnaviridae* család tagja. A további, kiterjedtebb vizsgálatok eredménye alapján került leírásra a macskák hepatitis B vírusa. A további kutatások valószínűsítik, hogy DCH-fertőzés esetén hasonló elváltozások fordulhatnak elő macskában, mint hepatitis B fertőzés esetén emberben, valamint, hogy hasonló analógián alapulva fordul elő HIV és HBV ko-infekció, mint FIV és DCH együttes fertőzöttség (Aghazadeh et al., 2018).

2019-ben Olaszországban 390 macskából származó vérsavó mintát vizsgáltak hepadnavírus jelenlétére, amiből 10,8% mutatott pozitivitást DCH vírusra, és a fertőzött egyedek 17,8% mutatott olyan tüneteket, amelyeknek fertőző betegség állhat a hátterében. A vírus genomszekvenciája 97%-os hasonlóságot mutatott az Ausztráliában izolált vírussal. Ezen felül több állatnál találtak májparaméter elváltozást a biokémiai laboreredményekben, ami párhuzamba állítható a humán hepatitis B vírus okozta elváltozásokkal (Pesavento et al., 2019).

2019-ben formalin-fixált egészséges, illetve patológiás elváltozásokat mutató máj biopátumokat vizsgáltak egy kutatás során. Az eredmények azt mutatták, hogy a krónikus hepatitisben szenvedő egyedek 43%-a, a hepatocellularis carcinomával érintett betegek 28%-a volt pozitív a házi macska hepatitis B vírusának jelenlétére irányuló PCR vizsgálat során. Az eredményük alátámasztja azt a hipotézist, miszerint a DCH és a HBV vírussal való fertőzöttség okozta klinikai kórképek között feltételezhető a hasonlóság (Lanave et al., 2019).

Az általunk végzett vizsgálatok eredményeiből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a házi macska hepatitis B vírusa jelen van Európán belül Magyarországon is. Az országban először mutattuk ki sikeresen a macskák hepadnavírusát vérmintákból real-time PCR módszerrel, a most vizsgált minták között 5,52%-os előfordulást mértünk. Ez az előfordulási

arány összhangban áll azokkal a korábbi kutatási eredményekkel, amiket az eddig megjelent szakirodalmi adatok említenek.

Az általunk vizsgált egyedekben egyelőre nem volt bizonyítható a korábbi tanulmányokban felállított hipotézis, miszerint a DCH hasonló klinikai formában jelenne meg a macskákban, mint a HBV a humán esetekben, valamint a retrovírussal való együttes fertőzés sem volt kimutatható ezen 8 pozitív minta esetén. A kandúrok között magasabb arányban tapasztaltunk fertőzöttséget, de ez sem nevezhető egyelőre szignifikánsnak. A korcsoportok vizsgálata során sem kaptunk egyértelmű választ, vajon valamelyik korosztályt inkább érinti-e a DCH-fertőzés, vagy mikor jelenik meg először, itt is szükséges a vizsgált populáció kiszélesítése, lehetőség szerint a későbbiekben a DCH-pozitív macskák utókövetésével.

A mintaszám egyelőre viszonylag alacsony, jelenleg ez egy nagyobb volumenű kutatás alapozó fázisa, így a mintagyűjtés és vizsgálatok folytatásával a fenti adatok még változhatnak, megjelenhetnek szignifikáns eredmények is. Reméljük továbbá, hogy a későbbiekben filogenetikai kutatással megállapítható lesz az országban jelen lévő vírustörzsek eredete, esetleges evolúciós kapcsolata a már izolált törzsekkel. Terveink szerint az ebben a kutatásban, illetve a később bevont minták között talált PVR-pozitív mintákat Sanger szekvenálással fogjuk vizsgálni.

8. Összefoglalás

2018-ban Ausztráliában jegyezték fel az első orthohepadnavírust házi macskában. További kutatások kimutatták, hogy a vizsgált egyedek között szignifikánsan magasabb a májdystrophia és a hepatocelluláris carcinoma előfordulási aránya, emellett gyakran előfordult koinfekció macska immundeficiencia vírussal (FIV). Kutatásunk célja, hogy megvizsgáljuk, a magyarországi macska populációban fellelhető-e a macskák hepadnavírusa, illetve, hogy a korábban publikált tanulmányokkal korrelációban lesz-e az a megállapítás, hogy a vírussal fertőzött állatok nagy százalékában tapasztalhatunk eltérést a májparaméterekben. A kutatásban részt vevő egyedeket nemtől, fajtától, kortól és betegségtől függetlenül választottuk, biztosítva így a minél szélesebb lefedettséget. Később két csoportra osztottuk az állatokat: ahol a vérlabor vizsgálatban májparaméter emelkedést tapasztaltak, illetve ahol nem. Vizsgálatunk módszere a teljes vérből történő nukleinsav izolálást követő real-time polimeráz láncreakciós vizsgálat (real-time PCR). A vizsgált 145 vérmintából 8 esetben (5,52%) találtunk macska hepadnavírust. Ez az előfordulási arány összhangban áll azokkal a korábbi kutatási eredményekkel, amiket az eddig megjelent szakirodalmi adatok említenek. A jelenlegi minták vizsgálata során nem találtunk összefüggést a DCH jelenléte és vérlaborbeli májparaméter emelkedés, vagy retrovírusos fertőzés között. A későbbiekben a most izolált szekvenciákat Sanger szekvenálással fogjuk vizsgálni, majd összevetjük a GénBankban található hepadnavírus szekvenciákkal.

9. Summary

In 2018, the first orthohepadna virus was isolated in domestic cats in Australia. Further research has shown that the incidence of liver dystrophy and hepatocellular carcinoma was significantly higher in addition to frequent co-infection with feline immunodeficiency virus (FIV). Our research aims to examine whether feline hepadnavirus can be found in the Hungarian cat population, and whether the finding will be in correlation with previously published studies that a large percentage of animals infected with the virus may show deviation in liver parameters. The cats involved in the research were chosen independently of sex, breed, age, and of other diseases, thus ensuring the widest possible coverage. Later we divided the animals into two groups, whether there was an increase in liver parameters or not. The method of our study, after nucleic acid extraction from whole blood, was real-time polymerase chain reaction assay (real-time PCR). Out of 145 feline whole blood samples, we found 8 PCR-positive cases (5.52%). This result is in correlation with previously published scientific data. Unfortunately, now we could not find any correlation with elevated liver parameters in bloodwork, or any hepatic lesion, nor parallel retroviral infection in DCH-positive patients. Continuing this study, we will analyse the isolated DCH-strains with Sanger sequencing, then we will make a phylogenetic study comparing our sequences to those can be found currently in the GenBank.

10. Irodalomjegyzék

Aghazadeh, M., Shi, M., Barrs, V., Mcluckie, A., Lindsay, S., Jameson, B., Hampson, B., Holmes, EC., Beatty, J. 2018: A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia. *Viruses*, 10(5), p. 269.

Balogh, I. Dr., Kappelmayer, J. Dr., Tözsér, J. Dr., 2011: Molekuláris diagnosztika, Debreceni Egyetem

Dorak, M.T. (szerk) 2006: Real-time PCR. New York, Taylor & Francise group

Drexler, JF., Geipel, A., Konig, A., Corman, VM., Van Riel, D., Leijten, LM., Bremer, CM., Rashce, A., Cottontail, VM., Maganga, GD., et al. 2013: Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to *hepatitis B virus* and capable of infecting human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*; 110(40):16151-6.

He, B., 2016: History and Global Burden of Viral Hepatitis. *Digestive Diseases*, 34(4), p. 293–302.

He, B., Fan, Q., Yang, F., Hu, T., Qiu, W., Feng, Y., Li, Z., Li, Y., Zhang, F., Guo, H., et al. 2013: Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar. *Emerging Infectious Diseases* (4): p. 638–640.

He, B., Zhang, F., Xia, L., Hu, T., Chen, G., Qiu, W., et al. 2014: Identification of a novel orthohepadnavirus in pomona roundleaf bats in China. *Archives of Virology*, 160(1), p. 335–337.

Jacquet, S., Pons, JB., De Bernardo, A., Ngoubangoye, B., Cosset, F.-L., Régis, C., Etienne, L., Pointer, D. 2018: Evolution of Hepatitis B Virus Receptor NTCP Reveals Differential Pathogenicity and Species-Specificities of Hepadnaviruses in Primates, Rodents and Bats. *Journal of Virology*. 1; 93(5)

Kondili, LA., Genovese, D., Argentini, C., Chionne, P., Toscani, P., Fabro, R., Cocconi, R., Rapicetta, M., 2006: Nosocomial transmission in simultaneous outbreaks of hepatitis C and B virus infections in a hemodialysis center. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 25:527-31.

Lanave, G., Capozza, P., Diakoudi, G., Catella, C., Catucci, L., Ghergo, P., ... Camero, M. 2019: Identification of hepadnavirus in the sera of cats. *Scientific Reports*, 9(1).

Lei, S.-C., Xiao, X., Liu, J.-W., Han, H.-J., Gong, X.-Q., Zhao, M., Wang, LJ., Qin, XR., Yu, X.-J. 2019: High prevalence and genetic diversity of hepatitis B viruses in insectivorous bats from China. *Acta Tropica*, 199: 105130

Liang, T. J. 2009: Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology*, 49(S5), S13–S21.

Lin, X.-D., Zhou, R.-H., Fan, F.-N., Ying, X.-H., Sun, X.-Y., Wang, W., ... Zhang, Y.-Z. 2014: Biodiversity and evolution of Imjin virus and Thottapalayam virus in Crocidurinae

shrews in Zhejiang Province, China. *Virus Research*, 189, p. 114–120.

Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H., & Robinson, W. S. 1980: A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(5), 2941–2945.

Nagy, B. 2014: A valósidejű PCR módszer alkalmazása a klinikai genetikai gyakorlatban, Budapest

Nie, F.-Y., Lin, X.-D., Hao, Z.-Y., Chen, X.-N., Wang, Z.-X., Wang, M.-R., ... Zhang, Y.-Z. 2018: Extensive diversity and evolution of hepadnaviruses in bats in China. *Virology*, 514, p. 88–97.

Nie, F.-Y., Tian, J.-H., Lin, X.-D., Yu, B., Xing, J.-G., Cao, J.-H., ... Zhang, Y.-Z. 2019: Discovery of a highly divergent hepadnavirus in shrews from China. *Virology*. 531: p. 162–170.

Pesavento, A. P., Jackson, K., Hampson, B., Munday, J. S., Barrs, V. R., & Beatty, J. A., 2019: A Novel Hepadnavirus is Associated with Chronic Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Cats. *Viruses*, 11(10), 969.

Radvánszky J., Resko P., Palffy R., Batova M. 2006: Olvadásgörbe analízis a specifikus PCR végtermékek kiértékelésében, Szlovákia

Rivkina, MB., Cullen, JM., Robinson, WS., Marion, PL. 1994: State of the p53 gene in hepatocellular carcinomas of ground squirrels and woodchucks with past and ongoing infection with hepadnaviruses. *Cancer Research*, 54(20):5430-7.

Robinson, W., Marion, P., & Miller, R. 1984: The Hepadna Viruses of Animals. *Seminars in Liver Disease*, 4(04), p. 347–360

Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk R, Krause G, Ott J., 2015: Estimations of worldwide prevalence of chronic *hepatitis B virus* infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *The Lancet*., 386(10003):1546–1555

Sutton, S., 2007: Detection of *Feline Immunodeficiency Virus* DNA Products in Lytic Versus Latent Infection, Including Early Reverse Transcription, Intermediate Reverse Transcription, and Late Circle Junctions., USA.

Szomor, K. 2009: Hepatitiszt okozó vírusok molekuláris vizsgálata, Budapest

Takács, M., Barcsay, E., Dencs, Á., Hettmann, A., Tresó, B., Csépai, M., Győri, Z., Rusvai, E. 2009: Hepatitis és HIV-markerek vizsgálata magyarországi börtönökben. *Egészségtudomány*; 89(1):108-16

Tandon, R., Cattori, V., Gomes-Keller, MA., Meli, ML., Golder, MC., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. 2005: Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan[®] real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 130.p. 124-132.

Trépo, C. 2013: A brief history of hepatitis milestones. *Liver International*, 34, p. 29–37.

Trépo, C., Chan, H. L. Y., & Lok, A. 2014: *Hepatitis B virus* infection. *The Lancet*, 384(9959), 2053–2063.

Urban, S., Schulze, A., Dandri, M., & Petersen, J. 2010: The replication cycle of *hepatitis B virus*. *Journal of Hepatology*, 52(2), p. 282–284.

WHO, Hepatitis B, URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>, Megtekintve: 2020.09.08

Yuen, M.-F., Chen, D.-S., Dusheiko, G. M., Janssen, H. L. A., Lau, D. T. Y., Locarnini, S. A., ... Lai, C.-L. 2018: *Hepatitis B virus* infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18035.

.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájának és orvosainak, asszisztenseinek a megfelelő minőségű minták levételét és tárolását.

Köszönöm a Patológiai Tanszék munkatársainak, Schönhardt Kittinek és Dénes Lillának a rengeteg segítséget, amit a gyakorlati kivitelezésben nyújtottak.

Hálás vagyok a családomnak, a páromnak és a barátaimnak, amiért mindig a segítségemre voltak, és elviseltek.

A legnagyobb köszönettel pedig Dr. Szilasi Annának tartozom, aki erőt és időt nem kímélve hozzásegített, hogy ez a dolgozat elkészüljön.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott dr. Szilasi Anna, mint témavezető nyilatkozom,
hogy Varga Zoltán állatorvostan-hallgató
Macska kópadnavírus prevalenciája Magyarországon
c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2020. évi
Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2020 év 10. hó 22 nap.

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Patológiai Tanszék
1078 Budapest, Bihari u. 2.
1400 Budapest, Pf. 2.



témavezető

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Varga Zoltán
Elérhetőség (e-mail cím): vzok75@gmail.com
A feltöltendő mű címe: Macska népeduációs prevenciója Magyarországon
A mű megjelenési adatai: 2020
Az átadott fájlok száma: 1

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

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

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

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

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérés biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

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



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

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

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

Budapest, 201 . év¹¹.....hó ...¹⁶...nap


aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

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

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

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