



2005. V. évfolyam 3. szám

Tartalomjegyzék

1. A rosszindulatú daganatok védőoltással és klasszikus nőgyógyászati diagnosztikával történő megelőzése

Berencsi György, Csire Márta, Younes Saleh Ali, Pályi Bernadett, Benczik Márta, Sziller István, Jeney Csaba, Mikala Gábor, Vályi-Nagy István, Melles Márta,

2. Az érlemeszesedés és a mikroorganizmusok

Gönczöl Éva és Kis Zoltán

3. Vírusgenom vizsgálatok szerepe a diagnosztikában

Takács Mária, N. Szomor Katalin, Dencs Ágnes, Kis Zoltán

4. Virális zoonózisok.

Gondolatok egy könyv megjelenése kapcsán.

Ferenczi Emőke



Tisztelt Kollegák! Tisztelt Olvasóink!

A körlevél jelen száma újszerű annyiban, hogy a mikrobiológia minden szakterületének helyet adva, most először virológiai témákat közöl, a Virológiai Főosztály legjelesebb képviselőinek közreműködésével.

Szerencsésen, közel ahhoz az időponthoz, amikor jelentős hiánypótlóként, kiadásra került Prof. Dr. Berencsi György szerkesztésében az „Orvosi Molekuláris Virológia” című kézikönyv, amelyet ezúton is szíves figyelmükbe ajánlunk. A körlevélben megjelenő írások egyikének is, a könyv egyik fejezete adott hivatkozási alapot. Kívánjuk, hogy szakmai körökben váljon közkinccsé az a sok új ismeret és tudás, mellyel a szerzők e könyv fejezeteit megírták.

Szeretnénk tájékoztatni a kollegákat, hogy a Mikrobiológiai Surveillance adatai/táblázatai az OEK honlapon november eleje óta megtekinthetők. (Elérhetőség: www.oek.hu)

Engedjék meg, hogy a karácsonyi ünnepek, s az újesztendő közeledtével kívánjunk minden Olvasónknak József Attila örökérvényű soraival minden jót:

*„Valami nagy-nagy tüzet kéne rakni,
Hisz zuzmarás a város, a berek,
fagyos kamrák kilincsét fölszaggatni
és rakni, adjon sok-sok meleget.*

*Azt a tüzet, ó jaj, meg kéne rakni,
Hogy felmelegednének az emberek!*

Szerkesztőség

A rosszindulatú daganatok védőoltással és klasszikus nőgyógyászati diagnosztikával történő megelőzése*

Berencsi György¹, Csire Márta¹, Younes Saleh Ali¹, Pályi Bernadett¹, Benczik Márta³, Sziller István², Jeney Csaba³, Mikala Gábor⁴, Vályi-Nagy István⁴, Melles Márta¹,

¹ 'Johan Béla' Országos Epidemiológiai Központ, Budapest

² I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest

³ GenoID Kft. Budapest

⁴ Országos Gyógyintézeti Központ, Budapest

Összefoglalás

A klasszikus nőgyógyászati vizsgálatok digitális kolposzkópiával kiegészítve, a Papanicolaou festést transzport tápoldattal kiegészítve, és biopsziával ma is a szűrővizsgálatok „arany standardja”. Ezek nélkül a molekuláris humán papillomavírus kimutatás nem értékelhető. A HPV fertőzések ugyanis a fertőzések 70-90 %-ában maguktól, nyomtalanul meggyógyulnak.

A gyógyulást „imiquimod” (Aldara) nevű immunstimulánsal, - amely interferont és interleukineket indukál, - serkenteni lehet, mert a HPV pontosan ezeknek a mediátoroknak a gátlására képes. Így kapcsolja ki a veleszületett immunitást a fertőzést követően.

A megelőzés kiemelkedő fontosságú a géntechnológia által nyújtott lehetőségek segítségével. A tetraavalens HPV6+11+16+18 védőoltás ártalmatlan, mert semmilyen tumorkeltő gént nem tartalmaz (üres víruskapszidokból áll). A sarjadzógomba tenyészetből származó anyagokat sem tartalmaz, mert az üres víruskapszidokat tisztára lehet pucolni, hasonlóan a hepatitis B vakcinához.

A vakcina hatékony, ha a serdülőkorú fiatalok kapják a védőoltást, mert ők még természetes úton nem fertőződtek a HPV vírusokkal. Időben kell a védőoltást alkalmazni, mert a már fertőzött hölgyeknek és uraknak nem segít a védőoltás. Számukra, és a már nőgyógyászati elváltozásokban szenvedő nőknek majd a fejlesztés alatt álló therapiás védőoltások lehetnek előnyösek.

Tekintettel arra, hogy a férfiak fertőzik meg a hölgyeket, mindkét nem védőoltása egyaránt indokolt serdülőkorban. Azonban a klasszikus diagnosztika jelentősége nem csökken, mert a kolposzkópia, Papanicolaou festés és biopsziás módszerekkel együtt lehet csak a védőoltott egyének kockázatát 90 % alá csökkenteni.

Sajnos csaknem 100 emberi HPV típus közül 13-15 képes rosszindulatú daganat keletkezését elindítani. Magyarországon is ezek a leggyakoribbak mind a szájüregi, mind a nőgyógyászati daganatokban (13, 19).

A probléma akkor keletkezik, amikor az újszülöttek a papillomavírust a szülés során kapják meg, vagy pedig az először a munkacsoportunk által kimutatott méhlepényen történő átjutás következtében fertőzik meg a magzatokat. Ezekben az esetekben ugyanis az immunválasz nem, vagy csak nagyon lassan indukálható.

Bevezetés

30 évvel ezelőtt fedezték fel, hogy a méhnyak rák kialakulásában a papillomavírusoknak szerepe lehet (22, 23). Ma már bizonyítottan ezen vírusok 13-15 típusa által elindított daganatok okozzák a méhnyakrák megbetegedéseket.. Magyarországon Debrecenben és Budapesten foglalkoznak kutatási szinten a problémával (13, 18, 19).

A diagnosztikai módszerek jelentős fejlődése zajlott le a közelmúltban.

A minőségbiztosítás elvei alapján a klasszikus klinikai diagnosztikai módszerek is modernizálódtak.

- 1.) Kialakultak a kolposzkópia digitális módszerei.
- 2.) Ezek lehetővé teszik a korábbiaknál jobb biopsziás minták vételét és a szövettani vizsgálatokat.
- 3.) A minőségbiztosítással összefüggő vizsgálatok kimutatták, hogy kizárólag a transzport tápoldatba vett mintákkal kapott (Papanicolau festés) PAP eredményeket szabad értékelni.

Egyezség van abban, hogy mindhárom vizsgálatra szükség van ahhoz, hogy klinikai döntéseket lehessen hozni. Ezeket a vizsgálatokat az európai szemléletmód szerint csak kiegészítik a molekuláris vizsgálatok. Az amerikai álláspont szerint a molekuláris vizsgálatok az alapját képezik a diagnosztikának és ezt, a biztosító társaságok támogatják is.

1. táblázat. A szövettani progresszió és a papillomavírusok által okozott károsodások összefüggése (16, 20).

Elváltozás	Gyógyulás aránya	Perzisztencia aránya	Progresszió <i>in situ</i> elváltozásba	Progresszió rosszindulatú elváltozásba
Östör közlemény (1993)				
CIN 1	57 %	32 %	11 %	1 %
CIN 2	43 %	35 %	22 %	5 %
CIN 3	32 %	< 56 %	-	> 12 %
Finnországi Kuopio-i vizsgálat 1981-1998 (Syrjänen K, 2000)				
HPV-NCIN	79.9 %	14.6 %	5.2 %	0 %
HPV-CIN1	65.1 %	20.8 %	14.2 %	0 %
HPV-CIN2	58.6 %	18.6 %	21.4 %	0 %
HPV-CIN3	11.6 %	9.3 %	79.1 %	0.5 %

A papillomavírus diagnosztika más elveken alapszik az európai és amerikai gyakorlat szerint. Európában a kolposzkópos vizsgálatot, a megfelelő szövettani mintavételt és a méhnyak minta szövettani vizsgálatának hármását részesítik előnyben, és amennyiben az eredmények alacsony fokú (low-grade) vagy súlyosabb fokú (high-grade) elváltozásokat mutatnak, akkor ennek függvényében végzik el a papillomavírus kimutatására alkalmas molekuláris vizsgálatokat (8). Magyarországon a Debreceni Egyetem Mikrobiológiai Intézetében elemezték a molekuláris diagnosztika fontosságát (12).

Az 1. táblázat az európai álláspontot mutatja. A finn szerző által összefoglalt eredmények fő következtetése az, hogy a szövettani vizsgálat a diagnosztika „arany standardja”. A szövettani vizsgálat alapján lehet a megfelelő diagnosztikai, prognosztikai és terápiás döntéseket meghozni.

Amerikában az FDA által jóváhagyott hibrid-capture módszereket alkalmazzák a rizikócsoportba tartozó papillomavírusok kimutatására. Majd a klinikai döntések a molekuláris diagnosztikai eredmények nyomán születnek meg. Az amerikai rendszert a gazdasági számítások valamint az egészségügyi biztosítási rendszerek teszik gazdaságossá. A klasszikus diagnosztikai módszereket azonban az amerikai rendszer sem hanyagolja el.

A molekuláris laboratóriumi módszerek lényege az, hogy szemölcsvírus nukleinsav próbákat mesterségesen előállítják. Ezek lesznek a reagensek.

1. A biopszia mintából, vagy a méhnyakból transzport oldatba vett mintából származó sejtekből nukleinsavat kell tisztítani. A szövettanászok ugyanezekből a mintákból u.n. *in situ* hibridizációs rendszerben használhatják ugyanezeket a reagenseket.
2. A próbák 13-15 magas kockázati csoportba tartozó vírus kimutatására alkalmasak: (ezek a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, amiket a 73-as és 82-es típusok is kiegészítenek az újabb eredmények alapján).
Ezeket a reagenseket egyes módszerek megjelölik biotinnal, vagy fluoreszcenciával. Amikor a próbákat összehozzák a vizsgálati anyagokkal a megfelelő hőfokon, akkor azok kötődnek a mintában lévő vírus DNS-hez.
3. Ezen a ponton szétválnak a módszerek, mert a vírus-DNS próba-RNS hibrideket kell láthatóvá tenni.
 - 3.1. Vannak olyan ellenanyag-reagensek, amelyek felismerik az RNS-DNS heteroduplexeket;
 - 3.2. Vannak olyan ellenanyag-reagensek, amelyek felismerik a biotinnal vagy digoxinnal jelzett nukleinsavakat
 - 3.3. Vannak olyan jel-erősítési módszerek, amelyek a jelzett próba láthatóvá tételét kémiai módszerrel sokszorozzák meg (immunfluoreszcens, torna-peroxidáz, digoxigenin vagy kemiluminescens eljárással). Ezek közül a legmodernebb módszereket molekuláris világítótoronyoknak (molecular beacon) nevezik, mert a fény kibocsátás csak akkor kezdődik, amikor a próba találkozik a cél nukleinsavval.
4. A módszerek legutolsó lépése az eredmények láthatóvá tétele, lefényképezése vagy lemerése.

Meg kell említeni, hogy Magyarországon is létezik szabadalmaztatott módszer, amely alkalmas mintegy 50 papillomavírus kimutatására (GenoID) és a vírusok (geno)tipizálását nukleotidsorrend vizsgálattal lehet csak kutatási célból megvalósítani (Szentirmay Zoltán személyes közlés). Gyakorlati orvosi szempontból azonban csak a *high risk* és *low risk* vírusok elkülönítésének van értelme. Csak ez a gazdaságos az amerikai vizsgálatok és számítások alapján. A jelenleg alkalmazott klinikai és szövettani módszerek érzékenysége 50% és 60 % közé esik, a specifitása mintegy 90 %. Ez egy lehetséges érv annak alátámasztására, hogy a diagnosztika alapját a molekuláris módszerek teremtsék meg.

Az amerikai érvrendszer az eltérő diagnosztikai rendszer mellett főleg gazdasági jellegű.

A számos érzékenységre és specifitásra vonatkozó vizsgálat azt mutatja, hogy a Papanicolau festésnek és a szövettani vizsgálatoknak az érzékenysége csak 50-70 %-nak bizonyult. Igaz, a specifitás 90 % fölött volt a legtöbb vizsgálatban. A papillomavírusok kimutatásának az érzékenysége is és specifitása is 90 % körül mozgott minden vizsgálatban.

A két módszer összehasonlításához a járványtani adatokat érdemes figyelembe venni.

A humán papillomavírusok járványtana

A mai felfogás szerint a papillomavírusok is egy szexuálisan továbbvitt fertőzést okoznak (STF). Meglepő jelenség, hogy az óvszerek nem csökkentik lényegesen a vírusok továbbvitelét (2). Felmerült annak a lehetősége is, hogy az újszülöttek a vírushordozó édesanyáktól fertőződnek, és a hámsejtjeikben évtizedeken át klinikai betegség nélkül hordozhatják a vírust. A Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ Viroológiai Főosztálya munkatársai vetették fel először azt a lehetőséget, hogy az újszülöttek fertőzéseit esetleg a placentán keresztül is bekövetkezhettek (4). A lehetőséget Füle és mts (11) kórszövettani

munkái alapozták meg. Ez a lehetőség azonban azt mutatja, hogy vannak immuntoleráns egyének a papillomavírus fertőzések szempontjából.

A papillomavírus fertőzés heveny következményeit számos munka vizsgálta. Az emberiség szerencséje az, hogy a fertőzést követő klinikai tünetek 3 év alatt megszűnnek az egyének 90 %-ában (15). A magas rizikó csoportba tartozó vírustípusok néha kevésbé hatékonyan számolhatóak fel az immunrendszer által (9, 10).

A járványtani és a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a papillomavírus fertőzések zöme spontán gyógyuló fertőzés. Az azonban tény, hogy a gyógyulás igen lassan következik be. Szemben a kanyaróval és bárányhimlővel a különböző felmérések alapján a papillomavírusok eltűnése egy- másfél éven belül következik be a vizsgált korcsoportokban. Ennek az oka az, hogy a papillomavírusok a veleszületett immunitást gátolják. Ezért nincs a szemölcsökben és a papillomák környékén gyulladás, fehérvérsejtes beszűrődés, interleukin és interferon termelés (3, 7, 21).

Új felfedezések születtek a vírusciklus és a rosszindulatú elfajulás eseményeiről is

A papillomavírusok sejt-receptorai a mukopoliszaccharidok. Az E-4 korai fehérje megakadályozza a normális elszarusodás folyamatát, mert jelen van a hám valamennyi sejtrétegében, és a leváló hámsejtekből könnyebben szabadulnak ki a fertőzőképes vírusok. A vírus-DNS termelődés a gazdasejtek egy részében lehetetlenné teszi a normális sejtciklus befejeződését. A sejtosztás folyamata is zavart szenved a vírusszaporodás következtében. A fertőzött sejtekben bekövetkezik a centromérek megsokszorozódása, lehetetlenné téve a mitózisok normális lefolyását (6, 14).

A dendritikus sejtek és a Langerhans sejtek lassan felismerik az MHC-I által bemutatott korai antigéneket (E1-E7), majd a kialakuló T8 sejtek lassan megakadályozzák a szemölcsök növekedését a betegekben a vírusfehérjét prezentáló sejtek elpusztításával.

Kimutatták azt is, hogy a normális hámsejtekben és bőrképletekben is tartósan jelen lehetnek humán papillomavírusok (1, 16).

A vírusgén „elszabadulását” 3-10 év alatt bekövetkező sejt-genetikai változások teszik lehetővé. A rosszindulatú daganat kialakulásának az alapja egyes vírusgenomok beépülése a gazdasejt kromoszómaiba. Kimutatták, hogy a 8. kromoszómán elhelyezkedő *myc* gén a 16-os genotípusú DNS beépülésének az egyik predilekciós helye. Ez egy hasonlóság az Epstein-Barr vírusok és a papillomavírusok között. A papillomavírus szabályozó génjei (nem kódoló régiói) serkentik a gazdasejt onkogének működését is a daganat keletkezés során.

A vírus-DNS beépülésének az ára az, hogy az E6 és E7 vírusfehérjék termelését mérséklő E2 gén tönkremegy. Ezért a virális szabályozó (nem kódoló) génszakasz sokszoros mennyiségben termelteti ezeket a daganatkeltő fehérjéket. Mind az E6, mind az E7 fehérje termékei pedig tucatjával befolyásolják a gazdasejt génjeinek a működését, aminek a végeredménye a rosszindulatú daganat kialakulása (5).

Hogyan lehet védőoltást kidolgozni az immunrendszert károsító vírus ellen?

Az állatorvosok már csaknem fél évszázada kidolgoztak daganatkeltő vírusok ellen hatékony védőoltást (baromfiak Marek betegségét okozó herpesvírus elleni védőoltás). A papillomavírusok elleni védőoltásokat is először állatorvosok dolgozták ki (kutya papilloma).

Az ártalmatlan emberi védőoltások kialakítását a géntechnológia fejlődése tette lehetővé. A hepatitis B vírus védőoltás bizonyítottan megelőzi a májrák kialakulását.

Mind az élesztősejtekben, mind a selyemhernyó baculovírus génkifejező rendszer már több évtizeddel ezelőtt lehetővé tette, hogy DNS-mentes, humán papillomavírus üres kapszidokat lehessen előállítani. A DNS-mentesség elvi jelentőségű, hiszen a papillomavírusok 3 tumorkeltő génje nem kerülhet be a vakcinába.

A papillomavírusok L1 kapszidfehérjéje ugyanis összeáll üres kapszidokká, amennyiben a fehérjék töménysége elegendő. Beszámoltak a 16-os HPV típussal végzett első oltási sorozat eredményeiről. A védőoltásban részesült hölgyek között 10-szer kevesebb HPV-specifikus elváltozás fordult elő, mint a kontroll csoportban (9, 10).

A következő klinikai kísérleteket HPV16+18 üres kapszid vakcinákkal végezték. A legfejlettebb vakcina jelenleg 4 típusból készült üres L1 kapszidokat tartalmaz (HPV6+11+16+18). Ez a kombináció a leggyakoribb bőrelváltozásokat okozó fertőzések ellen is biztosít bizonyos védeltséget.

Az eddigi klinikai kísérletek azt bizonyítják, hogy az oltottakban valamennyi HPV-hez társult elváltozás előfordulása szignifikánsan csökkent. A vizsgálatok azonban azt is bizonyították, hogy a klasszikus megelőző vizsgálatokat nem szabad abba hagyni. Az egyik klinikai nyomon követéses vizsgálatban a PAP vizsgálatokkal a vakcinált egyéneknél további 30 %-kal lehetett a méhnyakrák megelőzését javítani. A védőoltás kombinálása a klinikai szűrővizsgálatokkal 90 % feletti eredményt hozott (8).

Irodalomjegyzék

- 1.) Astori G, Lavergne D, Benton C, Hockmayr B, Egawa K, Garbe C, de Villiers E-M: Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J. Invest. Dermatol.* (1998) 110: 752-755.
- 2.) Baldwin SB, Wallace DR, Papenfuss MR et al.: Condom use and other factors affecting penile human papillomavirus detection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm. Dis.* (2004) 31: 601-607.
- 3.) Bodner K, Bodner-Adler B, Wierrani F, Kubin A, Szolts-Szolts J, Spangler B, Grunberger W: Cold-knife conization versus photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II with associated papillomavirus infection: comparison of preliminary results. *Anticancer Res.* (2003) 23: 1785-1788.
- 4.) Younes Saleh Ali, Márta Csire, Bernadett Pályi, Gábor Mikala, István Vályi-Nagy, Imre Cseh, Márta Benczik, Csaba Jeney, Tibor Takács, Éva Simon, Vilmos Fülöp, György Berencsi, Mária Visy: Transplacental transport of endotoxins and herpesvirus types 4, 5, 6, 7, 8 and human papillomaviruses (kézirat közlésre beküldve).
- 5.) de Villiers E-M: Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed Pharmacother.* (1998) 52: 26-33.
- 6.) Duensing S, Munger K: Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genetic instability. *Oncogene* (2002) 9: 6241-6248.
- 7.) Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographical regions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1983) 80: 3812-3815.
- 8.) Franceschi S: The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res.* (2005) 166: 277-297.
- 9.) Franco EL, Harper DM: Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* (2005) 23: 2388-2394.

- 10.) Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE: Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women in a high risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.* (1999) 180: 1415-1423.
- 11.) Füle Tibor, Máthé Miklós, Csapó Zsolt, Paku Sándor, Kovalszky Ilona: Papillomavirus 16 genes and gene products in endothelial cells end nerves of patients suffering from carcinoma of head and neck (manuscript sent for publication) .
- 12.) Hernadi Z, Szőke K, Sápy T, Krasznai ZT, Soof G, Veres G, Gergely L, Kónya J: Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions. *Eur J. Obstet. Gynecol Reprod. Biol.* (2005) 105: 325-332.
- 13.) Kónya J, Gazdag L, Szőke K, Szalmás A, Hernádi Z, Gergely L: Duration of HPV type associated risk for high-grade CIN in epithelial abnormalities of the human cervix. P-044.
- 14.) Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K: Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* (2004) 78: 11451- 11460.
- 15.) Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ: IARC Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* (2003) 348: 518-527.
- 16.) Östör AG: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia – a critical review. *Int J. Gynecol Pathol* (1993) 12: 186-192.
- 17.) Sidler L, Saftlas A, Wang W, Exeter M, Whittaker J, McCowan L: Treatment for intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. *JAMA* (2004) 291: 2100-2106.
- 18.) Szalmás A, Bánáti F, Koroknai A, Salamon D, Minárovits J, Veress G, Gergely L, Kónya J: Interleukin 10 promoter methylation in human papillomavirus infected and non-infected human keratinocyte cell lines. P-430.
- 19.) Szarka K, Tóth L, Czene J, Sztancsik T, Major T, Gergely L: Human papillomavirus prevalence and p53 genotype distribution in head and neck cancers in Hungary. P-057.
- 20.) Syrjänen K: natural history of cervical HPV infections and CIN. Chapter 6. In: Syrjänen K and Syrjänen S: Papillomavirus infections in human pathology. J. Wiley and Sons, New York, 2000: pp. 142-166.
- 21.) Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, Koutsky LA: Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J. Infect. Dis.* (2005) 191: 731-738.
- 22.) zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW: Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer.* (1974) 13: 650-656.
- 23.) zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical applications. *Nature reviews, cancer* (2002) 2: 342-350.

Az érlelmeszesedés és a mikroorganizmusok

Gönczöl Éva és Kis Zoltán

Az atherosclerózis (AT) az artériák falának megbetegedése, amely az artériák lumenének szűkülete, vagy az AT plakkok rupturája, és a leszakadó trombusok miatt okoz súlyos keringési zavarokat, a szivizom elhalását, az agyszövet károsodását, vagy a végtagok gangrénáját. Több ezer 5-15 éves gyermekén végzett vizsgálat szerint az AT kialakulása gyermekkorban kezdődik, csak a komplikációk azok, amelyekkel általában a késői felnőttkorban találkozunk. A kialakulása multifaktoriális. A klasszikus rizikó faktorok, így a magas szérum lipid szint, a magas vérnyomás, a diabetes, a dohányzás az esetek mintegy 50%-t magyarázzák. A folyamat beindítója az artéria falakat ért sérülés, és az ezt követő immunológiai és gyulladáshos jelenségek, amelyek krónikus formában, és valószínűleg más tényezők hozzájárulásával vezetnek a súlyos elváltozásokhoz. A gyulladáshos és immunológiai folyamatot elindító tényezők közül a legtöbb bizonyíték az oxidált low density lipoprotein (oxLDL) és hő sokk proteinek (HSP) szerepére vonatkozóan áll rendelkezésre.

Többirányban folytatott kísérletek eredményei szerint az emberi AT kialakulásában szerepet játszhatnak fertőző ágensek. Így

1. szeroepidemiológiai adatok utalnak az AT és fertőző ágensek, valamint gyulladáshos és autoimmun folyamatok összefüggéseire,
2. néhány fertőző ágens DNS anyagát kimutatták emberi AT plakkokban,
3. bizonyos fertőző ágensekkel korai AT léziókat sikerült kialakítani állatmodelleken,
4. *in vitro* kísérletekben fertőző ágensek olyan hatásokat fejtettek ki a fertőzött sejtekre, amelyek az AT folyamatok hatásmechanizmusára utalhatnak.

Az AT kialakulásával leggyakrabban kapcsolatba hozott patogének a *Chlamydomphila (Chlamydia) pneumoniae (C. pneumoniae)* baktérium és cytomegalovirus (CMV), azonban más patogéneket is gyanúsítanak a folyamatban való részvétellel, mint pl. a *Helicobacter pylori* baktérium, herpes simplex virus 1 típusa (HSV-1), coxsackie vírusok, vagy a periodontitiseket okozó *Porphyromonas gingivalis* és *Streptococcus sanquis* baktériumok.

A *Chlamydia* baktériumok csak intracellulárisan képesek szaporodni, mivel nem rendelkeznek az önálló szaporodást biztosító energia rendszerrel. Kétfázisú szaporodási ciklus szerint szaporodnak, amelynek során a sejtek a fertőző baktériumokat (elementáris testeket) felveszik, amelyek a cytoplazmán belül, egy zárt vacuolumban hasadáshos osztódnak (retikuláris testek), nagy cytoplazma zárványokat létrehozva. A retikuláris testek azonban nem fertőzőek. A szaporodási ciklus második felében a retikuláris testek elementáris testekké (fertőző formák) érnek, amelyek a sejtekből a ciklus végén kiszabadulnak és újabb sejtek megfertőzésére képesek. A chlamydiák elsősorban a nyálkahártyák és a tüdő epitheliális sejtjeit fertőzik meg, de megfertőzik a monocytákat, macrophagokat, T lymphocytákat és endothel sejteteket is. A chlamydiák családjának embert megbetegítő tagjai a *C. trachomatis*, *C. psittaci* és *C. pneumoniae*. A *C. trachomatis*-nak több mint 15 szerotípusát ismerjük, ezek okozzák a trachomát, urogenitalis fertőzéseket, conjunctivitist, lymphogranuloma venereumot. A *C. psittaci* légúti megbetegedéseket, atípusos pneumóniát okoz. A *C. pneumoniae* gyakran hoz létre felső és alsó légúti megbetegedéseket, a pneumonia esetek kb. 10 %-áért felelős. A fertőzések gyakran tünetmentesen zajlanak le. Az USA-ban végzett felmérések szerint a *C. pneumoniae* fertőzések leggyakrabban az 5-14 éves gyermekek között fordulnak elő, az emberek 50%-a 20 éves korra szeropozitív, tehát átesett a fertőzésen. Az átvészelttség az életkorral nő.

Magyarországon a 60 évesnél idősebb lakosság 70-80 %-a szeropozitív. Gyakori a reinfekció, és a *C. pneumoniae* DNS az egészséges emberek egy részében a vér mononucleáris sejtjeiben PCR módszerrel kimutatható.

A herpesvirusok családjába tartozó CMV a DNS vírusok nagy csoportjába tartozik, amelynek a szaporodása szigorúan species-specifikus, azaz az emberi CMV csak emberi sejteket fertőz meg. A fertőzés legtöbbször kora gyermekkorban létrejön és az átvészelttség az életkorral nő. A felnőtt lakosság életkorától és szociális helyzetétől függően 50-90 %-ban szeropozitív világszerte, a magyarországi 40 éven felüli lakosok 90 %-a szeropozitív. Fontos tulajdonsága a látenciára való hajlam, a primér fertőzés után szinte törvényszerűen látenciát alakít ki a fertőzött sejtekben. A látens (nem szaporodó) vírus genom, vagy annak bizonyos génjei, azonban reaktiválódhatnak, és teljes vagy részleges vírus szaporodás jöhet létre a reaktiváció következtében. A részleges reaktiváció esetén az igen korai (immediate early, IE) gének fejeződnek ki elsősorban. A látencia ideje alatt a vírus genomot a monocytá és dendritikus sejt prekursorokban és monocytákban mutatták ki.

Szeroepidemiológiai összefüggések

Finn kutatócsoport közölte először az 1980-as évek végén, hogy *C. pneumoniae* ellenanyagok szignifikánsan magasabb százalékban vannak jelen myokardiális infarktusban és más koronária betegségben szenvedőkben, mint a kontroll csoportban. Több kutatócsoport erősítette meg ezt a megfigyelést földrajzilag igen különböző laboratóriumokban, sőt az összefüggést a keringési rendszer más szakaszaira lokalizált AT lézióra is kiterjesztették, így az aortára, a carotisra, az agy és a végtagok ereire. Az esélyhányados érték 1,8-11,1 között változott.

Vannak azonban olyan eredmények is, amelyek szerint nincs szerológiai összefüggés az AT különböző formái és a *C. pneumoniae* ellenanyagok között. Ezekben az esetekben felmerül, hogy a vizsgált beteg és korban hozzáillő kontroll csoport idős életkora miatt nem mutatható ki a különbség (a *C. pneumoniae* szeropozitivitás az életkorral emelkedik), vagy nemrégiben lezajlott *C. pneumoniae* járvány miatt magas a kontroll csoport *C. pneumoniae* szeropozitivitása is és fedi el a beteg és kontroll egyének közötti különbségeket.

Lehetséges azonban az is, hogy az AT betegség és *C. pneumoniae* átvészelttség közötti szerológiai összefüggés ténylegesen gyenge, és az eredmények korra, nemre, dohányzásra, szérumban a koleszterin szintre, hipertenzióra és egyéb rizikó faktorokra történő igazítása után a különbségek szignifikanciája esetleg eltűnik.

Lehetséges, hogy az összefüggés csak azokban az egyéneknél érvényes, akik genetikai okokból fogékonyabbak a krónikus *C. pneumoniae* fertőzésre, pl. a mannóz-kötő lectin gén olyan mutációja révén, amely csökkent funkciójú vagy mennyiségű mannóz-kötő lectint eredményez a szérumban, amely a sejtek fokozott *C. pneumoniae* fertőzöttségét eredményezi. A *C. pneumoniae* egyik receptora a fogékony sejteken a mannóz-kötő lectin, amelyhez a baktérium a külső membrán mannóz tartalmú szénhidrát komponensén keresztül kapcsolódik. A normális mennyiségű és funkciójú mannóz-kötő lectin hozzákapcsolódva a baktérium felszínéhez, annak a sejtekhez történő hozzákapcsolódását csökkenti. A kaukázusi emberfajták („fehér” ember) kb. 30%-a heterozygota a mannóz kötő lectin gén genetikai variációira, tehát nem ritka a csökkent mennyiségű vagy funkciójú mannóz-kötő lectint hordozó emberek száma, akiknél nagyobb valószínűséggel alakulhat ki krónikus *C. pneumoniae* fertőzés, és ezzel összefüggésben az AT betegség.

Néhány tanulmány a CMV ellenanyag szint és az AT betegség között talált összefüggést, vagy még inkább a CMV ellenanyag szint és angioplasztikai műtétek után

bekövetkező restenosis esetek, vagy transzplantált szív artériáin bekövetkező AT léziók kialakulása között. Feltételezik, hogy a látens CMV reaktivációi lehetnek összefüggésben a magas ellenanyag szinttel és restenosisal vagy a transzplantált szív AT lézióival.

Más tanulmányok azonban nem találtak szeroepidemiológiai összefüggést az AT különböző formái és a CMV ellenanyag szint között. A CMV átvészelttség világszerte igen magas, Magyarországon a 60 év fölötti lakosság kb. 90 %-a szeropozitív. A kontroll csoportok összeállítása és a vizsgált esetszám befolyásolhatja az eredményeket.

Kórokozók kimutatása az AT léziókból

Elektronmikroszkópos vizsgálattal, immunhisztokémiai módszerekkel és polimeráz lánc-reakcióval (PCR) *C. pneumoniae*, CMV és HSV-1 antigéneket vagy/és DNS-t mutattak ki különböző AT léziókból kaukázusi, fekete-afrikai és indián rasszhoz tartozó egyéneknél. A vizsgálatba bevont egyének egészséges érszakaszainak vizsgálata nem minden esetben történt meg a vizsgálati anyaghoz jutás nehézségei miatt.

Az egészséges és beteg érszakaszokat magába foglaló vizsgálatokban azonban figyelemre méltó, hogy míg *C. pneumoniae* antigént, vagy DNS-t a vizsgált AT léziók egy részében (2 %-60 %) ki tudtak mutatni, az egészséges érszakaszokban nem, vagy csak nagyon kis százalékban volt kimutatható. *C. pneumoniae* DNS jelenlétét demonstrálták aorta, coronáriák, carotis és alsó végtag plakkjaiban. Ugyancsak *C. pneumoniae* DNS-t mutattak ki az artéria cerebri mediában elhelyezkedő plakkokban, amelyek gyakori kiindulási helyei az agyi thrombosisoknak. A *C. pneumoniae* DNS-t vagy antigént tartalmazó sejtek identifikálása nem minden esetben történt meg, de kimutattak *C. pneumoniae* antigéneket az artériák endothel sejtjeiben és az intima és intimitium macrophagjaiban. Coronária és carotis eredetű érszakaszok plakkjaiból *C. pneumoniae* szövetkultúrán történő izolálása és szaporítása is sikeres volt, ami azt jelenti, hogy replikációra képes állapotban van jelen a baktérium egyes plakkokban. A kórokozó jelenléte a plakkokban vagy arra utal, hogy a baktérium etiológiai szerepet játszik a betegség kialakulásában, vagy arra, hogy a már kialakult korai vagy érettebb szakaszban lévő AT léziókban a kórokozó megtelepedni, esetleg szaporodni képes.

CMV-DNS és fehérjék jelenlétét szintén igazolták AT plakkokban, azonban ezek kimutathatók voltak egészséges érszakaszokban is, bár kissé alacsonyabb százalékban, mint a beteg részeken. A kimutathatóság fokozott volt restenosis eseteiben. Ballonos coronária tágítást követő restenosisból nyert mintákban CMV-igen korai (IE) fehérjéket mutattak ki. A CMV-IE fehérjék a CMV más génjeinek és idegen gének, pl. más vírusok vagy a gazdasejt génjeinek kifejeződését serkentik.

Míg egészséges érszakaszok sejtjeiben nem, restenosisból nyert szövetminták simaizom sejtjeiben a p53 tumor szuppresszor fehérje is kimutatható volt. In vitro kísérletekben megállapították, hogy a CMV-IE fehérjék egyike, a CMV-IE2, aktiválja a p53 gén kifejeződését. A génaktivációt követően a CMV-IE2 és p53 fehérjék heterodimert képeznek, amely által a p53 fehérje inaktíválódik. Feltételezik, hogy a p53 fehérje működésének gátlása, azaz a tumorszuppressziós hatás kiesése, az artériák falának simaizom sejtjeit fokozott proliferációra készíti, ami a restenosishoz vezet. A restenosis pathomechanizmusában tehát a CMV-IE fehérjék játszhatnak szerepet, amelyek a gyermekkori vagy fiatal felnőttkori CMV fertőzések következtében a coronáriák simaizomsejtjeiben látens formában jelenlévő vírus reaktivációja miatt lehetnek jelen. Az angioplasztika kapcsán bekövetkező sérülés miatt reaktiválódhat a vírus, és a CMV-IE gén kifejeződése fokozódik, amely fokozott simaizom sejt szaporulatot és lokális gyulladást

reakciót hoz létre. A CMV kitenyésztéséről a restenosis mintákból nem tudunk. Bizonyos herpesvirusok okozta betegségekben „hit and run” mechanizmusokat tételeznek fel: a vírus beindítja a betegséget, de fertőző formában nem perzisztál a megbetegedett szövetben.

A CMV-DNS és fehérjék jelenléte egészséges, nem atheromatosus szövetekben azonban arra utal, hogy a vírus önmagában nem képes az érfalakat tartósan károsítani, más faktorok hozzájárulása is szükséges a tartós károsító hatás kialakulásához.

Állatmodellek

Mivel az AT multifaktoriális megbetegedés és kialakulása hosszú folyamat eredménye, etiológiájának a Koch-féle posztulátumok szerinti bizonyítása nehéz. Ennek ellenére próbálkozások történtek AT léziók kialakítására CMV és *C. pneumoniae* fertőzéssel egérben és nyúlban. Mivel a cytomegalovirusok szigorúan fajspecifikus vírusok, egerek fertőzéséhez egér (mouse)-CMV (MCMV)-t használtak, amely struktúrájában és biológiájában nagyon hasonló az emberi CMV-hez. Az MCMV-vel intraperitoneálisan oltott egerek körülbelül felének aortájában, az emberi artériákban kialakuló korai AT léziókhöz hasonló elváltozások jöttek létre, függetlenül attól, hogy az egereket normocholesterinemiás vagy hipercholesterinemiás diétán tartották.

Az elváltozások azonban lényegesen súlyosabbak voltak, ha az egerek a fertőzés előtt enyhe γ -sugárzásban részesítették, azaz az immunrendszer működését átmenetileg károsították, ezzel a vírusfertőzés hatását megnyújtották. Érdekes módon a szérumban lévő LDL szint magasabb volt az MCMV-vel fertőzött egerekben, mint a vírussal nem fertőzött kontrollokban, ami azt jelenti, hogy a vírus fertőzés a lipid anyagcserét is befolyásolja, és az AT léziók progressziójában részt vevő LDL szint irányba tolja el.

Az MCMV fertőzés tehát két mechanizmus szerint is hozzájárulhat az AT kialakulásához: lokálisan artéria-fal sérülést és gyulladást okoz, valamint a lipid anyagcsere LDL-irányba történő eltolásával a lokálisan felszaporodott macrophagokban az LDL felvételét fokozza. Az MCMV fertőzéssel kialakított gyulladással aorta léziók reverzibilisek voltak, azaz a fertőzés utáni 12-16 hétre meggyógyultak. Azonban az MCMV-vel már oltott egerek *C. pneumoniae*-val történő intranasalis inokulálása az AT léziók számát, súlyosságát és időtartamát megnövelte. Érdekes módon, MCMV fertőzés nélkül a *C. pneumoniae* egyszeri inokulálása nem eredményezett látható elváltozást. *C. pneumoniae*-val végzett többszöri inokulálás gócos gyulladást és intima vastagodást hozott létre, ami arra enged következtetni, hogy valamilyen lokális vagy szisztémás immunológiai reakció volt szükséges a léziók kialakulásához. Ugyancsak többszöri *C. pneumoniae* inokulálására volt szükség korai AT plakkra emlékeztető elváltozás kialakítására a nyúl aortájában. AT léziók spontán is kialakulnak az apolipoprotein-E (apo-E) deficiens egerekben, és mind a MCMV, mind a *C. pneumoniae* fertőzés fokozza az aortában az AT léziók súlyosságát és kialakulásuk gyorsaságát.

Több pathogén részvétele az emberi AT léziók kialakulásában

Érdeemes figyelmet fordítani arra a tényre, hogy a seroepidemiológia adatok és az AT léziókból kimutatható pathogénekre vonatkozó vizsgálatok eredményei szerint többféle pathogén is kapcsolatban lehet a betegség kialakulásával. Lehetséges, hogy több pathogén is előidézhethet olyan, a vasculáris rendszerre lokalizálódó, vagy szisztémás változásokat a fertőzött szervezetben, amelyek az AT betegség kialakulásában részt vehetnek.

Mechanizmusok, amellyel a fertőző ágensek az AT folyamatát kiválthatják

Az AT betegséget kiváltó mechanizmusokat magyarázhatjuk

1. a patogének közvetlen jelenlétével a plakkokban,
2. a patogének közvetett hatásával, amikor is a patogének a plakkokon kívül szaporodnak a szervezetben, azonban szisztémás hatásuk révén befolyásolják a plakkok biológiáját,
3. a kettő kombinációjával.

1./ A patogének közvetlen jelenléte következtében kifejtett hatások:

A plakkok legfontosabb sejt komponensei az endothél sejtek, monocyták, macrophagok, T lymphocyták, B lymphocyták, dendritikus sejtek, hízó sejtek és simaizomsejtek. In vitro körülmények között a monocyták-macrophagok, endothel sejtek és aorta eredetű simaizomsejtek megfertőzhetők *C. pneumoniae*-val. A monocyták-macrophagok fertőzésekor u.n. abberált formájú *C. pneumoniae* zárványtestek alakulnak ki, és igen kevés a fertőző elementáris testek hozama. A macrophagok azonban hosszú ideig képesek a *C. pneumoniae* partikulákat in vitro életben tartani. Ez a jelenség arra utal, hogy a monocyták-macrophagokban a *C. pneumoniae* partikulák in vivo is elkerülik az immunválaszt, ami a disszemináció, azaz a légúti fertőzés helyétől a cardiovascularis rendszer sejtjeibe való kerülés fontos eleme lehet. A perifériás vér sejtjei közül azonban a CD3+ T lymphocytákban is szaporodik a *C. pneumoniae*, tehát ezek a sejtek is részt vesznek a baktérium terjedésében és a plakkokban történő szaporodásában.

Az emberi macrophagok in vitro *C. pneumoniae* fertőzése azok funkcionális változását is előidézi, pl. fokozott intracelluláris LDL felhalmozódást okoz, amikor a fertőzött kultúrákat LDL jelenlétében tartják, és a macrophagok morfológiailag a korai AT plakkokra jellemző habos (foam) sejtekre hasonlítanak. Egy monocyták eredetű sejt vonal fertőzése olyan celluláris gének kifejeződésének fokozását idézte elő, amelyek nemcsak akut és krónikus gyulladásos folyamatokkal vannak összefüggésben, hanem olyan gének stimulációját is, amelyek az AT kialakulásával közvetlenül összefüggésben vannak. Human endothel sejtekben replikálódik a *C. pneumoniae*, és fontos prokoaguláns és proinflammatorikus funkciójú szöveti faktorok termelésének növekedését idézi elő. Valószínűleg a fenti faktorok fokozott kifejeződése következtében jön létre a fokozott neutrophil és monocyták sejt migráció a *C. pneumoniae*-val fertőzött endothel sejteken. A *C. pneumoniae* fertőzés a fertőzetlen endothél sejtek antikoaguláns funkcióját prokoagulánsná változtatja azáltal, hogy fokozza a sejtek thrombin termelését.

Fontos, hogy a fertőzött endothel sejtek olyan molekulákat termelnek, amelyek az LDL oxidációjában részt vesznek, tovább fokozva ezen sejtek az AT kialakulás irányába ható változását.

Bizonyos CMV izolátumok produktív szaporodásra képesek az emberi endothel sejtekben, ezekben a sejtekben a CMV fertőzés oly módon is befolyásolja a p53 gén funkcióját, hogy megakadályozza a p53 gén termékének sejtbe jutását. Az endothél sejtek in vitro CMV fertőzése szintén fokozza a sejtek prokoaguláns aktivitását és a sejtek LDL felvételét. Macrophagok, monocyták, endothelsejtek CMV-fertőzése stimulálja egyes cytokinek, adhézións molekulák, növekedési faktorok valamint növekedési faktor receptor kifejeződését, amelyek a sejtek proliferációját, adhéziónsát vagy migrációját fokozzák.

2./ A patogének közvetett hatásai:

Bizonyos kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a patogének jelenléte a plakkokban esetleg nem is szükséges az AT folyamat elindításához vagy progressziójához, hanem a cardiovascularis rendszeren kívül szaporodó patogének indirekt hatásai érvényesülnek. Ilyen indirekt hatást fejthetnek ki az emelt szintű cirkuláló cytokinek, vagy akut fázis fehérjék. Ezek közé tartozik pl. a TNF- α , amely fertőzések és gyulladások hatására magasabb szérumszintet ér el, és amely az adhéziós molekulák fokozott kifejeződését hozza létre az endothel sejteken, vagy a matrix metalloproteinaze, amely az AT plakkokat fedő fibrózus réteg degradálásával a plakkok ruptúráját, így thrombózist okozhat. Ide tartoznak olyan, patogének ellen kialakult humorális és celluláris immunválaszok, amelyek antigén rokonság miatt reakcióba lépnek az érfalak sejteivel, és ezáltal azok sérülését okozzák.

A hő-sokk fehérjék erősen konzervált, így a különböző fajokban, így baktériumokban és emberben is kifejeződő fehérje családot jelentenek. Kiterjedt irodalma van HSP60/65 és AT betegség kapcsolatának. Például az emberi HSP60 és *Mycobacterium tuberculosis* HSP65 AT léziókat hoznak létre nyulakban, ha az állatokat velük immunizálják. Human HSP60 fokozott kifejeződése jön létre különböző stressz hatásokra, pl. hypertensio, oxidált LDL, vagy a dohányzás toxikus termékeinek hatására. A bakteriális HSP és human HSP közötti nagyfokú homológia miatt a bakteriális, pl. *C. pneumoniae* HSP65 ellen termelődött ellenanyagok és celluláris immunválasz az emberi HSP60-at kifejező sejteket is károsítják.

Összefoglalás

A kórokozók és az atherosclerosis kapcsolatának jelenlegi ismeretében levonható következtetések:

1. Bizonyos patogének jelen vannak a plakkokban, de azok jelenléte nincs összefüggésben a plakkok kialakulásával vagy progressziójával.
2. Kiváltják az artériafal endothel sejteinek sérülését, de ko-faktorok hiányában a sérülés meggyógyul. A ko-faktorok (pl. magas LDL szint, hypertensio) folyamatos jelenléte miatt azonban a kezdeti léziók progressziója következik be és kialakul az AT betegség.
3. Nem patogének, hanem más tényezők váltják ki a kezdeti érfal sérülést, azonban a sérülés helyén a patogénekkal fertőzött gyulladásos sejtek (monocyták, makrofágok, T lymphocyták) inváziója következik be, és a léziók sejteiben megtelepedő patogének a sejtek funkciójának megváltoztatásával, valamint immunológiai reakciók kiváltásával fokozzák a betegséget.
4. Kiváltják a kezdeti léziót, és krónikus jelenlétükkel vagy reaktivációkkal olyan biológiai és immunológiai folyamatokat tartanak fenn, amelyek az AT betegség kialakulásához vezetnek.

A cikk szerzőinek az a véleménye, hogy nem valószínű, hogy bizonyos patogének jelenléte a plakkok sejteiben nincs semmi hatással a sejtek funkciójára, ezáltal a plakkok terjedelmének növekedésére, vagy a plakkok stabilitására. Valószínűbb, hogy a klasszikus rizikó faktorok mellett a 2-4 lehetőségek valamelyike, vagy mindegyike működik a betegség kialakulásában, legalábbis az AT betegek egy részében. A nagyszámú, korai stádiumban lévő léziókkal rendelkező emberen végzett antimikrobiális terapia vagy széleskörű aktiv immunizálás adhat kielégítő választ arra, hogy bizonyos patogének milyen mértékben járulnak hozzá az AT, ezen multietiológiájú betegség kialakulásához.

Vírusgenom vizsgálatok szerepe a diagnosztikában

Takács Mária, N. Szomor Katalin, Dencs Ágnes, Kis Zoltán

„Johan Béla” Országos Epidemiológiai Központ, Virologiai Főosztály, Budapest

Bár a vírusdiagnosztikában leggyakrabban ellenanyag-vizsgálatot alkalmazunk, jónéhány olyan eset van, amikor ezzel a módszerrel nem kapunk megfelelő vagy elég gyors információt. Néha szükség van arra, hogy tisztázzuk, jelen van-e maga a vírus a szervezetben: megpróbálhatjuk tenyésztetni a vírust, vagy valamilyen vírus-hatást is vizsgálhatunk, vagy kimutathatjuk a vírus valamelyik fehérjéjét vagy nukleinsavát.

A vírusok genomjának kimutatása a diagnosztikában egyre nagyobb teret nyer. Vizsgálhatjuk a vírus konzervatív, illetve variábilis régióját, végezhetünk kvalitatív vagy kvantitatív meghatározást.

A következő módszereket használjuk leggyakrabban vírusnukleinsav vizsgálatokra

- Polimeráz láncreakció (RNS vírusoknál előtte reverz transzkripció)
- Nested (fészkes vagy kettős) PCR (RNS vírusoknál nested RT-PCR)
- Real time (valós idejű) PCR (QPCR, RNS vírusoknál RT-QPCR)
- Hibridizálás
- RFLP
- Nukleotidsorrend meghatározás

Ezeken kívül még több más módszer is létezik, amelyek még vagy már nem használnak általánosan vagy egy bizonyos vírus vizsgálatához kötődnek (pl. bDNA, NASBA, DNS alapú chipek, heteroduplex analízis)

PCR - mikor érdemes konzervatív régióra tervezett primereket használni?

A polimeráz láncreakció (PCR) lényege, hogy megsokszorozzuk a vizsgálni kívánt nukleinsav egy kis darabját. Ha azt szeretnénk kimutatni, hogy bizonyos vírus jelen van, vagy nincs jelen a beteg szervezetében, akkor a csekély változatosságot mutató, ún. *konzervatív régióra* tervezett primereket kell használni. A leggyakrabban a következő esetekben vizsgáljuk a vírus nukleinsavának jelenlétét:

- Reaktiválódás, felülfertőződés kimutatása: Ha a beteg újra fertőződik, az ellenanyag-válaszból nem mindig lehet megállapítani, hogy a vírus a szervezetében van-e.
- Újszülöttek fertőzöttségének kimutatása: az anyai ellenanyag jelenléte miatt csak a vírus jelenlétének kimutatásával lehet megbizonyosodni arról, hogy az újszülöttnak friss fertőzése van-e.
- Gyors eredmény szükségessége: pl. a SARS vírussal való fertőződés esetén nem lehet várni a diagnosztikával addig, amíg az ellenanyag kifejlődik, minél gyorsabb biztos diagnózis kell.
- Alacsony víruskoncentráció esetén: a vírus-kimutató módszerek közül a PCR az egyik legérzékenyebb módszer.
- Immunkomplexben jelen levő vírusok kimutatása.
- Újonnan felfedezett vírusok kimutatása: az utóbbi időben felfedezett vírusok közül a SARS, a hepatitis G, a TTV és a SEN vírus genomszekvenciáját nagyon hamar

közzétették az Interneten. A szekvencia alapján primer volt tervezhető, így a PCR reakció elvégzése lehetővé vált. Az ellenanyag kimutatására szolgáló kitek csak sokkal később jelentek meg (ha léteznek egyáltalán).

- Antivirális terápia feltétele: krónikus májmegbetegedések esetén a kórokozó (hepatitis C, hepatitis B) genomjának kimutatásával lehet bizonyítani, hogy valóban vírus okozza a megbetegedést.

PCR - mikor érdemes variábilis régióra tervezett primereket használni?

Néha nem elég annak az ismerete, hogy a vírus jelen van-e a szervezetben. Egyes esetekben szükség lehet egy kórokozó evolúciós viszonyainak, genetikai változásainak nyomon követésére. A kórokozók esetében a genetikai változás (mutáció) általában a fennmaradás egyik kritériuma: a megváltozott genetikai állomány megváltozott fehérjékhez, és ezáltal új fenotípusos tulajdonságokhoz vezet, amely már képessé tehet egy kórokozót arra, hogy az emberi szervezetben időt nyerjen az immunrendszer támadásával szemben. Általánosan elmondható, hogy a kórokozók a felszíni fehérjék (antigénjeik) „változtatásával” érik el ezt a hatást. Ezek a változások hozzák létre a kórokozók különböző genotípusait, szubtípusait, és ezek a génszakaszok az ún. variábilis szakaszok a genomban. A variábilis régiót a gyakorlatban a következő esetekben érdemes vizsgálni:

- A genotípus hatással lehet a betegség kimenetelére: a hepatitis B vírus A genotípusa ritkábban okoz krónikus fertőzést, mint a D genotípus, a HIV E szubtípusa, vagy a TTV 1-es genotípusa rosszabb prognosztikájú, mint a többi szubtípus ill. genotípus
- Az interferon-kezelés hatásossága függhet a genotípustól: a HCV Magyarországon elterjedt 1b genotípusa kevésbé érzékeny az interferon kezelésre, mint a többi genotípus
- a vírus a vírusellenes kezelés hatására változhat: ennek nyomon követése az adott variábilis régió vizsgálatával lehetséges
- epidemiológiai célból történő vizsgálatok: a variábilis régió vizsgálatával bizonyíthatjuk, hogy egy bizonyos járványban történt megbetegedések forrása azonos-e vagy sem. Ilyenkor filogenetikai törzsfát készítünk (ld. később)
- vakcina hatásossága vagy hatástalansága: a hepatitis B vírus egyik vakcina-rezisztens mutánsának genomszekvenciája egyetlen nukleotidban különbözik a hepatitis B vírus eredeti szekvenciájától. Ez a nukleotid-különbség egyetlen aminosav megváltozását okozza a felszíni antigén „a” régiójában. A mutáns vírus így a hepatitis B oltás ellenére fertőzni tudja az oltott személyt.
- elképzelhető, hogy a szervezetben perzisztensen jelenlevő vírusok esetében jelentősége van a vírus szekvenciájának abban, hogy a tünetmentes hordozó állapot vagy krónikus megbetegedés alakul ki

A molekuláris virológiai módszerek gyakorlati felhasználása

A vírusgenom-vizsgálatok alkalmazását egy nozokomiális hepatitis B járvány tisztázása kapcsán ismertetjük.

Egy krónikus betegeket ápoló osztályon 2002-ben feltűnt, hogy egyre több beteg lesz HBsAg pozitív. Megvizsgálták a dolgozókat, és egyetlen adminisztrátor kivételével (aki soha nem érintkezett a betegekkel), mindenki HBsAg negatív volt. Ahhoz, hogy azt

valószínűsítjük, hogy egyetlen forrásból származott a fertőzés, a különböző betegekből származó vírus genomjának vizsgálatára volt szükség. A hepatitisz B vírus viszonylag stabil genomú vírus, az „S” fehérjét kódoló szakaszon belül a Pre-S1, és Pre-S2 régió mégis alkalmasnak tűnt filogenetikai vizsgálatokra. A betegek és kontrollok savójából ezért nukleinsavat tisztítottunk, nested PCR reakcióval felszaporítottuk a kérdéses DNS-szakaszt és a PCR termékeket szekvenáltuk.

Kontrollként Magyarország különböző területeiről származó hordozókból és betegekből kimutatott vírusszekvenciát használtunk.

A vizsgálat során 57 beteg, illetve tünetmentes hordozó vírus DNS-ének mintegy 600 bp-nyi szakaszát szekvenáltuk. A szekvenciákat filogenetikai fán ábráztuk. (1. ábra) Az ábrán oválisan karikáztuk a szakirodalomban közölt, reprezentatív szekvenciákat. A 24 különböző lakhelyű magyarországi kontrollbeteg közül 19 a D, 5 az A genotípusba tartozik. A fent említett kórházból származó 30 minta közül (ezek szaggatott vonallal vannak jelölve) 28 bizonyult D genotípusúnak. Ezekből a betegekből kimutatott szekvenciák nagyon hasonlóak. Valószínűsítenünk lehet azt, hogy fertőzés közös forrásból történt. Ugyanebben a kórházból érkezett egy adminisztrátor és egy újonnan felvett beteg mintája, az ő vírusuk az A genotípusba tartozik. Végül egy családi HBV halmozódást is megvizsgáltunk. Egy anyuka két testvért fogadott örökbe, akik – mint később kiderült – hepatitisz B vírus hordozók voltak. Sajnos az örökbefogadó anyjukat is megfertőzték. A három betegből kimutatott vírus szekvenciája a vizsgált szakaszon tökéletesen megegyezett (az ábrán folyamatos négyszögletes keretkezéssel jelölve).

A PCR-termékek szekvenciája alapján filogenetikai fa felállítása tehát segíthet egy járvány eredetének kiderítésében.

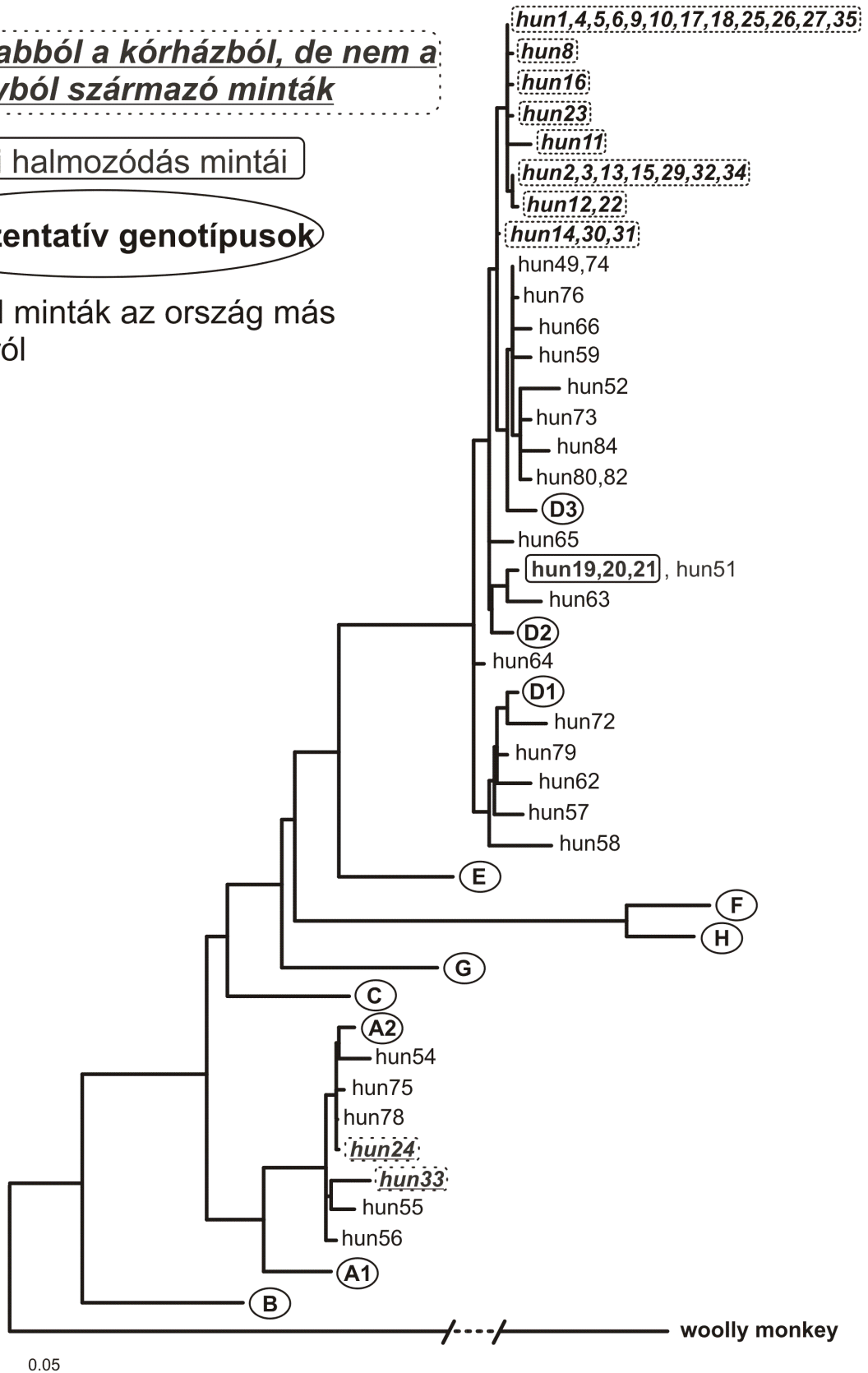
Kórházi járványból származó minták

Ugyanabból a kórházból, de nem a járványból származó minták

Családi halmozódás mintái

Reprezentatív genotípusok

Kontroll minták az ország más pontjairól



Virális zoonózisok.

Gondolatok egy könyv megjelenése kapcsán.

Ferenczi Emőke, Petrányi Gábor, Zádori Edit

A hazánkban és világszerte felbukkanó vírusos megbetegedések döntő többsége (ha nem mind) a zoonózisok körébe tartozik. Ennek a hatalmas témának csak egy szeletével foglalkozik az Orvosi Molekuláris Virologia „Virális zoonózisok” című fejezete, hiszen igen sok olyan kórokozó tartozik ebbe a körbe (madárinfluenza, hepatitis E, majom herpesz stb.), melyek természetüknél fogva más fejezetek szerves részét képezik.

Az állatról emberre terjedő megbetegedések közül korábban nálunk a kullancsok által terjesztett agyhártya-, és agyvelőgyulladás okozó, népszerű nevén kullancsencephalitis vírus és a vektorok nélkül, rágcsálók által terjesztett hantavírusok okoztak nagyobb számban hazai eredetű fertőzéseket (i, ii).

A kullancsencephalitis vírus a Flavivírus család flavivírus nemzetségébe tartozik, ennek a nemzetségnek más tagjai által okozott fertőzéseket néhány importált megbetegedés esetében időről-időre laboratóriumi vizsgálattal igazoltak. Az utazások számának növekedése és kedvenc uticélok következtében ezek közül leggyakoribb a hatalmas területeken honos (Dél-kelet Ázsia, Afrika, Közép-, és Dél-Amerika), szúnyogok által terjesztett dengue- láz vírusa okozta megbetegedés (iii). Heveny megbetegedés diagnosztikája során nehézségeket okoz a flavivírusok kiterjedt keresztreaktivitása. Idegrendszeri tüneteket okozó vírusfertőzés gyanújában az emberi megbetegedés kóroki nyomozása során gyakorlatilag nincs esély a kórokozó, vagy nukleinsava kimutatására. Szerológiai vizsgálatok adhatnak ilyen esetekben megfelelő választ, de az interpretáció a klinikai és járványtani adatok, információk nélkül nem lehetséges. A kórokozó, vagy nukleinsava állatokban (beteg, rezervoár, vagy vektor) megtalálható, ezáltal az emberi megbetegedések pontos kóroki azonosítását elősegíti a vírus izolálása, vagy nukleotid sorrendjének meghatározása (iv). Hazánkban 3 flavivírus faj okoz nem-importált fertőzéseket: a kullancsencephalitis-, nyugat-nílusi láz-, és az Usutu vírus.

Az első kettő emberben okoz idegrendszeri tünetekkel járó megbetegedéseket, míg az Usutu vírus madarakat betegít (Erdélyi Károly, Bakonyi Tamás), de emberben az immunológiai reakció kimutatható a fertőzés hatására. A klasszikus virológiai módszerek lehetővé tették a vírusok azonosítását, de annak megválaszolására, hogy melyik évben milyen földrajzi területről hozhatták be hazánkba a vándormadarak a nyugat-nílusi láz vírusát, csak a molekuláris módszerek (nukleotid sorrend meghatározás) alkalmasak. A fentiekből is kitűnik, hogy a humán-, és állategészségügyi szolgálatok együttműködése elengedhetetlen a virális zoonózisok pontos megismerésében.

- A klinikai tünetek megfelelnek a vizsgált kórokozó által okozott megbetegedésnek.
- Klinikai laboratóriumi vizsgálatok eredményei alátámasztják a feltételezett diagnózist.
- Más kórokozó szerepe kizárható az elvégzett vizsgálatok alapján, kivéve, ha feltételezhető a kettős fertőzés (pl. azonos terjedési mód és hasonló klinikai lefolyás).
- Ízeltlábú (kullancs, szúnyog) csípése a kórelőzményben, illetve az ízeltlábúak aktivitásának szezonja van.

Fent leírtak ízelítőt kívánnak adni a téma bonyolult és egyben nagyon izgalmas, érdekes voltáról. A fejezet ifjú társszerzőinek (Czeglédi Alíz, Zádori Edit, Petrányi Gábor) színvonalas munkája véleményem szerint jelentősen növeli a könyv értékét.

ⁱ Ferenczi E., Rácz G., et al. NATO Science Series

ⁱⁱ Ferenczi E., Rácz G., Szekeres J, Balog K, Toth E, Takacs M, Csire M, Mezey I, Berencsi G, Faludi G.: : Újabb adatok a hazai hantavírusok népegészségügyi jelentőségének vizsgálatához. Orv Hetil. 2003 Mar 9;144(10):467-74. Orv Hetilap

ⁱⁱⁱ [Nemes Z](#), [Kiss G](#), [Madarassi EP](#), [Peterfi Z](#), [Ferenczi E](#), [Bakonyi T](#), [Ternak G](#).: Nosocomial transmission of dengue. Emerg Infect Dis. 2004 Oct;10(10):1880-1.

^{iv} Glavits R, Ferenczi E, Ivanics E, Bakonyi T, Mato T, Zarka P, Palya V.: Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. Avian Pathol. 2005 Oct;34(5):408-14.