

# A hepatitis G- és TT-vírus diagnosztikájának bevezetése Magyarországon

Takács Mária  
Rusvai Erzsébet  
Brojnás Judit  
Tóth Gábor  
N. Szomor Katalin  
Tóth Etelka  
Szendrői Andrea  
Mezey Ilona  
Berencsi György

## INTRODUCTION OF HEPATITIS G AND TT VIRUS DIAGNOSTICS IN HUNGARY

**INTRODUCTION** – The majority of the viral hepatitis is caused by five hepatitis viruses (A, B, C, D, E). In 1995, three new flaviviruses were discovered, the GBV-A, GBV-B and GBV-C (also known as HGV) viruses. The TT virus was discovered in 1997. Based on literature data, it is now supposed that a part of the unknown hepatitis cases is caused by the recently discovered hepatitis G or TT virus. The aim of this study was to determine the occurrence of hepatitis G and TT viruses in Hungary.

**PATIENTS AND METHODS** – To reveal the RNA of the HGV viruses in the sera of patients suffering from hepatitis of unknown origin, RT-PCR was applied using the primers published in the literature. Seminested PCR was used to detect the DNA of TTV. The nucleotide sequences of nested PCR products were determined. Anti-HGV antibodies were detected by ELISA.

**RESULTS** – The sera of 408 healthy persons older than 60 years were tested for the presence of hepatitis G virus antibodies: 113 tested positive. HGV virus antibodies were found in the sera of patients suffering from hepatitis of unknown origin or aplastic anaemia. 51 sera were tested and 20 were found to be positive for GBV-C antibodies, 4 for HGV RNA. Altogether, 213 sera of patients suffering from hepatitis of unknown origin or from aplastic anaemia were tested for HGV RNA and 26 were found to be positive. Eight PCR products were sequenced, and these sequences were found to be different from each other. 154 sera of patients with hepatitis of unknown origin were tested for the presence of TTV-DNA and 72 of them were positive. Seven PCR products were directly sequenced. Genotype 2 was found to be the most frequent one in Hungary.

**BEVEZETÉS** – A vírushepatitisek döntő többségét öt hepatitisvírus okozza (A, B, C, D, E). 1995-ben három új flavivírust fedeztek fel (GBV-A, GBV-B, GBV-C/HGV), 1997-ben pedig a TT-vírust. Az irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az ismeretlen eredetű hepatitises megbetegedések egy részének hátterében az újonnan felfedezett hepatitis G- és TT-vírus áll. A kutatás fő célja annak megállapítása volt, hogy ez a két vírus előfordul-e Magyarországon.

**BETEGEK ÉS MÓDSZEREK** – A hepatitis G-vírus RNS-ének kimutatásához az ismeretlen eredetű hepatitisben szenvedő betegek savójából vírus-RNS-t izoláltunk, majd ebből a szakirodalomban leírt primerekkel reverz transzkripció után PCR-terméket amplifikáltunk. A TT-vírus (TTV) DNS-ének kimutatásához seminested PCR-t alkalmaztunk. Meghatároztuk a PCR-termékek szekvenciáját. A hepatitis G-vírus elleni ellenanyagot ELISA-módszerrel mutattuk ki.

**EREDMÉNYEK** – A vizsgált 408 egészséges, 60 év feletti személy vére közül 113-ban találtuk meg a hepatitis G-vírus (HGV) elleni ellenanyagot. 51, ismeretlen eredetű hepatitisben szenvedő beteg savója közül 20 esetben mutattunk ki aHGV-ellenanyagot és négy esetben HGV-RNS-t. A megvizsgált 213 beteg savójából 26 esetben tudtuk kimutatni a HGV-RNS-t. A betegek többsége politranszfundált, hepatitisben, illetve aplastic anaemiában szenved. Nyolc betegből származó vírus-RNS esetén a nukleotidsorrendet is meghatároztuk. Mindegyik szekvencia kismértékben különbözött. 154, ismeretlen eredetű hepatitisben szenvedő beteg savóját teszteltük TTV-DNS jelenlétére. 72 savót találtunk pozitívnak. Hét PCR-terméknek határoztuk meg a nukleotidsorrendjét. Kimutattuk, hogy Magyarországon a 2-es genotípus a leggyakoribb.

**CONCLUSION** – Our results show that both HGV and TTV are present in Hungary and none of them can be considered rare. Further studies are needed to reveal the association between the genotypes of these viruses and hepatitis of unknown origin.

**KÖVETKEZTETÉSEK** – A kapott eredmények azt mutatják, hogy mind a hepatitis G-vírus, mind a TT-vírus kimutatható Magyarországon, egyik sem tekinthető ritka vírusnak. További vizsgálatokat kell végezni annak tisztázására, hogy a vírusok mely genotípusai állnak kapcsolatban a hepatitises megbetegedésekkel.

Correspondence:  
Mária Takács, dr.  
Johan Béla National  
Center for Epidemiology,  
Division for Virology  
H-1097 Budapest, Gyáli út 2–6.

Levelező szerző:  
dr. Takács Mária,  
Johan Béla Országos  
Epidemiológiai Központ,  
Virologiai Főosztály  
1097 Budapest, Gyáli út 2–6.

**hepatitis G vírus, TT vírus,  
hepatitis, polymerase chain reaction,  
sequencing**

**hepatitis G-vírus, TT-vírus,  
májgyulladás, polimeráz láncreakció,  
nukleotidsorrend-vizsgálat**

Számos vírusról tudjuk, hogy hepatitiszt okoz, mégis mindmáig találkozunk olyan fertőző hepatitises megbetegedésekkel, amelyek nem hozhatók kapcsolatba a rutinszerűen vizsgált vírusokkal. Az ilyen megbetegedések egy részének hátterében valószínűleg az újonnan felfedezett hepatitis G-vírus (HGV) és TT-vírus (TTV) áll. Ezeknek a vírusoknak a vizsgálata az utóbbi években az egész világon elterjedté vált. Magyarországi előfordulásokról azonban csak igen kevés adattal rendelkezünk. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a fenti két vírus magyarországi előfordulását, meghatározzuk a Magyarországon előforduló vírusok jellegzetességeit, és az eredményeket összehasonlítsuk a nemzetközi szakirodalomban leírt adatokkal.

## Irodalmi háttér

A máj vírus okozta gyulladása, a vírushepatitis a legrégbben ismert megbetegedések közé tartozik. A hepatitis A-vírus (HAV) a picornavírusok közé tartozik; egyszálú RNS-vírus, többnyire enterálisan terjed, kizárólag akut megbetegedést okoz. A hepatitis B-vírus (HBV) a Hepadna víruscsalád tagja; DNS-vírus, parenteralisan (leggyakrabban szexuális érintkezéssel, vérrel, vérkészítményekkel és vertikális úton) terjed. Tünetmentes vírushordozás és krónikus megbetegedés is gyakran bekövetkezik. A hepatitis D-vírus (HDV, régebben delta-agens) defektív vírus. Valamennyi gazdaélőlényben csak a hepatitis B-vírus jelenlétében képes szaporodni. Genomja cirkuláris RNS. Mindazokat a vírushepatitiseket, amelyeknek etiológiája tisztázatlan volt, korábban non A-non B-hepatitisnek nevezték. A non

A-non B-hepatitisek létezése majdnem három évtizede ismert (1).

Az elmúlt évtizedben jelentősen bővültek ismereteink a hepatitisvírusokról és az általuk okozott megbetegedésekről. A differenciálás lehetőségét a molekuláris klónozás, majd a rekombináns technológia felhasználásával kidolgozott szerológiai vizsgálatok teremtették meg. Így fedezték fel a nem tenyészhető hepatitis C-vírust (HCV) (2), és bebizonyították, hogy a parenteralisan terjedő non A-non B-hepatitisek nagy részéért ez a vírus felelős (3, 4). A hepatitis C-vírus a flavivírusok közé tartozik. Pozitív polaritású, egyszálú RNS-vírus, váladékokkal és parenteralisan terjed. A fertőzött egyének 40-60%-ánál krónikus megbetegedést okoz (5). A hepatitis C (HCV) felfedezésével sem sikerült azonban egyértelműen tisztázni valamennyi inokulációs vírushepatitis okát (6).

A hepatitis A-vírustól különböző, enterális úton terjedő, hepatitiszt okozó vírus létezésére jóval felfedezése előtt egyértelmű bizonyíték volt (7). A hepatitis E-vírust (HEV) 1989-ben fedezték fel molekuláris módszerekkel (8, 9). Az enterálisan terjedő vírus leginkább a calicivírusokra hasonlít. Genomja pozitív polaritású, egyszálú RNS.

A GB-vírusok felfedezésének története a hatvanas évekre nyúlik vissza, bár ma-

dr. Takács Mária,  
dr. Rusvai Erzsébet,  
Brojnás Judit,  
N. Szomor Katalin,  
Tóth Etelka,  
Szendrői Andrea,  
dr. Mezey Ilona,  
dr. Berencsi György:  
Johan Béla Országos  
Epidemiológiai Központ,  
Virologiai Főosztály;  
dr. Tóth Gábor:  
Eötvös Loránd  
Tudományegyetem,  
Genetikai Tanszék,  
Budapest.  
Érkezett: 2001. február 8.  
Elfogadva: 2001. április 11.

gukat a vírusokat csak napjainkban sikerült azonosítani. Egy akut non A-non B-hepatitisben szenvedő sebész (nevének kezdőbetűi: G. B.) vérével fertőztek újvilági, szélesorrú majmokat (tamarinokat), ami akut hepatitist idézett elő náluk, míg az ugyanezzel a vérrel beoltott csimpánzok nem betegedtek meg (10). Később bebizonyították, hogy a GB-agens nem azonos a hepatitis C-vírussal, mert az a csimpánzokat megbetegíti, viszont a tamarinokat nem. Két különböző vírust izoláltak, ezeket GBV-A-nak és GBV-B-nek nevezték el. Az új vírusok flavivírus természetét 1995-ben publikálták (11).

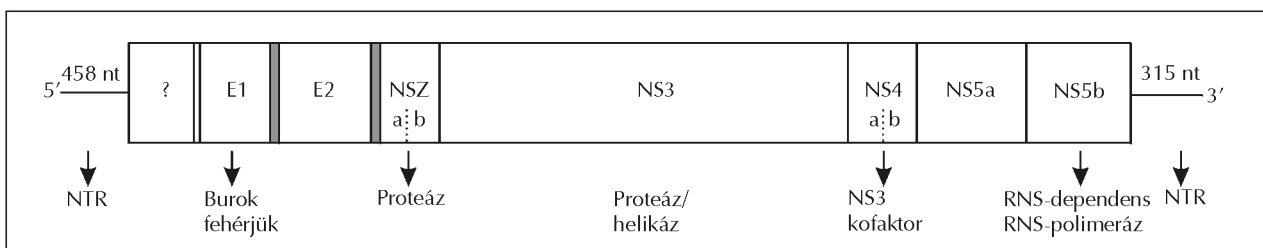
További, polimeráz lánreakcióval (PCR) végzett vizsgálatokkal egy szerkezetileg hasonló vírust sikerült felfedezni, a GBV-C-vírust. A GBV-C-t egy nyugat-afrikai betegből azonosították (11). A GBV-C-RNS-t kimutatták már számos, klinikai tünet alapján hepatitisnek tartott betegnél, valamint a hepatitis szempontjából fokozott rizikójú csoportokban (hemofiliások, intravénás kábítószer használók, politranszfundáltak). Ez a vírus nagyon hasonlónak bizonyult az 1995-ben klónozott hepatitis G-vírushoz (HGV) (12). A hepatitis G-vírust *Linnen* és munkatársai (12) két betegből mutatták ki: egyikük tisztázatlan eredetű hepatitisben szenvedett, a másik betegnél a hepatitis G-vírus mellett a hepatitis C-vírus jelenlétét is kimutatták. Igazolták, hogy a GBV-C és a HGV között nagy a hasonlóság, nukleotidszinten 86%, aminosavszerkezeten 95%. Ma a GBV-C-t és a HGV-t ugyanazon vírus két variánsának tartják (13), míg a GBV-A és a GBV-B a természetes gazdafajok, a célsejtek, és a szekvencia különbözősége alapján különálló vírusok. A két utóbbi (GBV-A és GBV-B) vírusról bebizonyosodott, hogy nem humánpatogének.

A hepatitis G-vírus is pozitív szálú RNS-t tartalmaz, és génszerkezete hasonlít a többi flavivírushoz (1. ábra). A HCV-hez hasonlóan a hepatitis G-vírus genomja is az 5' végén egy 458 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló leolvasatlan régiót tartalmaz, amelyet egy hosszú leolvasási keret követ. A genom 3' végén is egy 315 nukleotid hosszúságú, leolvasatlan régió található. A feltételezett poliprotein

tein a következő fehérjéket tartalmazza: E1- és E2-burokfehérjék a genom 5' végén, majd ezeket követik a nem szerkezeti (non-structural) proteinek (NS2, NS3, NS4, NS5). Igen érdekes, hogy a hepatitis G-vírus genomja nem tartalmaz olyan teljes mag- (core-) gént, amely a nukleokapszidot kódolná (14). Mivel a hepatitis G-vírus aminosav-szekvenciájának változékonysága kicsi, a hepatitis G-vírus típusok és altípusok helyett csoportokba és alcsoportokba sorolják (15). Négy csoport (1, 2, 3, 4), továbbá a kettes csoporton belül két alcsoport (2a és 2b) létezik: Az 1-es alcsoportba tartozó vírust Nyugat-Afrikában mutatták ki, a 2-est Észak-Afrikában, Európában és Indiában, a 3-ast Ázsiában. A 4-es csoportba tartozó vírus egy kínai betegből származik (13, 15).

Jelenleg nem ismert olyan szerológiai eljárás, amellyel az akut HGV-fertőzést ki lehetne mutatni. Az E2-proteinre alapozott ELISA-eljárás a hepatitis G-vírus-ellenanyagot csak későn, egyes esetekben fél évvel a fertőzés után mutatja ki. Így a friss fertőzések igazolására csak az RT-PCR (reverz transzkripciót követő polimeráz lánreakció) jöhet szóba. Az NS-régiókra több primerpárt terveztek (16, 17). Érdekes, hogy egyes vizsgálatok szerint majdnem minden, anti-E2-t tartalmazó szérumnál negatív eredményt kaptak hepatitis G-vírus-RNS-re (13). Ez azt jelenti, hogy az anti-E2 megjelenése összefügg a hepatitis G-vírus termelődésének megszűnésével. Az anti-E2 jelenléte azt mutatja, hogy a beteg találkozott a hepatitis G-vírussal.

Sok országban leírták a hepatitis G-vírus-RNS előfordulását a véradók körében. Magas az előfordulási arány Thaiföldön (4,3%), Vietnámban (5,7%), Németországban (4,7%), Dél-Afrikában (14,2%), de alacsony Japánban (0,6–0,9%), Kínában (0,7–2,0%) és az Egyesült Államokban (0,8–1,7%) (12, 18–24). A nagy kockázatú csoportokban a hepatitis G-vírus RNS-ének előfordulása igen gyakori: intravénás kábítószer élvezők esetében 4–38%, fizetett véradóknál 5–26%, hemodializált egyéneknél 3–10%, hemofiliás betegek körében 14–38%. Magyarországon vesetranszplantált és dializált betegek 3–17%-ánál mutatták ki a hepatitis G-vírus



1. ábra. A hepatitis G-vírus genomja. Az 5' végén leolvasatlan régió található, ezt egy feltételezett poliprotein követi, majd a 3' végén szintén leolvasatlan régió helyezkedik el. Az egyes fehérjék kódolóhelyeit az ábrán bejelöltük

nt: nukleotid

NTR: nem transzálódó (leolvasatlan) régió

RNS-ét (25). A szakirodalmi adatok szerint poszttranszfúziós akut hepatitisben szenvedők 19–40%-ánál mutatták ki a hepatitis G-vírus RNS-ét, míg a sporadikus esetekben csak 0–9%-ban. A rendelkezésre álló adatok szerint a hepatitis G-vírus valószínűleg nem okoz hepatocellularis carcinomát (26, 27); kapcsolatba hozzák viszont az aplasticus anaemia kialakulásával. Olyan elmélet is ismert, hogy csak az egyik alcsoportba tartozó vírus áll kapcsolatban az aplasticus anaemiával (28, 29).

Japánban 1997-ben egy ismeretlen eredetű poszttranszfúziós hepatitisben szenvedő beteg szérumból DNS-vírust mutattak ki (30, 31). A beteg nevének kezdőbetűi (T. T.) alapján a vírust TT-vírusnak nevezték el; genomját a 2. ábra szemlélteti. A TT-vírus egyszálú, cirkuláris DNS-vírus, a genom hossza a genotípustól függ. Az 1-es genotípus 3853 nukleotidból áll. A TT-vírus DNS-e 1,2 kilobázis (kb) nem kódoló és 2,6 kb kódoló régióból áll. Két, részben átfedő, nyitott leolvasási kerettel rendelkezik (ORF1 és ORF2). Az ORF1 valószínűleg a kapszidfehérjét kódolja. Az aminosav-szekvencia N-terminális részén mintegy 100 aminosavat tartalmazó hidrofíls szakasz található, amely nagyon gazdag argininben. Hasonló szekvenciák fordulnak elő a hepatitis B-vírus mag- (core-) proteinjének C-terminális végén és a hepatitis C-vírus core-proteinjének N-terminális részén (31). Az ORF2 szerepét a prototípus törzs esetében vizsgálták. Azt találták, hogy nem az első, hanem a második ATG-kodonnál kezdődik az átírás. Az ORF2 valószínűleg egy nem szerkezeti (non-struktural) proteint kódol, ami a vírusreplikáció során válik szükségessé (32). Bár kezdetben a TT-vírust a parvovírusokhoz sorolták, kiderült, hogy a TT-vírus a circovírusokra hasonlít. Változékony, eddig már legalább 16 genotípusát

azonosították szerte a világon, Európában, Észak-Amerikában, Ázsiában, Afrikában és Óceániában (33–38). A genotípusok közötti szekvenciakülönbség elérheti a 30%-ot is. A nem kódoló régió konzervatív, míg a fehérjét kódoló szakaszok nagyon változékonyak. A TT-vírusnak nincsen burka (31). A vírusfertőzés után nagyon rövid ideig mutatható ki a vírus-specifikus IgM, viszont az IgG egyes esetekben négy évig is kimutatható (32). Bebizonyosodott, hogy nemcsak parenteralisan, hanem enteralisan is terjed (39). Felmerült az a gyanú, hogy sok esetben nem a TT-vírus az oka a hepatitiszes megbetegedésnek (35, 40). Az 1-es genotípusról viszont kiderült, hogy több esetben poszttranszfúziós hepatitiszt okozott. Egyes betegeknél a szervezet eliminálta a vírust, másoknál hosszú éveken át ki tudták mutatni a vírus-DNS-t a szervezetben (32).

## Betegek és módszerek

### Betegek

A vizsgálatokhoz olyan betegek savóit választottuk, akiknek a kórelőzményében májbetegségekre utaló adatok szerepeltek, és a beteg kapott már transzfúziót. 213 olyan beteg savóját választottuk ki, akiknél a májbetegség eredetét nem tudták tisztázni: vérükben sem a hepatitis B-vírust, sem a hepatitis C-vírust nem tudták kimutatni. A betegek átlagéletkora 42 év volt.

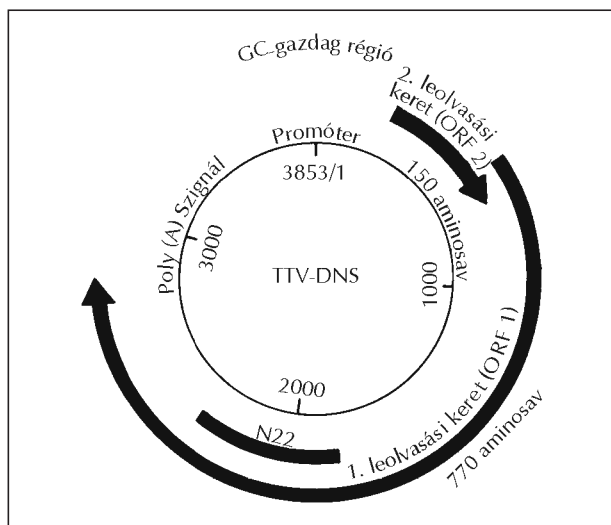
A vizsgálatokhoz 479, epidemiológiai szűrésben részt vett egyén savóját használtuk fel. Közülük a vérvétel időpontjában 408 személy 60 éven felüli, 71 személy 60 éven aluli volt.

### Szerológiai vizsgálatok

A vizsgálatra beküldött vérsavó mennyiségétől függően a következő vírusserológiai vizsgálatokat végeztük el a kereskedelemben kapható reagensek segítségével: anti-HGV (R&D Systems anti-GBV-C), anti-HBc (Organon Technika Hapanostika HBsAg UNI-FORM II és Hapanostika anti-HBc UNI-FORM), anti-HAV-IgG és -IgM (Organon Technika Hapanostika HAV antibody és Hapanostika HAV-IgM), anti-HCV (Pasteur Sanofi Monolisa anti-HCV PLUS), anti-HEV-IgG és -IgM (Biokit Bioelisa HEV-IgG és Bioelisa HEV-IgM).

### RNS- és DNS-tisztítás vérsavóból, PCR céljára

160  $\mu$ l savóhoz 395  $\mu$ l lizálóoldatot (25 mM EDTA, 0,2 M Tris-HCl pH: 7,5, 0,3 M NaCl, 2% SDS) és



2. ábra. A TT-vírus genomja. Az egyszálú TTV-DNS két lehetséges leolvasási keretet kódol (ORF1 és ORF2)

4 µl, 20 mg/ml proteináz K-t adtunk, összekevertük, és 60 percre 37 °C-ra tettük. Ezután 395 µl fentolt (amelyet előzőleg 1 M Tris-HCl pH=8 oldattal kiráztunk), és 160 µliter kloroformot adtunk hozzá. Alaposan összekevertük, majd 15 percig +4 °C-on Eppendorf-centrifugában centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, és azonos térfogatú izopropanolt tettünk hozzá. Egy éjszakán keresztül, -20 °C-on tartott az RNS-kicsapás. Eppendorf-centrifugában 15 percig +4 °C-on centrifugáltuk, 70%-os etanollal mostuk, majd újból centrifugáltuk a csapadékot. Az RNS-t és DNS-t száradás után 8 µl bidesztillált vízben oldottuk fel (41).

### A cDNS-szintézis

A reverz transzkripció elegy ösztérfogata 20 µl volt. A reakcióelegyet a következőképpen állítottuk össze: 2 µl 10-szer koncentrált Perkin-Elmer PCR-puffer (100 mM Tris-HCl pH=8,3, 500 mM KCl), 3 µl bidesztillált víz, 8 µl dNTP (10 mM), 1 µl moloney murine leukemia virus reverz transzkriptáz (50 U/µl), 1 µl RN-áz inhibitor (20 U/µl), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM/µl), 1 µl random hexamer (0,5 µM/µl), 2 µliter RNS. Ásványi olajjal lefedve, 15 percig, 42 °C-on történt a reverz transzkripció, majd a mintát 5 percre 99 °C-ra melegítettük.

### Polimeráz láncreakció

A HGV, a TTV és a HCV kimutatásához polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmaztunk. Az irodalomban közölt primereket használtuk (17, 35, 42) (1. táblá-

zat). A primereket az Integrated DNA Technologies Inc. (USA) szintetizálta.

Az első PCR-elegy ösztérfogata 50 µl volt, amely 0,2 mM dNTP-t, 1 egység Taq polimerázt, és mindkét primerből 20 pmol-t tartalmazott. A cDNS-oldat felét (10 µl) használtuk fel a PCR-hez. A PCR-t minden esetben háromperces, 94–96 °C-on végzett denaturálással kezdtük, és az utolsó ciklus után még 7 percig 72 °C-on tartottuk.

A második PCR-hez az 1. PCR termékéből 1 µl-t használtunk fel. Az egyik primer 5' végére biotint szintetizáltattunk. A másik primer 5' végéhez az „Universal primer” 15 nukleotidját szintetizáltattunk, így minden régió PCR-termékének szekvenciameghatározása lehetővé vált egy fluoreszcenccel jelölt primerrel. A PCR-hez 5 pM primert használtunk fel. 5 µl terméket agarózgélben ellenőriztünk.

### A nukleotidsorrend vizsgálata

A második PCR termékét streptavidinnel fedett mágneses gyönggyel (Dyna, AB, Norvégia) tisztítottuk, majd meghatároztuk a biotinnal jelölt szál szekvenciáját fluoreszcenccel jelölt M13 Universal primer segítségével. A reakciót AutoRead DNA Sequencing kit (Pharmacia Biotech, Svédország) felhasználásával végeztük el. A reakciótermékeket A.L.F. automata DNS-szekvencia-meghatározó készüléken (Pharmacia Biotech, Svédország), poliakrilamid gélen szeparáltuk. A futtatásnál kapott eredményeket az A.L.F. 2.5 verziója segítségével értékeltük ki.

A kapott szekvenciák illesztéséhez a Clustal W programot használtuk (43), a szekvenciák közötti

1. táblázat. A vizsgálatokhoz felhasznált primerek szekvenciái

HGV-primerek	
1. PCR primereinek szekvenciája:	
HGYK877	5'-ACCGACACCTTAGATCCCCAGCCC
HGYK874	5'-CTGATGTTGCTAGCCTGTGTGAGA
94 °C, 3 perc, 94 °C 30 sec, 57 °C 30 sec, 72 °C 1 min, 35 ciklus, majd 72 °C 7 perc	
2. PCR primereinek szekvenciája:	
HGYK876	5'-biotin-CCTTACAGTCCTTATTGCTTCCTC
HGYK1183	5'-GTAAAACGACGGCCACAGAACCATACAGCCTATTGTGAC
94 °C, 3 perc, 94 °C 30 sec, 56 °C 30 sec, 72 °C 1 min, 30 ciklus, majd 72 °C 7 perc	
TTV-primerek	
1. PCR primereinek szekvenciája:	
TTV1428:	5'-ACAGACAGAGGAGAAGGCAACATG-3`
TTV1689:	5'-CTGGCATTTTACCATTTCCAA AGTT-3`
94 °C, 3 perc, 94 °C 30 sec, 55 °C 45 sec, 72 °C 45 sec, 35 ciklus, majd 72 °C 7 perc	
2. PCR primereinek szekvenciája:	
TTV <sub>snu</sub> :	5'-GTAAAACGACGGCCAGGCAACATGYTRIGGATAGACTGG-3`
TTV1689b	5'-biotin-CTGGCATTTTACCATTTCCAAAGTT-3`
94 °C, 3 perc, 94 °C 30 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 30 sec, 25 ciklus, majd 72 °C 7 perc	

genetikai távolságok számításán alapuló filogenetikai analízishez pedig a PHYLIP programcsomag 3.572c verzióját (44). A filogenetikai megbízhatóságának becslésére a nukleotidszekvenciapozíciók véletlenszerű ismétléses mintavételét és ezt követő faszerkesztést 1000-es ismétlésben alkalmazó bootstrap analízist végeztünk

## Eredmények

### Az aHGV-ellenanyagok meghatározása a népességben

Főosztályunk részt vett az országos szeroepidemiológiai szűrésben. Az ország minden részéről érkezett savókban megvizsgáltuk az anti-HGV-ellenanyagok jelenlétét. A kapott eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze. Mivel a vizsgált 408, 60 év feletti lakos közül 113 bizonyult pozitívnak, megállapíthatjuk, hogy Magyarországon az idősebb lakosság jelentős része találkozott már a hepatitis G-vírussal. Egyetlen megyében fiatalabb egyéneket is vizsgáltunk, a vártnak megfelelően az aHGV-ellenanyagok előfordulását alacsonyabbnak találtuk: mindössze egyetlen 30 évesnél fiatalabb személy vére tartalmazott aHGV-ellenanyagot.

2. táblázat. Az anti-HGV-ellenanyag előfordulása egészséges népességben

	Vizsgált savók száma	Anti-HGV-pozitív
60 évesnél idősebb (egész Magyarország területéről)	408	113
60 évesnél fiatalabb (Fejér megyéből)	71	8

3. táblázat. Az anti-HGV-ellenanyag és HGV-RNS előfordulásának összehasonlítása ismeretlen eredetű hepatitises betegek körében

	aHGV-pozitív	aHGV-negatív	Összesen
HGV-RNS-pozitív	0	4	4
HGV-RNS-negatív	20	27	47
Összesen	20	31	51

### Az aHGV-ellenanyag és a HGV-RNS jelenlétének vizsgálata

51, ismeretlen eredetű hepatitisben szenvedő betegnél határoztuk meg az aHGV-ellenanyagot és a HGV-RNS-t. Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

Az 51 beteg közül 20-nál mutattunk ki aHGV-ellenanyagot. Meg kell jegyezni, hogy legalább fél év kell ahhoz, hogy a savó kimutatható mennyiségű ellenanyagot tartalmazzon, ezért ez a módszer akut betegség diagnózisára nem alkalmas. A 20 savó egyike sem tartalmazott HGV-RNS-t.

HGV-RNS-t négy beteg savójából tudtunk kimutatni, ezek mindegyike aHGV-ellenanyag-negatívnak bizonyult. Így nem találtunk olyan beteget, akinek a savójából mind aHGV-ellenanyagot, mind HGV-RNS-t ki tudtunk volna mutatni. Ezek az eredmények összhangban állnak az irodalomban megjelent közlésekkel (13).

### A HGV-RNS kimutatása, a nukleotidsorrend meghatározása

Összesen 213 savóban vizsgáltuk meg a HGV-RNS jelenlétét (4. táblázat). A 202, ismeretlen eredetű hepatitisben szenvedő beteg közül 24 esetében mutattuk ki a HGV-RNS-t. Sajnos csak három aplasticus anaemiás beteg savóját tudtuk vizsgálni, ezek közül egy bizonyult pozitívnak.

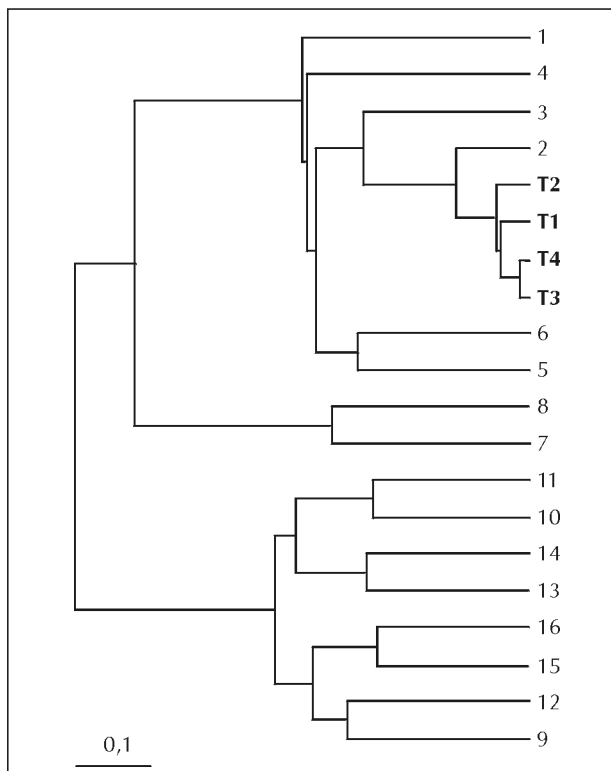
Nyolc PCR-termék szekvenciáját határoztuk meg. Az így kapott eredmények a 3. ábrán láthatók. A felső nyolc szekvencia az irodalomból származik (12, 17), az alsó nyolc pedig (G1–G8) a betegekből kimutatott vírusok szekvenciájának egy részlete. Mindegyik szekvencia kismértékben különbözik egymástól és az irodalomban közölt szekvenciáktól.

### A TTV-DNS kimutatása

154, ismeretlen eredetű hepatitisben szenvedő beteg savóját vizsgáltuk meg TTV-DNS jelenlétére. 72 esetben kaptunk pozitív eredményt. Hét PCR-ter-

4. táblázat. A HGV RNS-ének előfordulása betegeknél

	Vizsgált savók száma	HGV-RNS-pozitív
Ismeretlen eredetű hepatitis	202	24
Aplasticus anaemia	3	1
Más betegség	8	1
Összesen	213	26



4. ábra. A vizsgált TT-vírusok filogenetikai fája. A filogenetikai kapcsolatokat feltüntető fán számokkal jelöltük az irodalomban (45) közölt 16-féle genotípust. T1–T4 jelöléssel az általunk meghatározott TTV-DNS-szekvenciák láthatók. A szekvenciák közötti genetikai távolságot a PHYLIP programcsomag (44) segítségével, Kimura kétparaméteres módszere alapján becsültük. Két szekvencia közötti genetikai távolság az őket összekötő vonalak vízszintes részeinek együttes hosszúságából olvasható le, a 0,1 genetikai távolságot (10% eltérést) reprezentáló szakasz figyelembevételével. Látható, hogy a T1–T4 szekvenciák a 2-es genotípushoz állnak legközelebb

mékek határoztuk meg a nukleotidszekvenciáját, ebből három kevert szekvenciával rendelkezett. A szekvenciák jelentős különbséget mutattak, egymással és az irodalomban közöltekkel összehasonlítva egyaránt. A jól leolvasható négy szekvencia esetén az irodalomban közölt (45) genotípusok (1–16) alapján filogenetikai fát állítottunk fel (4. ábra). Megállapítottuk, hogy mind a négy betegből (T1–T4) kapott szekvencia a 2-es genotípushoz áll a legközelebb. A bootstrap analízis alapján a 2-es genotípushoz való tartozás valószínűsége 100%. A kevert szekvenciákat klónozni fogjuk.

## Következtetések

Eredményeinket az 5. ábrán összegeztük. Megállapítottuk, hogy Magyarországon a 60 év feletti korosztály jelentős hányadában (28%) kimutatható a hepatitis G-vírus ellen termelődött specifikus ellenanyag. Ez azt jelenti, hogy a hepatitis-G nem ritka vírus, talán érdemes lenne vizsgálni előfordulását a vérkészítményekben is. Fiataloknál sokkal kisebb mértékben fordul elő, mint idősebbek körében; ez azzal magyarázható, hogy a hepatitis G-vírus vérrel, vérkészítményekkel és szexuális úton terjed.

Az általánosan használt hepatitis G-vírus-primerek (17) alapján nested polimeráz láncreakció segítségével vizsgáltuk, hogy ismeretlen eredetű májgyulladásban szenvedő betegekben és néhány, aplasticus anaemiában szenvedő betegben előfordul-e a hepatitis G-vírus RNS-e. Az ismeretlen eredetű hepatitises betegek mintegy 12%-ánál mutatuk ki a hepatitis G-vírus RNS-ét. A szakirodalom-

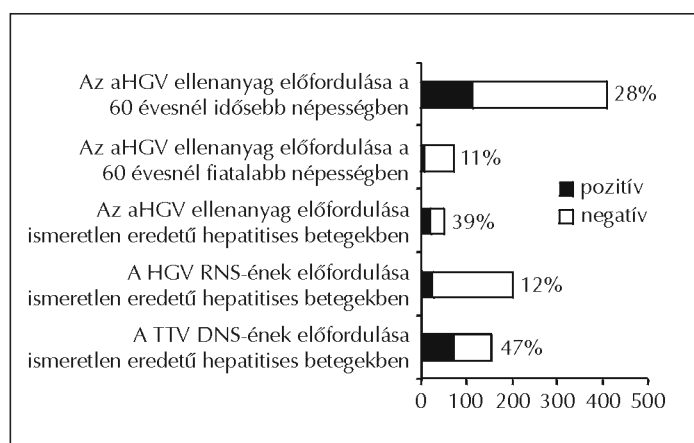
U44402	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGTGCTCCTAGGGTTCATGATAAGTACCTCGTGGACT
D87255	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGTGCTCCGAGGGTTCATGACAAATACCTCGTGGACT
U96117	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGAGAGCCCCCTCGGGTCCATGACAAATTTCTCGTGGATT
U96118	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGAGAGCCCCCTCGGGTCCATGACAAATTTCTCGTGGATT
U63715	GAGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGTGCCCCCTCGAGTCCATGACAAATTTCTCGTGGACT
U75356	GGGTTGACAAGGTGACCTTTTGGCGCGCTCCTCGGGTTCACGACAAGTTTCTCGTGGACT
U96122	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGCGCCCCCTAGGGTTCACGACAAATACCTCGTGGACT
D87708	GGGTTGACAAGGTGACCTTCTGGCGCGCGCCTCGGGTCCATGACAAATCCTTGTGGATT
G1	TGGTGGACAAGGTGACCTTTTGGCGTGCCCCCTAGGGTTCATGACAAATACCTCGTGGACT
G2	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGCGCTCCTAGGGTTCACGACAAATACCTCGTGGATT
G3	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGTCCCTCTAGGGTTCACGACAAATATCTCGTGGACT
G4	GAGTTGACAAGGTAACCTTCTGGCGCGCCCCCTAGGGTTCATGACAAATATCTCGTGGATT
G5	GAGTAGACAAGGTGACCTTTTGGCGAGCTCCCTAGAGTCCATGATAAATTTCTCGTGGATT
G6	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGCGCTCCAGGGTTCATGACAAATTTCTCGTGGACT
G7	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGAGCTCCGAGAGTTCATGACAAATTTCTCGTGGACT
G8	GGGTGGACAAGGTGACCTTCTGGCGAGCTCCGAGAGTTCATGACAAATTTCTCGTGGACT

\* \* \* \* \*

3. ábra. A hepatitis G PCR-nél kapott nukleotidszövegeinek részlete. Az ábrán G1–G8 jelöléssel szerepelnek az általunk vizsgált betegekben kimutatott vírusnukleotid-szekvenciák. Felettük összehasonlítás céljából a szakirodalomban közölt nyolc hepatitis G-szekvencia megfelelő részét tüntettük fel, a nemzetközi nukleotidszekvencia-adatbázisbeli (GenBank/EMBL) azonosítójukkal együtt. A csillaggal jelölt pozíciókban mind a tizenhat szekvencia azonos nukleotidokat tartalmaz.

mal megegyezően azt tapasztaltuk, hogy a hepatitis G-vírus RNS-e és a vírus ellen termelődött ellenanyag egyetlen mintában sem mutatható ki egyszerre (46). A kapott PCR-termékeknek meghatároztuk a szekvenciáját. Az eddig kapott szekvenciák vizsgálata azt mutatta, hogy a hepatitis G-vírusok vizsgált szakaszán kismértékű szekvenciakülönbségek találhatók. Az azonosság és eltérés a törzsfakészítéssel számszerűsíthető. A törzsfakészítéshez az újabb adatok szerint hepatitis G-vírus esetében legalább 2000 bázispárnyi szekvenciával kell rendelkezni a vírus több különböző régiójából (47), különben félrevezető eredményeket kaphatunk. A jelenlegi vizsgálatokkal csak 400 bázispárnyi PCR-termék áll rendelkezésre, ami nem elegendő a törzsfakészítéshez. Ahhoz, hogy megállapítsuk, milyen genotípusú hepatitis G-vírus fordul elő Magyarországon, további vizsgálatok szükségesek.

Sajnos TT-vírusra specifikus ellenanyag-vizsgálatokat hozzáférhető reagenskészlet hiánya miatt nem tudtunk végezni. A szakirodalomban található szekvenciák és az általánosan használt TT-vírus-primerek (35) alapján polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk, hogy ismeretlen eredetű hepatitisben szenvedő betegekben megtalálható-e a TT-vírus DNS-e. A kapott PCR-termékeket nukleotidsorrend-vizsgálattal azonosítottuk. A vizsgált betegek csaknem felénél (47%) mutattuk ki a TT-vírus DNS-ét. A terjedés módja szerepet játszhat abban, hogy a TT-vírus genomja az ismeretlen eredetű hepatitisben szenvedő betegek véréből nagyobb százalékban mutatható ki, mint a hepatitis G-vírus: a TT-vírus nemcsak parenteralisan terjed, hanem bizonyított az enterális terjedés is. A TT-vírusok heterogenitását (a vizsgált szakaszon) az irodalmi adatoknak megfelelően nagymértékűnek találtuk (32, 35). Ismert, hogy egy betegben több, különböző szekvenciájú vírus is perzisztálhat (32, 45). Hét vizsgált beteg közül háromnál mi is kevert szekvenciát mutattunk ki. Ebben az esetben a PCR-termék szekvenciájának meghatározásával nem kapunk értékelhető eredményt. Ilyenkor a PCR-termék plazmidba történő klónozása és inzert szekvenciájának meghatározása szükséges. A törzsfakészítéshez TT-vírus esetében már viszonylag rövid szekvencia



5. ábra. A hepatitis G- és TT-vírusokkal kapcsolatos vizsgálatok összességé

(220–300 bázispár) elég (45). A PCR-rel kapott szekvenciák elemzésekor kimutattuk, hogy a 2-es genotípus fordul elő leggyakrabban Magyarországon.

A hepatitis G-vírus és a TT-vírus etiológiai szerepe egyelőre egyetlen kórkép esetében sem bizonyított. Abban, hogy okoznak-e valamilyen betegséget, nagy valószínűséggel szerepet játszik a vírus genotípusa. Jelenleg egyik vizsgált vírus esetében sem ismeretes olyan primerpár, amely elkülönítené az egyes genotípusokat. Ezért jelenleg a széles körben alkalmazott PCR-technika önmagában, alkalmas primerpárok hiányában, genotípus meghatározására nem alkalmas. Ahhoz, hogy megállapítsuk, a tapasztalt megbetegedéseket milyen genotípusú TT-vírus, illetve hepatitis G-vírus okozta, és milyen genotípusok fordulnak elő Magyarországon, további nukleotidsorrend-vizsgálatok szükségesek.

#### Köszönetnyilvánítás

A kísérletek gondos kivitelezésében nyújtott segítségéért Kerégyártó-Zalka Ceciliát és Körmendi Sándornét illeti köszönet. A munkát az Egészségügyi Minisztérium az ETT 138/2000, az OTKA a T034470 nyilvántartási számú kutatási szerződéssel támogatta. A nukleotidsorrendet az OTKA III. műszerközpontjában határozták meg. Dr. Takács Mária a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai ösztöndíjasa.

#### IRODALOM

- Dienstag JL. Non-A, Non-B hepatitis. I. recognition, epidemiology and clinical feature. *Gastroenterology* 1983;85:439-62.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A non-B hepatitis. *N Eng J Med* 1989;321:1494-500.
- Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, Bonino F, Saracco G, Lee CR, et al. Detection of hepatic C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990;335:1-3.
- Hammel P, Marcellin P, Martinot-Peignons M, Pham BN, Degott C, Level R, et al. Etiology of chronic hepatitis in France: predominant role of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1994;21:612-23.
- Berencsi Gy, Takács M, Garamvölgyi E. A hepatitis C-vírus genetikai és biológiai tulajdonságai. *Transzfúzió* 1993;26:49-57.
- Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via fecal-oral route. *Intervirology* 1983;20:23-31.
- Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990;247:1335-9.

9. Bradley DW. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990;46:442-61.
10. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RW, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. *J Exp Med* 1967;125:673-87.
11. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences with human hepatitis. *Nature Medicine* 1995;1:564-9.
12. Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271:505-8.
13. Kiyosawa K, Tanaka E. GB Virus/Hepatitis G Virus. *Intervirology* 1999;42:185-95.
14. Simons JN, Desai SM, Shchutz DE, Lemon SM, Mushawar IK. Translation initiation in GB viruses A and C: Evidence for internal ribosome entry and implications for genome organisation. *J Virol* 1996;70:6126-35.
15. Smith DB, Cuceanu N, Davidson F. Discrimination of hepatitis G virus/GBV-C geographical variants by analysis of the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1997;78:1533-42.
16. Zhang XH, Shinzawa H, Shao L, Takahashi T. Detection of hepatitis G virus RNA in patients with hepatitis B, hepatitis C, and non-A-E hepatitis by RT-PCR using multiple primer sets. *J Med Virol* 1997;52:385-90.
17. Khudyakov YE, Cong ME, Bonafonte MT, Abdulmalek S, Nichols BL, Lambert S, et al. Sequence variation within a non structural region of the hepatitis G virus genome. *J of Virology* 1997;71:6875-80.
18. Rengsakulrach B, Ong-Aj-Yooth Thaiprasert T. High prevalence of hepatitis G viraemia among kidney transplant patients in Thailand. *J Med Virol* 1997;53:162-6.
19. Brown KE, Wong S, Buu M, Binh TV, Be TV, Young NS. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus in healthy persons in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Infect Dis* 1997;175:450-3.
20. Heringlake S, Osterkamp S, Trautwein C, Tillmann HL, Boeker K, Muerhoff S, et al. Association between hepatic failure and strain of GBV virus C. *Lancet* 1996;348:1626-9.
21. Dawson GJ, Schlauder GG, Pilot-Matias TJ, Mushawar SM. Prevalence studies of GB virus C infection using reverse transcriptase chain reaction. *J Med Virol* 1996;50:97-103.
22. Masuko K, Mitsui T, Iwano K, Yamazaki C, Okuda K, Meguro T, et al. Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1996;334:1485-90.
23. Kinoshita T, Miyake K, Nakao H, Tanaka T, Tsuda F, Okamoto H, et al. Molecular investigation of GB virus C infection in haemophiliacs in Japan. *J Infect Dis* 1997;175:454-7.
24. Tanaka E, Tacke M, Kobayashi M, Nakatsuji Y, Kiyosawa K, Schmolke S, et al. Past and present hepatitis G virus infection in areas where hepatitis C is highly endemic and those where it is not endemic. *J Clin Microbiol* 1998;36:110-4.
25. Szabó A, Uwe H, Müller V, Reusz Gy, Sallay P, Viazov S, et al. Hepatitis G-vírus-infekció vesetranszplantált és dializált gyermek- és felnőtt betegekben. *Orvosi Hetilap* 1999;140:1619-23.
26. Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Ehata T, Saisho H, et al. GB virus-C RNA in Japanese patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27:464-9.
27. Brechot C, Jaffredo F, Lagorce D, Gerken G, Meyer Zum Buschenfelde K, Papakonstantinou A, et al. Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: Results of a European concerted action. *J Hepatol* 1998;29:173-83.
28. Brown KE, Tisdale J, Barrett AJ, Dunbar CE, Young NS. Hepatitis-associated aplastic anemia. *N Eng J Med* 1997;336:1059-64.
29. Crespo J, De Las Heras B, Rivero M, Lozano JL, Fabrega E, Pons Romero F. Hepatitis G virus infection as a possible causative agent of community-acquired hepatitis and associated aplastic anaemia. *Postgrad Med J* 1999;75:159-60.
30. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:92-7.
31. Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 1998;10:1-16.
32. Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M. A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* 1999;42:196-204.
33. Charlton M, Adjei P, Poterucha J, Zein N, Moore B, Therneau T. TT-virus infection in North America blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 1998;28:839-42.
34. Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, Macdonald DM, Ellender, et al. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998;352:191.
35. Naumov NV, Petrova EP, Thomas MG, Williams R. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 1998;352:195-7.
36. Prescott LE, Simmonds P, et al. Global distribution of transfusion-transmitted virus (letter). *N Eng J Med* 1998;339:776-7.
37. Tanaka H, Okamoto H, Luengrojankul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J Med Virol* 1998;56:234-8.
38. Tanaka H, Mizokami M, Orito E, Nakano T, Kato T, Ding X. A new genotype of TT virus (TTV) infection among Colombian native Indians. *J Med Virol* 1999;57:264-8.
39. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y. Fecal excretion of a non enveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 1998;56:128-32.
40. Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Kawabe Y. Prevalence of TTV DNA among children with a history of transfusion or liver disease. *J Med Virol* 2000;60:172-6.
41. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, USA. 1989.
42. Falus A, Hajnal A. Detection of hepatitis C virus (HCV) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Acta Microbiol Immunol Hung* 1995;42:235-6.
43. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994;22:4673-80.
44. Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 1989;5:164-6.
45. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, et al. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR primers from coding and non-coding regions. *Virology* 1999;259:428-36.
46. Nordbo SA, Krokstad S, Winge P, Skejldestad FE, Dalen AB. Prevalence of GB virus C (also called hepatitis G virus) markers in Norwegian blood donors. *J Clin Microbiol* 2000;38:2584-90.
47. Cong ME, Fried MW, Lambert S, Lopareva EN, Zhan M, Pujol FH. Sequence heterogeneity within three regions of the hepatitis G virus genome. *Virology* 1999;255:250-9.