

# **Doktori (Ph.D) értekezés**

**A KRÓNIKUS „C”, „B” ÉS „DELTA” VÍRUSHEPATITISEK  
SZEROLÓGIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI DIAGNOSZTIKÁJA.  
A HEPATITIS „C” ÉS „B” VÍRUSOK SZERKEZETI ANALÍZISE.**

**DR. GERVAIN JUDIT**

Programvezető: Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanár

**Fejér Megyei Szent György Kórház**

**I. Belgyógyászat, Hepato-Pancreatológiai Részleg**

**Székesfehérvár**

**2002**

A betegágy és a laboratórium egyre közelebb kerültek egymáshoz és a kísérletes orvostudomány módszerei végül is annyira átjárták a medicinát, hogy az maga is csaknem kísérletes orvostudománnyá lett.

(Dale, USA)

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>BEVEZETÉS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>8</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>9</b>
<b>CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>10</b>
<b>1. IRODALMI HÁTTÉR - ELMÉLETI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>11</b>
1.1. KRÓNIKUS HEPATITIS FOGALMA .....	11
1.2. KRÓNIKUS HEPATITIS SZINDRÓMA KÓRKÉPEI.....	11
1.3. KRÓNIKUS VÍRUSHEPATITISEK.....	13
<b>1.3.1. Krónikus B vírushepatitis</b> .....	<b>13</b>
HEPATITIS B VÍRUS SZERKEZETE .....	13
B VÍRUSHEPATITIS EPIDEMIOLOGIÁJA .....	17
B VÍRUSHEPATITIS KLINIKUMA .....	19
<b>1.3.2. Krónikus Delta vírushepatitis</b> .....	<b>20</b>
HEPATITIS D VÍRUS SZERKEZETE .....	21
D VÍRUSHEPATITIS EPIDEMIOLOGIÁJA .....	21
DELTA VÍRUSHEPATITIS KLINIKUMA.....	22
<b>1.3.3. Krónikus C vírushepatitis</b> .....	<b>22</b>
HEPATITIS C VÍRUS SZERKEZETE .....	22
C VÍRUSHEPATITIS EPIDEMIOLOGIÁJA .....	23
C VÍRUSHEPATITIS KLINIKUMA .....	25
<b>2. BETEGEK ÉS AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK</b> .....	<b>25</b>
2.1. VIZSGÁLT BETEGANYAG .....	25
2.2. ALKALMAZOTT MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK .....	26
<b>2.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR)</b> .....	<b>27</b>
REVERZ-TRANSZKRIPTÁZ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (RT-PCR) .....	29
NESTED POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (Nested-PCR).....	30
<b>2.2.2. Nukleotid szekvencia analízis</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2.3. Hibridizáció</b> .....	<b>31</b>

<b>3. DIAGNOSZTIKAI PROTOKOLLOK</b> .....	<b>33</b>
3.1. A KRÓNIKUS VÍRUSHEPATITISES BETEGEK DIAGNOSZTIKÁJÁBAN	
ALKALMAZOTT PROTOKOLLJAINK.....	33
<b>3.1.1. Krónikus B vírushepatitisben végzett szerológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok.</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1.2. Krónikus Delta vírushepatitisben végzett szerológiai vizsgálatok</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1.3. Krónikus C vírushepatitis diagnosztikai protokollja</b> .....	<b>42</b>
3.2. 10 ÉV ALATT VÉGZETT LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATAINK ADATAI .....	53
<b>4. KUTATÁSI EREDMÉNYEK</b> .....	<b>54</b>
4.1. KRÓNIKUS B HEPATITISES BETEGEK LAMIVUDIN KEZELÉSE ALATT	
MEGJELENŐ REZISZTENS MUTÁNSAINAK MEGHATÁROZÁSA. ....	54
4.2. ANTI-HCV IGM PREDIKTÍV ÉRTÉKE A TERÁPIÁBAN. ....	62
4.3. ANTI-HCV KIMUTATÁS IV. GENERÁCIÓS TESZT MÓDSZERÉVEL ÉS ENNEK	
GYAKORLATI ÉRTÉKE.....	64
4.4. MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ HCV TÍPUSAINAK MEGHATÁROZÁSA....	68
4.5. MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ HCV SZUBTÍPUSAINAK	
MEGHATÁROZÁSA. ....	70
4.6. IFN MONOTERÁPIA ÉS IFN + RIBAVIRIN KOMBINÁCIÓS KEZELÉS ALATTI	
VÍRUSKINETIKAI VIZSGÁLAT(HCV-RNS, ANTI-HVC IgM, ALT	
MONITOROZÁS) .....	75
4.7. MAGYARORSZÁGI KRÓNIKUS HEPATITISES BETEGEINKBŐL IZOLÁLT HCV 1b	
RNS-FÜGGŐ PROTEIN KINÁZ KÖTŐ RÉGIÓ (PKR-BR) SZERKEZETI ANALÍZISE	
ÉS AZ IFN TERÁPIÁVAL VALÓ ÖSSZEFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA.....	78
<b>5. KÖVETKEZTETÉSEK</b> .....	<b>89</b>
<b>6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>91</b>
<b>7. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>92</b>
<b>8. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT SAJÁT PUBLIKÁCIÓK</b>	
<b>JEGYZÉKE</b> .....	<b>102</b>

## BEVEZETÉS

Vallom, hogy magas szintű belgyógyászatot csak nagyon jó diagnosztikai háttérrel lehet művelni, de igazán jó diagnosztikus szakember is csak a leletek mögött lévő embert és a beteget érző és ismerő orvosból válhat.

Szerencsés orvos vagyok. Gyógyító munkám 30 éve alatt nagyszerű tanítómesterek mellett lehetőségem nyílt a klinikum és a diagnosztika több ágának együttművelésére és a belgyógyászat sokszínűségének megismerésére.

Orvostanhallgatóként Dr. Varró Vince Professzor Úr Gasztroenterológiai Laboratóriumában dolgoztam. Itt érintett meg a kutatás varázsa és a laboratóriumi munka szépsége. Mindezt azonban a betegágy mellett, a szülővárosomban akartam folytatni. Ezért jöttem haza Székesfehérvárra. Orvosként eltöltött első 7 évemet „életem legszerencsésebb szerencsétlenségeként” emlegetem. Belgyógyászati állás hiánya miatt a Megyei Kórház Központi Laboratóriumába kerültem. Néhány könnycsepp elmaszatolása után barátként fogadó kollégák és asszisztencia mellett elsajátíthattam a laboratóriumi munka fortélyait. Ez az ismeretanyag és gyakorlati tudás adta az alapját, hogy a Dr. Gógl Árpád főorvosi vezetésével megalakuló új, a belgyógyászat teljes spektrumát magába foglaló osztályon belül – már, mint gyakorló klinikus - 1980-ban kialakíthattam egy laboratóriumot. Az osztály magas színvonalú gyógyító munkájához szükséges speciális vizsgálatok végzése mellett később tudományos tevékenységre is itt nyílt lehetőségem.

Mint gasztroenterológus is szerencsés vagyok. A hepatológia fénykorát éljük. Az elmúlt évtizedben új diagnosztikai módszerek bevezetésével lehetővé vált a hasonló tüneteket mutató krónikus hepatitisek kóroki differenciálása. A hepatitis C vírus felfedezése óta el lehet különíteni a vírushepatitisek főbb típusait, új gyógyszerek előállításával pedig célzottan tudjuk betegeinket kezelni. A fejlődés azonban nem állt meg. Finomul a diagnosztika, egyre hatékonyabb a terápia, a tökéletes prevenciót jelentő védőoltás kifejlesztésén pedig világszerte kutatók tömege dolgozik. Szinte havonta jelennek meg új közlemények e nagyon intelligens és nagyon rafinált vírusoknak a még máig sem teljesen tisztázott szerkezetéről, az általuk okozott kórképek pontos pathomechanizmusáról és újabb vírustípusok létezéséről.

A „B”, „C” és „Delta” krónikus vírushepatitises betegek interferon kezelését hazánkban szervezeten 1992-ben kezdtük meg. Osztályunk laboratóriumában akkor vezettük be a terápiához és a differenciáldiagnosztikához szükséges szerológiai, néhány immunológiai, majd 1994-ben a molekuláris biológiai vizsgálatokat. Azóta - mint a krónikus vírushepatitises betegek laboratóriumi centruma - a hazai 22 akkreditált hepatológiai központ betegei számára végezzük ezeket a vizsgálatokat. A technika és a módszertan folyamatos frissítésével próbáljuk a betegek és orvosai számára a pontos és gyors diagnózis felállítását és a terápia követését elősegíteni.

Doktori értekezésem első felében összefoglaltam protokolljainkat, melyeket a vírushepatitisek diagnosztikájában alkalmazunk.

A gyógyítás és a diagnosztika együttművelése tette lehetővé saját gondolataim és ötleteim kivitelezését. Ez a kutatómunka soha nem volt öncélú, mindig kezelt betegeink eredményei inspiráltak a gyógyítás hatékonyságának fokozására és a magyarországi infekció sajátosságainak megismerésére.

Értekezésem második részében a vírushepatitisek diagnosztikájában végzett kutatásaimat és ennek gyakorlati értékét foglaltam össze.

Dolgozatomban szeretném éreztetni azt a nem múló érdeklődést és lelkesedést, ahogy ezt a munkát kiváló asszisztensnőimmal, Papp Istvánnéval, Szabóné B. Katalinnal és Bakiné H. Erikával évek óta végezzük. Szakmai zsákutcák, finanszírozási és működési gondok természetesen Laboratóriumunkat is többször elérték, azonban a Magyar Gasztroenterológiai Társaság Hepatológiai Szekciója, a Hepatológiai Centrumok, az Országos Laboratóriumi Intézet, az Országos Egészségbiztosítási Pénztár, a Roche, a Schering Plough gyógyszercégek és kórházunk, a Fejér megyei Szent György Kórház vezetésének támogatásával ezek az akadályok elhárultak és az eredmények ezeket a problémákat el is feleltették.

Hogy ebből a gyakorlatban elvégzett nagyon sok munkából végül írott anyag, doktori értekezés lett, azt köszönöm Dr. Tulassay Zsolt Professzor Úrnak, aki tanácsaival segített és támogatásával ösztönözt e dolgozat megírására.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Magyarországon 1992 óta egységes protokoll alapján történik az összes véradó hepatitis C vírus (HCV) fertőzöttségének szűrése és a B és Delta vírushepatitisszel együtt a pozitív betegek további kivizsgálása és antivirális kezelése. Laboratóriumunkban azóta végezzük az ország összes Hepatológiai Centruma számára a krónikus hepatitis klinikai képében jelentkező különböző betegségek differenciálásához és a terápia vezetéséhez szükséges specifikus és szenzitív szerológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokat.

A „rutin” módszereken túl 1994-ben Magyarországon elsőként kezdtük vizsgálni a betegek anti-HCV IgM és a HCV RNS szint változása és az interferon (INF) terápia eredményessége közötti kapcsolatot. Megállapítottuk, hogy az IgM típusú ellenanyag perzisztálása az antivirális kezelés eredményességének negatív előjelzője. Igazoltuk, hogy a bazális vírustiter nagysága a terápia kimenetelét döntően befolyásoló virális faktorok egyike.

1995-től a magyarországi betegekből izolált HCV fő típusainak, 1999 óta a vírus szubtypusainak meghatározását végezzük. Több mint 600 beteg vizsgálata alapján elsőként igazoltuk a hazai beteganyag 91,5%-os HCV 1b fertőzöttségét. Ez a vírusnak a terápiával szemben a legellenállóbb és a legrosszabb gyógyulási készsége mutató szubtypusa. Ennek ismeretében indokolt betegeinknél a nagyobb dózisu, tartós és kombinált antivirális kezelés.

Két év munkájának eredménye a magyarországi betegekből izolált HCV 1b NS5A területének nukleotid szintű szerkezeti analízise. Vizsgáltuk az RNS függő protein kináz kötő régió (PKR-BR) mutációinak és az interferon terápia hatékonyságának kapcsolatát. Megállapítottuk, hogy a magyarországi vírus nukleotid szekvenciája eltér a világban prototípusként elfogadott japán HCV 1b-J-től. Összefüggést találtunk a PKR-BR (aa 2209-2274) területén az interferon érzékenységet meghatározó régióban (ISDR) expresszálandó mutációk száma és az interferonra mutatott gyógyulási hajlam között.

Két éve vezettük be a diagnosztikai problémát okozó, C hepatitisre gyanús betegek 99,8%-os specificitású, szubtypusokra érzékenyített IV. generációs anti-HCV teszttel történő vizsgálatát.

A krónikus B hepatitis kezelésére az interferon mellett második antivirális szerként két éve alkalmazzuk a nukleozid analóg lamivudint. A terápia idején megjelenő HBV polimeráz gén B és C domén YMDD variánsainak kimutatására nested polimeráz lánreakció és reverz hibridizáció kombinációjával új diagnosztikai módszert vezettünk be. A mutánsok kimutatása lehetővé teszi a hatástalan lamivudin kezelés okának tisztázását és „klinikai breakthrough” esetén a terápia módosítását.

Doktori értekezésemben egyrészt a krónikus vírushepatitisek szerológiai és molekuláris biológiai diagnosztikájában végzett munkámat, másrészt az e témához csatlakozó kutatásaimat foglaltam össze, melyek a „B” és „C” vírushepatitisek epidemiológiájához vagy terápiájához új, eddig még nem ismert magyar eredményeket nyújtottak. Céloom a magyarországi fertőzést okozó hepatitis vírusok sajátosságainak megismerése és a terápia sikerességét előrejelző markerek vizsgálata volt.

## SUMMARY

Screening of blood donors for hepatitis C virus infection, further investigation and interferon (IFN) treatment of those infected and of those with viral hepatitis B and Delta started in 1992 in Hungary. Since then we have been carrying out the specific, sensitive and uniform serological and molecular biological tests necessary to the differentiation and adequate therapy of the different diseases appearing in the clinical picture of chronic viral hepatitis in our Virus Serology Laboratory. These tests are available for each Hepatology Centres.

Over and above these routine methods, we pioneered in analysing the correlation between the changes in patients' anti-HCVIgM and HCV-RNA levels and the success of IFN therapy in 1994. We found that persistent presence of IgM antibodies is a predictive factor for negative treatment outcome. We demonstrated that basal viral titre has important influence on therapy outcome.

We have been analysing the type distribution of HCV since 1995 and its subtype distribution since 1999. Based on a representative cohort of more than 600 patients, we filled in the gap in the national and international literature by determining that 91.5% of the Hungarian population with chronic C hepatitis is infected by HCV-1b, the most resistant and the least recovery-prone subtype. These results confirm the high dose, long-term antiviral treatment of Hungarian patients.

Two years ago we introduced the IVth generation of anti-HCV tests for the examination of diagnostically problematic patients with suspected HCV infection. The test has 99.8% specificity and it is sensitive for the different subtypes of HCV.

During the last two years, we analysed the genetic structure of the NS5A domain of HCV-1b isolated from the samples of Hungarian patients. We found that the „Hungarian quasispecies” of HCV-1b differs from HCV-J, the internationally used prototype. We also investigated the relationship between the mutations in the RNA dependent protein kinase-binding region (PKR-BR) of the virus and the treatment outcome. We confirmed a positive correlation between the phenotypically expressive mutations within the Interferon-Sensitivity Determining Region (ISDR) of PKR-BR (aa 2209-2274) and the sensitivity to IFN therapy.

Based on international results, lamivudine treatment of patients with chronic hepatitis B has been successfully applied during the past two years in Hungary. We introduced the new method of detecting the therapy-resistant YMDD variants of the B and C domains within the HB-pol gene by combining nested polymerase chain reaction and reverse hybridisation. Detection of these mutants makes the clarification of the reason behind ineffective lamivudine therapy and the modification of treatment in the case of ‘clinical breakthrough’ possible.

In this PhD Thesis, I summarised my work in the field of the serological and molecular biological diagnosis of chronic viral hepatitis and my researches which greatly contributed to the epidemiology and therapy of viral hepatitis B and C by new Hungarian results. The aim of my investigations was to determine the characteristics of hepatitis viruses in Hungary and to examine the different markers with predictive values for treatment outcome.



## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFP	alfa-fötoprotein
Ag	antigén
ALP	alkalikus foszfatáz
ALT	alanin-aminotranszferáz
AMA	antimitochondriális antitest
ANA	antinuclearis antitest
ASMA	simaizomellenes antitest
AST	aszpartát-aminotranszferáz
At	antitest
CMV	cytomegalovírus
CT	computertomographia
DNS	dezoxiribonukleinsav
EBV	Epstein-Barr vírus
EIA	enzimimmunoassay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERCP	endoscopos retrograd cholangiopancreatographia
GGT	gamma-glutamil-transzferáz
HAV	hepatitis A vírus
HBcAg	hepatitis B vírus core antigén
HBeAg	hepatitis B vírus e antigén
HBsAg	hepatitis B vírus felületi (surface) antigén
HBV	heptitis B vírus
HCC	hepatocellularis carcinoma
HCV	hepatitis C vírus
HDAg	hepatitis Delta vírus antigén
HDV	hepatitis Delta vírus
HGV	hepatitis G vírus
HIV	human immunodeficientia vírus
IFN	interferon
LDH	laktát-dehidrogenáz
LKM	máj-vese microsomalis antitest
LSP	májspecifikus protein
NK-sejt	természetes ölő- (Killer) sejt
PBC	primer biliaris cirrhosis
PCR	polimeráz láncreakció
PSC	primer szkterotizáló cholangitis
PT	prothrombin idő
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkriptáz
TVK	teljes vaskötő kapacitás

## **CÉLKITŰZÉSEK**

### **I. Vírusszerológiai Laboratóriumunkban végzett diagnosztikai tevékenység:**

1. Elméleti áttekintés a „B”, „Delta” és „C” vírusok szerkezetéről, epidemiológiájáról és a krónikus hepatitisek klinikumáról.
2. A krónikus „B”, „Delta” és „C” vírushepatitises betegek diagnosztikai protokolljainak bemutatása, kiemelve a szerológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokat, melyeket Vírusszerológiai Laboratóriumunkban 1992 óta végzünk.  
10 év alatt végzett vizsgálataink statisztikai összesítése.
3. Az alkalmazott molekuláris biológiai módszereink bemutatása.

### **II. Kutatási témáim és eredményeik:**

#### **1. HBV MUTÁNSOK VIZSGÁLATA BETEGEINKBEN.**

- 1.1. A hepatitis B vírus polimeráz gén lamivudine rezisztens mutánsainak meghatározása.

#### **2. AZ INTERFERON TERÁPIA PREDIKTÍV MARKEREINEK VIZSGÁLATA KRÓNIKUS C HEPATITISBEN.**

- 2.1. Anti-HCV IgM pozitivitás és az INF terápia eredménye közötti összefüggés elemzése.

- 2.2. IV. generációs anti-HCV-teszt módszertana és gyakorlati értéke.

- 2.3. HCV RNS titer antivirális kezelés alatti monitorozása és terapiás prediktív értékének meghatározása.

#### **3. A MAGYARORSZÁGI HEPATITIS C VÍRUSOK EPIDEMIOLÓGIÁJA ÉS SZERKEZETI ANALÍZISE.**

- 3.1. HCV típus és szubtypus megoszlásának meghatározása Magyarországon.

- 3.2. HCV 1b NS5A domén RNS függő protein kináz kötő régiójának (PKR-BR) (aa 2209-2274) nukleotid szekvencia meghatározása és ennek összehasonlítása a nemzetközileg prototípusként elfogadott HCV 1b-J szerkezetével.

- 3.3. Virális és gazdai tényezők és az antivirális terápiára adott válasz közötti összefüggés vizsgálata. Betegeinkből izolált HCV 1b PKR-BR területén található mutációk analízise és az interferon szenzitivitást meghatározó régióban (ISDR) (aa 2209-2248) expresszáldó mutációk összefüggése az interferon terápia hatékonyságával.

# 1. IRODALMI HÁTTÉR - ELMÉLETI ÁTTEKINTÉS

## 1.1. KRÓNIKUS HEPATITIS FOGALMA

Krónikus hepatitis alatt a máj 6 hónapon túl állandósult gyulladással járó folyamatát értjük, melyhez a májeredetű transzamináz emelkedett szintje társul. Súlyossága változó, az enyhe, csupán a májsejt necrosisára utaló biokémiai eltérésektől az idült májbetegségen át a májelégtelenségig terjedhet. Multicausalis megbetegedés. 1994-ig a szövettani kép alapján krónikus aktív, perzisztáló és lobuláris hepatitiset különítettünk el, melyek ugyan meghatározták a betegség stádiumát és utaltak a lefolyására, de nem tükrözték a kiváltó etiológiai faktort és így oki terápiához sem nyújtottak segítséget.

## 1.2. KRÓNIKUS HEPATITIS SZINDRÓMA KÓRKÉPEI

A diagnosztika fejlődésével, pl. az endonukleázok felfedezésével, a molekuláris klónozás kidolgozásával, a géntérképezéssel és mint legfontosabb új molekuláris biológiai módszer, a polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction = PCR) kifejlesztésével lehetővé vált számos, a hagyományos metodikákkal kimutathatatlan kórokozó azonosítása, a sejtek életfolyamatainak vizsgálata, örökletes megbetegedések genetikai hátterének megismerése, a mutációk kromoszómális lokalizálása, az anyagcsere betegségek patomechanizmusának tisztázása. A hepatitis C vírus felfedezése óta differenciálni tudjuk a vírushepatitiseket és ma már el tudjuk választani etiológiai alapon a hasonló klinikumú krónikus májbetegségeket.

A krónikus hepatitisek nagyobb részét a vírushepatitisek okozzák. Az elsődlegesen hepatotrop vírusok, a HAV, HBV, HCV, Delta, HEV és a HGV heterogén csoportot képeznek, de az általuk kiváltott betegség tünete sokban hasonló. A HB-vírus DNS, a többi RNS tartalmú.

Az „A” és „E” vírusokról úgy tudjuk, hogy soha nem okoznak idült gyulladást. A fertőzés útja feko-orális. A világ különböző részein klinikailag manifesztálódó „A” hepatitisek 0,03%-2,7%-a válhat fulmináns lefolyású, fatális kimenetelűvé, a többi maradványtünet nélkül gyógyul. A mortalitás a betegek életkorával párhuzamosan emelkedik (Hadler, 1991.) Az „E” vírus infektivitása kisebb, de az általa kiváltott betegség súlyosabb. Átlagos mortalitása 1%, terheseknél ez 20%-ra emelkedik.

A jelentős morbiditású és mortalitású krónikus hepatitisek kórokozói a HBV, HCV és a Delta vírus. Ezeken kívül még ma is vannak pontosan nem azonosított vírusok, melyek az akut és krónikus hepatitis okozói lehetnek.

Újabban izolált hepatitis G vírus (HGV) humán pathogenitása még nem teljesen tisztázott. Szerkezete sokban hasonlít a HCV-hez, azonban kb. 25% aminosav azonosság van csak a két vírus típus között. A HGV a Flaviviridae családkhoz tartozó egyszálú RNS vírus. Gén szekvenciája alapján 3 altípusát lehet differenciálni. Egyikőjük PNF 2161 néven ismert, 9392 nukleotidot tartalmaz, mely 2873 aminosavból álló fehérjét kódol. A másik izolátum, az R10291, 9103 nukleotidból áll. A harmadik a GB-vírus C (GBV-C), mely szerkezetileg legjobban jellemzi a HGV-t. Ez a vírus típus az amerikai lakosság 1,5%-ában megtalálható, ezért még további kutatások fogják eldönteni kóroki szerepét a humán betegségekben.

Sok más vírus is képes az általuk okozott egyéb szervi vagy szisztémás fertőző betegség részeként májsejt károsodást kiváltani: pl. HIV-fertőzések, cytomegalia-, Epstein-Barr-, adenovírus, stb., de ez csak másodlagos.

Az 1994-es Gasztroenterológiai Világkonferencián kidolgozták a krónikus hepatitisek új nevezéktanát, mely a hasonló tünetekkel és végstádiummal járó betegségeket etiológiájuk alapján különíti el. Az újonnan kifejlesztett gyógyszerekkel – mint az interferonok, nukleozid analógok, immunszuppresszív szerek, epesavak, zsírcsökkentők stb. – célzott kezelésük is lehetővé vált.

#### KRÓNIKUS HEPATITIS SZINDRÓMA KÓRKÉPEI (Los Angeles, 1994.)

- Autoimmun hepatitis
- **Krónikus B hepatitis**
- **Krónikus Delta hepatitis**
- **Krónikus C hepatitis**
- Egyéb krónikus vírus hepatitisek
- Toxikus hepatitis (drog, alkohol, gyógyszerek stb.)
- Nem alkoholos steatohepatitis
- Primer biliáris cirrhosis
- Primer szklerotizáló cholangitis
- Wilson betegség
- Alfa-1 antitripszin hiány

## 1.3. KRÓNIKUS VÍRUSHEPATITISEK

### 1.3.1. Krónikus B vírushepatitis

A B vírushepatitis a világon leggyakrabban előforduló fertőző betegségek egyike. A hepatitis B vírus (HBV) infektivitása a humán immundeficiencia vírusénál (HIV) 100x nagyobb. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai alapján B vírussal 2.000 millió ember fertőződött meg a világban. 1998-ban 350 millióra becsülték a vírushordozók számát, de ez 2000-re valószínűleg elérte már a 400 milliót. Az USA-ban megközelítőleg 1,25 millió krónikus B hepatitises él. Európában évente 900.000-1.000.000 friss fertőzés történik, közülük 90.000-en maradnak vírushordozók. Ezeknél a betegeknél fokozott a májcirrhosis, a dekompenzált májbetegség és a hepatocelluláris carcinoma kialakulásának a valószínűsége (1). A világon évente a HBV fertőzés és szövődményei miatt több mint egy millió ember hal meg. Bár az idült vírushepatitis nem mindig progrediál malignus kórformába, a betegek 15%-40%-ánál komoly, az egész életüket végigkísérő hepaticus és extrahepaticus tünetesoporttal járó betegség marad fenn.

#### HEPATITIS B VÍRUS SZERKEZETE

A HBV a hepadnavírus család (Hepadnaviridae) tagja. Elsődlegesen humán patogén. A közelmúltban más emlősökben, pl. pekingi kacsában, mókusban, majomban is találtak a HBV felületi antigénjének (HBsAg) megfelelő vírus partikulumot, de ezek mindegyike faj specifikus.

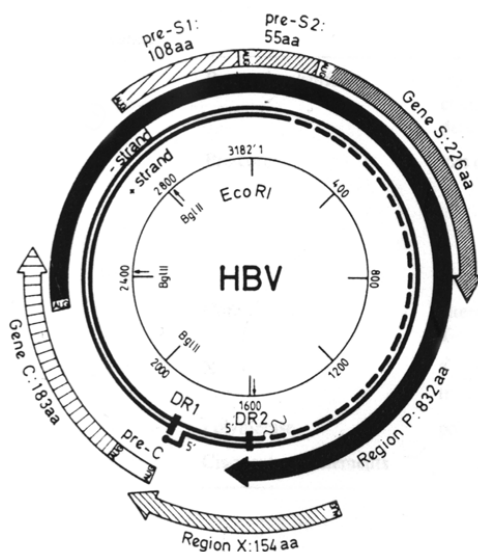
1965-ban Blumberg és munkatársai egy májbeteg ausztráliai bennszülött véréből izoláltak egy fehérjét, melyet Ausztrália (Au) antigénnek neveztek el (JAMA, 1965.). 1968-ban több kutató, Prince, Okochi és Murakami is megerősítették az Au antigén létezését, melyről ma már tudjuk, hogy a HBV „surface” antigénjének felel meg. 1971-ben írták le a HBsAg szubtypusait (Le Bouvier, J. Inf. Dis. 1971), majd Dane izolálta a teljes vírust, melyet azóta Dane particulumnak is neveznek. Kaplan és Robinson nevéhez fűződik a HBV DNS és DNS polimeráz szerkezetének és működésének tisztázása.

A Dane-particulumként ismert virion 42 nm átmérőjű. A vírus egy külső burkot és egy belső nukleokapszidot tartalmaz, mely utóbbi a core antigént, a DNS polimeráz/reverz transzkriptázt és a vírus genomot foglalja magába. A felületi (s) antigén szerológiai

elemzése alapján 4 fő szubtypusát, molekuláris biológiai módszerrel 9 genotípusát (A - G) lehet elkülöníteni. A genotípusok megoszlása földrajzilag meghatározott (2).

## VÍRUS GENOM

Megközelítőleg 3200 bázispárból álló cirkuláris, részlegesen kettősszálú DNS, mely egy teljes negatív (-) és egy rövidebb pozitív (+) százból áll. Négy fontos, részben egymást fedő génszakasz, „open reading frame” (ORFs) különíthető el, melyek hét proteint kódolnak. A pre-S/S génről 3 különböző nagyságú felületi, ún. surface, HBsAg glikoprotein íródik át, ez a vírus külső burka. A precore/core gén tárolja az információt a nukleoposzid fehérje, a HBc antigén, és szolúbilis változata, a HBe antigén felépítéséhez. A P gén egy DNS polimeráz és reverz transzkriptáz funkciót ellátó proteint kódol, mely kulcsfontosságú a vírusszaporodásban. Az X génről átíródó HBxAg protein egy potenciális transzaktivátor, melynek a hepatocarcinogenezisben is szerepe van (4). (1.ábra)

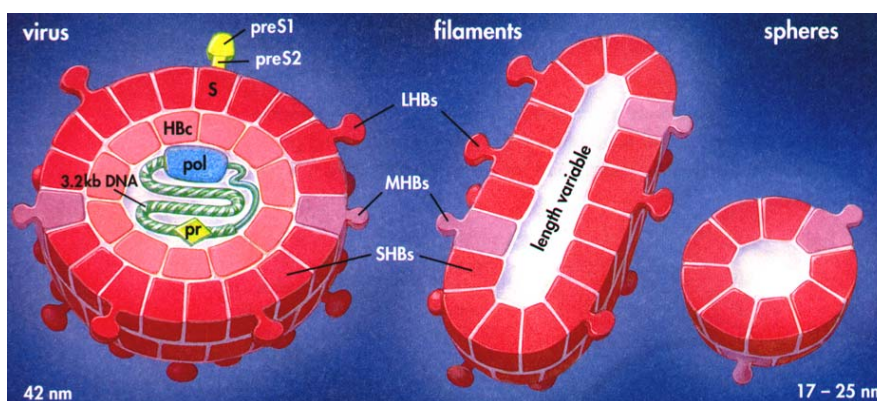


1. ábra: HBV genom szerkezete

## VÍRUS ANTIGÉNEK

HBsAg (felületi, „surface” antigén): Az S gén 226 aminosavból álló „large” (L), a pre-S régió S1 része egy 108 aminosav hosszúságú „middle” (M) és a pre-S2 régió egy 55 aminosavat tartalmazó „small” (S) proteint kódol. Ezek önmagukban nem fertőző komponensek. A hepatocyták citoplazmájában termelődnek, innen kerülnek a beteg vérébe. Elektromikroszkóppal 3 formájuk látható, úgymint a teljes HB virion burokkészlete és két kisebb, 18-22 nm átmérőjű gömb és tubuláris részecske. (2. ábra)

E fehérjéknek elsősorban a fertőzés első lépésében, a hepatocytá felszíni receptora és a virion közötti kötődésben van fontos szerepük. Mint antigének, az anti-HBs antitestképződését indukálják. Ennek jelenlétében az egyén védett a B vírusfertőzéssel szemben. A HBsAg antigén szerkezete alapján a vírusnak 9 genotípusát lehet megkülönböztetni. Csoport specifikus antigén determinánása az „a”, emellett „d”, „y” és „w”, „r” allélpárok találhatóak. Ezek elnevezése az alábbi: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+*, *adrq-* (3). A genotípusok között 8% vagy ennél nagyobb nukleotid különbséget lehet találni. A genotípusoknak jól meghatározott geográfiai megoszlása van. Európában az A és a D típusok találhatóak. A genotípusok által okozott megbetegedések súlyossága különböző. A C típus okozta krónikus B hepatitisre az idősebb életkor, a hisztológiai aktivitás súlyosabb foka, a cirrhosis és a hepatocellularis carcinoma gyakoribb megjelenése jellemző. Közép-Európában a legjobb indulatú és az INF terápiára jól reagáló A genotípus a gyakori.



2. ábra: HBV és a HBsAg tubuláris és gömb formátuma

HBcAg (mag, „core”antigén), HBeAg (szolúbilis mag, „core” antigén): A core és a pre-core gén transzlációjával egy 183 és egy 29 aminosavból álló polypeptid keletkezik, mely proteolyticus hasítás útján egy oldékony antigénvariánssá, a HBeAg proteinné alakul. A HBcAg csak a hepatocytában mutatható ki. A fertőzött sejt felületére kerülve celluláris immunválaszt indukál annak elpusztítására. A HBeAg az aktív HBV replikáció jelzője, extracellulárisan cirkulál és ezért a szerológiai diagnosztikában könnyen mérhető vírusmarker.

## HBV MUTÁNSOK ÉS VARIÁNSOK

Más mikroorganizmusokhoz hasonlóan a vírusok nukleinsavában is - külső vagy belső szelektív nyomásra – spontán nukleotid felcserélődés, azaz mutáció történhet, mely a

kódoló triplet megváltozásával az átíródó fehérjében eltérő aminosav beépülését eredményezheti. Gyakorisága az RNS vírusoknál 1 mutáció/1.000-10.000, DNS vírusoknál 1 nukleotid csere 100.000 replikációs ciklusonként. A mutáció típusától és helyétől függően funkciómódosulást nem okozó néma pontmutációként jelentkezhet vagy a megváltozott triplet-kód okozta aminosav csere következtében képződő új fehérje révén expresszáldhat és funkcióváltozást okozhat. Ha az új triplet stop-codonnak felel meg, csonka, gyakran funkcióképtelen fehérje képződik, mely a terápiás válasz és a betegség kimenetelének megváltoztatását is eredményezheti. A genetikai heterogenitás nagysága alapján különböző szintű módosulásokat ismerünk. Variánsokról vagy „quasispeciesekről” beszélünk, ha az eredeti „vad-típuson” belül alakul ki mutáció. Azonos típusokban a szekvencia azonosság < 72%. Szubtípus esetében a homológia 72%-86%. Mutánsok szekvencia egyezése > 86%. A variánsok pontos meghatározása molekuláris biológiai eljárásokkal, PCR amplifikáció és nukleotid analízis különböző módszereivel végezhető. HBV esetében az alábbi, a diagnosztikát és a terápiát befolyásoló mutációk ismertek.

#### *Pre-core/core gén mutáns*

A core promoter vagy a precore régióban megjelenő mutációk a HBeAg csökkenését vagy teljes eltűnését okozzák. Leggyakrabban a precore 1896-os nukleotid pozíciójában megjelenő stop codon blokkolja a HBeAg szintézist. Ez a mutáció mindenütt a világon előfordul, de gyakorisága különböző. Legnagyobb számban, 40%-80%-os prevalenciával a Mediterrán területeken és Ázsiában található. A szélsőséges földrajzi megoszlás a HBV genotípusával van összefüggésben, itt általában a D típus található. Ott jelenik meg, ahol az 1858. nukleotidban timidin van. A leggyakoribb core promoter mutáció az 1762-es és 1764-es nukleotidokban együttesen található, mely következtében csökken a mRNS transzkripció és a HBeAg termelődés. A HBeAg negatív krónikus hepatitis lefolyása különbözik a HBeAg pozitív hepatitistól. Az „e” antigén hiányának egyik következménye a szervezet immunválaszának sérülése. Az interferon terápia csökkenő eredményességét, a betegség progresszióját és a fokozott relapszus készséget figyelték meg ezeknél a betegeknél. Mivel ezen betegek a vírus replikáció idején is HBeAg negatívak, náluk a betegség lefolyását csak HBV DNS és ALT monitorozással lehet követni. A HBeAg és a HBV DNS szintézise zavartalan (2).



### *Pre-S/S gén mutáns*

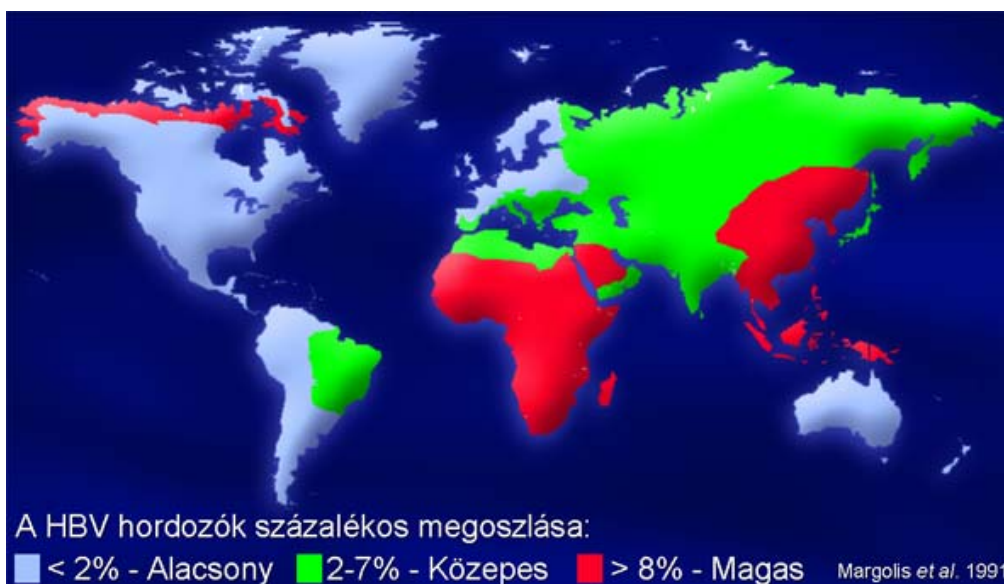
A HBV S génen belüli mutáció a HBsAg megváltozásához, ezzel a preventív vaccináció biztonságosságának csökkenéséhez vezethet. A vad-típusú HBsAg elleni ellenanyag nem ismeri fel és nem tudja semlegesíteni a mutáns HBsAg-t, így az „megszökik” az immunrendszer védelme elől. Leggyakoribb a 145-ös aminosav pozícióban a glicin arginin csere.

### *HBV polimeráz variánsok*

A reverz transzkriptáz és protein kináz aktivitású HBV DNS polimeráz a vírus szaporodás egyik kulcsfontosságú enzime. Ez a krónikus B hepatitis terápiájában alkalmazott nukleozid analóg, a lamivudine támadáspontja. Ismert, hogy a kezelés alatt HBV polimeráz variánsok, ún. YMDD (M552V/I) vagy egyéb (L528M, A529T, I555) mutánsok jelennek meg, melyek döntően befolyásolják az antivirális terápia hatékonyságát. (Részletesen lásd a 4.1. fejezetben)

## B VÍRUSHEPATITIS EPIDEMIOLOGIÁJA

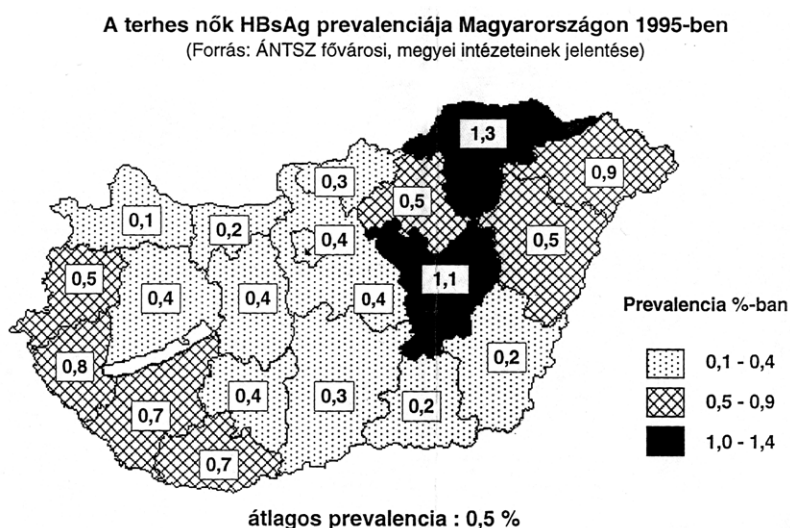
A HBV fertőzöttek mindenütt megtalálhatók a világban, de eloszlásuk egyenetlen. (3. ábra) Az endémiás, a közepesen és az alacsonyan fertőzött területeken a fertőzés prevalenciája 70%-95%, 20%-55% és 4%-6%, a vírus-hordozók aránya 8%-20%, 2%-7% és < 2% (5).



3. ábra: A HBV hordozók százalékos megoszlása a világban

Az endémiás területeken a vírus átvitel dominálónan vertikális, anyáról újszülöttre terjed, kisebb jelentőségű a felnőttkori direkt átfertőződés. Az alacsony prevalenciájú országokban a fertőzés inkább horizontálisan, a szexuális életet kezdő serdülők, a vénás droghasználók, a homoszexuálisok, HIV pozitívak, a vírushordozók hozzátartozói vagy a velük szoros közösségben élők (pl. katonaság, kollégium), az endémiás területről bevándorlók és a kiemelten veszélyeztetett foglalkozásúak (pl. egészségügyi dolgozók, rendőrök, tűzoltók és börtönben dolgozók) között terjed. A terjedés útja perinatalis, percután és szexuális, de nagyobb mennyiségű,  $10^{7-9}$  vírus részecskét tartalmazó váladékok a testen kívül, beszáradt állapotban is fertőzhetnek.

Magyarország az alacsonyan fertőzött országok közé tartozik. A megyei vértranszfúziós állomások adatai alapján a donorok között 0,1%-0,4% a HBsAg hordozó (Győr-Moson-Sopron, Szabolcs-Szatmár, Tolna, Fejér megye) (6.7.8.9). A terhes nők HBsAg prevalenciája 0,1%-1,3% (10). (4. ábra)



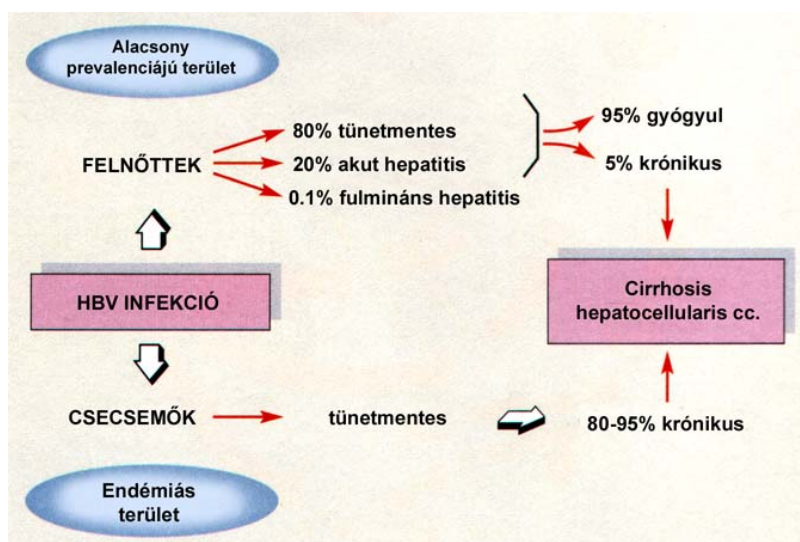
4. ábra

Hazai felmérés alapján az egészségügyben dolgozók 12%-25%-a esett át tünetmentes HBV fertőzésen, közülük 10% maradt „surface” antigén pozitív (11). A fertőzésben a legnagyobb veszélyt a tünetmentes hordozók jelentik. A terjedés főbb útjainak – mint anyáról újszülöttre, zárt közösségekben, vér közvetítésével és szexuális úton való lezárására – hazánkban szinte minden rendelkezésre áll. A kötelező terhes szűrés, a veszélyeztetett újszülöttek aktív és passzív immunizálása, a serdülők ingyenes védőoltása, az egészségügyiiek ingyenes és kötelező védőoltása, a donorok és a vérkészítmények szűrése megteremtették az alapját a fertőző lánc megszakításának (12). A feladat azonban még nagyon sok. Az intenzív felvilágosító tevékenység mellett a

pozitív betegek minél nagyobb számú kiszűrését szenzitív diagnosztikával, eredményes kezelésüket hatékony terápiával, a non-responderek gondozását, mint tumorprevenációt kell végeznünk.

## B VÍRUSHEPATITIS KLINIKUMA

A B vírushepatitis klinikuma sokszínű. Endémiás területeken, mint pl. Ázsiában, ahol a fertőzések nagy része perinatálisan, éretlen immunrendszerű újszülötteknél történik és minden olyan esetben, amikor sérült az egyén immunstátusza – az elégtelen citotoxikus T-sejt működés miatt – nem alakul ki a típusos akut hepatitis, a fertőzés tünetmentesen zajlik és a vírus perzisztál. A vírushordozás a járványügyi problémán túl a májcirrhosis és a hepatocelluláris carcinoma kialakulása miatt jelent potenciális veszélyt. Az akut hepatitis krónikussá válásának a valószínűsége újszülötteknél 90%, kisgyermekkorban 25%-30%, felnőtteknél 5%-10%. Közülük évente kb. 10%-nál spontán szerokonverzió figyelhető meg. A többieknek a vírus perzisztál és a krónikus hepatitisből évente 2%-3%-nál cirrhosis alakul ki. (5.ábra) A vírus pozitív, kompenzált cirrhoticus betegek 5 éves túlélését multicentrikus tanulmányokban 84%-ban adják meg, de a dekompenzált cirrhosisnál ez csupán 14% (13.14). A HBV direkt onkogén vírus. A fertőzött májban a hepatocelluláris carcinomák gyakorisága igen nagy. E tumorok 30%-50%-ánál mutatható ki a B vírus.



5. ábra: HBV infekció és a carcinogenesis

## KRÓNIKUS B HEPATITIS KLINIKAI DEFINÍCIÓI

(National Institutes of Health 2000. évi meghatározása alapján) (4).

*Krónikus B hepatitis:* A máj krónikus, perzisztáló HBV infekció okozta necroinflammatoricus elváltozással járó betegsége. HBeAg pozitív és HBeAg negatív alcsoportra osztható.

*Inaktív HBsAg hordozó állapot:* Necroinflammatoricus elváltozás nélküli perzisztáló HBV infekció.

*Gyógyult B hepatitis:* A máj azon állapota, amikor előzetesen HBV infekció zajlott, de aktív vírus infekció vagy a betegség virológiai, biokémiai vagy hisztológiai jelei már nem diagnosztizálhatók.

*HBeAg clearance:* Előzőekben pozitív HBeAg beteg HBeAg negatívvá vált.

*HBeAg szerokonverzió:* Megelőzőekben HBeAg pozitív és anti-HBe negatív beteg HBeAg negatívvá és anti-HBe pozitívvá válása. Ezzel együtt a szérumban HBV DNS szintje  $10^5$  copies/ml alá csökken.

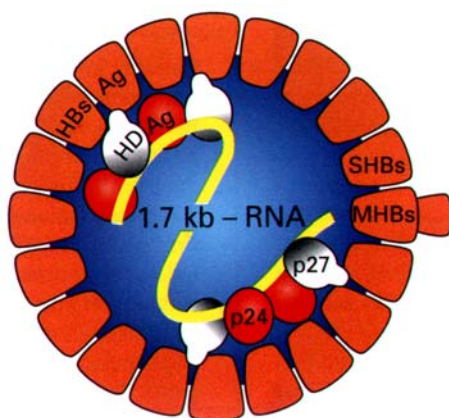
(Saját megjegyzés: A HBV DNS szint pozitivitás és ezzel együtt a fertőzőképesség feltételének a megelőző években az irodalom az ún. nem-amplifikációs technikájú szerológiai tesztekkel történő kimutathatóságot tartotta. Ez a HBV-nál a  $10^5$  alatti genom szám volt, ami nem jelent vírusmentességet, de a tapasztalatok alapján kisebb vírustömegnél kicsi az esély a fertőzés tovaterjedésére és a hepatitis aktiválódására. A két éve megjelent PCR alapú, lényegesen érzékenyebb módszerrel az addig negatívnak véleményezett betegek nagy része is pozitívnak bizonyult. A közeljövő feladata annak eldöntése, hogy milyen vírustiterű beteget tekintünk fertőzőképessnek és kezelendőnek. Ld. még 3.1.1. fejezetben)

### 1.3.2. Krónikus Delta vírushepatitis

1977-ben Rizetto és mtsai egy új antigén-antitest rendszert fedeztek fel a hepatitis B fertőzötték vérében, a Delta vírust. Magyarországon a krónikus Delta hepatitis ritka betegség. Ez a B hepatitis alacsony prevalenciájának köszönhető, és a B vírus elleni védőoltás bevezetésével várhatóan még tovább fog csökkenni. Az általa okozott hepatitis súlyos lefolyása miatt azonban jelentősége nagy (15. 16).

## HEPATITIS D VÍRUS SZERKEZETE

A hepatitis Delta vírus (HDV) inkomplett RNS vírus, melynek a szaporodásához a HBV jelenléte szükséges. Delta vírus csak B vírussal együtt fertőzőképes. A 37 nm átmérőjű részecske nukleokapszidja tartalmazza a Delta antigént. Cirkuláris RNS genomja relatíve kicsi, 1,7 kb. Emberi májsejtekben csak HBV jelenlétében szaporodik. Külső burka a B vírus által kódolt HBsAg. A HDV RNS által kódolt saját antigénje a HDAg, mely két proteinrészből áll. A HDV szerológiailag egységes vírus, mely 80-95%-os genetikai azonosságot mutat. (6. ábra)



6. ábra: Hepatitis Delta vírus

## D VÍRUSHEPATITIS EPIDEMIOLÓGIÁJA

Előfordulása a világ különböző részein igen eltérő. A mediterrán vidékek endémiásnak tekinthetők, különösen Dél-Európában, Közép-Keleten, Közép Ázsiában, Nyugat-Afrikában, az Amazonas vidékén és a csendes-óceáni szigetvilágban gyakori, Európa többi részén sporadikusan fordul elő. Terjedése a B víruséhoz hasonló. Koinfekció esetén a HBV és HDV fertőzés egyidejűleg történik, szuperinfekció esetén a krónikus HBV hordozó személy fertőződik D vírussal. Egy 2000-ben olasz kutatók által közölt 10 éves multicentrikus vizsgálat eredménye Dél-Európában is igazolta a fertőzés prevalenciájának csökkenését. 1987-ben a HBV fertőzöttek 40%-ánál találtak Delta infekciót, ezzel szemben 1997-ben ez az érték már csak 8,3% volt (17). Elsősorban az i.v. droghasználók és a dializáltak veszélyeztetettek.

Három genotípusa ismert, melyeknek földrajzi megoszlása a következő: I.szubtípus: Franciaország, Itália, USA, Japán, Taiwan, Libanon, II. szubtípus: Japán, III szubtípus: Peru és Kolumbia. Az eddig elvégzett szerkezeti analízis vizsgálatok a különböző variánsok, genotípusok vagy mutánsok között aránylag magas, 80%-95%-os szekvencia

egyeztetést igazoltak. A HBV-hez és a HCV-hez hasonlóan itt is található összefüggés a vírus szerkezete és az általa kiváltott betegség klinikai lefolyása között. Eddig a III. típusal kapcsolatban közöltek kifejezetten súlyos delta hepatitiszt (2.18).

#### DELTA VÍRUSHEPATITIS KLINIKUMA

A *koinfekció* klinikai képe megegyezik a HBV fertőzésével, azonban az akut periódus sokkal súlyosabb. Ennek lezajlása után a betegek több mint 90%-a mindkét vírus tekintetében negatív lesz. A krónikussá válás igen ritka.

A *szuperinfekció* prognózisa rosszabb és különbség van aszerint, hogy tünetmentes HBV hordozóban vagy krónikus B hepatitis talaján alakult-e ki a Delta felülfertőzés. Ilyenkor a májsejt károsodás súlyosabb, gyakori az idültté válás (70%-90%), a folyamat gyorsabb progressziójú, a cirrhosis és/vagy tumor előbb jelenik meg. A fulminans akut hepatitis ennél a formánál gyakoribb.

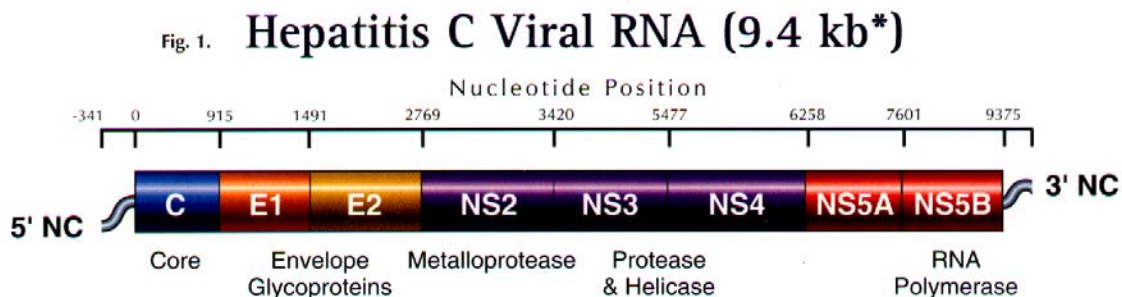
#### 1.3.3. Krónikus C vírushepatitis

Az 1988. év a jelenkori hepatológia egyik mérföldköve volt. Ekkor vált ismertté az addig non-A, non-B hepatitisnek nevezett kórkép fő kórokozója a C vírus. Azóta világszerte intenzív kutatások folynak a vírus epidemiológiai, immunológiai, pathogenetikai sajátosságainak és az ezek alapját képező molekuláris genetikai tulajdonságainak tisztázására.

#### HEPATITIS C VÍRUS SZERKEZETE

Ez az egyszálú RNS vírus a pestivírusokkal, a flavivírusokkal valamint a GBV-A, a GBV-B és a GBV-C vírusokkal együtt a Flaviviridae család tagja. Genomja egy pozitív szálú RNS molekula, mely 9400 nukleotidból és lipid borítékból áll. Két át nem íródó részt („untranslated”) foglal magába az 5' és a 3' végeken (5'UTR, 3'UTR) és egy hosszú nyitott leolvasású keretet ún. „open reading frame”-t, mely egy 3010-3030 aminosavból álló polyproteint kódol. Az 5'UTR erősen konzervált régió, ezért számos diagnosztikai teszt ennek vizsgálatához kötődik. Az átíródó fehérje „strukturális” és „nonstrukturális” részekből áll, melyeket a gazdaszervezet és a vírus által kódolt enzimek bontanak. A strukturális protein a core fehérjét és két boríték, „envelope” glycoproteint tartalmaz: E1 és E2. A „nonstrukturális” domen az N végtől a C vég felé haladva 6 proteint kódol: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A és NS5B. Az NS3 szerinproteáz, helikáz és ATP-függő nukleotid trifoszfataz aktivitást mutat. A nem strukturális

régiók szerepe a vírusszaporodásban és az enzimek kódolásában van. A 3' vég mind hosszban, mind nukleotid szekvenciában változékony. (7. ábra)



7. ábra: HCV szerkezete

A HCV szerkezete nem egységes és nem stabil, több típusa és szubtípusa van. Világszerte elterjedt, de az egyes földrészekén más-más típusa fordul elő. A különböző típusok nukleotid szerkezete 68-70%-ban, a szubtípusok 77-90%-ban egyeznek. Az egy betegből izolált, 10%-nál kevesebb különbséget mutató, főleg az „envelope” régióban megjelenő, pontmutációk általi variánsok a “quasispeciesek”. A különböző kutatócsoportok (Simmonds, Houghton, Cha, Chan, Okamoto, Mori, Enomoto, Tsukiyama és mtsai.) attól függően, hogy mely országban izoláltak egy-egy vírus típust - a szerkezeti azonosság ellenére – más-más elnevezést adtak neki, így rövid időn belül klasszifikációs káosz alakult ki. Ennek megszüntetésére 1994-ben P. Simmonds vezetésével egységes nevezéktant dolgoztak ki, melyben 1-6 típusokat és a-c szubtípusokat különítettek el (19). (26. ábra) A szubtípusok elkülönítésének az epidemiológiában és a klinikumban van jelentősége. Következtetni lehet belőle a vírus származási helyére, tovaterjedésének útjára és módjára. Az általuk okozott kórképek súlyossága és gyógyulási hajlama különböző, így ismeretükben dönteni tudunk az antivirális kezelés időtartamáról, a gyógyszerek választandó dóziséjáról és a terápia utáni betegkövetés módjáról (pl. tumor prevenció) (20. 21. 22. 23. 24. 25).

## C VÍRUSHEPATITIS EPIDEMIOLÓGIÁJA

A HCV az egész világban megtalálható, de előfordulásának gyakorisága különböző. Kutatók a vírus szerkezeti elemzéséből próbálták megállapítani a vírus származásának helyét és idejét. A szekvencia változás rátájából (0.14% - 0.19%/hely/év) a típusok jelenlegi előfordulási helyeiből és számából arra következtettek, hogy egy új szubtípus kialakulásához 200-270 év, új típushoz kb. 400 év kellett. A fentiek alapján állítható, hogy a vírus több ezer év óta jelen van a humán populációban, vagy egy evolúciós

robbanást kell feltételeznünk, mely felgyorsította a genom differenciálódási folyamatát. Ma még az is tisztázandó kérdés, hogy a bizonyítottan parenterálisan transzmittálódó kórokozó ilyen hosszú időn keresztül milyen mechanizmusokkal tudta magát az élővilágban fenntartani. A WHO 1997. évi epidemiológiai felmérése alapján a föld lakóinak kb. 3%-a esett át HCV fertőzésen és több mint 170 millió krónikus vírushordozót tartanak nyilván. Ők potenciális jelöltjei a májcirrhosis és/vagy a májtumor kifejlődésének. A 130 országban végzett felmérések adatai alapján a nagyobb földrészek HCV prevalenciája a következő:

WHO Régió	Népesség száma (millió)	Hepatitis C Prevalencia (%)	A fertőzött népességszám (millió)
Afrika	602	5.3	31.9
Amerika	785	1.7	13.1
Keleti-Mediterrán	466	4.6	21.3
Európa	858	1.03	8.9
Dél-Kelet-Ázsia	1500	2.15	32.3
Nyugat-Csendes-óceán	1600	3.9	62.2
<b>Összesen</b>	<b>5811</b>	<b>3.1</b>	<b>169.7</b>

Ebben a felmérésben Magyarország 0.98%-os prevalenciával szerepel. A legmagasabb prevalenciát Egyiptomban (18.1%), a legalacsonyabbat Finnországban (0.02%) találták (26.27.28). A legfrissebb hazai adatok alapján Magyarországon a prevalencia csökkenő tendenciát mutat, jelenleg 0.6%. A fertőzés összesítésén túl nagy jelentősége van a HCV szubtypus szerinti megoszlásának:

Földrajzi területek	Szubtypus megoszlás
USA, Kanada, Nyugat-Európa	1a, 1b, 2a, 2b, 3a
Dél-Kelet-Európa	1b
Észak-Európa	1a, 1b, 2b, 3a
Dél-Európa (Itália, Spanyolország)	1b, 2c
Ázsia	1b, 4
Dél-Afrika	1, 2, 3, 5a
Észak- és Közép-Afrika	4
Thaiföld	1b, 2, 3, 6
Hong Kong	6a, 1b, 2a, 2b
Japán	1b, 2a, 2b

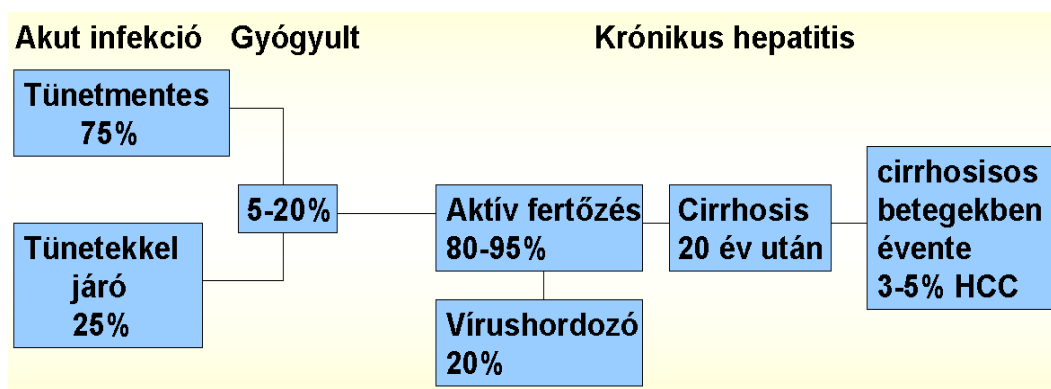
A HCV fertőzésnek számos útja ismert, közülük a leggyakoribb és a legjobban vizsgált a parenterális átvitel, úgymint a vérátömlesztés és az i.v. kábítószerélvezőknél a közös tű használata. A tűszúrásos balesetek, különösen az egészségügyben dolgozók körében, változatlanul jelentős kockázati tényezőknek tekintendők (44). Magas rizikójú betegcsoportba tartoznak még a hemodializáltak, hemopfiliások, a politranszfundáltak



és a szoros közösségben élők (pl. börtönlakók). A krónikus HCV fertőzések kb. 60%-ában lehet tisztázni az etiológiát, ezért a terjedés egyéb lehetőségeinek is nagy szerepe van. A szexuális átvitel igazolt, de lényegesen kisebb jelentőségű, mint a HBV és a HIV fertőzések esetében. A vertikális fertőzés intrauterin vagy perinatális átvitele szintén előfordul. A HCV megismerése előtt a fertőzések jelentős hányadát a különböző invazív orvosi beavatkozások okozták. A vírus természetének és a fertőzés patomechanizmusának megismerése és az egyre kiterjedtebb felvilágosító tevékenység eredményeképpen ma az új fertőzések legnagyobb számát az i.v. droghasználók és a hagyományos diagnosztikai módszerekkel nem identifikálható mutánsok okozzák.

## C VÍRUSHEPATITIS KLINIKUMA

Az akut HCV fertőzés leggyakrabban tünetmentesen, szinte észrevétlenül zajlik. A betegség gyanúja sokszor véletlenszerűen szűrővizsgálatok, véradáskor vetődik fel. A fő problémát a betegség 80%-90%-os krónikussá válása okozza, mely cirrhosisba, majd hepatocellularis carcinomába progridiálhat (32.33.34.35.36.37.38). (8. ábra)



8. ábra: A HCV fertőzés klinikuma

Részletesen ld. 3.1.3. fejezetben. A vírushepatitisek és a carcinogenesis összefüggésének kutatásával hazánkban Schaff Zs. és mtsai. foglalkoznak (45. 47).

## 2. BETEGEK ÉS AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

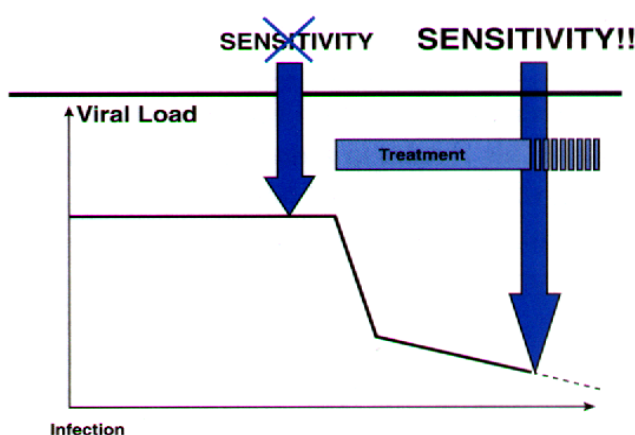
### 2.1. VIZSGÁLT BETEGANYAG

Osztályunk 1992 óta a krónikus vírushepatitises betegek kezelésére akkreditált hepatológiai centrumok egyike. Az éves statisztikáink alapján Magyarországon 1992 és 2002 év vége között közel 3.000 beteg részesült antivirális terápiában (Telegdy L.).

Hepato-Pancreatológiai Részlegünkön 1992. szeptember – 2002. augusztus között 259 krónikus HCV, 12 HBV és 2 HDV hepatitiszes beteget kezeltünk interferon (IFN) monoterápiával vagy ennek ribavirinnel történő kombinációjával, pegilált IFN és ribavirin kombinációjával, újabban a HBV fertőzötteket lamivudinnal. Laboratóriumunkban egyrészt a diagnózis felállításához, másrészt a terápia bevezetéséhez és követéséhez szükséges méréseket végezzük.

A disszertációmban közölt adatok az általunk kezelt és a Szakrendelésünkön ellátott betegek vérmintáinak eredményeit tartalmazzák. A magyarországi HCV típus és szubtypus analízisünkben a többi centrum betegeinek a Laboratóriumunkban végzett vizsgálati értékeit is összegeztük (606 beteg). A lamivudin rezisztens mutánsok bemutatásánál Részlegünk mellett még 6 centrum betegeinek leleteit dolgoztuk fel (Petz Aladár Megyei Kórház, I. Belgyógyászat, Győr, Rác István dr., Csöndes Mihály dr., Budai Irgalmasrendi Kórház, Belgyógyászat, Budapest, Nemesánszky Elemér dr., Zala Megyei Kórház, Infektológia, Zalaegerszeg, Ribiczey Pál dr., Szent László Kórház, III. Belgyógyászat, Budapest, Telegdy László dr., DEOEC, II. Belklinika, Debrecen, Tornai István dr., Kenézy Gyula Kórház, Infektológia, Debrecen, Weisz György dr.). A mérések egy része a kezelésünk alatt álló betegek vérmintáiból naprakészen, másik része fagyasztott szérumok retrospektív feldolgozásából történtek.

## 2.2. ALKALMAZOTT MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK



9. ábra: A diagnosztikus tesztek érzékenysége iránti igény

### 2.2.1. Polimeráz lánreakció (PCR)

A módszert a Cetus Corporation tudósai dolgozták ki és 1985-ben a Science hasábjain közzölték le. A technológia szülőatyja, *Karry Mullis* munkájáért 1993-ban kémiai Nobel-díjat kapott. Ezzel az in vitro technikával a természet DNS-reprodukáló képességét utánozzuk. A módszer lényege, hogy az igen kis mennyiségben jelen lévő ( $10^{-18}$ g) mikroorganizmus genetikai anyagát, vagy ennek egy részecskéjét nagy specificitással, több nagyságrenddel feldúsítjuk és az így nyert mintát a hagyományos laboratóriumi módszerekkel megjeleníthetővé és mérhetővé tesszük. Specifikus enzimek (hőstabil *Thermus thermophilus*, DNS-polimeráz és AmpErase), nukleotidok és ko-faktor ( $Mn^{2+}$ ) pufferolt elegyében 20–30 bázispárból álló, ismert szekvenciájú oligonukleotidok, ún. primerek segítségével 30–40 ciklus eredményeként a vizsgálandó anyag  $10^9$  nagyságrendű, milliárdszoros mennyiségét kapjuk meg, melyet azután pl. kolorimetriásan mérünk. (13. ábra) A reakció egy thermocyclernek nevezett automatában megy végbe. (10.11.12.13).

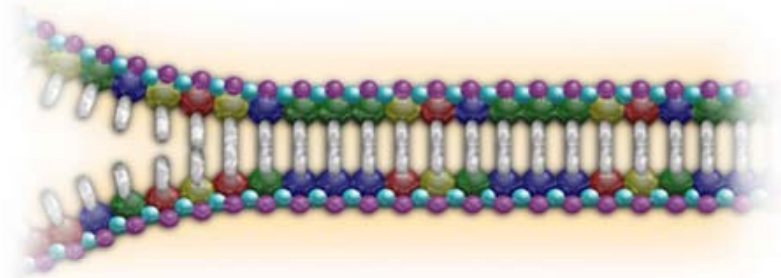
A PCR lényege a dúsítás vagy amplifikáció. Ennek során mintegy 30-40x ismétlődik egy reakció sor, mely három különböző hőmérsékleten játszódik le. Az első lépés a DNS hővel történő denaturálása. 93-95 °C-on a DNS két szála egymástól elválik. (11. ábra) A második reakciólépés általában 45-60 °C között játszódik le, ezen a hőmérsékleten a reakció elegyben jelen levő oligonukleotid primerek kötődnek, „annelálódnak” a megsokszorozandó, még egyszálú formában lévő DNS szakasz két végéhez. Ezek az oligonukleotidok olyan rövid, 20-30 bázisból álló, szintetikus, egyszálú DNS darabkák, melyek a megsokszorozandó DNS szakasz két végének komplementerei. A harmadik reakció során, 72 °C-on, a jelen lévő polimeráz enzim, a hőstabil Taq polimeráz a primereket meghosszabbítva, lemásolja a két vég közötti DNS szakaszt és ezzel egy új kétszálú DNS szintetizálódik. Ezután az egész folyamat ismétlődik. A megsokszorozódott DNS fragmentumot különböző molekuláris biológiai technikával elemezhetjük. (12. ábra)

Az amplifikáció nagyon szelektív és jól megválasztott körülményei között nem keletkeznek zavaró melléktermékek. A vizsgálat nagy figyelmet és az előírások pontos betartását igényli, hogy véletlenszerűen se történjék átfertőződés.

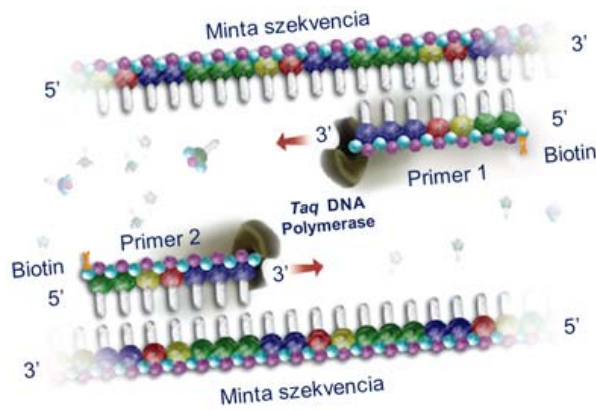
	<b>RNS</b>	<b>DNS</b>
<b>Cukor</b>	Ribóz	Dezoxiribóz
<b>Bázisok</b>	Adenin (A)	Adenin (A)
	Citozin (C)	Citozin (C)
	<b>Uracil (U)</b>	<b>Timin (T)</b>
	Guanin (G)	Guanin (G)
<b>Szálak száma</b>	Ált. egyszálú	Kétszálú
<b>Hőstabilitás</b>	Nem	Igen

10. ábra: RNS és DNS összetétele közötti különbség

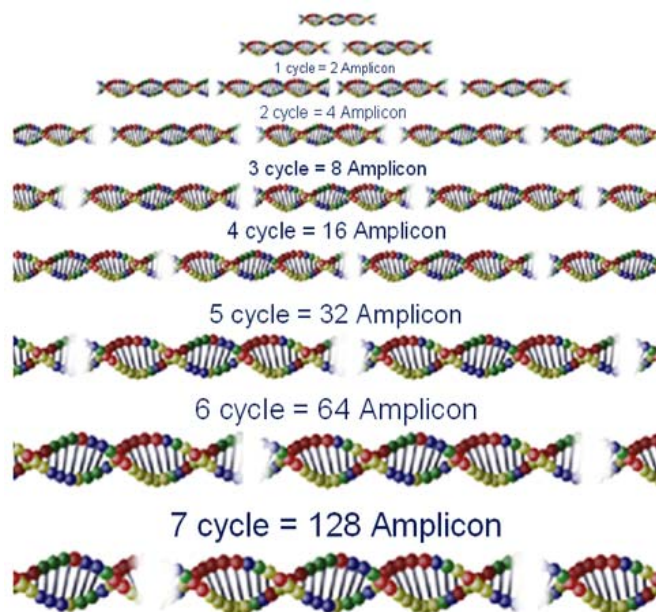
Laboratóriumunkban PCR technikát használunk a HBV DNS mennyiségi meghatározásához. (9. ábra) A HCV nukleinsav és a HBV lamivudin mutánsainak kimutatását ennek továbbfejlesztett formájával, a reverz-transzkripcióval kombinált polimeráz láncreakcióval végezzük.



11. ábra: PCR 1. lépés: DNS denaturációja hő hatására



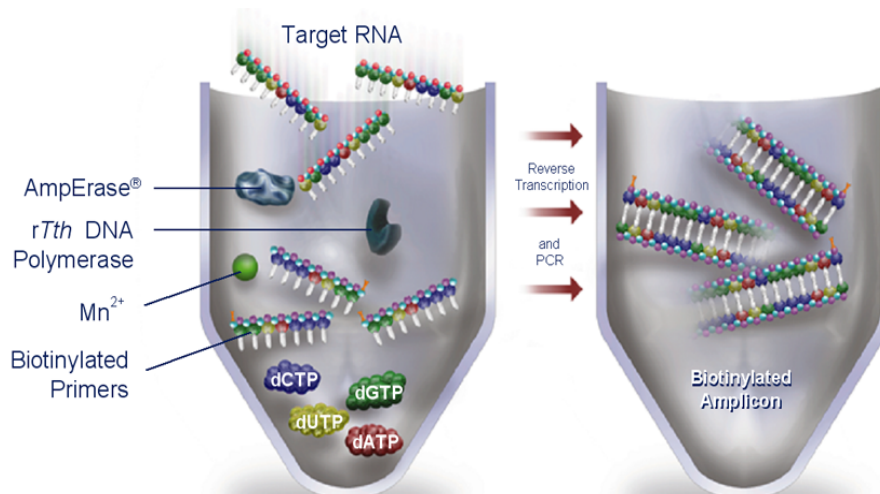
12. ábra: A DNS első komplementer párjának felépítése



13. ábra: Amplifikációs ciklusok

### REVERZ-TRANSZKRIPTÁZ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (RT-PCR)

Genetikai információ nem csak DNS-ről íródhat át RNS-re, hanem ez fordítva is lejátszódhat. Ezt a folyamatot RNS által irányított DNS szintézisnek, az ezt végző enzimet pedig reverz transzkriptáznak nevezik. Ez teszi lehetővé, hogy RNS-ből komplementer DNS (cDNS) szintetizálódjék. Mivel a HCV RNS-vírus, ezért első lépésként reverz transzkripcióval az egyszálú RNS-ből komplementer DNS-t készítünk, mely az amplifikáció kiinduló mintája lesz. (14. ábra) Ez a reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR).



14. ábra: Reverz transzkripció és PCR

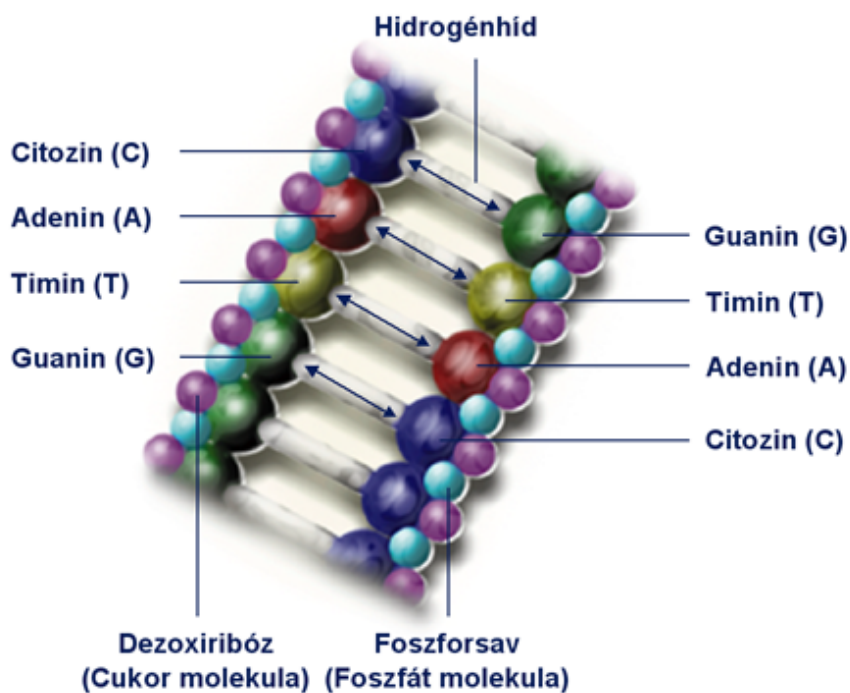
### NESTED POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (Nested-PCR)

Igen kis mennyiségű minta biztonságos és a cél szekvencia még pontosabb dúsítása érdekében az amplifikációt két körben megismételhetjük. A második sorozatban felhasznált kiindulási minta az első kör reakció keverékéből származik. Lényeges eltérés a primerek szekvenciáiban van. Az ún. „outer” vagy külső primerekkel hosszabb nukleinsav szakaszt dúsítunk, a második sorozat ún. „inner” vagy belső primerei rövidebb célszakaszt fognak közre. A polimeráz láncreakció egyéb paramétereit általában mindkét sorozatban egyezőek. Nested-PCR technikát használunk a lamivudine rezisztens mutánsok kimutatásához és a HCV 1b PKR-BR szakaszának szekvencia analíziséhez.

#### 2.2.2. Nukleotid szekvencia analízis

Az örökletes információk hordozói a nukleinsavak. Két típusuk ismert: DNS (dezoxiribonukleinsav) és RNS (ribonukleinsav). A nukleinsav molekula egy cukor-foszfát gerincből áll és a cukor molekulákhoz bázisok kapcsolódnak. Két típusú bázis ismert: purinok (adenin=A, guanin=G), és pirimidinek (timin=T, citozin=C). Az RNS-ben timin helyett uracil (U) van. (10. ábra) Egy bázis, cukor, foszfát molekula egységet nukleotidnak hívunk. A DNS molekula két nukleotid sorozat kettős spirálja, melyeket hidrogén-híd köt össze. (15. ábra) Három bázisból álló triplet kódol egy aminosavat. A fehérjékben 20féle aminosav fordul elő. A metionint és a triptofánt csak egyfajta bázis

kombináció (codon), a többi aminosavat több codon kódolhatja. Háromféle codon a fehérje szintézis végét jelzi, ez az ún. stop-codon.



15. ábra: Nukleotidok felépítése

A genetikai utasítás döntően arra vonatkozik, hogy milyen legyen az utód molekuláiban az aminosavak sorrendje. A genetikai kód tehát a fehérje szintézis kódja, az öröklődés pedig a fehérje szintézist meghatározó utasítások nemzedékről nemzedékre történő átadása.

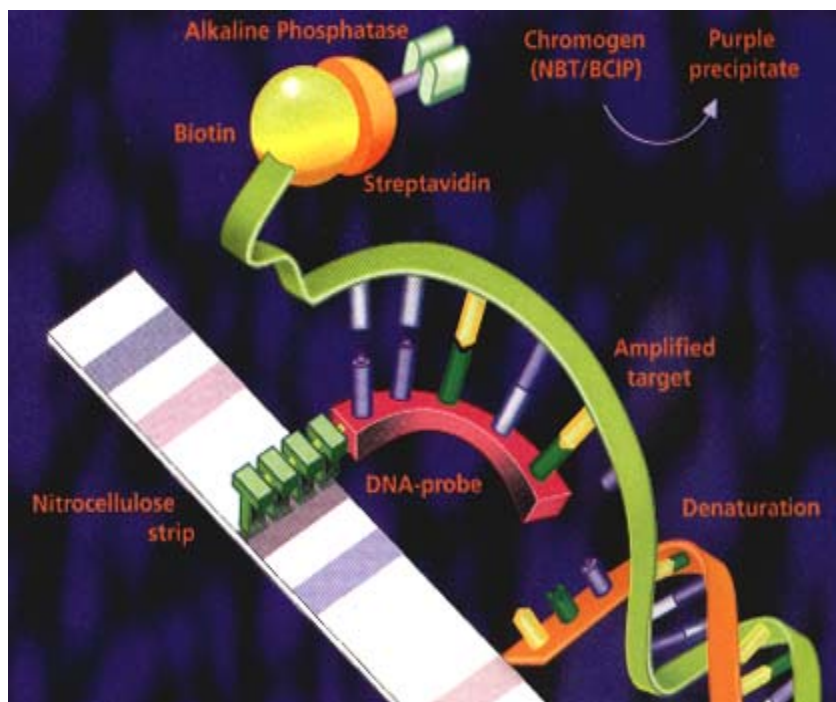
A fentiek alapján természetes, hogy ha egy fehérje minta finom szerkezetét akarjuk megismerni, az azt kódoló nukleotidok elemzését kell elvégeznünk.

Laboratóriumunkban a HCV szerkezeti analízisét nukleotid szekvencia vizsgálattal végeztünk. (A metodika leírása a 4.7. fejezetben.)

### 2.2.3. Hibridizáció

DNS szakaszok azonosítására szolgál a hibridizációs próba. Nagy tömegű, különböző nukleinsav molekula közül speciális szondával, „probe”-val ki tudjuk választani a keresett szekvenciájú mintát. A „probe”-okat szilárd fázishoz kötjük, pl. nitrocellulóz-membránhoz, melyhez reverzibilis módon kötődik, hibridizálódik a keresett,

komplementer szekvenciájú anyag. (16. ábra) Laboratóriumunkban HCV szubtípus és lamivudin rezisztens mutánsok detektálásához használjuk ezt a módszert. Mindkét esetben az amplifikált vírus nukleinsav részecskét megjelöljük (eseteinkben biotinnal). A jelölt termékek a velük teljesen szekvencia azonos „probe”-kal kötődnek. A megkötött hibrideket színreakcióval láthatóvá tesszük.



16. ábra: Hibridizációs „line probe assay”

### 2.3. ALKALMAZOTT STATISZTIKAI MÓDSZEREK

A statisztikai összehasonlító analízisek minden esetben SPSS v.10 software-rel történtek.

A magyar populáció HCV genotípus megoszlásának vizsgálatokor a minta nagy elemszámára való tekintettel a parametrikus kétmintás t-próbát alkalmaztuk a bazális vírus titerek összehasonlításánál. A vizsgált kategórikus változók esetén Chi-square tesztet használtunk. A tesztek kétoldalúak voltak. Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha a p értéke kisebb vagy egyenlő volt 0.01-gyel.

Az ISDR mutációinak analízisénel az elemezett adatok száma nem haladta meg csoportonként a kritikus 30-at és eloszlásuk “non-normál” formát mutatott. Kvalitatív változók esetén (pl. nem, ISDR típusa) Chi-Square tesztet használtunk, míg kvantitatív adatok esetén (pl. kor, mutációk száma) a non-parametrikus Mann-Whitney U teszttel hasonlítottuk össze a két csoportot. Minden statisztikai teszt kétoldalú volt, a szignifikancia szintet 5%-nak választottuk.



### 3. DIAGNOSZTIKAI PROTOKOLLOK

#### 3.1. A KRÓNIKUS VÍRUSHEPATITISES BETEGEK DIAGNOSZTIKÁJÁBAN ALKALMAZOTT PROTOKOLLJAINK

A krónikus vírushepatitis egyike azon betegségcsoportnak, melynek kezelése - a világ fejlett országaival egyidőben - hazánkban is 1992-ben, nemzetközi standardok alapján kezdődött meg és jelenleg is e szerint történik. Ennek szakmai alapját a hepatológiai centrumok által kidolgozott, protokollokhoz kötött terápia adja. Így a hazánkban kezelést végző 22 osztályon azonos gyógyszerelési előírások érvényesek. A krónikus „B”, „C” és „Delta” vírushepatitis gyógyítását 1992-1997 között interferon monoterápiával, azóta ennek különböző antivirális szerekkel történő kombinációjával végezzük. A gyógyszereket az Országos Egészségbiztosítási Pénztár (OEP) az erre elkülönített, évente megállapított keretből, 100%-os térítési támogatással finanszírozza. A betegek mielőbbi és nagyobb létszámú kezelését a gyógyszergyártók (Roche, Schering-Plough) ingyenes mintái segítik. A diagnózis felállításához, a terápia monitorozásához és az utánkövetéshez szükséges komplex szerológiai vizsgálatokat Vírusserológiai Laboratóriumunkban végezzük. 1994-1997 között és 2000 szeptemberétől a speciális metodikák költségtérítése az OEP által biztosított diagnosztikai keretből történik. A finanszírozással megteremtődött a feltétele annak, hogy az egységes terápiás elvek alapján kezelt betegcsoport diagnosztikája azonos műszerekkel és módszerekkel történjen. A leg szenzitívebb és legspecifikusabb, nemzetközileg ellenőrzött és engedélyezett tesztek használva a kapott eredmények standardizáltak és összehasonlíthatóak.

A betegek kiszűrése több területen történhet. Ellenanyag meghatározást szűrés céljából (donor- és foglalkozás-egészségügyi szűrővizsgálat) az Országos Vérellátó Szolgálat és az ÁNTSZ laboratóriumaiban, betegség gyanúja esetén (családorvos, járóbeteg-szakrendelés vagy fekvőbeteg intézet orvosának kérésére) az ÁNTSZ laboratóriumaiban és néhány speciális vírusserológiai laboratóriumban végeznek. Pozitív eredmény esetén a beteget hepatológiai centrumba kell küldeni, ahol a további kivizsgálásukat majd kezelésüket végzik. Ellenanyag pozitív beteg szakkonzílium nélküli obszerválása szakmai felelőtlenség, hiszen ezzel egy májcirrhosisba, esetenként hepatocelluláris carcinomába progrediáló betegség marad terápia nélkül.

A vírushepatitisek *diagnosztikájában a cél:*

- a fertőzés fennállásának igazolása vagy kizárása
- pozitív esetben a májstátusz pontosítása,
- a terápia indikálása, majd a megkezdett kezelés hatékonyságának követése,
- terápia rezisztens esetekben a betegek gondozása (tumor prevenció),
- a hepatitis extrahepatikus manifesztációinak kezelése.

**Diagnosztika-differenciáldiagnosztika különböző területei:**

- Klinikai tünetek
- Biokémiai és hematológiai vizsgálatok
- Morfológiai vizsgálatok
- Szerológiai vizsgálatok
- Molekuláris biológiai vizsgálatok
- Hisztológiai vizsgálatok
- Immunológiai vizsgálatok
- Differenciáldiagnosztika

Az alábbiakban a krónikus hepatitis diagnosztikájában végzett vizsgálatainkat foglaltam össze. (Összefoglaló táblázat: ld. külön)

**3.1.1. Krónikus B vírushepatitisben végzett szerológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok.**

Krónikus B hepatitisben a következő antigén és ellenanyag vizsgálatokat végezzük szerológiai vagy molekuláris biológiai módszerekkel:

HBsAg	anti-HBs
HBeAg	anti-HBe
HBV DNS	anti-HBc IgM
	anti-HBc total

(HBV lamivudin rezisztens mutánsainak meghatározása: ld. 3.1. fejezetben)

## 1. táblázat: Krónikus B, Delta, C vírushepatitisek diagnosztikai protokollja

A BETEG ÚTJA	HELYE	VIZSGÁLT PARAMÉTEREK		
		KRÓNIKUS B HEPATITIS	KRÓNIKUS DELTA HEPATITIS	KRÓNIKUS C HEPATITIS
<b>SZÜRŐPROGRAMOK</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Véradó</li> <li>Terhesgondozás</li> <li>Foglalkozás-egészségügy</li> </ul>	ÁNTSZ Laboratórium Vérellátó	HBsAg anti-HCV II. v. III. gen. ALT	HBsAg anti-HCV II. v. III. gen. ALT	anti-HCV II. v. III. gen. HBsAg ALT
<b>BETEGVIZSGÁLAT</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Családorvosi- és járóbeteg-szakrendelés vagy fekvőbeteg-gyógyintézet orvosai</li> <li>Gasztroenterológus szakorvos</li> </ul>	Járóbeteg-Szakrendelés Fekvőbeteg-Osztályok ÁNTSZ Laboratórium	Fizikális vizsgálat HBsAg, ALT anti-HCV II. v. III. gen.	Fizikális vizsgálat HBsAg, ALT anti-HCV II. v. III. gen.	Fizikális vizsgálat anti-HCV II. v. III. gen. HBsAg, ALT
	Hepatológiai Centrum (OEP által nevesített)	Fizikális vizsgálat Hasi UH (ERCP, CT?) Májbiopszia	Fizikális vizsgálat Hasi UH (ERCP, CT?) Májbiopszia	Fizikális vizsgálat Hasi UH (ERCP, CT?) Májbiopszia
	Vírusszerológiai Laboratórium (OEP által nevesített)	HBV-DNS, HBe Ag, anti-HBc-IgM HD Ag, anti-HD-IgM, anti-HD	HD Ag, anti-HD-IgM, anti-HD HBV-DNS, HBe Ag, anti-HBc	HCV-RNS (RT-PCR) (minőségi) Differenciáldiagnosztika
<b>TERÁPIA</b>	Hepatológiai Centrum <ul style="list-style-type: none"> <li>Járóbeteg-szakrendelés</li> <li>Fekvőbeteg osztály</li> </ul> Vírusszerológiai Laboratórium (OEP által nevesített)			
<b>ELŐSZÜRÉS</b>		HBV-DNS (mennyiségi) Kémiai, hematológiai paraméterek Differenciáldiagnosztika HIV	HD Ag, HBsAg Kémiai, hematológiai paraméterek Differenciáldiagnosztika HIV	Kémiai, hematológiai paraméterek HCV-RNS (PCR) (mennyiségi) HCV genotípus anti-HCV-IgM HBsAg, anti-HBc, HIV Differenciáldiagnosztika
<b>TERÁPIA KÖVETÉS</b> (4-6 hetente)		Fizikális vizsgálat Kémiai, hematológiai paraméterek	Fizikális vizsgálat Kémiai, hematológiai paraméterek	Fizikális vizsgálat Kémiai, hematológiai paraméterek
TERÁPIA 3. és/vagy 6. hónapja		HBV-DNS anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc-IgM (Lamivudine rezisztens mutánsok)	HBV-DNS, HD Ag, anti-HD	HCV-RNS (PCR) (minőségi, pozitív esetben mennyiségi) anti-HCV-IgM
<b>TERÁPIA BEFEJEZÉSE</b>		HBV-DNS anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc-IgM HCC gyanúnál hasi UH, AFP, CT?	HBV-DNS, HD Ag, anti-HD HCC gyanúnál hasi UH, AFP, CT?	HCV-RNS (PCR) (minőségi) anti-HCV-IgM HCC gyanúnál hasi UH, AFP, CT?
UTÁNKÖVETÉS 6. hónapja		HBV-DNS	HBV-DNS, HD Ag, anti-HD	HCV-RNS (PCR) (minőségi)
<b>BETEGKÖVETÉS</b> 0,5-1 évente	Hepatológiai Centrumok	A beteg állapota szerint	A beteg állapota szerint	A beteg állapota szerint

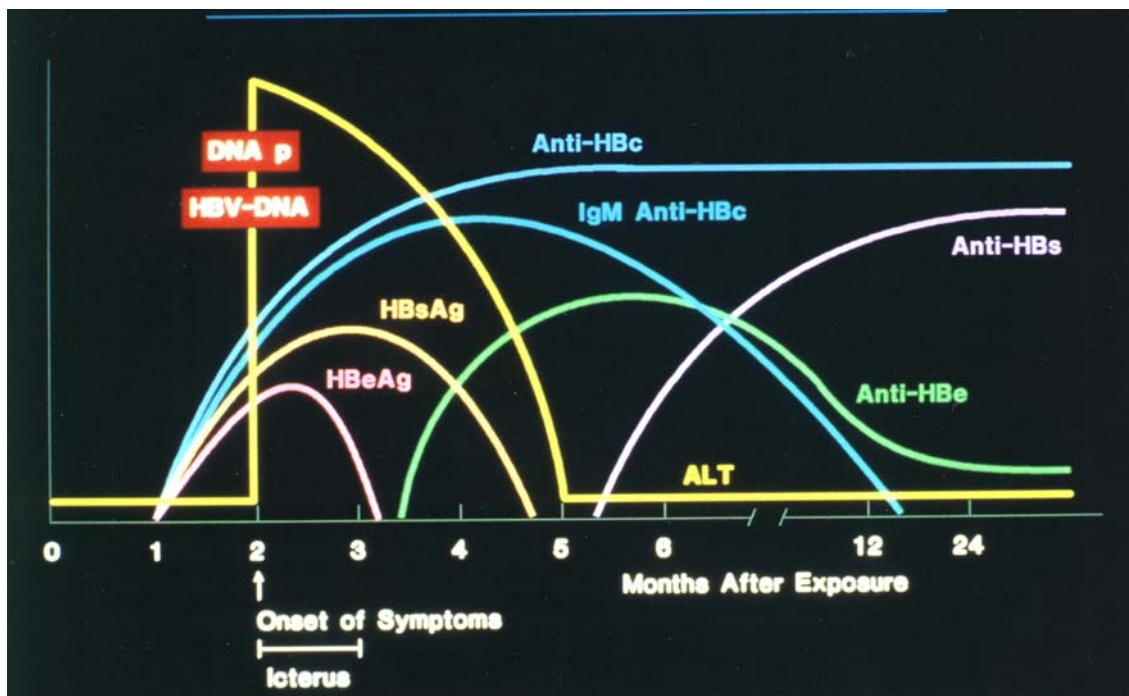
## A HBV FERTŐZÉSEK DIAGNOSZTIKAI KRITÉRIUMAI:

### A. Krónikus B hepatitis

1. HBsAg 6 hónapon túl is pozitív
2. Szérum HBV-DNS  $>10^5$  copies/ml
3. Tartósan vagy intermittálva magasabb ALT érték
4. Májbiopszia nekroinflammációs score  $\geq 4$

### B. Inaktív HBsAg hordozó státusz

1. HBsAg 6 hónapon túl pozitív
2. HBeAg negatív, anti-HBe pozitív
3. Szérum HBV-DNS  $< 10^5$  copies/ml
4. Tartósan normál ALT érték
5. Májbiopszia nekroinflammációs score  $\leq 4$



17. ábra: Akut B hepatitis szerológiai jellemzői

A HBV fertőzés akut stádiumában elsőként a HBsAg, majd a HBeAg jelenik meg a szérumban. A HBsAg az a „rutin” diagnosztikai marker, melyet szűrésre és betegvizsgálatra is használunk. A HBeAg jelenléte a szérumban aktív vírus replikációt és infektivitást jelez. A HBcAg a szérumban nem detektálható.

Az antigéneket követi a 4 ellenanyag egymás utáni megjelenése, melyek perzisztálása vagy eltűnése a betegség kimenetelétől függ. Egyedüli anti-HBs pozitívitás védőoltás után látható. (17. ábra)

A molekuláris biológiai módszerek bevezetése előtt a vírus replikáció és az aktív virémia jellemzésére csak a HBeAg-t és az ALT szintet tudtuk mérni. A B vírus nukleinsav meghatározást 1996 óta hibridizációs módszerrel végezzük. 2001-ben vezettük be a  $2 \times 10^2$  copies/ml cut-off érzékenységgű PCR technikát.

A klasszikus szerológiai vizsgálati panel a HBV mutánsok (pre-core/core gén; pre S/S gén mutáns) kimutatására nem alkalmazható.

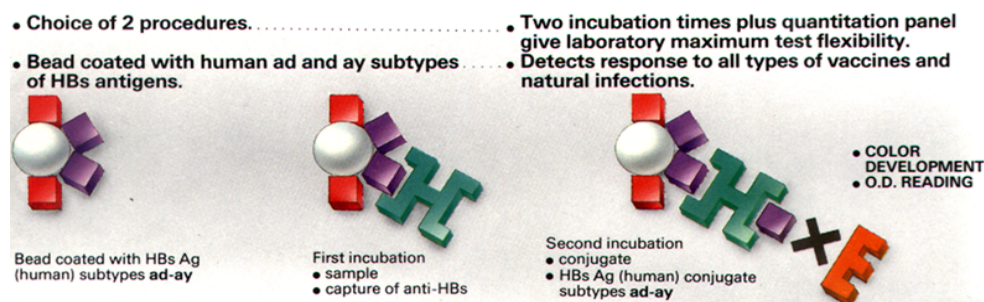
**HBsAg:** Virális protein, mely a virionban és a vérben is megtalálható. Az akut HBV infekció első megjelenő markere, mely a fertőzés 6. hetétől 3 hónapig mutatható ki. Az akut hepatitisek 95%-ában jelen van. 6 hónapon túli perzisztálása krónikus HBV infekció kialakulását jelenti. A HBsAg szerokonverziója - mely alatt az antigén eltűnését és az anti-HBs ellenanyag megjelenését értjük – a B vírus szaporodás megszűnésének és a betegség gyógyulásának a jele. Az aktív védőoltáshoz kifejlesztett vakcina rekombináns HBsAg-t tartalmaz, melynek hatására a szervezetben anti-HBs termelődés indul meg.

*A kimutatás módszerének elve:* Microparticle enzimimmunoassay (MEIA)

*EIA:* A szilárd fázisú enzimimmunoassay antigének vagy ellenanyagok kimutatására alkalmas módszer. Antigén vizsgálat esetén a specifikus ellenanyagot, ellenanyag vizsgálat esetén a specifikus antigént szilárd fázishoz kötik (pl. polisztirol golyó). A megfelelő partner molekulát a rendszerbe adva antigén-antitest kötődés jön létre, mely egy specifikus enzimmel jelzett ellenanyaggal kimutatható. A jelzéshez olyan enzimek alkalmasak, melyeknek stabil szerkezetű és szintelen a szubsztrátja. Ez az enzimhatás után színes terméké alakul. Leggyakrabban tormaperoxidázt és alkalikus foszfatázt használnak. A vizsgált savóban lévő antigén illetve ellenanyag mennyiséggel arányosan keletkezett színes végterméket fotometriás módszerrel mérjük.

*A MEIA az EIA-hoz képest a reakciófelület többszörösét biztosítja az antigén-antitest reakció számára. Ezzel megnő a vizsgálat érzékenysége és sebessége. 0.5 mikron átmérőjű részecskék felületére van kötve a mérendő antigénre specifikus antitest. A rendszerhez adott konjugát eredményeként egy „szendvics”-reakció jön létre. A*

szubsztrátból keletkező fluoreszcens termék mennyisége arányos a szérumban lévő antigénnel.



18. ábra: anti-HBs enzimmunoassay meghatározása (AUSAB® EIA)

*Műszer:* IMx: 0.5 mikron átmérőjű latex gyöngyökön fixált anyagokkal történik a meghatározás. Fluoreszkáló végterméket mér.

*Teszt:* HBsAg (V2) (ABBOTT)

**anti-HBs:** A HBsAg eltűnése után jelenik meg a szérumban, jó prognosztikai jel a gyógyulásra. Krónikus infekcióban nem mérhető.

*Teszt:* AUSAB (ABBOTT) (ad+ay szubtypusú HBV antigént tartalmaz). (18. ábra)

*Módszer:* MEIA.

*Műszer:* IMx.

**anti-HBc (IgM és total):** IgM típusa friss fertőzést jelez, akut hepatitisben a surface antigén után ez az első megjelenő ellenanyag. Alacsony titere múltó fertőzésre, perzisztálása pedig krónikus hepatitisre jellemző.

IgG (totál) ellenanyag a hepatitis gyógyulása után is évekig fennmarad. A legjobb epidemiológiai marker.

*Teszt:* CORE™-M és CORE™ (ABBOTT).

*Módszer:* MEIA.

*Műszer:* IMx.

**HBeAg/anti-HBe:** A HBeAg a perifériás vérben szabadon keringő antigén. Kimutathatósága akut és krónikus hepatitisben is infektivitást és vírus replikációt jelent. HBsAg hordozókban a HBeAg negativitás jó prognosztikai jel. Ez alól kivétel, ha pre-core mutánsa van a betegnek. HBeAg szerokonverzióban az anti-HBe jelenik meg, ez a betegség gyógyulását jelenti. Az interferon terápia eredményességének követésére éveken keresztül a HBeAg mérését használtuk.

Férezetők a szérumban marker eredmények, ha precore/core mutáns van jelen. Ilyenkor típusos hepatitis klinikai képe mellett a betegek HBeAg negatívak. Ez a variáns

leggyakrabban a „D” szubtypusban fordul elő, főleg a mediterrán vidékeken. Ezekben a betegekben A biztos diagnózist a szérumban HBV DNS kimutatás adja.

*Teszt:* HBe 2 és anti-HBe 2 (ABBOTT).

*Módszer:* MEIA.

*Műszer:* IMx.

**HBV-DNS:** A májban zajló HBV replikáció direkt markere a szérumban cirkuláló virális DNS. Kvantitatív mérésével monitorozzuk az akut és a krónikus fertőzés progresszióját és az antivirális terápia hatékonyságát. Az alacsony bazális HBV-DNS szint a gyógyulás pozitív prediktív jelzője. Kimutatására 2 módszert használunk: hibridizációt és polimeráz láncreakciót.

*Hibridizációs módszer:* az eljárás alapja jel-amplifikáció, hibridizáció és kemilumineszcenciás detektálás. Az eredményt pg/ml vagy genomszámban kapjuk meg. Érzékenysége A, B, C és D szubtypusokra azonos. A méréstartomány  $2 \times 10^5$ - $1 \times 10^9$  copies/ml között lineáris. A méréstartomány alsó határa 0.5 pg vagy  $1.4 \times 10^5$  copies/ml. Az irodalom a közelmúltig az ezzel a módszerrel negatív eredményű beteget gyógyulniak véleményezett.

*Műszer:* luminométer.

*Teszt:* Hybrid Capture<sup>®</sup> II HBV DNA Test (Digene-ABBOTT)

*PCR-módszer (mennyiségi):* Ezzel a módszerrel a HBV vírus DNS mennyiségének meghatározását végezzük HBV kvantitatív standard segítségével. A HBV kvantitatív standard egy klónozott plazmid, mely a vizsgált B vírus célszakasszal megegyező primer kötő helyet tartalmaz és egy olyan egyedi próba kötő helyet, mely segítségével a beteg mintától megkülönböztethető. Ezt a kvantitatív standardot, melynek ismert a kópia száma, minden mintához hozzákeverjük és így a beteg vizsgálandó mintájával együtt a PCR összes lépésén áthalad. A meghatározás végén az ismert standard szignáljához hasonlítva számoljuk ki a mintában lévő HBV-DNS mennyiségét. A célszakasz kiválasztásánál a HBV genom azon szakaszait választjuk ki, melyek a legnagyobb szekvencia stabilitást mutatják az összes genotípusra vonatkoztatva. Jelen esetünkben, a COBAS AMPLICOR HBV MONITOR (ROCHE) teszténél egy 104 nukleotidból álló szekvenciát határozunk meg a legstabilabb pre-core/core régióban. A műszer a COBAS AMPLICOR analízátor. A teszt érzékenysége  $2 \times 10^2$  copies/ml- $2 \times 10^5$  copies/ml között lineáris. Ennél magasabb kópia számnál hígítjuk a mintát.

A közelmúltig a B hepatitis aktivitásáról akkor beszéltünk, ha a hibridizációs módszerű HBV-DNS kimutatás pozitív eredményt adott. A PCR technika bevezetésével kiderült, hogy igen gyakran a gyógyultnak véleményezett betegekben - negatív HBeAg, pozitív anti-HBe és tartósan normál ALT érték mellett is - a HBV-DNS PCR vizsgálattal kimutatható volt. Az elmúlt évben több tanulmány jelent meg arról, hogy mekkora legyen az a nukleinsav szint, amelyet határértékűnek tekinthetünk a krónikus aktív hepatitis és az inaktív vírushordozás között. Napjainkban a HB vírus DNS-nek az a küszöbértéke, mely együttjár progresszív májbetegséggel, még nem eldöntött. Nem könnyű ennek a meghatározása, mert több virális (precore/core mutánsok, genotípus, fluktuáló vírus-DNS szint), gazdai (immunválasz) és exogén (alkoholfogyasztás) tényező befolyásolja ennek megítélését. Színezi a képet még, hogy a HBV elsősorban nem cytopatogén, hanem dominánsan immunmediált folyamattal károsítja a hepatocytákat és az extrahepaticus szerveket. Úgy tűnik, hogy az alacsony HBV DNS szint nem feltétlenül pathogén és talán akkor nincs is szükség antivirális kezelésre. A közeljövő feladata annak egyértelmű eldöntése, hogy mikor tekintünk betegeinket gyógyultnak és milyen vírustiter mellett kezdjük őket kezelni. A legújabban ajánlott érték a  $3 \times 10^4$  copies/ml (46).

Laboratóriumunkban évekig a hibridizációs technikájú HBV DNS kimutatást használtuk. Kb. 1 éve vezettük be a PCR módszerű meghatározást. A két vizsgálati metodika paralell használata teljes bizonytalanságot eredményezett, ezért ma már csak a COBAS AMLICOR HBV teszttel kvantitatív mérést végzünk. A beteg biokémiai adatait és a kórlefolyást ismerve a terápia szempontjából a kezelő orvosnak kell értékelni a HBV nukleinsav eredményt.

### **3.1.2. Krónikus Delta vírushepatitisben végzett szerológiai vizsgálatok**

A Delta infekció mindig a B hepatitisrel együtt található, ezért minden krónikus B hepatitises betegnél a Delta szűrő markereket is vizsgálni kell. (Fordítva viszont előfordulhat, hogy aktív Delta hepatitis esetén a HBV replikáció elnyomása miatt hiányozik a HBsAg.)

A Delta hepatitis szerológiai markerei az alábbiak: HDAg, anti-HD IgM, anti-HD. HDV-RNS-t PCR technikával lehet kimutatni. A magyarországi igen alacsony Delta hepatitis előfordulás miatt laboratóriumunkban D vírus nukleinsav vizsgálatot PCR technikával nem végzünk.



**Anti-Delta totál:** Ez az ellenanyag a fertőzést követően 10-12 hét múlva jelenik meg a szérumban. Az akut infekció gyógyulása után néhány hónapig még kimutatható, de a vírus elimináció után maximum 2 évvel eltűnik a vérből.

Vizsgálatát javasoljuk: HBsAg pozitív betegnél, súlyos lezajlású B hepatitisben és B vírus fertőzés szempontjából magas rizikójú egyéneknél, pl. i.v. droghasználóknál, hemodializáltaknál, mediterrán vagy más endémiás területről érkező betegnél.

*Módszer:* kompetitív enzimimmunoassay.

*Teszt:* ABBOTT anti-Delta EIA.

*Műszer:* Quantum II.

**Anti-Delta IgM:** Ez az ellenanyag differenciálni tud a Delta hepatitis koinfekció és a szuperinfekció között. Perzisztálása a betegség kimenetelével van összefüggésben. Tartós fennmaradása krónikus hepatitis stádiumába történő átmenetet jelent. Szintje és jelenléte a Delta vírus szaporodásával és a gyulladás aktivitásával van összefüggésben. Az akut HBV/HDV koinfekcióban ez az ellenanyag a klinikai tünetek megjelenése előtt néhány naptól néhány hétig mutatható ki.

*Jelentősége:* Differenciál az aktív, a gyógyuló és a krónikus infekciók között. Rövidebb ideig és alacsonyabb titerrel van jelen a koinfekcióban és magas és elhúzódó az IgM szint szuperinfekció esetén.

*Módszer:* plate-enzimimmunoassay.

*Teszt:* ETI-DELTA-IGMK-2.(DiaSorin)

**HDAg:** A májban és a szérumban mutatható ki. Az IgG és IgM típusú ellenanyagok termelődését indukálja. A fertőzés első megjelenő markere, rövid életű, 2-11 hétig mutatható ki a vérből. Pozitivitása aktív Delta infekciót igazol. Negatívvá válásakor megjelenik az anti-HD. Perzisztálása a májbetegség progresszióját és krónikussá válását jelzi.

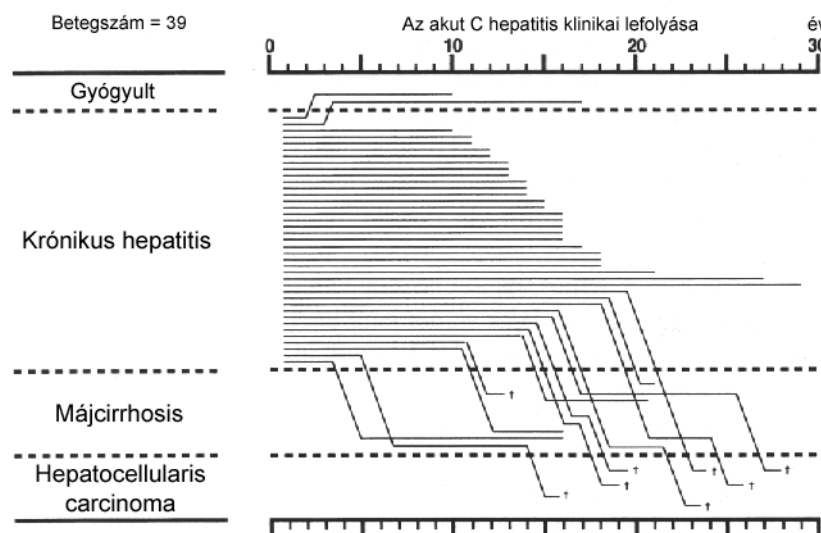
*Módszer:* plate-enzimimmuno assay.

*Teszt:* ETI-DELTAK-2 (DiaSorin)

### 3.1.3. Krónikus C vírushepatitis diagnosztikai protokollja

#### 1. Klinikai tünetek

Az akut C vírushepatitis inkubációs ideje 6-12 hét, mely rövidebb is lehet, pl. fertőzött vérkészítmény vagy transfúzió adáskor. Bevezető tünetként gyengeség, fáradékonyság, myalgia, hányinger, hasi diszkomfort jelentkezhethet. A klinikailag enyhe lefolyású, tünete szegény megbetegedés gyakran nem is kerül felismerésre. A súlyos probléma kórlefordulásában van, mivel a betegek kb. 20%-a gyógyul csak meg spontán, 80%-a vírus pozitív marad. Ha a máj gyulladásos megbetegedése 6 hónap után is fenn áll, a betegség krónikussá vált. Ennek prevalenciája hazánkban 0,5–1,5% közötti (67). Évtizedek alatt a betegség lassú, de folyamatos progressziója májcirrhosishoz vezet, melynek talaján gócos májelváltozás és/vagy hepatocelluláris carcinoma alakulhat ki. (19. ábra) Néha a keringő immunkomplexek okozta többszervi extrahepatikus manifesztációk utalnak a fertőzésre, úgymint: vasculitis, cryoglobulinaemia, porphyria cutanea tarda, membranoproliferatív glomerulonephritis, Sjögren- syndroma, lichen ruber planus.



19. ábra: Az akut C hepatitis klinikai lefolyása

(Kiyosawa, Tanaka, Sodeyama, 1998)

## *2. Biokémiai és hematológiai vizsgálatok*

Legfontosabb a szérum alanin-aminotranszferáz (ALT/SGPT) szintjének mérése. Emelkedett értéke a betegség aktivitását jelzi, azonban nem követi párhuzamosan annak stádiumát. Vírus pozitív betegben a máj jelentős szöveti átalakulását mutató hisztológiai eredmény ellenére is lehet normális ALT szint, de ennek a fordítottja is érvényes. Saját betegeink vizsgálatával hasonló eredményt kaptunk (Z Gastroenterol 1999;37:418). Mégis ez a legegyszerűbben monitorozható és legérzékenyebb biokémiai marker, melynek emelkedettségéhez kötjük az interferon terápia bevezetését is. Követett paraméterek még az aszpartát-aminotranszferáz (AST/SGOT), alkalikus foszfatáz (ALP), gamma-glutamil-transzpeptidáz (GGT), laktát-dehidrogenáz (LDH), bilirubin, albumin, vas, vércukor. Monitorozandó hematológiai jelzők: protrombin szint, kvalitatív és kvantitatív vérkép, thrombocytá szám. Ezek kóros értékei cirrhosis jelenlétére utalnak, és a gyógyszeres terápia dózisát is meghatározzák.

## *3. Morfológiai vizsgálatok*

A kivizsgálás része a hasi ultrahang, ha gócos elváltozás gyanúja merül fel, akkor hasi CT és/vagyMRI vizsgálat. Obstrukciós enzimemelkedés illetve cholestasis laboratóriumi jeleinél endoszkópos retrográd cholecystographia mérlegelendő. Különösen érvényes ez májbiopszia előtt, mert tárgult intrahepatikus epeutak esetében végzett biopsziánál halálos szövődménnyel járó epecsorgás, epeperitonitis alakulhat ki.

## *3. Szerológiai vizsgálatok*

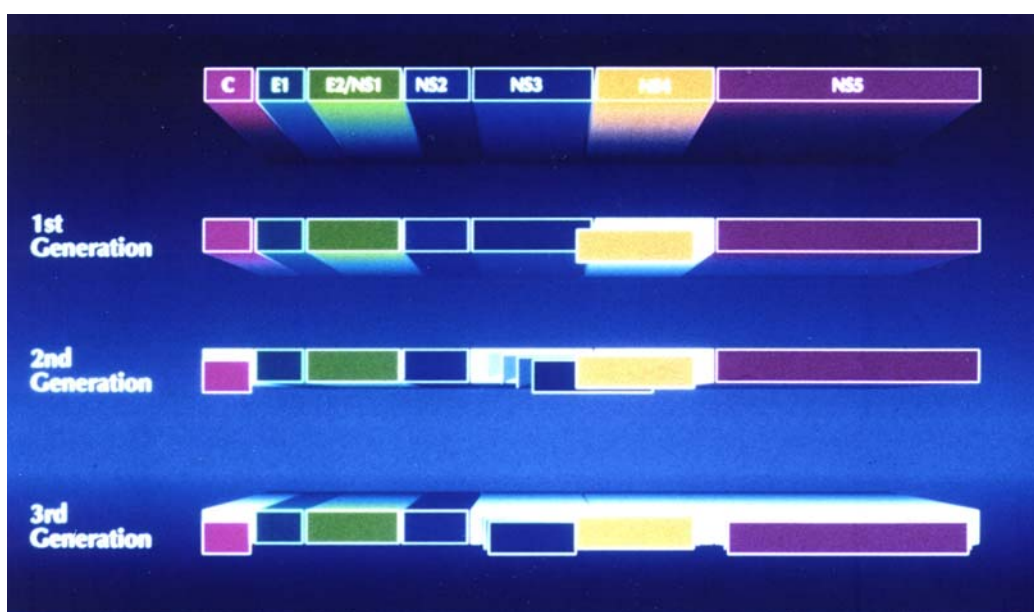
Infekció esetén a HCV ellen antitestek képződnek, ezt azonban nem követi a vírus eliminációja. Az ellenanyag pozitívítás a fertőzés jelenlétére hívja fel a figyelmet és nem a beteg gyógyulását jelenti. Ezeket a vizsgálatokat szűrésre és a terápiára való reagálás követésére használjuk. Mérésük enzimimmunoassay (EIA) módszerrel történik. A tesztekben mikrocsovek vagy gyöngyök felületéhez rekombináns vagy szintetikus vírusantigéneket kötnek, melyekkel a beteg szérumában lévő IgG vagy IgM típusú ellenanyagok reagálnak. A szérumban keringő ellenanyagból hibridizációs technikával a vírus típusát is meg tudjuk határozni.

**Anti-HCV (totál):** A dominálón IgG típusú ellenanyag a vírussal történő fertőzéskor, az immunválasz részeként jelenik meg. Ez a szűrővizsgálatok fő szerológiai markere. Mivel gyógyulás után is évekig perzisztál, pozitivitása csupán a vírussal való találkozást, de nem a betegség aktivitását bizonyítja. (20. 21. ábra)

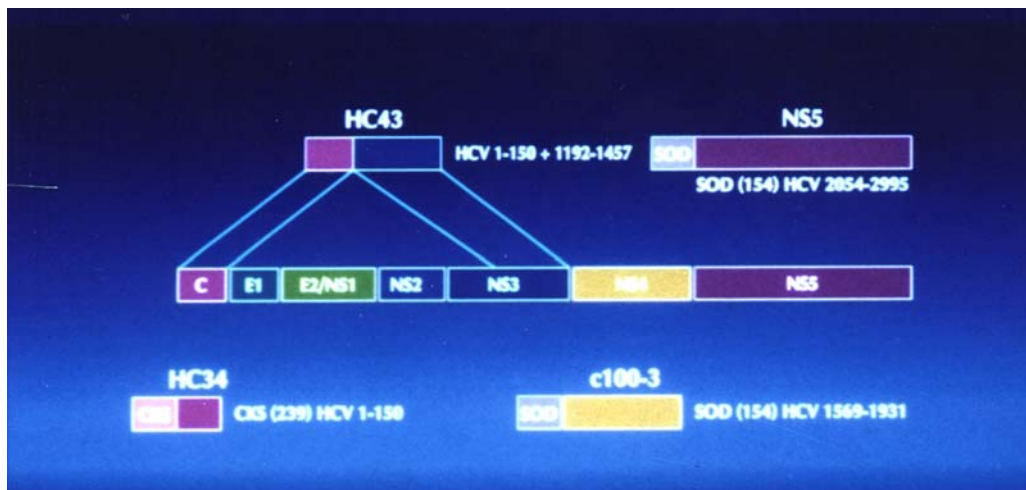
*I. generációs anti-HCV teszt:* 1988-ben, a vírus identifikálásakor fejlesztették ki. Ezzel igazolták, hogy az addig non-A, non-B hepatitisnek nevezett kórkép 80%-a C vírus eredetű. A teszt a HCV NS4 régiója által kódolt proteinnek megfelelő c100-3 rekombináns antigént használta az ellenanyag detektálására. Mivel ez a fertőzést követően csak 6 hónappal válik pozitívvá, így a teszt a lappangási periódusban hosszú ideig téves negativitást mutatott és az alacsony specificitása miatti keresztreakciók következtében sokszor adott hamis pozitív eredmény. Ma már ennek a tesztnek a továbbfejlesztett típusait használjuk.

*II. generációs anti-HCV teszt:* 1991-ben került forgalomba. A HCV „structuralis”, core proteinjét (C22-3), a „nonstructuralis” NS3 (C33c) és NS4 (C100-3) régiót használják antigénként a méréshez. Ezzel a teszttel korábban kimutatható az akut fertőzés.

*III. generációs anti-HCV teszt:* Ez a teszt tartalmazza az NS5 régió által kódolt protein rekombináns antigénjét is. 1992-ben az Abbott, Ortho és Sanofi Pasteur cégek hozták forgalomba. A szenzitivitása nem nőtt jelentősen a II. generációs assay-hez képest, de az NS3 antigén reaktivitásának emelésével tovább rövidült a szerokonverzió detektálhatóságának az ideje, és csökkent a fals pozitív eredmények száma. Európában elterjedten használják. Laboratóriumunkban az Abbott HCV EIA 3<sup>rd</sup> kittel dolgozunk.



20. ábra: HCV ellenanyag tesztek antigén összetevői



21. ábra: III. generációs anti-HCV teszt antigén alkotói

*Konfirmációs tesztek:* Mindhárom generációjú ellenanyag vizsgálat eredményének a megerősítésére immunoblot alapú konfirmációs tesztek fejlesztettek ki. Hátrányuk, hogy ezek is ellenanyagszámításra alapulnak, így nem adnak információt a vírus jelenlétéről vagy hiányáról, másrészt nem költségkímélők, mert összköltségük megegyezik a C vírus antigént kimutató (később ismerttetendő) nukleinsav tesztek árával. A legújabb állásfoglalás szerint a fertőzés aktivitásának megállapításához nem ezeket a kiegészítő vizsgálatokat, hanem a PCR technikájú vírus antigén kimutatást kell elvégezni.

*IV. generációs anti-HCV teszt:* Klinikailag meggyőző, de hagyományos ellenanyag tesztekkel negatív eredményt adó betegeknél, speciális eseteiben használjuk. Részletesen ld. Kutatási eredmények 4.3. fejezetben.

**Anti-HCV IgM:** Ez az ellenanyag az akut hepatitisz 50%–93%-ában, krónikus stádiumban 50%–70%-ban mutatható ki. Jelenléte nem friss infekciót jelez, hanem a hepatitisz aktivitásával és súlyosságával van összefüggésben. Negatív terápiás prediktív értékét vizsgálatainkkal is igazoltuk. Részletesen ld. Kutatási eredmények 4.2. fejezetben.

**HCV szerotípus meghatározás:** A C vírus nagy variabilitása miatt nukleotid szekvenciájában jelentős különbségek találhatók. 11 típusát és több, mint 90 szubtypusát lehet elkülöníteni. Klinikai szempontból az 1-6 típus fontos. Laboratóriumunkban 1996-tól végezzük a HCV szerotípus meghatározását. Eredményeinkkel a magyar beteganyag 83%-os 1-es típusú fertőzöttségét igazoltuk. Részletesen ld. Kutatási eredmények 4.4. fejezetben.

**Interferon ellenanyagok kimutatása:** Az elmúlt években több tanulmányban leírták, hogy interferon-ellenes antitesteket lehet kimutatni egészségesekben, vírusfertőzött betegekben, autoimmun kórképű, illetve csontvelő-transzplantáción átesett egyéneknél. Ez az eredmény meglepő, mivel az IFN-t úgy tartjuk számon, mint a test saját molekuláját. Később beszámoltak arról, hogy a terápiás célból alkalmazott alfa-interferonok ellen mérték antitesteket. Ilyen interferon-ellenes antitestek kialakulása gyakran szövődik terápiás rezisztenciával.

Két típusuk van:

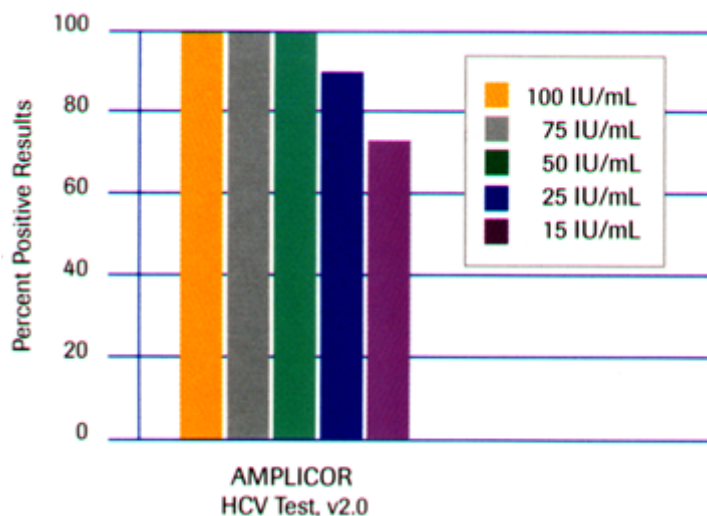
- a. IgG típusú kötő ellenanyag
- b. neutralizáló, IgM típusú antitest

A kezelés hatástalanságát az antitestek mennyisége, megjelenésük ideje és típusuk befolyásolhatja, azonban a kötő ellenanyagok títere nem mutat szignifikáns különbséget a virológiailag nem reagáló és a tartósan gyógyult betegek között. Magyarországon *Béldi és munkatársai* Szegeden végeztek ilyen irányú vizsgálatokat. Ma már a C vírus molekuláris biológiai tulajdonságainak elemzése olyan speciális részleteket tárt fel, melyek ismeretében az interferonellenanyag-vizsgálatok a rutin diagnosztikában jelentőségüket veszítették.

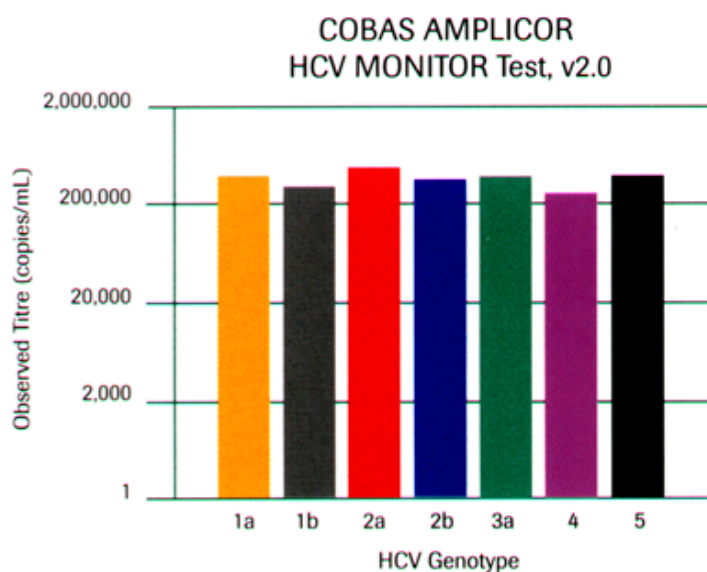
##### *5. Molekuláris biológiai vizsgálatok*

**A HCV-RNS kvalitatív és kvantitatív meghatározása:** Az aktív C vírushepatitis diagnosztikájának kulcsfontosságú vizsgálata a vírusnukleinsav közvetlen kimutatása. Hosszú éveken keresztül a fő problémát az RNS-vírusnak a hagyományos laboratóriumi módszerekkel kimutathatatlan igen kis mennyisége okozta. A megoldást az utóbbi évtizedek legjelentősebb molekuláris biológiai módszerének, a polimeráz láncreakciónak, „polymerase chain reaction”-nek (PCR) a kidolgozása adta. Az első hepatitis diagnosztikai tesztet a Roche cég fejlesztette ki AMPLICOR® HCV néven. Laboratóriumunkban 1994-ben vezettük be az 1. majd a 2. generációs kvalitatív és az AMPLICOR HCV MONITOR™ kvantitatív metodikákat, melyekhez a Perkin Elmer típusú thermocyclert és egy „plate-enzimimmunoassay” detekciós módszert használtunk. Jelenleg a COBAS AMPLICOR™ HCV 2. (ROCHE) automatizált rendszerű minőségi és mennyiségi teszttel dolgozunk. A minőségi vizsgálatnál pozitív vagy negatív értéket adunk meg. Mennyiségi mérésnél a régebbi manuális vizsgálatnál copy/ml-ben vagy genomEquivalens/ml-ben, újabban a WHO ajánlására nemzetközileg egységesen, IU/ml-ben számítjuk a vírustömeget. A két metodika eredménye pontosan

csak a tesztek gyári számának ismeretében konvertálható, de a mértékegységek közötti átszámítás megkönnyítésére a 2,5-szörös szorzó ajánlott.



22. ábra: AMPLICOR HCV Test v 2.0 szenzitivitása



23. ábra: COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 érzékenysége a különböző HCV szubtypusok esetében

Pl.: 800 000 IU/ml=kb. 2 000 000 copy/ml.

A kvalitatív tesztek érzékenységének alsó határa 50 IU/ml, a kvantitatív monitor teszteknel ez az érték 600 IU/ml. Szenzitivitásuk a különböző C vírus szubtypusokra azonos. (22. 23. ábra) Méréstartományuk 600 IU/ml és 850 000 IU/ml között lineáris, nagyobb vírustiternél hígított szérumból ismételjük meg a mérést.

A cDNS alapú PCR-amplifikációs módszer a C vírushepatitis diagnosztikájának nemzetközileg elfogadott „gold standard” vizsgálata. A klinikumban ennek pozitivitása

alapján mondhatjuk ki (a.) a betegség aktivitását, (b.) indikáljuk az interferonterápiát, (c.) a terápia előtti ún. bazális vírustömeg nagyságától és a szubtypustól függően döntünk a gyógyszer dózisaról és a kezelés időtartamáról, (d.) az induló vírustiter értéke és a víruskinetika monitorozása pedig a terápia sikerének előjelzője. Az 50 IU/ml érzékenysége alapján az ezzel a módszerrel kapott negatív eredménynél szabad csak kimondani a beteg vírusmentességét. Kiemelkedő szenzitivitása és specificitása alapján minden új nukleinsav-detekciós módszer összehasonlítási alapját képezi.

Hazánkban elterjedten használják a Chiron cég Quantiplex HCV, jel-amplifikáción alapuló bRNS módszerét. Itt nem a vizsgálandó nukleinsav, hanem a hozzá hibridizált komplex kemilumineszcenciás méréséből következtetnek a vírustiterre. Hátránya, hogy érzékenysége lényegesen gyengébb a cél-DNS amplifikációján alapuló PCR-módszerénél. Alsó méréshatára 200.000 genomEquivalens/ml, az ennél kisebb vírustitert negatívként jelzi. Gyakran a két metodika szenzitivitása közötti különbséget figyelmen kívül hagyva a Quantiplex HCV bRNS-mérés eredményét PCR-leletként értékelik, ezáltal az interferon kezelés valódi hatékonyságának megítélése hibás lesz. Hasonló okból a kis vírustiterű beteg szűrő vizsgálatkor tévesen vírusmentes eredményt kap és ezzel eleve kizárják a kezelendők és a nagy valószínűséggel gyógyulók közül (az alacsony vírustiter a terápiás válasz pozitív prediktív jele!).

Utóbbi időben sajnos nálunk is elterjedtek az ún. „home-brew” PCR-vizsgálatok, melyek veszélye, hogy „házi” laboratóriumokban előállított, gyárilag nem ellenőrzött, nem „validált”, csak bizonyos szubtypusra érzékeny primereket használnak, így specificitásuk alacsony. Ezek a tesztek kutatási célra kiválóak, de diagnosztikai célra nem alkalmasak.

A közelmúltban jelent meg két új teszt: a Bayer cég *transzkripció-mediált nukleinsav-amplifikációs módszere (TMA)*, mely mágneses vírusszeparálást és luminometriás detektálást alkalmaz, és az Abbott cég LCx kittje, mely ligáz láncreakción alapul. Érzékenységüket az Amplicor RT-PCR módszerhez hasonlónak írják le, saját tapasztalatunk nincs velük.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy mind az előszűrésben, mind a terápia alatt és az utánkövetésben a fals eredmények elkerülésére a legérzékenyebb és nemzetközileg standardizált diagnosztikai módszereket kell alkalmazni.



**A HCV szubtípus (genotípus) meghatározás:**1999-ben kezdtük meg a C vírus antigén elemzésén alapuló genotípus meghatározását, mellyel a típusokon belül a szubtípusokat is analizáljuk. Vizsgálatainkat a beteg terápia előtti szérumból vagy plazmájából az AMPLICOR® HCV 2.0 (ROCHE) reverz polimeráz lánc-reakció és az INNO-LiPA HCV II. (INNOGENETICS) hibridizációs módszer kombinációjával végezzük. Analízisünk a magyarországi betegek 91,5%-os 1b fertőzöttségét igazolta. Részletesen ld. Kutatási eredmények 4.5. fejezetben.

### *5. Hisztológiai vizsgálatok*

A májsérülés fokának és a hepatitis etiológiájának pontosítása szövettani vizsgálattal lehetséges. Saját gyakorlatunkban a beteg hemosztázisának ellenőrzése után - kóros paraméterek esetén thrombelasztogram készül - UH vezérléssel ún. „free-hand” technikával, 17–18 G vastagságú tűvel törénnek a percutan májbiopsziák. E módszerrel a szövődmények előfordulása minimalizálható.

A terápia indikálásához és a gyógyszerek engedélyezéséhez a szövettani lelet közlése kötelező. Kivétel ez alól, ha súlyos koagulációs betegség vagy tág intrahepaticus epeúti elváltozás áll fenn.

A korábban alkalmazott krónikus aktív, perzisztáló hepatitis elnevezés ma már túlhaladott. A patológus a szövettani eredményt a Knodell-féle módosított hisztológiai aktivitási index (HAI) alapján numerikusan adja meg (85). Alapelv az etiológia, az „inflammatoricus grade” és a „fibrosis score” megállapítása. A „necroinflammatoricus grade” (periportális, periszeptális nekroinflammáció, konfluáló vagy fokális nekrosis, portális inflammáció) maximális pontszáma 18, a „fibrosis score” 6 lehet. (2. táblázat) Döntő fontosságú a fibrosis foka. Már enyhe aktivitású krónikus hepatitis esetén is előfordulhat kiterjedt kötőszöveti átépülés, ekkor az interferon terápia bevezetése indokolt. A hisztológiai lelet a krónikus hepatitis kimeneteléhez használható prediktív markerek egyik alapköve. A magyar beteganyagot *Schaff, Jármay és Sipos* összefoglalói alapján ismerjük.

<b>MÓDOSÍTOTT HAI GRADING: necroinflammatoricus pontrendszer</b> (Ishak és munkatársai, 1995)	
A. Periportal or periseptal interface hepatitis piecemeal necrosis) Absent → Severe	0 → 4
B. Confluent necrosis Absent → Panacinar or multicentric necrosis	0 → 6
C. Focal (spotty lytic necrosis, apoptosis and focal inflammation) Absent → More than ten foci per 10x objective	0 → 4
D. Portal inflammation None → Marked, all portal areas	0 → 4
<b>Maximum possible score</b>	<b>18</b>

<b>MÓDOSÍTOTT STAGING: fibrosis, cirrhosis</b> (Ishak és munkatársai, 1995.)	
No fibrosis → Cirrhosis, probable or definite	0 → 6
<b>Maximum possible score</b>	<b>6</b>

*2. táblázat*

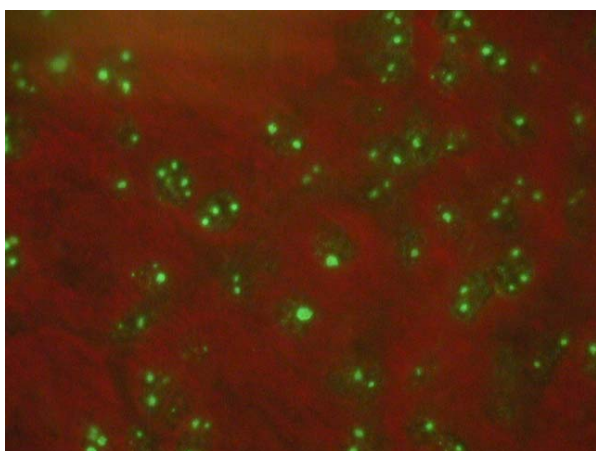
Májbiopsia módosított HAI grading és staging értékelése

(Ishak és munkatársai, 1995)

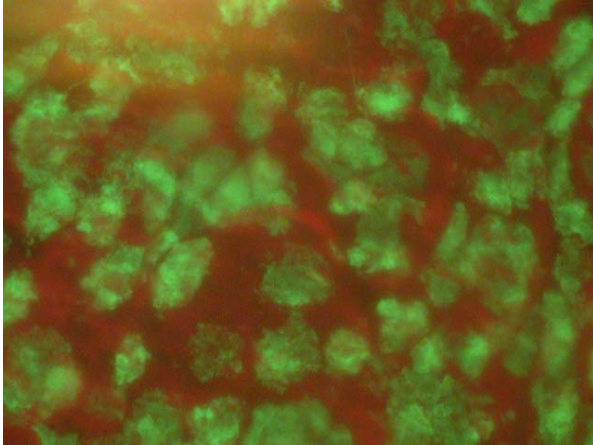
## 6. Immunológiai vizsgálatok

Krónikus C hepatitisben immunológiai vizsgálatokat diagnosztikus vagy kutatási célból végzünk. A HCV-fertőzés humorális és celluláris immunreakciót is kivált, ennek ellenére kb. 80%-ban nem következik be víruselimináció. Ennek gazdai és virális okai vannak, melyeket nem ismerünk pontosan és ezek ma is a kutatások középpontjában állnak. Az elégtelen immunválasz kialakulásában döntő szerepet játszhat a vírus hipervariabilitása, „quasispeciesek” kialakulása. Hazánkban évek óta *Pár és munkatársai* foglalkoznak mélyrehatóan a krónikus C hepatitis immunológiai vonatkozásaival.

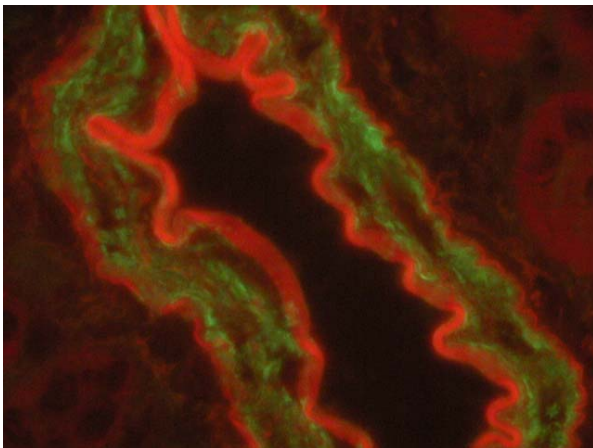
A mindennapok klinikumában diagnosztikus célból immunológiai vizsgálatokat hepatitis és autoimmun kórkép együttes fennállásának gyanújakor kell végezni. A C vírus okozta hepatitisben igen erős autoimmunitás lehet jelen. Mivel a hepatitisben adott interferon kezelés valódi autoimmun betegségben életveszélyes klinikai állapotot okoz, a két kórformát el kell különíteni. Laboratóriumunkban immunhisztokémiai módszerrel és ELISA technikával végzünk vizsgálatokat. (24.25.26. ábra) Antinukleáris ellenanyag jelzett, határértékű pozitívítását betegeink 40%-ában találtunk. *Javasolt vizsgálatok:* antinukleáris ellenanyag (ANA), antimitochondriális ellenanyag (AMA), simaizom-ellenes ellenanyag (ASMA), immun-globulinok (IgG, IgA, IgM), komplement faktorok (C3, C4), béta-2-mikroglobulin, CD4-, CD8-pozitív T-sejtek, NK-sejt-aktivitás, máj-vese mikroszomális ellenanyag (anti-LKM1), rheumatoid faktor (RF), thyreoidea-peroxidáz elleni antitest (anti-TPO), májspecifikus protein ellenanyag (anti LSP).



24. ábra: Antinukleáris ellenanyag  
(Immunfluoreszcens módszer)



25. ábra: Antinukleáris ellenanyag  
(Immunfluoreszcens módszer)



26. ábra: Simaizomellenes ellenanyag  
(Immunfluoreszcens módszer)

### 7. Differenciáldiagnosztika

Vírushepatitis mellett más etiológiájú hepatitisszel való együttes előfordulása vagy malignus kórkép megjelenése is lehetséges. A differenciáláshoz morfológiai, kiegészítő biokémiai, szerológiai és molekuláris biokémiai vizsgálatok használhatók. Hasi UH minden betegnél kötelezően végzendő. Primer biliaris cirrhosis, primer szklerotizáló cholangitis, cholestasis gyanújánál ERCP-, CT- és ellenanyag-vizsgálatok (AMA, pANCA) javasoltak. Autoimmun hepatitisnél ANA-, ASMA-, anti-LKM1-, HLA-típusozás, immunglobulinszint-mérés indokolt.

Veszélyeztetett metabolikus kórfarmáknál, Wilson-kór és haemochromatosis gyanújánál szérumszén- és vizelet-réz-, cöruoplazmin-, szérumszén-, ferritin-, transzferrin- és génmutáció-vizsgálatok végzendők. A diagnózis felállításakor és az utánkövetéskor – a hepatocelluláris carcinoma időben történő felismeréséhez és a transzplantáció

indikálásához – az alfa-főtoprotein szintjének monitorozása, időszakos hasi UH, indokolt esetben CT-, MR-vizsgálat szükséges. A szénhidrát- és zsírsanyagcsere pontosítása elengedhetetlen „non-alcoholic steatohepatitis” fennállásakor. IFN-terápia alatt vércukor-monitorozás kötelező. Gyakran előfordul C hepatitisszel együtt fel nem ismert autoimmun thyeroditis. Az ilyenkor adott interferon thyreotoxicus krízist okozhat, ezért a terápia megkezdésekor mindig, későbbiekben a klinikai képtől függően a TSH, FT4, sz.e. anti-TPO értékek ellenőrizendők.

### 3.2. 10 ÉV ALATT VÉGZETT LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATAINK ADATAI

Teljesítés éve	1996-ig	1997	1998	1999	2000	2001	2002.07	Összesen
HBeAg	1318	167	528	377	301	223	127	<b>3041</b>
HBeAg	1039	44	58	40	18	69	91	<b>1349</b>
anti-HBs	1013	38	22	91	18	34	9	<b>1225</b>
anti-HBc total	1193	174	461	297	185	96	53	<b>2459</b>
anti-HBc IgM	370	82	220	108	61	70	65	<b>976</b>
anti-HBe	1047	19	26	20	10	53	60	<b>1235</b>
HBV-DNA (hibridizáció)	21	35	40	54	70	160	147	<b>529</b>
HBV-DNA (PCR)						31	37	<b>68</b>
HBV lamivudine mutáns						22	15	<b>37</b>
anti-HCV II. gen.	903							<b>903</b>
anti-HCV 3.0	552	147	427	397	243	217	142	<b>2123</b>
anti-HCV IV. gen.						5	6	<b>11</b>
anti-HCV IgM	328	106	377	288	121	132	110	<b>1462</b>
HCV-PCR minőségi	855	321	241	375	423	421	439	<b>3075</b>
HCV-PCR mennyiségi	171	123	188	159	211	493	386	<b>1731</b>
HCV szerotípus	17	66	141	99	36	1		<b>360</b>
HCV genotípus-szubtípus				65	160	209	188	<b>622</b>
anti-Delta total	453	30	15	6	13	38	25	<b>580</b>
anti-Delta IgM	14	15	5	3	7	27	26	<b>97</b>
HD Ag	20	6	4		5	36	33	<b>104</b>
ANA	265	63	78	108	261	339	270	<b>1384</b>
AMA	265	63	78	108	242	233	186	<b>1175</b>
ASMA	265	63	78	108	44	79	51	<b>688</b>

## 4. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

### 4.1. KRÓNIKUS B HEPATITISES BETEGEK LAMIVUDIN KEZELÉSE ALATT MEGJELENŐ REZISZTENS MUTÁNSAINAK MEGHATÁROZÁSA.

#### Elméleti háttér

A krónikus B hepatitis terápiajának célja a HBV eliminációja a fertőzött sejtekből, a vírus replikáció tartós elnyomása (HBeAg és HBV DNS eltűnése a szérumból), a májbetegség remisszióba kerülése (ALT érték normalizálódása és a máj hisztológiai aktivitásának csökkenése) és ezzel a hepatocellularis carcinoma kialakulásának megelőzése. Az elmúlt évtized leghatékonyabb antivirális gyógyszere, az interferon mellett az utóbbi évek legeredményesebb új terápiaja az orálisan adható nukleozid analóg lamivudin. Felszívódása gyors, a vérben  $0.5^h$ - $1.5^h$  alatt éri el csúcskoncentrációját. 70%-a a vesén keresztül kötetlen formában ürül ki. Kémiaileg (-)- $\beta$ -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine, melynek foszforilált formája antivirális hatású a HBV és a humán immundeficiencia vírus (HIV) ellen. Beépül a képződő DNS szálba. Gátolja a virális DNS polimerázt ezzel a reverz transzkripciót és visszaszorítja a virális DNS szintézist. Hatására fokozódik a HBeAg szerokonverzió, javul a máj hisztológiai képe. Oralis adagolása miatt alacsony compliance-ű betegnél, minimális és enyhe mellékhatása miatt (hemolízis, hyperuricaemia) gyermekkorban és decompenzált májcirrhosisban is alkalmazható (48).

Tartós kezelés során két probléma fordul elő.

1. Az egyik az aránylag magas relapsus ráta, mely 1 és 2 éves kezelés felfüggesztése után 38% illetve 49 % (4. 49). Ennek magyarázatául szolgálhat, hogy a szer a vírus szaporodását gátolja, de a hepatocytákba beépült kórokozót nem tudja elpusztítani. Emiatt a megkezdett kezelést nem szabad abbahagyni, a szert tartósan kell alkalmazni.
2. A nagyobb gondot a gyógyszerrel szemben kialakuló rezisztencia okozza. A terápia alatt a kezelés idejével arányosan növekvő számban lamivudin rezisztens mutánsok jelennek meg. Leggyakoribb variánsok a HBV DNS polimeráz YMDD mutációi, ahol a C domenban az M552V/I metionin valinra vagy isoleucinra, a B domenban az L528M locusban a leucin metioninra változik. Ezek mellett egyre több közlemény számol be új mutánsokról is, pl. A529T, mely stop codont jelent a HBV surface génjén, és ezzel a HBsAg kiürülését gátolja (5. 50). (24.ábra)

Hazánkban 2 éve alkalmazzuk a krónikus B hepatitises betegek kezelésében a lamivudint. A mutánsok kimutatását és típusának meghatározását 1 éve kezdtük meg Laboratóriumunkban.

### **Betegek**

A Részlegünkön és az ország 6 Hepatológiai Centrumában lamivudinnal kezelt 18 krónikus B hepatitises betegnek (nő: 4; férfi:14) a kezelés 6. és/vagy 12., 18. havi mintáit vizsgáltuk. (Centrumok: Fejér Megyei Szent György Kórház, Hepato-Pancreatológia, Székesfehérvár; Szent László Kórház, III. Belgyógyászat, Budapest; Budai Irgalmasrendi Kórház, Belgyógyászat-Gasztroenterológia, Budapest; DEOEC, II. Belklinika, Debrecen; Kenézy Gyula Kórház, Infektológia, Debrecen; Petz Aladár Megyei Kórház, I. Belgyógyászat, Győr; Zala Megyei Kórház, Infektológia, Zalaegerszeg.) A betegek életkora 36-73 év között változott (átlag: 49 év). A krónikus B hepatitis diagnózisának alkalmazott kritériumai a következők voltak: minimum 6 hónapon át a szérum ALT a normál érték felső határának kétszerese; HBsAg és/vagy HBeAg pozitívitas; HBV DNS pozitívitas reverz hibridizációs módszerrel; májbiopsziával igazolt hisztológiai aktivitás (nem történt biopszia igazolt coagulopathia esetén és a beteg hozzájárulásának hiányában).

*Terápiás protokoll:* 14 beteg napi 100 mg, 4 immunuszuprimált, vesetranszplantált beteg napi 50 mg lamivudint kapott. Minden beteget követtünk a terápia előtt minimum 6 hónapig, a kezelés alatt 1 majd 2 havonta, a terápia felfüggesztése után 3, majd 6 havonta.

A betegek adatai közül az életkor, nemi megoszlás, bazális ALT, HBV-DNS szint, hisztológiai aktivitási index értékek az 3. táblázatban láthatóak.

### **Módszer**

*HBsAg és HBeAg vizsgálatot* „microparticle” enzimimmunoassay (MEIA) módszerrel (HBsAg V.2 és HBe 2; ABBOTT) végeztük.

*Bazális HBV-DNS mennyiségi meghatározása* hibridizációs módszerrel, kemilumineszcenciás detektálással (Hybrid Capture® II HBV DNA Test; Digene-ABBOTT) történt. A vizsgálat érzékenységének alsó határa:  $4 \times 10^5$  pg/ml.

*Terápia követéshez a HBV-DNS mennyiségi meghatározását* PCR módszerrel végeztük. (COBAS AMPLICOR HBV MONITOR; ROCHE). A teszt érzékenységének alsó határa  $2 \times 10^2$  copies/ml.

A máj kezelés előtti *hisztológiai eredményét* összesített Knodell-féle aktivitási index alapján határoztuk meg.

3.. táblázat: Lamivudin kezelésben részesült betegek adatai

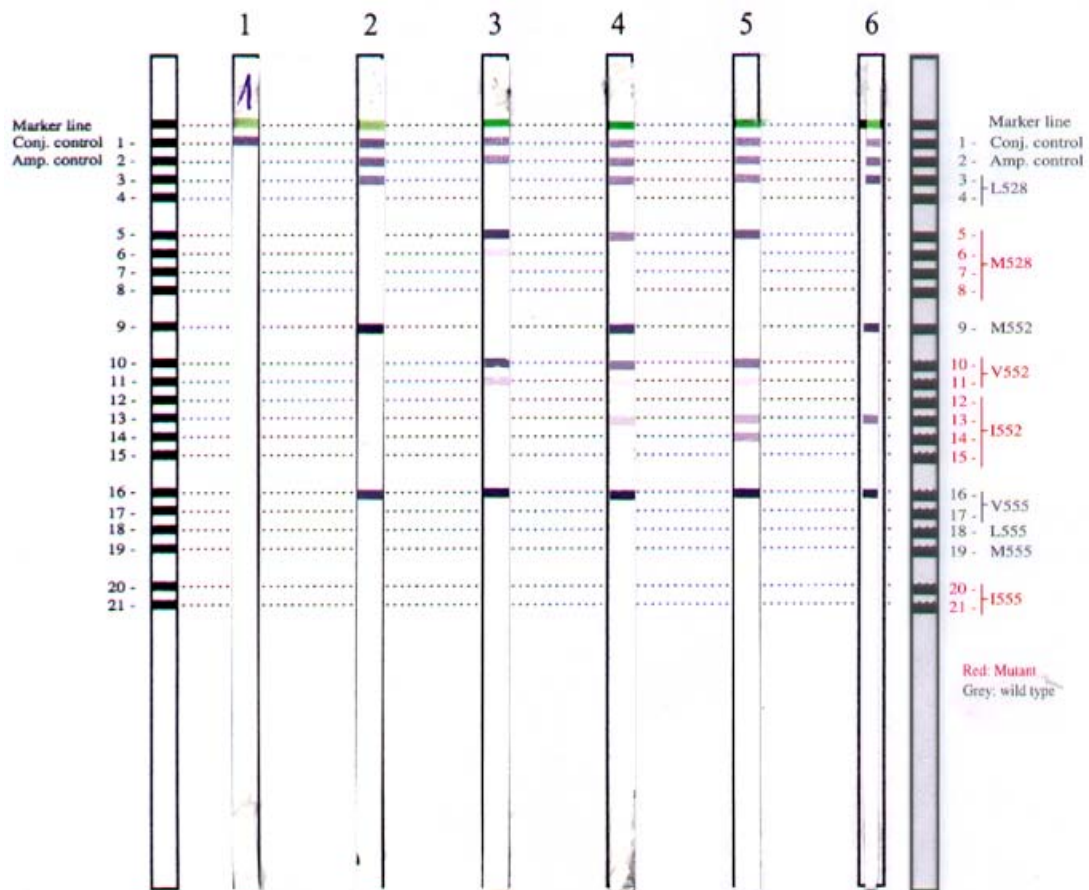
Betegek	Nem	Kor (év)	Bazális ALP (IU/ml)	Májbiopszia (Knodell index)	Lamivudine mutáns vizsgálat ideje	Mutánsok	HBV-DNA (a vizsgálat idején)	Megjegyzés
1.	ffi	60	333	cirrhosis	6. hónap	---	PCR negatív	Th. folyamatban
2.	ffi	64	80	(Syncumar th.)	6. hónap	M528, V552	PCR pozitív	
3.	nő	68	200	cirrhosis +HCC	6. hónap	M528, V552, I552	PCR pozitív	exitus, HCC
4.	ffi	51	316	12	6. hónap	---	PCR negatív	Th. folyamatban
5.	nő	57	59	4	12. hónap	M528, V552, I552	PCR pozitív	
6.	ffi	39	92	2	12. hónap	M528, V552	hybr. teszt: negatív	
7.	ffi	49	129	---	12. hónap	---	PCR pozitív	
8.	ffi	40	340	12	12. hónap	---	PCR pozitív	
9.	ffi	73	258	14	12. hónap	I552	PCR pozitív	normál ALT
10.	ffi	47	97	8	12. hónap	M528, V552	PCR pozitív	normál ALT
11.	ffi	46	146	12	12. hónap	V552, I552	PCR pozitív	
12.	ffi	36	131	aktív hepatitis	12. hónap	---	PCR pozitív	
13.	ffi	38	149	7	18. hónap	---	PCR pozitív	
14.	nő	53	170	8	18. hónap	M528, V552	PCR negatív	Th. folyamatban
15.	nő	40	108	5	18. hónap	x M528, V552	PCR pozitív	vesetranszplantált
16.	ffi	38	273	---	18. hónap	x I555	PCR pozitív	vesetranszplantált, exitus, coma hep.
17.	ffi	46	76	---	18. hónap	x ---	PCR pozitív	vesetranszplantált, th. folyamatban
18.	ffi	38	96	14	18. hónap	x ---	hybr. teszt: negatív	vesetranszplantált, th. folyamatban

x. Lamivudine dózis 50 mg/nap.



*HBV lamivudin rezisztens mutánsok meghatározásához* nested-PCR és reverz hibridizációs csík-módszer kombinációját használtuk (51).

*Módszertani leírás:* A vírus nukleinsav preparálást a QIAgen cég vegyszereivel végeztük (QIAamp® DNA mini Kit 50). Az amplifikáció az INNO-LiPA HBV DR (INNOGENETICS) teszt külső és belső primereivel, a QIAgen reagensekből készült master mix-szel, Perkin-Elmer 9600 Thermocyclerben történt. A nested amplifikáció első köre 40 ciklusból, a második köre 35 ciklusból állt. Ennek során a HBV polimeráz gén B és C domén részét amplifikáltuk. A biotinnal jelölt amplifikált terméket reverz hibridizációval kötöttük az INNO-LiPA HBV DR teszt 19 különböző oligonukleotid szondát tartalmazó nitrocellulóz csíkjához. A kapcsolódást steptavidinnel jelzett alkalikus foszfáttal és BCIP/NBT szubsztrát színreakciójával (bíbor-barna) detektáltuk. Az eredményt gyári leolvasó kártya segítségével értékeltük. (27. ábra)



27. ábra: Lamivudine rezisztens mutánsok típusai betegeinkben

A teszt érzékenysége: mutáns vírust  $10^3$  copies/ml, illetve a „vad-vírus” 4-5%-át elérő mennyiségnél lehet kimutatni.

## Eredmények

A 18 beteg közül 14 beteg májstátuszát objektívizáltuk szövettani vizsgálattal. A betegek felénél vagy cirrhosis, vagy 10 feletti összesített Knodell index igazolódott. 4 beteg vesetranszplantáció miatt immunszuprimált volt, 1 betegnél pedig a kezelés elején hepatocellularis carcinomát találtak. Ezek alapján elmondható, hogy betegeink felénél a lamivudin kezelést előrehaladott, májcirrhosisba progrediáló krónikus B hepatitis stádiumában kezdtük.

4 betegnél a kezelés 6. hónapjában történt vizsgálat. Közülük 1 beteg csak 6 hónapig kapott gyógyszert, 2 beteg még kezelés alatt áll, a negyedik beteg primer hepatocellularis carcinomában exitált. A terápia alatt lévő két beteg nukleinsav vizsgálata PCR technikával negatív lett és mutánst sem tudtunk eddig kimutatni.

A 12 hónapos kezelést kapó 9 beteg közül 5-ben, a kezelés 18. hónapjában lévő 6 beteg közül 3-ban igazoltunk különböző típusú mutánsokat. A kezelés alatt álló 14. beteg nukleinsav vizsgálata a 18. hónapban PCR módszerrel negatív, a többi beteg HBV DNS pozitív. A hibridizációs és a PCR technikák közötti jelentős szenzitivitás különbség miatt nem mondható pontos vélemény a 6. és a 18. betegről. A mutánsok megjelenésének aránya magas, 10/18 lett. Egy immunszuprimált, vesetranszplantált beteg májelégtelenség tünetei között exitált. A lamivudin kezelés felfüggesztése a többi betegnél nem járt jelentősebb májfunkció romlással. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

A különböző mutánsok együttes megjelenésének variációi az alábbiak voltak:

M528 + V552: 5x

M528 + V552 + I552: 2x

V552 + I552: 1x

I552: 1x:

I555: 1x

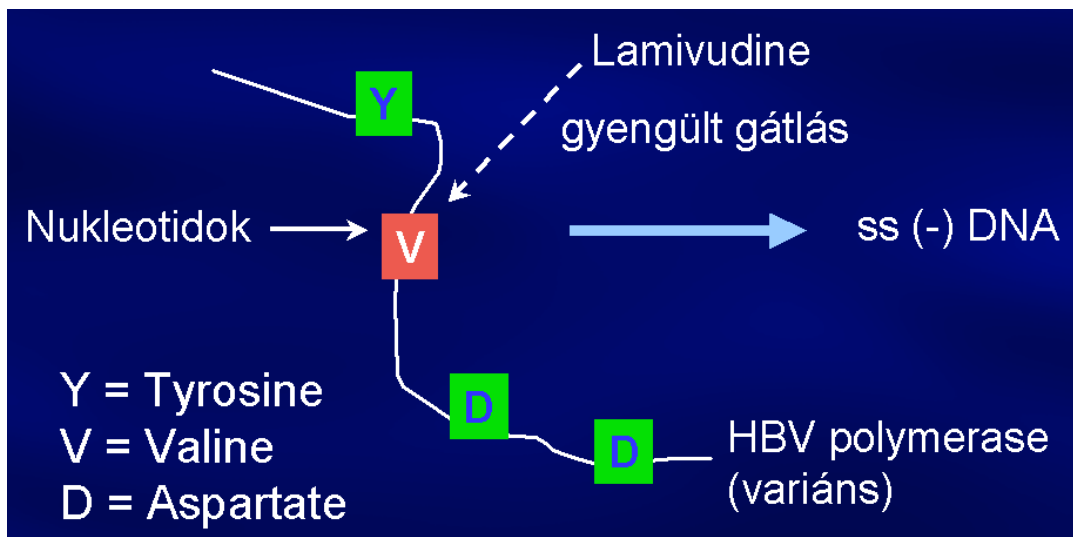
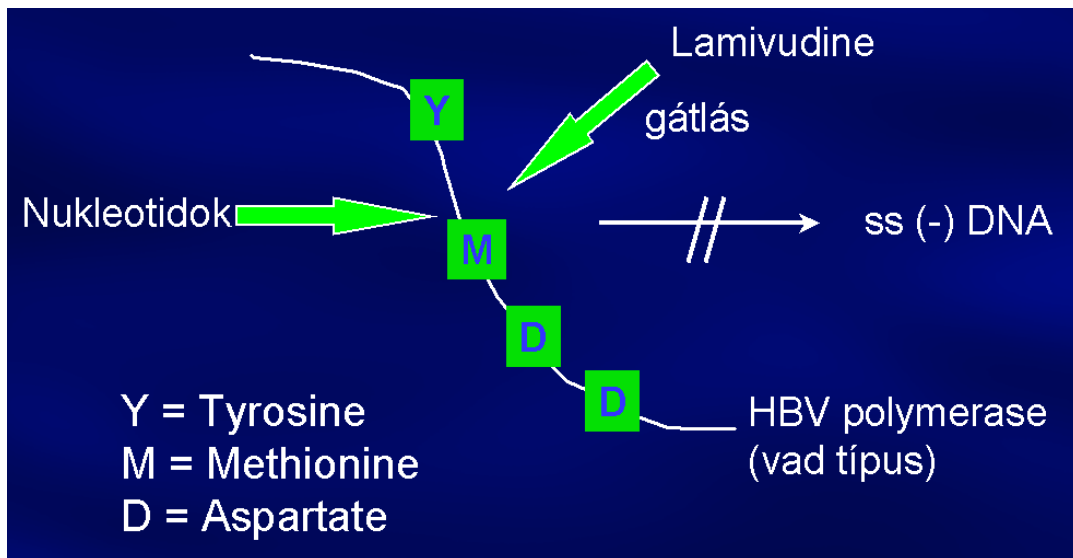
A vizsgált 528, 552 és az 555 codon variánsai a HBV „A” genotípusára jellemzőek. Eredményeink hasonlóak a nemzetközi irodalomban közöltekkel, mely szerint az 552 és az 528 pontok együttes aminosav cseréje okoz magas szintű lamivudin rezisztenciát, a csak az 552 pontban jelentkező aminosav váltás pedig enyhe rezisztenciával jár (53). Ilyen mutánst 2 betegünkönél találtuk. Egyikőjüknél (9. beteg) az ALT érték normál

tartományú, a másik beteg (12. beteg) jelentős aktivitású hepatitisét nagy valószínűséggel nem csak a lamivudin rezisztencia okozza.

### **Megbeszélés**

A krónikus B hepatitis változó gyakorisággal, de az egész világon elterjedt betegség (5). A magyar egészségügy a donorok és a vérkészítmények vizsgálatával, a kötelező terhes szűréssel, a veszélyeztetettek aktív és passzív immunizálásával, a serdülők ingyenes és az egészségügyi kötelező védőoltásával megteremtette az alapját a fertőző lánc megszakításának. Hazánk a WHO felmérése szerint is az alacsony fertőzött területek közé tartozik. A megyei vérellátó állomások adatai alapján a donorok között 0.1-0.4% a HBsAg hordozók előfordulása (6, 7, 8, 9). A terhes nőknél a HBsAg hordozás prevalenciája 0.1-1.3% (10). A HBV pozitív betegek száma így hazánkban szerencsére elég kicsi, végleges gyógyításuk azonban nem megoldott. Egyetlen lehetőség a gyógyszeres antivirális kezelés. Végstádiumú májcirrhosis állapotában vagy hepatocellularis carcinoma kialakulásakor a túlélést jelentő májtranszplantációt - az egy életen át szükséges hyperimmun gammaglobulin költség vonzata miatt - hazánkban ma még nem végeznek. A fentiek miatt kiemelten fontos az egyre hatékonyabb gyógyszerek kifejlesztése és ezek elérhetősége.

A HBV P génje kódolja a DNS polimeráz és reverz transzkriptáz funkciót ellátó proteint, mely a víruszaporodás kulcsfontosságú enzime. Az antivirális terápiában használt nukleozid analógnak, a lamivudinnak ez a támadáspontja. A gyógyszer „mellékhatásaként” kialakuló terápia rezisztens polimeráz variánsok leggyakrabban a HBV genom magasan konzervált régiójában alakulnak ki. A C domén (aa 548-558) mutációja leggyakrabban az ún. YMDD területen (tirozin, metionin, aszparagin, aszparagin) eredményez aminosav cserét. Az 552 codonban a metionin valinra (M552V; YVDD variáns) vagy isoleucinra (M552I; YIDD variáns) változik. Ritkábban előforduló variáns még az I555. Ezekhez csatlakozóan gyakori a B domén mutációja (aa 511-537), mely az 528 codonban a leucin metioninra történő cseréjét eredményezi (L528M) (52). (28. ábra). Ezek mellett egyre több közlemény számol be új variánsokról is, pl. A529T, mely stop codont jelent a HBV surface génjén, és ezzel a HBsAg kiürülése gátlódik (49.50).



28. ábra: Lamivudin hatásmechanizmusa és az YMDD HBV variáns

A lamivudin kezelés sikertelenségének két oka lehet: vagy a szer hatástalan, vagy a gyógyszerrel szemben rezisztens mutánsok alakultak ki.

A mutánsok általi terápiás rezisztencia kialakulására molekuláris biológiai magyarázatot a virális enzimek 3 dimenziós kristályszerkezeti modelljének vizsgálata adott. Röntgensugár krisztallográfiával és mágneses rezonancia spektroszkópiával a HIV reverz transzkriptáz struktúrájának mintájára modellezték a HBV polimeráz fehérje tercier kristályszerkezetét és ezen belül azonosították a lamivudin aktív kötődési helyét. Ha az YMDD területén aminosav csere jön létre (pl. YMDD→YIDD vagy YVDD), a metionin helyére lépő elágazó szénláncú izoleucin vagy valin lefedez

aktív kötőhelyet. A térszerkezet megváltoztatásával a lamivudin nagy méretű kén atomja már nem fér bele kötési helyébe és így hatástalanná válik (54). Egy másik antivirális készítmény, az adenin analóg adefovir dipivoxil aciklikus szerkezetével a mutánsokban kialakult szűkebb kötőhelybe is befér. Ezzel magyarázható, hogy ez a gyógyszer a „vad”- vírussal és a lamivudin rezisztens mutánsokkal szemben is hatékony (53. 55. 56).

Mutánsok megjelenésekor klinikai ún. „visszacsapás”, „breakthrough” manifesztálódhat. A vérben hibridizációs teszttel mérhetetlenül alacsonnyá vált HBV DNS újra megjelenik. 1, 2, 3 és 4 éves utánkövetéses vizsgálatok 14%, 38%, 49%, és 66%-os, más tanulmányok már az egy éves terápia végén 43%-os rezisztenciát igazoltak (4. 57. 58). Attól függően, klinikai ún. „visszacsapás”, „breakthrough” előtt már 1-7 hónappal lehetséges (53. 59). Ilyen érzékenyített PCR reakció a „peptide nucleic acid-PCR” (PNA-PCR) mellyel  $10^5$ – $10^9$  „vad”-vírus mellett 0,01%-0,001% mutánst ki tudnak mutatni. Ezzel a módszerrel végzett vizsgálatoknál számoltak be már az antivirális kezelés megkezdése előtt is kis számú YMDD mutánsról tünetmentes betegek vérében (58). Feltételezik, hogy ezek a betegek terápia rezisztensek lesznek már a lamivudine kezelés elején.

Mutánsok megjelenése esetén a betegség kimenetele változó. Leírtak akut fellángolásokat, a hepatitis súlyossá válását és a manifeszt májcirrhosis dekompenzálódását. Ennek fordítottja is lehetséges, mert a jelenlévő „vad”- típusú vírus szaporodásának elnyomásával és a mutánsok replikációjának zavarásával a krónikus hepatitis aktivitása csökkenhet, másrészt a mutánsok pathogenitása gyengébb. Úgy tűnik, hogy az 1 éves vagy ennél rövidebb kezelés után magas a relapszusok száma, túl hosszú terápia esetén pedig a betegek egyre nagyobb százalékánál alakul ki rezisztencia (55).

### **Következtetés**

A krónikus B hepatitises betegek gyógyítására a világ nagy részén, így hazánkban is csupán gyógyszeres antivirális kezelésre van mód. Az összefoglalónkban bemutatott új módszer a B vírushepatitis diagnosztikai lehetőségeit bővíti. A nested polimeráz láncreakció és a reverz hibridizáció módszerével az „A” genotípusú HBV polimeráz gén C és B doménjának lamivudin rezisztenciát okozó mutánsait tudjuk kimutatni. Munka-, költségigénye és az általa nyert speciális információ alapján a módszer nem rutin vizsgálat. Értéke az antivirális terápiára nem reagáló betegek és a terápia rezisztens mutánsok okozta klinikai „breakthrough” elkülönítésében van. Pozitív esetben a mutánsokra is ható új antivirális szernek a terápiába való beépítése válik

szükségessé, a gyógyszer hatástalansága esetén pedig más hatásmechanizmusú kezelést kell választanunk.

#### 4.2. ANTI-HCV IGM PREDIKTÍV ÉRTÉKE A TERÁPIÁBAN.

##### **Elméleti háttér**

Az IgM típusú ellenanyagok jelenléte a vírus fertőzések akut szakára jellemző, az évekig perzisztáló IgG típusú ellenanyag megjelenésekor általában eltűnnek a szérumból. A HCV nonstrukturális (c 100-3) és nonstrukturális (core) antigén ellen termelődő IgM típusú ellenanyag azonban kimutatható mind az akut, mind a krónikus vírushepatitisben, perzisztálása összefüggést mutat az interferon terápia sikertelenségével. Ezt főleg 1. típusú HCV fertőzések kapcsán figyelték meg (65.66).

##### **Vizsgálatunk célja**

3 különböző terápiás ciklusban az egyébként követendő klinikai és virológiai változók mellett mértük a betegek anti-HCV IgM szint változását és összefüggést kerestünk negatívvá válásuk vagy perzisztálásuk és az antivirális terápia eredményessége között.

##### **Betegeink**

39 betegünk anti-HCV IgM ellenanyag meghatározását és az ellenanyag szintjének változását követtük IFN monoterápia (3x/hét), "nagy dózisos, indukciós" IFN monoterápia (6 hétig napi 5MU IFN) és IFN + Ribavirin kombinációs kezelés alatt. A terápia 0, 12, 24, 48. hetében és az utánkövetési periódus 24. hetében végeztük a méréseket. Vizsgáltuk emellett a HCV RNS szint és az ALT változását, az összesített HAI indexet és a vírus szubtypusát.

##### **Módszer**

Az *IgM ellenanyagot* HCV IgM EIA 2.0 (ABBOTT) plate-enzimimmunoassay tesztel vizsgáltuk. A tesztben rekombináns E. coli 1-75 aminosavat tartalmazó core antigén található polisztirol gyöngyökhöz kötve.

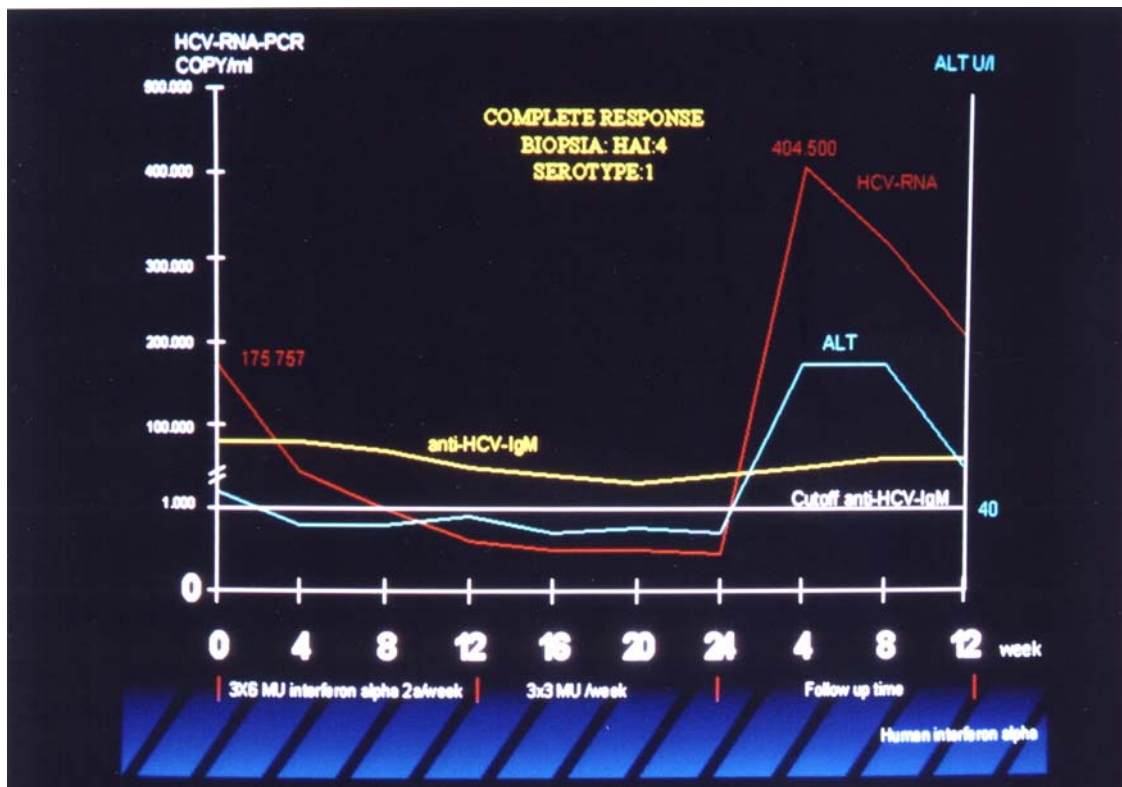
*Műszer:* Quantum II. (ABBOTT).

A *HCV RNS szint minőségi és mennyiségi* meghatározását PCR módszerrel végeztük.

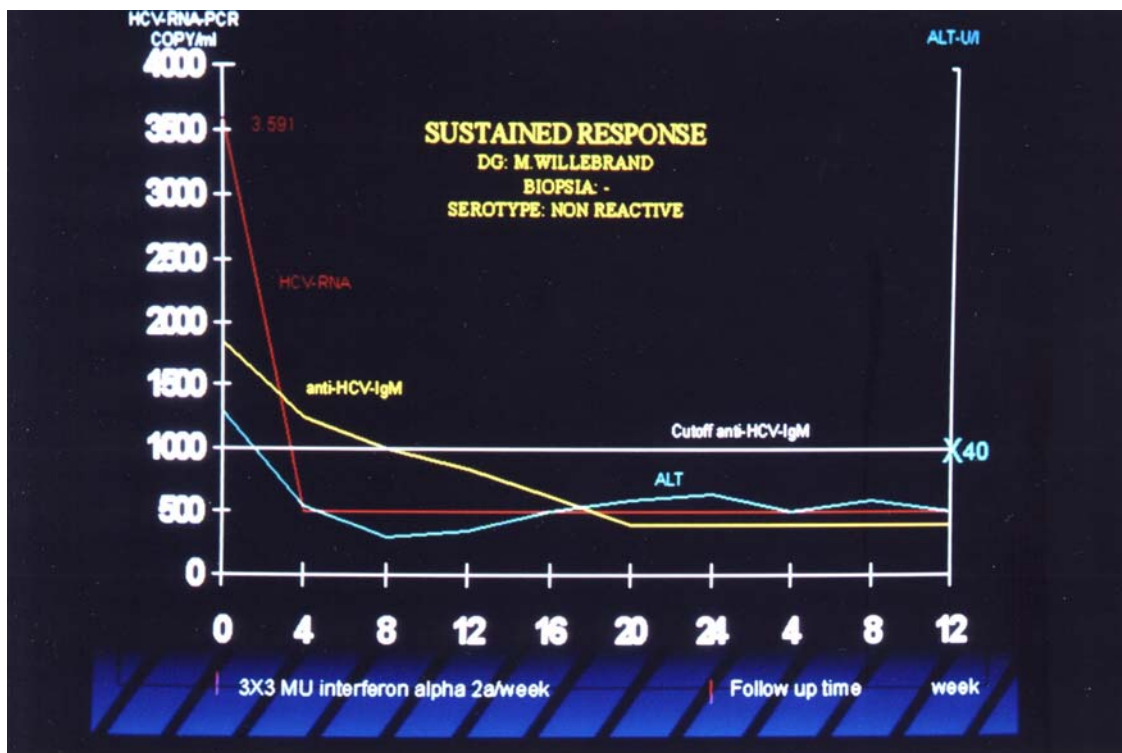
##### **Eredmény**

A 39 monitorozott beteg közül 13 már a kezelés 12. hetében anti-HCV IgM negatív lett. Közülük 6 beteg lett tartósan gyógyult (sustained responder). A másik 7 betegből 1 betegnél „breakthrough”-t, 2 betegnél transiens responder, 4 betegnél non responder eredményt igazoltunk. 19/39 betegnél pozitív anti-HCV IgM érték mellett átmeneti HCV RNS (PCR) negativitást találtunk, de mindegyikük a terápia végére vagy az

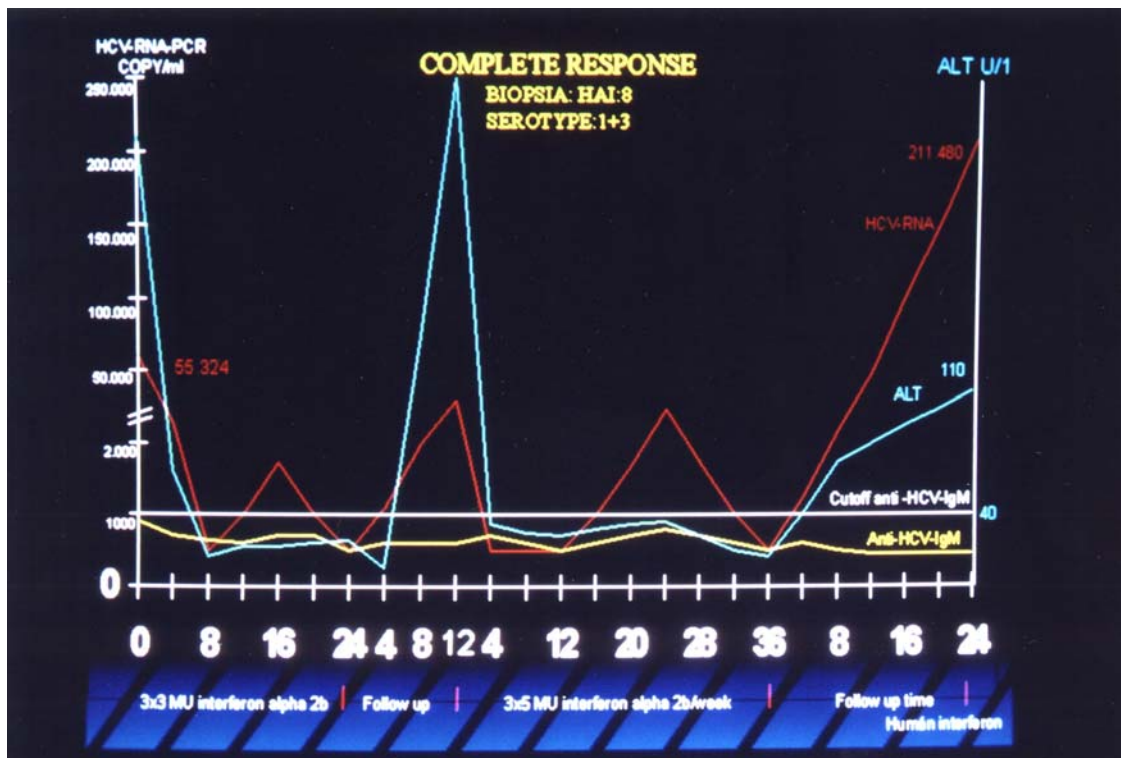
utánkövetési időszakban vírus pozitívvá vált. A részletes adatokat a 4. és 5 táblázatban és három beteg követési görbéjén ábrázoltuk



29. ábra: „Transiens response” terápias eredmény (relapszer)



30. ábra: „Sustained response” terápias válasz



31. ábra: „Non response” terápiás válasz

#### 4.3. ANTI-HCV KIMUTATÁS IV. GENERÁCIÓS TESZT MÓDSZERÉVEL ÉS ENNEK GYAKORLATI ÉRTÉKE.

##### Elméleti háttér

Az anti-HCV IV.generációs teszt „plate” enzimmunoassay módszerű vizsgálat, melyet a HCV antitestek humán szérumból és plazmából történő kimutatására fejlesztettek ki. A „rutin” szerológiai diagnosztikában a II. és III. generációs tesztek használjuk. A IV. generációs ellenanyag vizsgálatot (INNOGENETICS) Magyarországon elsőként vezettük be a klinikailag jellemző, de hagyományos szerológiai módszerekkel nem identifikálható esetek tisztázására. A teszt értéke kiemelten magas szenzitivitás és az optimális specificitás, melyet a core, NS3, NS4 és NS5 antigének 1a, 1b, 2 és 3 szubtypusának felhasználása biztosít. 2009 európai véradót vizsgálva az eredmények 99.8%-os specificitást igazoltak (2005/2009 beteg).

##### Módszer

Polisztirol mikrotiterlemez mélyedéseit HCV antigének keverékével vonják be (core, NS3, NS4, NS5). A beteg szérumát a lemez vályulatába mérjük és inkubáljuk. Amennyiben a mintában vírusspecifikus ellenanyagok vannak, ezek kötődnek a szilárd fázisra kötött antigénekhez. Ezután tormaperoxidáz konjugátummal jelölt nyúlból származó anti-humán IgG-t (H-lánc specifikus) adunk hozzá.



4. táblázat: „NAGYDÓZISÚ”, INDUKCIÓS INTERFERON  $\alpha 2b$  TERÁPIA EREDMÉNYEI

Név	Kor (év)	Nem	„0” nap		2. hét		12. hét		24. hét		Terápia vége		Utánkövetés		Szövetta n Knodell index	Geno- típus	Terápiás eredmén y
			HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)			
N.J.	40	ffi	1.832.000	34	251.000	27	282.000	33	302.000	28	1.373.000	34	1.750.000	37	8	1b	NR
B.M.	44	ffi	1.383.000	102	183.000	85	153.000	49	344.000	53	95.600	42	1.220.000	24	7	1b	NR
M.F.	49	nő	987.125	177	169.300	122	1300	17	negatív	15	-	-	1.830.000	117	6	1b	TR (R)
R.K.	42	nő	845.000	-	124.000	-	582.000		614.000		660.000		pozitív		11	1b	NR
K.E.	45	nő	610.000	94	84.000	66	negatív	31	40.500	33	611.000	105	485.000	144	10	1b	TR(BT)
M.I.	50	nő	407.230	74	154.700	91	238.120	102	244.000	79	68.520	74	274.213	73	11	1b	NR
H.J.	54	nő	252.000	129	500.000	160	-	-	467.139		1.214.000	147	750.000	275	14	1b	NR
R.A.	43	ffi	219.000	76	190.000	60	172.000	37	262.000	56	80.300	98	pozitív	45	5	1b	NR
G.J.	37	ffi	34.000	86	negatív	99	negatív	35	negatív	36	negatív	36	negatív	21	12	1b	SR

5. táblázat: INTERFERON ( $\alpha 2a$ ,  $\alpha 2b$ ) MONOTERÁPIA EREDMÉNYEI

Név	Kor (év)	Nem	"0" nap			12. hét			24. hét			Kezelés vége			Utánkövetés 6. hó	Szövettan Knodell index	Geno-típus	Szero-típus	Terápiás eredmény
			HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	a-HCV IgM	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	a-HCV IgM	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	a-HCV IgM	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	a-HCV IgM					
A.I.	33	nő	2.500.000	39	+	4.500	16	+	370	5	+	240	7	+	311.500	7	1b	1	NR
G.S.	42	nő	1.270.000	69	-	negatív	15	-	184.000	108	-	1.435.000	50	-	469.000	2	1b	1	NR-BT
Z.A.	38	ffi	1.164.000	182	+	negatív	42	+	negatív	31	+	negatív	29	+	191.000	4	1b	1	TR (R)
G.M.	30	nő	980.000	66	+	43.000	44	+	306.000	60	+	240.000	73	+	455.000	9	1b	1	NR
D.M.	36	nő	970.000	92	+	14.000	24	-	48.000	108	-	13.000	23	-	1.262.000	5	1b	1	NR
I.T.	41	ffi	910.000	47	-	155.000	73	-	1.120.000	89	-	2.700.000	82	-	pozitív	6	-	1	NR
N.J.	56	nő	870.000	86	+	720.000	93	+	325.000	100	+	530.000	88	+	1.142.000	5	1b	1	NR
P.I.	46	ffi	520.000	228	+	2.600	156	+	335	127	+	negatív	107	+	pozitív	17	1b	1	TR (R)
B.S.	48	ffi	415.000	166	-	negatív	34	-	negatív	29	-	negatív	35	-	negatív	5	1b	1	SR
K.É.	47	nő	380.000	76	+	negatív	49	+	negatív	48	+	negatív	45	+	165.000	6	1b	1	TR (R)
P.J.	67	ffi	326.000	59	+	1.400	32	+	negatív	21	+	negatív	21	+	pozitív	9	1b	NTS	TR (R)
H.P.	21	ffi	176.000	32	+	570	36	+	negatív	26	+	negatív	25	+	216.000	4	1b	1	TR (R)
CS.A.	46	nő	147.000	97	+	86.000	69	+	141.000	235	+	120.000	184	+	pozitív	9	1b	1	NR
H.L.	56	nő	140.000	112	+	negatív	29	+	136	30	+	negatív	26	+	pozitív	12	1b	3	TR
D.P.	58	ffi	140.000	124	+	1.900	153	+	2.600	117	+	500	101	+	pozitív	9	1b	1	NR
T.I.	61	nő	82.000	128	+	6.000	66	-	59.000	85	-	105.000	94	-	pozitív	12	-	1	NR
B.Á.	55	ffi	28.000	71	+	6.000	84	+	8.000	170	+	7.000	97	+	pozitív	6	1b	1	NR
H.B.	37	ffi	6.000	73	+	negatív	19	-	negatív	18	-	negatív	16	-	negatív	6	-	1+4	SR
K.Z.	38	ffi	5.000	85	+	negatív	50	+	1.100	48	+	negatív	41	+	pozitív	14	1b	1	TR
SZ.GY.	64	nő	3.600	51	+	negatív	20	-	negatív	18	-	negatív	17	-	negatív	haemophilia	-	NTS	SR

SR: sustained response

BT: breakthrough

NR: non-response

TR: transiens response

R: relaps

6. táblázat: INTERFERON  $\alpha 2a$  + RIBAVIRIN TERÁPIA EREDMÉNYEI

Név	Kor	Nem	"0" nap			12. hét			24. hét			Kezelés vége			Utánkövetés 6. hó	Szövetta n Knodell index	Geno- típus	Szero- típus	Terápiás eredmény
			HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	a-HCV IgM	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	a-HCV IgM	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	a-HCV IgM	HCV-RNS (copy/ml)	ALT (U/l)	a-HCV IgM					
A.J.	37é	nő	295.000	43	+	10.000	23	+	42.000	27	+	90.500	28	+	pozitív	2	1b	Non-R	NR
CS.L.	52é	nő	265.000	160	+	15.500	114	+	negatív	118	+	negatív	73	+	208.000	14	1b	1	TR (R)
M.Á.	46é	ffi	252.000	50	+	negatív	40	-	negatív	35	-	negatív	39	-	negatív	3	1b	1+2	SR
K.I.	36é	nő	250.000	152	+	462.000	27	+	272.000	28	+	15.500	39	+	338.000	14	1b	1+4	NR
K.V.	34é	ffi	237.000	107	+	negatív	18	+	negatív	19	+	1.800	15	+	446.000	3	1b	1	TR (R)
P.P.	32é	ffi	188.000	103	+	13.300	14	-	negatív	13	-	negatív	10	-	negatív	3	1b	1	SR
A.GY.	56É	nő	109.000	118	+	10.500	32	+	18.000	34	+	47.000	34	+	416.000	2	1b	1	NR
I.J.	48é	ffi	50.000	49	-	477	13	-	negatív	27	-	negatív	18	-	356.000	6	1b	1+3	TR (R)
G.G.	40é	nő	30.000	58	+	23.000	17	+	52.000	29	+	64.000	22	+	591.500	6	1b	1	NR
K.B.	32é	ffi	9.300	39	-	750	14	-	18.500	17	-	14.000	16	-	393.000	3	kevert	4	NR

Pozitív reakció esetén a jelzett antitest kötődik a korábban kialakult szilárd fázis antigén-anti-HCV ellenanyag komplexhez. TMB (tetrametil-benzidin) szubsztráttal történő inkubáció után ellenanyag jelenlétében sárga színreakciót kapunk.

*A módszer értéke és használatának indikációja:*

Ellenanyag tesztek fals negativitása 100%-os biztonsággal ma sem zárható ki. Immunhiányos, immunszuprimált, hemodializált betegeknel és friss akut fertőzésnél víruspozitív esetben is kaphatunk negatív eredményt. Mivel a vérkészítmények ellenőrzése ellenanyag vizsgálattal történik, előfordulhat fertőzött készítmény beadása. A világirodalmi adatok szerint ennek valószínűsége 3:10.000 E – 1:103.000 E közötti. 1998 januárjában, Franciaországban végzett plazma szűrővizsgálatánál 2.000.000 E között 4 egységet találtak pozitívnak, melyet a véradásnál nem ismertek fel. A donorokat utánvizsgálva háromnál 3 hónapon belül tudtak szerokonverziót igazolni, egy donor azonban 18 hónap után is anti-HCV negatív maradt, azonban a HCV-RNA szintje  $10^6$  copies/ml volt (64).

### **Eredményeink**

A most bemutatott ellenanyag vizsgálati tesztet speciális, diagnosztikai gondot okozó esetek tisztázására használjuk. Első méréseink máris igazolták érzékenységét. Két tisztázatlan etiológiájú, III. generációs anti-HCV teszttel negatív eredményű, kóros májfunkciójú beteg szérumát küldték hozzánk országos Hepatológiai Centrumból vizsgálatra (Nemesánszky E.). Mindkét esetben ezzel a teszttel igazoltuk a betegek ellenanyag pozitívítását és ezt követően PCR vizsgálattal pozitív HCV-RNS titerüket. A megelőző téves antitest negativitást az egyik betegnél cytomegalia infekció okozta immunszuprimált állapot magyarázta.

(A kis esetszám miatt előadás vagy közlemény még nem jelent meg munkánkból.)

## **4.4. MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ HCV TÍPUSAINAK MEGHATÁROZÁSA.**

### **Elméleti háttér**

Egyes földrészekon a C vírus különböző típusai és szubtypusai fordulnak elő. A nagyobb országok és régiók a 90-es évek elején már meghatározták a területükön előforduló HCV típusokat. Hazánkban a beteganyag ilyen típusú reprezentatív felmérése jelen munkánk előtt nem történt. Kis számú betegcsoport szérumát külföldi laboratóriumban vizsgálták, innen sejtettük, hogy nálunk főleg az 1-es típus található (42). Részletesen lásd 1.2.3.2. fejezet alatt.

A beteg savójában és plazmájában a fertőzés során a vírus típusára jellemző ellenanyag alakul ki. Ezen típus-specifikus ellenanyagok vizsgálatát nevezzük szerotipizálásnak, mellyel a vírus fő típusait tudjuk elkülöníteni.

### **Betegek**

175 krónikus hepatitiszes beteg (nő: 83, férfi: 92) C vírus szerotípus meghatározását végeztük. A krónikus C hepatitis diagnózisát a 6 hónapon túl is emelkedett alanin-aminotranszferáz (ALT/SGPT) szint, a HCV-RNS reverz polimeráz láncreakcióval igazolt pozitivitása és a máj hisztológiai vizsgálata alapján állítottuk fel.

### **Módszer**

A szerotípus vizsgálatot szérumból vagy plazmából HCV Serotyping 1-6 Assay (Murex, ABBOTT) teszttel, „plate”-enzimimmunoassay módszerrel végezzük. Az analízis a HCV NS4 régió elleni ellenanyag meghatározásán alapul. A vizsgálat időtartama kb. 3 óra. Műszerigénye: plate-EIA mosó és leolvasó. A módszer előnye, hogy időtakarékos, mérsékelt költségigényű, és gyógyult betegnél is meghatározható a vírus 6 fő típusa. Hátránya, hogy szubtypust nem tudunk vele elkülöníteni. Immunhiányos kórképekben vagy alacsony ellenanyag szintnél, pl. immunsuppresszív kezelésnél, HIV fertőzötteknél, haemodializáltaknál, haemophiliásoknál ún. „non-reaktív” (NR) eredményt kapunk. Ha blokkoló fehérjék vannak a vérben, pl. herpes simplex vírus koinfekció esetén, értékelhetetlen, ún. „non-type specific” (NTS), lesz a reakció.

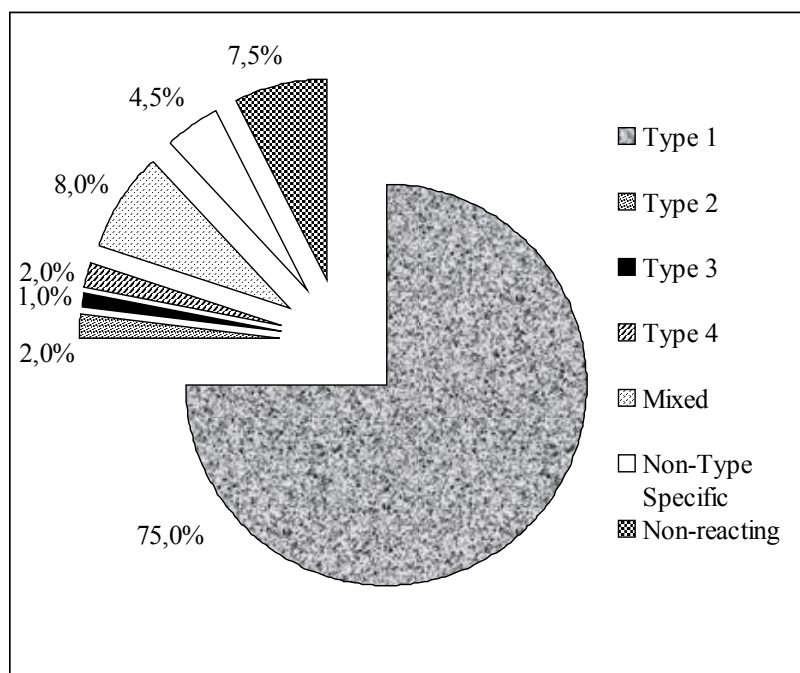
### **Eredmények**

A hepatitis C vírus NS4 régiójával szemben kialakult ellenanyag analízisével 175 betegünkben 75% (132/175) 1., 2% (3/175) 2., 1% (2/175) 3., 2% (3/175) 4. és 8% (14/175) kevert típusú ellenanyagot találtunk. A minták 4.5%-a (8 beteg) nem volt tipizálható (NTS), és 7.5%-a (13 beteg) nem adott reakciót (NR). A kevert vírustípusok megoszlása a következő volt: 1+2, 1+3, 1+4, 1+4+5, 1+6. Közöttük több egészségügyi dolgozó és politranszfundált volt. (32. ábra)

### **Következtetés**

A C vírus típus meghatározást 1996-ban vezettük be, mint hiánypótló vizsgálatot, mely az első itthon végzett analízis eredményeit szolgáltatta a magyarországi HCV vírus szerkezeti összetételéről. Vizsgálatainkkal betegeink 83% 1-es típusú fertőzöttségét igazoltuk. A később megkezdett szubtypus meghatározások eredményétől való eltérést a 12% nem tipizálható, illetve nem reagáló minta magyarázza.

A módszer értéke a gyorsasága, könnyű kivitelezhetősége és relatív olcsósága, hátránya, hogy szubtypus meghatározásra nem alkalmas. Az utóbbi 2 évben a szubtypus meghatározásokat részesítjük előnybe, azonban gyógyult, vírus negatív betegnél ezzel a módszerrel lehetőség van a vírus fő típusának retrospektív meghatározására.



32. ábra: A HCV típusok százalékos megoszlása betegeinkben

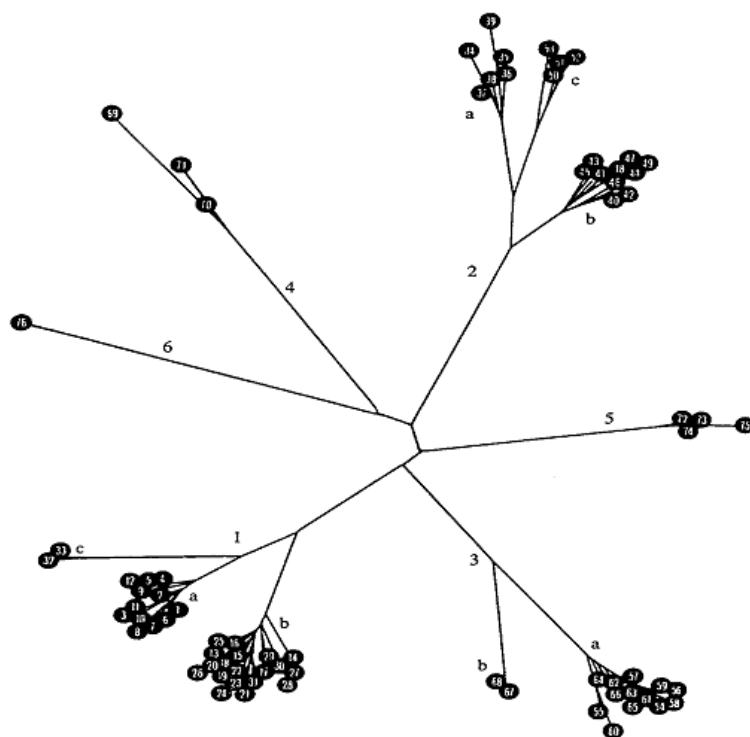
#### 4.5. MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ HCV SZUBTÍPUSAINAK MEGHATÁROZÁSA.

##### Elméleti háttér

A kutatók a HCV core/E1 és NS5B nukleotid szekvencia filogenetikai elemzése során 11 típust és kb. 90 szubtypust különítettek el, közülük 6 típus és 11 szubtypus bír patogenetikai jelentőséggel. (33.ábra)

Néhány szubtypus az egész világban megtalálható, ezek az 1a, 1b, 2a, 2b, a többinek – mint pl. 5a, 6a – jellegzetes földrajzi előfordulása van. A szerkezeti különbségek vizsgálatának epidemiológiai és terápiás jelentősége van, mert a különböző szubtypusok meghatározói a kezelés eredményességének és befolyásolják a kórkép súlyosságát is (29. 30. 31. 39. 40).

A C vírus antigén elemzésén alapuló genotípus meghatározást 1999-ben dolgoztuk ki (41. 69).



33. ábra: HCV filogenetikai analízise az NS5 régió nukleotid szekvenciája alapján  
(Simmonds P.Hepatology 1995;2:572)

### Vizsgálatunk célja

- HCV szubtypusainak meghatározása betegeinkben
- Különböző genotípusoknál az interferon monoterápia eredményességének és a terápia előtti vírusszám összefüggésének vizsgálata.

### Módszer

A módszer a vírus stabil 5'NCR szubtypusokra jellemző variabilitásán alapszik. A vizsgálattal a 6 fő típus és ezek szubtypusainak egyidejű meghatározása lehetséges.

### Betegek

3 év alatt, az ország különböző centrumaiból vizsgálatra küldött egymást követő 606 (nő 292; férfi 314) krónikus C hepatitiszes betegből álló, reprezentatív betegcsoport terápia előtti szérumból vagy plazmájából végeztük a genotípus megoszlás meghatározását.

169 általunk kezelt betegeknél (nő 89; férfi 80) a terápia előtti vírus szintet és az IFN kezelés eredményességét vizsgáltuk.

*Terápiás protokoll:* A betegek antivirális kezelése 1992-1998 között interferon monoterápiával történt (48 vagy 52 hétig heti 3x4,5 MU vagy 6 MU interferon alfa 2a vagy 3x5 MU interferon alfa 2b). A jelenleg alkalmazott kombinációs terápiában az interferon mellé napi 1.000 - 1.200 mg ribavirint kapnak a betegek.

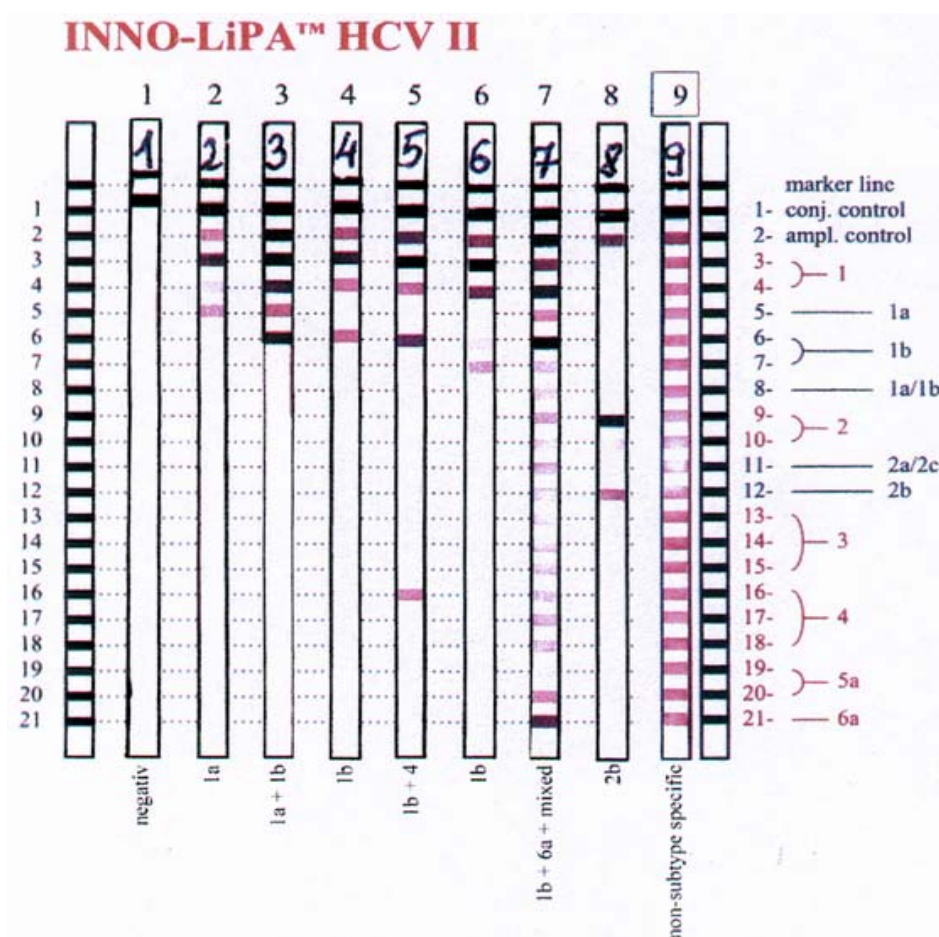
### Statisztikai analízis

T-tesztet használtunk a különböző genotípusok és a bazális vírus szint kapcsolatának elemzésére ( $\alpha=0.01$ ).

### Módszer

A meghatározást AMPLICOR HCV 2.0 (Roche) és INNO-LiPA HCV II. (Innogenetics) tesztek kombinációjával végeztük. A módszer első lépésében a virális RNS-t izoláljuk, majd reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizálunk. Az így létrehozott nukleinsavat biotinnal jelölt primerekkel, polimeráz láncreakció módszerével amplifikáljuk. A megsokszorozódott, biotinnal jelölt termékeket egy típus-specifikus ellenanyagokat tartalmazó nitrocellulóz membránhoz reverzibilisen hibridizáljuk. A kötődés a membránnak csak azon a részén jön létre, mellyel a vírusrészecske nukleotid szekvenciája tökéletesen kompatibilis. A biotinnal jelölt hibrideket ezután színreakcióval jelenítjük meg. A pozitív csíkokból diagram segítségével tudjuk leolvasni a jelenlevő szubtypusokat.

(34. ábra)



34. ábra: HCV szubtypus meghatározás eredményei



A vizsgálat időtartama kb. 7 óra. A módszer előnye, hogy szubtypus meghatározásra alkalmas, hátránya, hogy idő-, műszer-, költségigényes és nagy gyakorlattal rendelkező asszisztenciát kíván. Igen alacsony vírustiterű mintánál nem kapunk értékelhető reakciót.

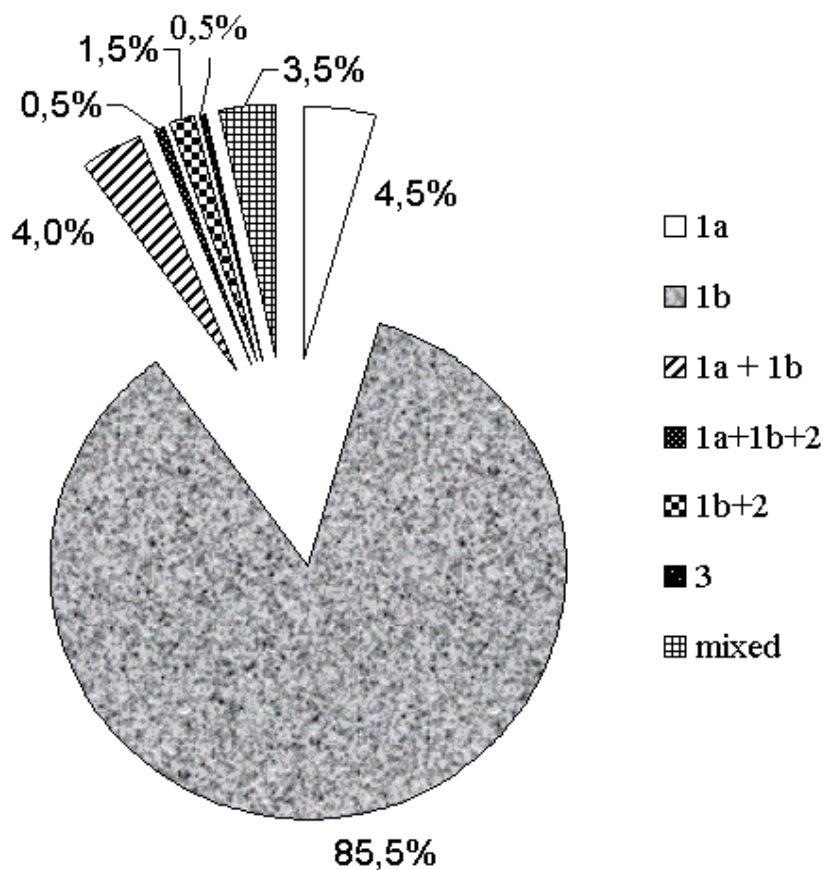
Műszerigénye: thermocycler, speciális rázógép, vízfürdő vagy száraz inkubátor.

*Quantitatív vírusszám meghatározás:* Kezelés előtti szérumból vagy plazmából Amplicor (Roche) teszttel, reverz transzkripció és polimeráz láncreakció módszerével történt (ld. Roche: Amplicor.

Módszertani leírás).

### Eredmények

1. 606 betegünk vizsgálata azt mutatta, hogy a magyarországi betegek 91,5%-a 1b szubtypusú C vírussal fertőződött. (35. ábra)



35. ábra: Magyarországi betegeink HCV szubtypus megoszlása (n=606)

Részletes eredmények:

1a	4,5%	27/606
1b	85,5%	518/606
1a+1b	4,0%	25/606
1b+2	1,5%	9/606
1a+1b+2	0,5%	3/606
3	0,5%	3/606
kevert	3.5%	21/606

(A kevert szubtypusú csoportban haemophiliás, i.v. droghasználók és többszöri műtéten átesett betegek találhatóak.)

2. 169 kezelt betegünkél (HCV1a:10; HCV1b:159) kvantitatív RT-PCR technikával meghatároztuk a kezelés előtti vírus számot. Az adatokat az alábbi táblázat tartalmazza.

**Terápia előtti vírus szint szubtypusok szerinti megoszlása**

<b>Pre-treatment viral load</b> (IU/ml)	<b>HCV-1a</b> (n=10)	<b>HCV-1b</b> (n=159)
<200000	<b>60%</b>	<b>29%</b>
200000-800000	20%	<b>37%</b>
800000-2x10 <sup>6</sup>	20%	<b>23%</b>
>2x10 <sup>6</sup>	0%	11%
	<b>100%</b>	<b>100%</b>

Az eredmények mutatják, hogy az 1a csoportban a bazális vírus szám szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az 1b csoportban (p<0.01).

#### **Következtetés**

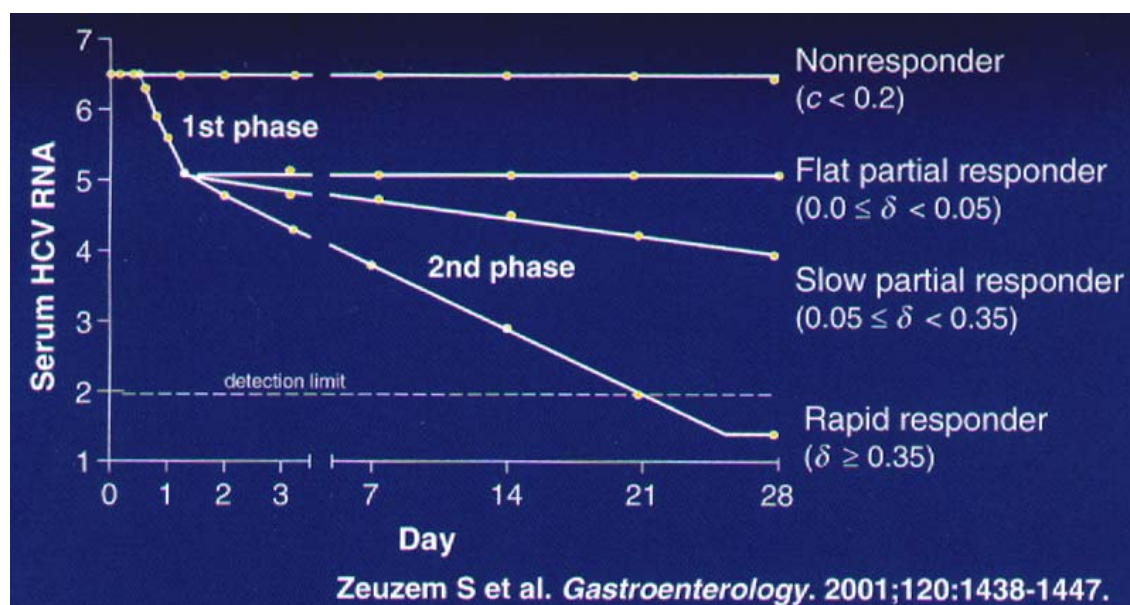
- Szubtypus analízis eredményeinkkel magyarországi betegeink 91.5% 1b fertőzöttségét igazoltuk.
- Az 1a szubtypusú betegekben szignifikánsan alacsonyabb terápia előtti vírus szintet találtunk.
- A fentiek alapján érthető, hogy az IFN monoterápiára betegeink 10%-ánál értünk csak el sustained responder állapotot.

#### 4.6. IFN MONOTERÁPIA ÉS IFN + RIBAVIRIN KOMBINÁCIÓS KEZELÉS ALATTI VÍRUSKINETIKAI VIZSGÁLAT(HCV-RNS, ANTI-HVC IgM, ALT MONITOROZÁS) .

##### Elméleti háttér

Ma már közismert, hogy az IFN terápia eredményességét meghatározó virális tényezők egyike a terápia előtti vírustiter és a terápia alatti vírus szám csökkenés gyorsasága. Az 1990-es évek elején azonban a krónikus hepatitis aktivitását és a terápia kimenetelét a szérum alanin-aminotranszferáz és a máj szövettani eredménye alapján állapítottuk meg. Csak feltételeztük, hogy a bazális vírus érték és a vírus elimináció gyorsasága meghatározó szerepű a terápiában. Ennek vizsgálatát saját betegeinknél 1994-ben, a kvantitatív PCR bevezetésével kezdtünk meg. Azóta multicentrikus nemzetközi tanulmányok igazolták a terápiás eredmény és a kiindulási vírus szint közötti meghatározó kapcsolatot (62. 63). 2.000.000 copies/ml-ben (800.000 IU/ml) határozták meg azt a vírushatárt, mely alatt a betegek tartós gyógyulására remény van.

A HCV clearance több tényezőtől függ. A betegben a vírus által megfertőzött hepatocyták mellett egészséges májsejtek is találhatóak. A hepatitis krónikus stádiumára jellemző ún. „steady state”, melyben az infekt sejtek pusztulása, a virionnak a keringésbe történő kiválasztása és az egészséges hepatocyták újrafertőződése egyensúlyban van. Ekkor a szérumban a vírusszint állandó. Az IFN ezt az állapotot szakítja meg. A kezelés alatti vírusszám az IFN direkt vírus reprodukciót gátló hatásától, a gyógyszer immunmodulátor hatása által stimulált humorális válasz erősségétől és a cytotoxicus T sejt okozta hepatocytá pusztulástól függ. Az interferon kiváltotta vírus szint csökkenés két lépcsős. Az első, ún. gyors fázisban a terápia első napján a szérum vírus titerének gyors esése az IFN dózistól függ, és a vírus gátlás szinte minden betegben azonos. A második, ún. lassú fázis a terápia második napjától a kezelés végéig tart, és a HCV replikáció gátlásának hatékonyságától és az infekt sejtek pusztulásától függően igen nagy variabilitást mutat.



36. ábra:  
Az  
interferon  
által  
kiváltott  
terápiás

## válaszadás típusai

A második fázis „lejtője” szabja meg a terápia kimenetelét. (36. ábra) Ennek alapján csoportosíthatjuk betegeink terápiás válaszát:

1. Non response - nem reagáló: a terápia alatt nincs jelentős vírusszint változás, az ilyen beteg soha nem válik tartósan gyógyulttá.
2. Flat partial response – enyhén reagáló: a terápia első napja utáni vírus szint csökkenés nem szignifikáns. Ezek a betegek nagy valószínűséggel soha nem lesznek vírusmentesek.
3. Slow partial response – lassan reagáló: a vírus elimináció szignifikáns csökkenése után a második fázisban lassú a vírus elimináció.
4. Rapid response – gyorsan válaszoló: az első fázis gyors vírus szám csökkenését követő kevéssé gyors második fázis elején (kb.4 hét) a beteg vírusmentessé válik.

A víruskinetikai vizsgálatok jelentősége az egyénre szabott terápia dózisének és időtartamának meghatározásában van (4). A beteg korai vírus válaszána ismeretében mód van a terápia azonnali, hatékonyabb módosítására.

Betegeinknél 1996-ban és 1999-ben a bazális vírus szám, a vírus értékek terápia alatti változása és a kezelés eredményessége közötti összefüggést vizsgáltuk (88.89.90).

### Vizsgálat célja

- HCV-RNA mennyiségi meghatározása PCR technikával interferon monoterápia és interferon + ribavirin terápia alatt. A kezelés eredménye, a bazális vírusérték és a vírustiter változás közötti összefüggés elemzése.
- anti-HCV IgM és a terápia eredményessége közötti összefüggés vizsgálata.
- Egyéb vizsgált paraméterek:
  - ALT,
  - terápia előtti hisztológiai aktivitási index (Knodell score),
  - HCV szerotípus és/vagy genotípus (szubtípus).

### Betegek

39 krónikus C hepatitiszes betegünk adatait elemeztük.

- 20 beteget (10 férfi, 10 nő) kezeltünk interferon monoterápiával:
  - 10 beteg heti 3x6 MU interferon  $\alpha$ 2a (Roferon A) 40-52 hétig

10 beteg heti 3x5 MU interferon  $\alpha$ 2b (Intron A) 40-52 hétig

- 10 beteget (5 férfi, 5 nő) kezeltünk kombinációs terápiával:  
hetente 3x3 MU interferon  $\alpha$ 2b (Intron A) + napi 1000-1200 mg ribavirin 52 hétig
- 9 beteget (4 férfi, 5 nő) kezeltünk nagy dózisu, „indukciós” IFN terápiával: (6 hétig  
napi 3x5 MU interferon  $\alpha$ 2b (Intron A), majd hetente 3x5 MU IFN  $\alpha$ 2b).

A betegek életkorát, a hisztológiai aktivitási indexeket (Knodell score) és a C vírus típus és szubtypus eredményeit az alábbi táblázatokon tüntettem fel. (ld. 4. 5. táblázatok, 65, 66. oldal)

### **Módszer**

- HCV-RNS mennyiségi meghatározása mennyiségi RT-PCR módszerrel.  
AMPLICOR<sup>®</sup> HCV Monitor 2.0 (Roche) teszt,  
Perkin Elmer GeneAmp 9600 thermocycler.
- anti-HCV IgM „szendvics” EIA módszerrel  
Abbott HCV IgM EIA 2.0 teszt  
Quantum II fotométer
- HCV típus meghatározás ELISA módszerrel  
HCV Serotyping 1-6 Assay (Abbott-Murex) teszttel.
- HCV szubtypus meghatározás RT-PCR és reverz hibridizációs módszerrel  
AMPLICOR<sup>®</sup> HCV 2.0 (Roche) és INNO-LiPA HCV II. (Innogenetics) teszt  
Perkin Elmer GeneAmp 9600 vagy COBAS AMPLICOR automata

### **Értékelés (virologiai válasz alapján)**

- SR: sustained response: a follow up 24. hetében HCV-RNS(PCR) negatív a beteg.
- PR: partial response: a terápia alatti átmeneti HCV-RNS negativitás után ismét kimutatható a vírus.
- NR: non-response: a terápia alatt a HCV-RNS végig kimutatható.
- R: relapser: a terápia végén HCV-RNS a kimutathatósági határ alá csökken, de a terápia felfüggesztése után újra pozitívvá válik
- BT: breakthrough: a terápia közben virológiai és biokémiai javulás, vírusszám csökkenés, majd negatívvá válás után hirtelen vírusszám és ALT emelkedés jelentkezik.

### **Eredmények**

- Az IFN monoterápiával (3x/hét) kezelt 20 betegünk közül a terápia végére 10 beteg (50%) HCV-RNS (PCR) negatívvá vált, közülük azonban az utánkövetési periódusban 7 relapsusba került, és csak 3 betegünk (15%) maradt sustained responder.

- Az IFN + Ribavirin kombinációs terápiával kezelt 10 betegünk közül 5 (50%) a terápia végén HCV-RNS (PCR) negatívvá vált, az utánkövetési periódusban 2 (20%) betegünk maradt sustained responder.
- A „nagy dózisú” IFN monoterápia eredményeként 9 betegből egy (11%) betegünk lett sustained responder, egy betegnél terápia alatti breakthrough-t tapasztaltunk.

### **Következtetés**

- Vizsgálataink alátámasztották azt a tényt, hogy a krónikus C hepatitis IFN terápia eredményességét alapvetően befolyásolja a kezelés előtti vírustiter. 500.000 copies/ml bazális vírustiter felett egyetlen betegünk sem vált tartósan gyógyulttá.
- A 6 sustained responder közül 5 beteg már a terápia 12. hetében HCV-RNS (PCR) negatív volt, egyikük már a 2. héten negatívvá vált. Egy beteg a 24. héten vált vírus negatívvá (slow partial response?).
- Minden gyógyult betegünk anti-HCV IgM negatív lett. Ha az anti-HCV IgM a kezelés végére nem tűnik el, ez negatív prediktív markere a tartós gyógyulásnak.
- Az ALT érték nem mindig követi párhuzamosan a gyógyulást.
- A terápia eredményességének a végső kimondásához nukleinsav vizsgálat szükséges, melynek érzékenysége 50 copies/ml.

## **4.7. MAGYARORSZÁGI KRÓNIKUS HEPATITISES BETEGEINKBŐL IZOLÁLT HCV 1b RNS-FÜGGŐ PROTEIN KINÁZ KÖTŐ RÉGIÓ (PKR-BR) SZERKEZETI ANALÍZISE ÉS AZ IFN TERÁPIÁVAL VALÓ ÖSSZEFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA.**

### **Elméleti háttér**

**A.** Az *interferon rendszer* a szervezet komplex, természetes védekező rendszerének fontos tagja. A csontos halakban jelenik meg először és az élővilág minden náluk fejlettebb egyénében megtalálható. Az emlősök a gesztáció második felétől képzik. Szerkezet, antigén tulajdonság és hatásmechanizmus alapján 3 fő típusa különíthető el: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  és az IFN- $\gamma$ . Jellemzőik:

1. Cellularis proteinek, melyek termelődését idegen ágensek, leggyakrabban a különböző DNS-, RNS-vírus infekciók indukálják. Hatásukra a sejtekben a termelésüket gátló represszorok inaktiválódnak és az IFN képződésért felelős mRNS-ek a riboszómákon megindítják a szintézisüket. A keletkező interferonok egyrészt intracellulárisan maradnak, nagyobb részük azonban az extracelluláris térbe szekretálódik és a többi sejtet a bekövetkezett vírus infekcióra védetté teszi.

2. Nem közvetlen hatnak a virionra, csak indukálják az antivirális állapotot. Hatásukra ún. effektor proteinek termelődnek, melyek a vírus transzkripcióját és translációját gátolják.

3. Szinte az összes vírus replikációt gátolni tudják, tehát az őt indukáló vírusra nem specifikusak, de fajspecifikusak.

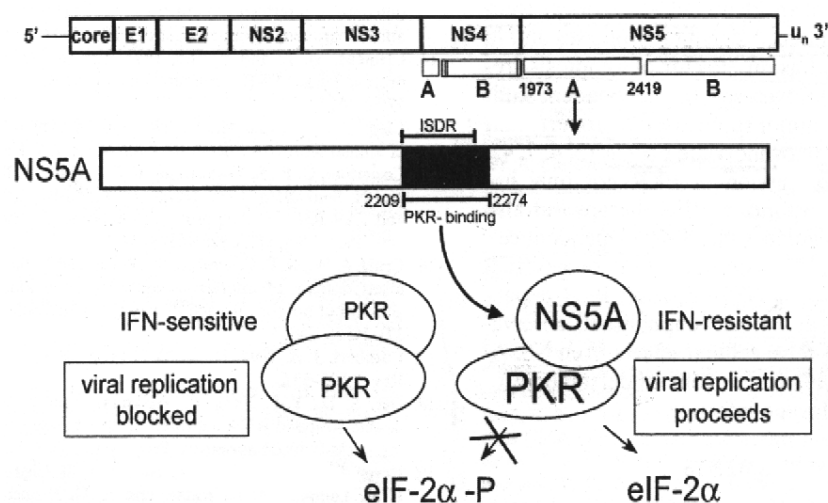
4. A keringésben néhány órától néhány napig találhatóak meg, de eliminációjuk után antivirális hatásuk még 24-48 óra múlva is tart.

Az IFN- $\alpha$ , melyet leukocita interferonnak is nevezünk, 19.000-24.000 dalton (D) molekulásúlyú és 165-166 aminosavból áll. Vírusok, idegen nukleinsavak, bakteriális részecskék által indukált lymphocyták vagy makrofágok termelik. Könnyen diffundál a szövetek között, így azonos hatékonysággal indukál antivirális hatást az egész szervezetben.

Az IFN- $\beta$  19.000-24.000 D molekulásúlyú, 166 aminosavból áll. Fibroepitheliális sejtek termelik. Ez az IFN az első, amely a természetes vírus infekciókban megjelenik. Rosszul diffundál a környező szövetekbe, így a termelődés helyén magas koncentrációban található. Lokálisan igen hatékony a vírus szaporodás gátlásában, de szisztémás hatása gyenge.

Az IFN- $\gamma$  45.000 D súlyú, antigének által stimulált T-lymphocyták terméke. Kb. 10x kevésbé hatékony, mint az  $\alpha$  vagy  $\beta$  IFN és lassabban indukál antivirális állapotot a különböző sejtekben. Hatása főleg immunmoduláló és tumor gátló.

*Hatásmechanizmusuk:* Az interferonok antivirális hatásának első lépése a sejtmembránok felszínén található specifikus receptorokhoz történő kapcsolódás. Az IFN- $\alpha$  és  $\beta$  azonos receptorra hat. A receptorok száma sejtenként változó, feltételezik, hogy a sejtek IFN érzékenységét ez is nagyban befolyásolja. Ezt követi az IFN által indukált, a különböző biológiai hatásokat ténylegesen kifejtő effektor fehérjék termelődése. Az IFN- $\alpha$  és  $\beta$  jelen ismereteink szerint kb. 24 protein képzéséért felelős. Közülük néhány hatásmechanizmusát ma már pontosan ismerjük. Ezek közül egyik a kettős szálú RNS-függő (dsRNS) protein kináz, a PKR. Az IFN antivirális és antiproliferatív hatásának kulcsfontosságú lépése ennek az RNS-függő protein kináznak az aktivációja. A dsRNS jelenlétében a PKR foszforilálja szubsztrátját, a protein-iniciációs faktor 2  $\alpha$  alegységét, az eIF-2 $\alpha$ -t. Ezzel a mRNS transláció, a DNS illetve protein szintézis és ezen keresztül a vírus replikáció gátlása jön létre (60. 61). Az antivirális mechanizmusok ellen a filogenezis során a vírusok különböző védekező rendszereket építettek ki. A hepatitis C vírusnál ez az NS5A régiójában, a protein kináz hatást blockoló területen (PKR-BR: aa 2209-2274) található. Ha megköti a vírus a PKR-t, az működésképtelenné válik és így szabad lesz az út a vírus szaporodás, áttételesen a hepatocytá malignus transzformációja előtt. (37. ábra)



37. ábra: A HCV NS5A domain PKR-BR működésének elmélete

(Gale et al, Mol. Cell. Biol., 1998. 5216.)

**B.** A hepatitis C vírus kb. 9400 nukleotidból álló genomja 3010-3030 aminosav tartalmú proteint kódol. Az 1973-2420 aminosavak közé eső részt nevezzük "non-structural 5A" (NS5A) fehérjének, melyen belül található a PKR kötő terület (aa 2209-2274). Ez a szakasz meg tudja kötni a PKR-t, ezzel felfüggeszti annak működését, és ezáltal szabaddá válik az út a vírus szaporodásához és áttételesen a hepatocytá malignus transzformációjához. (37. ábra)

**C.** Hazánkban a krónikus C hepatitises betegek kezelése 1992-ben kezdődött meg. Az első években IFN monoterápiát, majd ennek ribavirinnel történő kombinációját alkalmaztuk. A gyógyszer kezdetben 6, majd 12 hónapos, heti 9-18 millió IU adásával betegeink 13-22%-a, kombinációs terápiával 36%-a vált csupán tartósan vírusmentessé □ polimeráz-láncreakció (PCR) módszerével a beteg a terápia befejezése után 6 hónappal is vírusmentes □ (41. 68). Ez a nemzetközi adatokkal összehasonlítva alacsonyabb terápiás hatékonyságot jelentett (70). Ennek lehetséges magyarázatát a HCV hazai szubtípus megoszlásának meghatározása adta. A magyarországi betegek vírus típus analízisével 1996-ban a HCV 1b 91%-os, újabb eredményeink alapján 91.5%-os előfordulását igazoltuk (41. 42. 69). Ismert, hogy ez a legnehezebben eliminálható vírus szubtípus, és ez magyarázhatja az alacsony gyógyulási arányt. Továbbra is kérdés maradt azonban, hogy azonos vírus szubtípuson belül milyen egyéb tényezőktől függ a gyógyultak és a nem reagálók szétválása. A HCV 1b szubtípus előfordulása a japán populációban a magyarokéhoz hasonlóan igen magas, 73% (76). Japán tudósok évek óta intenzíven kutatják a vírus szerkezete és terápiás válaszkészsége közötti összefüggést (20. 71. 73). 1995-ben *Enomoto N. és munkatársai* összehasonlították az interferonra reagáló és az interferonra rezisztens HCV 1b szerkezetét. Az HCV 1b-J (japán típus) vírust alapul véve megállapították, hogy a PKR-BR domén egy szakaszának aminosav változásokban expresszáldó mutációi döntően befolyásolják az interferonra adott választ. Ezt a területet „Interferon Sensitivity Determining Region”-nak (ISDR) nevezték el. E területen



megjelenő aminosav cserék száma alapján ún. „wild-type” (0 szubsztitúció), „intermedier-type” (1-3 szubsztitúció) és „mutant-type” (4 vagy több szubsztitúció) vírus csoportokat alakítottak ki, és eszerint analizálták a terápiás eredményeket (74).

Statisztikai összefüggést mutattak ki az ISDR fenti típusai és az IFN hatékonysága között. Azóta több japán szerző megerősítette ezt, az európai és amerikai vizsgálatok azonban egy kivétellel nem jutottak hasonló eredményre (77. 78. 79. 82. 83. 84). Közép-Kelet-Európában, így Magyarországon sem végeztek ezideig hasonló elemzést.

**D.** Tanulmány jelent meg a Japánban és a világ többi részén előforduló HCV 1b nukleotid szerkezetének, „quasispecies”-einek különbözőségéről. Meghatározták a nemzetközi GenBank-ban nyilvántartott és a Japánban izolált vírusok szerkezetét. Ennek alapján az 1b szubtypusnak 3 csoportját különítették el: „J” (japán), „NJ” (nem japán) és a „W” (worldwide). Ez adta az alapját annak a tézisnek, hogy ez a különbözőség lehet az oka a japán kutatók által a „J” szubtypusra megállapított szerkezeti és terápiás összefüggés és a nemzetközi eredmények közötti eltérésnek (81).

Jelen munkánkban az általunk kezelt 21, véletlenszerűen kiválogatott és eltérő terápiás választ adó krónikus HCV 1b pozitív betegből izolált vírus NS5A régiójának szerkezeti analízisét végeztük el. A vizsgált genom szakasz azt a kb. 200 aminosavat (aa 2130-2330) kódolja, mely az RNS-függő protein-kináz kötő régiót (aa 2209-2274) is magában foglalja. A PKR-BR két rövidebb szakaszból épül fel, ezek a már említett interferon érzékenységet meghatározó régió (ISDR aa 2209-2248) és az ún. II. régió. A kapott eredményt összehasonlítottuk a HCV 1b-J megfelelő szakaszának szerkezetével.

#### **Vizsgálat célja**

- HCV 1b-vel fertőzött betegek savóját vizsgálva meghatároztam a vírus genom NS5A régiójának nukleotid szekvenciáját, illetve az általuk kódolt aminosavakat (aa 2209-2274), és összehasonlítottam a HCV1b-J szerkezetével. Arra kerestem választ, hogy a magyarországi betegekből izolálható vírus azonos összetételű-e a Japánban előforduló vírussal.
- A talált aminosav cserék száma, helye, típusa és az IFN-ra kapott terápiás eredmény között van-e összefüggés? Lenne-e gyakorlati értéke a terápia előtti nukleotid szekvencia meghatározásnak a klinikumban?

#### **Betegek**

21 HCV 1b fertőzött beteg (nő: 13; férfi: 8) szérumát retrospektív analizáltuk. Betegeink elemzett adatait a 7. táblázat tartalmazza. Életkoruk 24-64 év között változott (átlag 43.8 év). A krónikus C hepatitis diagnózisának kritériumai a következők voltak: a szérum alanin-aminotranszferáz (ALT) minimum 6 hónapon át a normál érték felső határának kétszerese legyen; anti-HCV pozitivitás;

szérum HCV-RNA kimutathatósága PCR alapú vizsgálattal több, mint 6 hónapon át; májbiopsziával bizonyított hisztológiai aktivitás.

*Terápiás protokoll:* 11 beteg (nő: 7; férfi: 4) kezelése IFN- $\alpha$ 2a vagy IFN- $\alpha$ 2b monoterápiával (teljes dózis 432-936 millió IU), 10 beteg (nő: 6; férfi: 4) kezelése IFN- $\alpha$ 2a vagy IFN- $\alpha$ 2b (teljes dózis 468-780 millió IU) + ribavirin (teljes dózis: 210.600-438.000 mg) kombinációs terápiával történt 48-52 hétig. Minden beteget követtünk a terápia előtt minimum 6 hónapig és a terápia után legalább 1 évig. A tanulmány protokollja az 1975. évi helsinki megállapodás alapján készült és a betegek tájékoztatott írásos beleegyezésüket adták.

*Analitikai módszerek:* A terápiás eredmény alapján a beteget tartósan gyógyultnak (sustained responder) értékeltük, ha az IFN terápia utánkövetési szakaszában is normális ALT szintje és negatív HCV-RNS (PCR) eredménye volt. Ellenkező esetben "non responder"-ként definiáltuk.

A virológiai faktorok IFN érzékenységet előjelző értékének szempontjából analizáltuk az ISDR típusát és a PKR-BR-en belül az aminosav szubsztitúciók pozícióját és fajtáját. Az ISDR-ben lévő, HCV 1b-J szerkezetéhez viszonyított aminosav cserék száma szerint a betegek kezelés előtti mintáit három csoportba osztottuk. „Vad-típusú”-nak ("wild-type") definiáltuk, ha nem volt aminosav változás, intermediér típusúnak ("intermediate-type"), ha 1-3 helyettesítés volt és mutáns típusúnak, ha 4 vagy több aminosav különbséget találtunk. Vizsgáltuk az összefüggést az IFN terápiával elért eredmény és a különböző klinikai paraméterek között is: módosított Hisztológiai Aktivitási Index (HAI), necroinflammation grading és a staging score-ok (*Ishak és mtsai.* 1995), bazális ALT érték és vírustiter (85).

Vizsgálat paraméterek	Sustained responder	Non-responder
Életkor (év)	34 (24-45)	41 (30-64)
HAI grading score	4 (1-7)	5 (1-8)
HAI staging score	0 (0-0)	2 (0-4)
ALT (IU/ml)	151 (92-530)	94.5 (39-167)
HCV PCR (IU/ml)	403 000 (263 000-902 000)	351 500 (44 000-1 779 000)
IFN összdózis (MU)	468-780	432-936
Ribavirin összdózis (mg)	403 200-436 800	210 000-436 800

(A median értékek, zárójelben a tartományok szerepelnek)

## 7. táblázat: Betegeink elemzett adatai

### **Módszer**

Az *anti-HCV ellenanyag* vizsgálat II. vagy III. generációs enzimimmunoassay (ABBOTT) teszttel történt.

A *HCV-RNS mennyiségi* vizsgálata a betegek kezelés előtti szérumból reverz transzkripció polimeráz láncreakció módszerével (RT-PCR) AMPLICOR HCV Monitor 2.0 (Roche) teszttel végeztük.

A *HCV genotipizálás* AMPLICOR HCV (Roche) és INNO-LiPA HCV 2.0 (Innogenetics) PCR és reverz hibridizációs módszerekkel történt.

A *HCV NS5A PKR-BR régió nukleotid szekvenciájának* vizsgálata nested RT-PCR termék szekvencia analízisével, Enomoto N. és mtsai által használt primerekkel történt (N Engl J Med. 1996 Jan 11;334:77-81).

RNS extractio: A vizsgálathoz az AMPLICOR HCV 2.0 teszt megfelelő részét használtuk, de csak 50µl HCV Dil-t adtunk minden mintához.

cDNA szintézis: A szérum preparátumok reverz transzkripciója 20 µl reakció keverékben történt, mely tartalmazott 5 µl RNA oldatot, 200 U Moloney murine leukemia vírus reverz transzkriptázt (GIBCO-BRL), 75 U RN-ase inhibitort, 2,5 nM random hexamert, 0.5 mM ΣdNTP-t, Tris-puffert, KCl-t és MgCl<sub>2</sub>-t. A keveréket 37<sup>0</sup>C-on 45 percig, majd 90<sup>0</sup>C-on 5 percig inkubáltuk. Az NS5A domain amplifikációját nested PCR technikával végeztük: A primerek szekvenciái az alábbiak voltak:

5' outer forward: 5'TGGATGGAGTGCGGTTGCACAGGTA3' (6703-6727),

3' outer reverse: 5'TCTTTCTCCGTGGAGGTGGTATTGG3' (7296-7320),

5' inner forward: 5'CAGGTACGCTCCGGCGTGCA3' (6722-6741),

3' inner reverse: 5'GGGGCCTTGGTAGGTGGCAA3' (7275-7294).

PCR I.: 5 µl cDNA oldatot adtunk 40 µl reakció keverékhez, mely tartalmazott 500 nM-t az outer primer szettből, 200 µM ΣdNTP-t, 2 U Taq polimerázt, Taq<sup>TM</sup> pufferban. Az első körben 40 ciklust végeztünk.

PCR II.: A második kört ugyanilyen összetevőkkel végeztük, kivéve, hogy a reakció keverék az első körből származó oldat 1 µl-jét tartalmazta a cDNS helyett, és az inner primereket használtuk. Ebben a körben az amplifikációs ciklusok száma 35 volt.

A ciklusok paraméterei a következők voltak: 94<sup>0</sup>C 1 perc, 60<sup>0</sup>C 1 perc, 72<sup>0</sup>C 1 perc. Egyszeres denaturációs lépéseket végeztünk az amplifikáció előtt 94<sup>0</sup>C-on 2 percig és utána 72<sup>0</sup>C-on 10 percig.

Mindkét amplifikációs ciklust PTC-1™ Programmable Thermo Controller-ben végeztük.

A PCR terméket 1.5%-os agaróz gél elektroforézissel analizáltuk és GenElute™ agaróz oszlopon tisztítottuk. A PCR termékek mindkét szálát szekvenáltuk Dyeterminater Cycle Sequence kit-tel (Perkin Elmer) 373 DNA szekvenátorral. A szekvencia analízist BioEdit programmal végeztük. A PKR-BR nukleotid szekvencia alapján kapott aminosav összetételét a HCV1b-J prototípus szerkezetéhez hasonlítottuk.

*Genetikai kapcsolatrendszer vizsgálata:* Az analizált aminosav szekvenciáinak kapcsolatrendszerét NETWORK 2.0 program felhasználásával vizsgáltuk (86).

*Statisztikai analízis:* A minőségi adatokat Chi-Square teszttel, a mennyiségi változókat pedig Mann-Whitney U teszttel analizáltuk SPSS-es v.10 szoftver felhasználásával. A 0.05-nél kisebb P értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

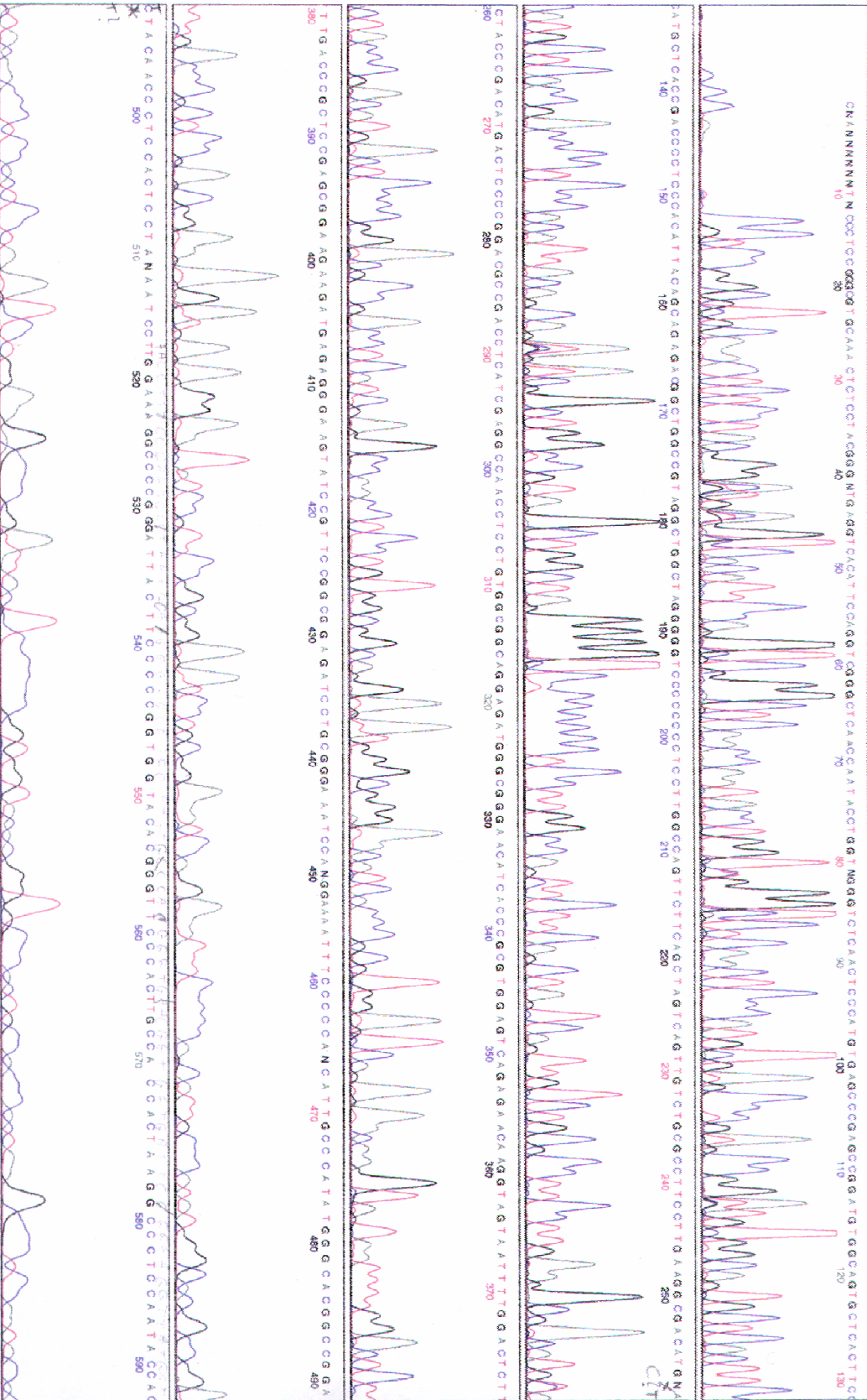
## **Eredmények**

A vizsgált 21 betegünkben 3 beteg lett tartósan gyógyult (sustained responder), 18 beteg a terápia felfüggesztése után vírus pozitív maradt (non-responder). A monoterápiával kezelt csoportban 1 tartósan reagáló és 10 nem reagáló beteg volt, a kombinációs terápiás csoportban 2 tartós reagáló és 8 nem reagáló volt. A nemzetközi normáknak megfelelően non-respondernek definiáltuk azokat a betegeket is (6/21), akiknél a kezelés végén normál ALT és negatív HCV-RNS értéket találtunk, de az utánkövetési időszakban újra vírus pozitívvá váltak ("transient responder"). Az életkor és a nemi megoszlás hasonló volt a tartósan reagáló és a nem reagáló csoportban. Betegeink PKR-BR aminosav szekvencia eredményei 8. táblázatban láthatóak.

Vírus szekvencia eredményeink a nemzetközi NCBI GenBank-ban AF 522299-AF 522320 sorszámokkal nyilvántartásba kerültek és az NCBI Home Page-n: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) alatt megtekinthetőek. 8. táblázat

Az összes vizsgált mintát véve az aminosav szubsztitúciók száma 0-7 között váltakozott az ISD régióban, és 3-6 között volt a II. régióban. Az ISDR aminosav változásainak median értéke a tartósan reagálóknál 3, a nem reagálóknál 0.5 volt. Bár ez a különbség jelentős, de statisztikailag nem szignifikáns. 9. táblázat

Az IFN rezisztens betegeknél a 2218 aminosav pozícióban az összes eset közel egyharmadában (6/21) hisztidin helyett arginint találtunk. A szubsztitúciónak ezt a típusát egy esetben sem észleltük az IFN-ra reagálóknál. Ez a jelenség megerősíti *Frangoul és munkatársai* korábbi eredményeit, akik összefüggést találtak a non-responder státusz és az arginin jelenléte között a 2218-as pozícióban (87). A PKR-BR II. régiójának domináns szubsztitúciós helyei a 2259 (20/21), 2262 (21/21) és a 2266 (14/21) aminosavak voltak, más pozíciókban lévő aminosav változások aránya nem haladta meg az 50%-ot.



9. táblázat: Betegeink HCV 1b PKR kötő régió aminosav szerkezetének összehasonlítása a HCV 1b-J prototípussal

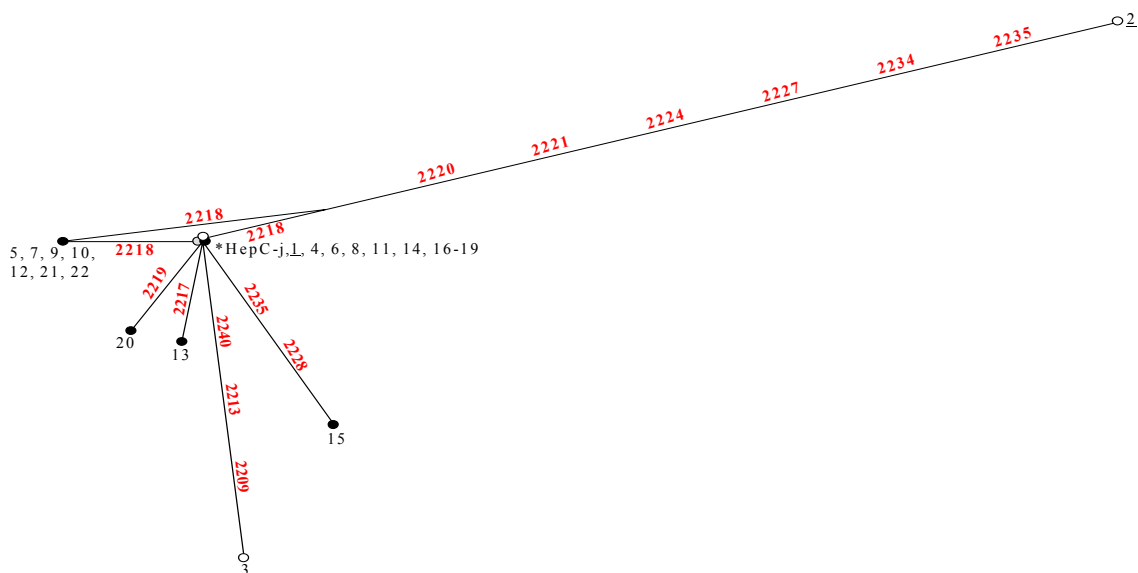
aa 2209		2248		2274
↓		↓		↓
<b>HCV 1b (HCV-J)</b>				
<u>PSLKATCTTHDSPDADLIEANLLWRQEMGNITRVESENKVVILDSFDPIRAVEDEREISVPAEI</u>				
<b>SR</b>			Number of mutations	
				↓
1	-----	-----	LQ-E--G-----	0+4
2	-----	Y-GP-G-V-----	WR-----L-TE-G-G-----	7+5
3	L--P-----	-----	I-----V--E-G-G-----	3+4
<b>NR (TR+NR)</b>				
4	-----	-----	L--E--G-----	0+3
5	-----	R-----	-----L--E---V-----	1+3
6	-----	-----	-----I-----L--E--G-----	0+4
7	-----	R-----	-----L--E---V-----	1+3
8	-----	-----	-----LQ-E--GG---A---	0+6
9	-----	R-----	-----LK-E--G-V-----	1+5
10	-----	R-----	-----L--E--G-V-----	1+4
11	-----	-----	-----L--E--G-----	0+3
12	-----	R-----	-----L--E---V-I-----	1+4
13	-----	A-----	-----LH-E--G-----	1+4
14	-----	-----	-----LQ-E--G-----	0+4
15	-----	-----	-----Q-----K-----LY-E---V-----	2+4
16	-----	-----	-----L--E-G--V-----	0+4
17	-----	-----	-----L--E--G-V-I-----	0+5
18	-----	-----	-----L--E--G-----	0+3
19	-----	-----	-----L--E--G-----	0+3
20	-----	R-----	-----L--E--GG-----	1+4
21	-----	R-----	-----L--E---V-----	1+3

A 2259-ben az esetek 95%-ában leucin helyettesítette az izoleucint (20/21), egy betegnél pedig valin. A 2262-es pozícióban lévő valin helyett minden betegünkél glutaminsavat (21/21) találtunk, a 2266 pozícióban lévő arginint pedig 67%-ban (14/21) glicin helyettesítette. A II. régió aminosav cseréi nem bizonyultak csoportspecifikusnak a terápiára adott válasz tekintetében. A nem említett pozíciókban lévő aminosav változások aránya nem haladta meg az 50%-ot.

Az ISDR szerkezetét elemezve azt találtuk, hogy a "sustained responder" csoportban 1/3:1/3:1/3 volt a „vad”-, az „intermedier”- és a „mutáns”-típusok aránya. "Non-responder"-ek között ez az arány 1/2:1/2:0 volt.

*Megállapítottuk*, hogy az IFN terápia eredményessége függ az ISDR típusától ( $p=0.043$ ) és a mutáns típusú HCV 1b fertőzésnek prediktív értéke van a "sustained responder" státuszra ( $p=0.012$ ). Hasonló prediktív értéket sem a HCV 1b „vad”-, sem az „intermedier”- típusánál nem találtunk. Szignifikáns összefüggést találtunk még a tartós gyógyulás és a májbiopszia módosított HAI staging score-ja között. A gyógyultaknál ez jelentősen alacsonyabb volt, mint a nem reagálóknál (median: 0 v. 2,  $p=0.017$ ). Nem találtunk összefüggést a terápiás kimenetel és a többi vizsgált klinikai változó között.

*Genetikai kapcsolatrendszer vizsgálat eredménye:* Elemeztük az izolált HCV 1b ISDR aminosav szekvenciái közötti kapcsolatot. Referenciaként a HCV J-t használtuk. Amint az ábrából látható, nem találtunk olyan aminosavat, melyből eredő szekvenciák jól elkülönült rendszert alkottak volna. Ez arra utal, hogy nincsen olyan jól meghatározott mutáció vagy mutáció kombináció, melynek jelenléte szükséges és egyértelműen előre jelzi a terápiára adott választ: ld. az alábbi ábra.



## Következtetés

A HCV 1b ISDR régiójában lévő mutációk és az IFN terápia közötti összefüggést vizsgáltuk 21 magyar betegnél. A tanulmány eredményei megegyeznek azzal a japán megállapítással, hogy összefüggés van az ISDR típusa és a terápiára mutatott reagálás között. Magyar betegeinknél is azt találtuk, hogy a mutáns típusú ISDR prediktív értékű a pozitív terápiás eredményre, de a vírus IFN érzékenysége független a mutációk helyétől. Bár a 2218-as pozícióban a hisztidin arginin átalakulás csak a non respondereknél található, ez egyedül nem tudja megmagyarázni a vírus IFN érzékenységi státuszát, mivel a 18 nem reagálóból 12-nél ez az aminosav változás hiányzik.

A vizsgált klinikai paraméterek közül a módosított HAI staging score mutat összefüggést a kezelés eredményével. A sustained responder betegeknél ez a pontszám szignifikánsan alacsonyabb.

Az azonos mutációk magas aránya a 2259 (95%), a 2262 (100%) és a 2266 (71%) azt igazolja, hogy a HCV 1b quasispecies prototípusa különbözik a HCV-J-től Magyarországon. Az analizált minták alapján a PKR-BR leggyakoribb aminosav szekvenciája Magyarországon a következő:

PSLKATCTTHHDSPPADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFDPLRAEEDEGEISVPAEI

Ez az eredmény felhívja a figyelmet arra, hogy a krónikus HCV fertőzés nemzetközi kutatási eredményeit csak bizonyos elővigyázatossággal szabad magyar betegekre alkalmazni.

A "sustained responder" betegek alacsony száma korlátozza a tanulmány statisztikai erejét, mely magyarázatot ad az ISDR aminosav szubsztitúciók teljes számában talált nem szignifikáns különbségre. A kis elemszám azonban természetes következménye annak, hogy hazánkban kevés a tartósan reagáló, krónikus HCV 1b fertőzésből véglegesen meggyógyult beteg. A vizsgált betegek számát esetünkben tovább csökkentette az alkalmassági szelektálás.

Elővigyázatossággal kell kezelni azoknak a betegeknek a besorolását is, akik kezdetben reagáltak az IFN-ra (normál ALT szint és negatív HCV-RNS-PCR), de pozitívvá váltak az utánkövetési periódusban (6/21). Vitatható az a nemzetközileg alkalmazott, *Enomoto és munkatársai* által bevezetett beosztás, mely szerint ezen a tranziens responder betegeket a non-responder csoportba soroljuk. Különböző tudományos elméletek vannak az átmeneti reagálás mechanizmusára, de egyiket sem sikerült még



hitelesen bizonyítani. A betegek pontosabb csoportosítása érdekében a tranziens responder betegek kezelés utáni szérum mintáit a későbbiekben tovább kellene vizsgálni.

## **5. KÖVETKEZTETÉSEK**

A gasztroenterológián belül 10 éve foglalkozom kiemelten a vírushepatitisek klinikumával és diagnosztikájával. Az eltelt évek forradalmian új tudományos, diagnosztikai és terápiás nemzetközi eredményei és a mindennapok gyógyító munkája során nyert tapasztalataim odavezettek, hogy az utóbbi években a hepatológia már nem csak a munkámat, hanem a szórakozásomat is jelentette. A klinikum és a laboratóriumi munka együttművelése lehetővé tette számomra a betegellátás során felmerült diagnosztikai és terápiás kérdések megoldását.

A világban folyó intenzív kutatómunka eredményei ellenére még igen hiányosak ismereteink erről a betegcsoportról. Nem minden vírus esetében ismerjük pontosan az infekció módját, pathomechanizmusát, elégtelen a terápiánk, nincs meg a C hepatitis prevenciójához szükséges vakcina.

Osztályunk Víruszserológiai Laboratóriumában a vírushepatitisek diagnosztikáját nemzetközi protokollok alapján állítottuk be és igyekeztünk naprakészen újítani. Vizsgálataink a hazai összes májcentrum számára a mai napig elérhetőek.

Az e témában végzett kutatásaim célja a magyarországi hepatitis vírusok tulajdonságainak megismerése és új magyar adatok szolgáltatása volt.

Az elmúlt 10 év tapasztalataiból a krónikus vírushepatitisek diagnosztikájával kapcsolatban az alábbi következtetésekre jutottam:

- A véradók és a betegek szűrésére és kezelésükhöz mindig a legspecifikusabb és szenzitívebb teszteket kell felhasználni.
- A vizsgálati eredmények egységesek és összehasonlíthatóak legyenek.
- A diagnosztikus „ablak periódus” szűkítésére kell törekedni.
- Az IFN terápia megkezdése előtt fontos a differenciáldiagnosztikai vizsgálatok elvégzése.
- Specifikus molekuláris biológiai technikákkal fel kell ismernünk a hagyományos módszerekkel meghatározhatatlan atípusos mutánsokat.
- A terápiás prediktív markerek monitorozása javasolt: bazális vírustömeg (HBV-DNS, HCV-RNS), anti-HCV IgM, HCV szubtypus meghatározás, terápia alatti vírus kinetika követés, májbiopszia staging score.

- A vírus markerek időben történő mérésével racionalizálhatjuk az antivirális terápia dózisát és a kezelés idejét.
- A terápia eredményét csak PCR alapú, validált nukleinsav vizsgálat alapján szabad kimondani.
- A vizsgálatok centralizálásával a költségek csökkenthetők és gyakorlott asszisztenciával a technikai hibák száma minimalizálható.

**Kutatási eredményeimből az alábbi megállapításokra jutottam:**

- A lamivudin kezelés alatt a HBV DNS polimeráz C és B domén mutációi következtében megjelenő terápia rezisztens mutánsok meghatározásával lehetővé vált az antivirális terápia szükség szerinti módosítása.
- A negatív anti-HCV IgM jó előrejelzője az eredményes IFN terápiának. IFN kezelés alatt perzisztáló anti-HCV IgM pozitivitás a terápiás válasz negatív prediktív jelzője.
- A tisztázatlan etiológiájú, de klinikailag vírushepatitisnek tűnő esetekben a szubtypusokra érzékenyített fokozott szenzitivitású és specificitású IV. generációs ellenanyag teszttel a diagnózis pontosítható. A vizsgálat immunszupprimált betegeknél javasolt.
- A HCV típus és szubtypus analízisével a magyarországi betegek 91.5%-os 1b fertőzöttségét igazoltuk, mely magyarázza az IFN terápiával elért gyenge, 10% sustained responder választ. Ennek ismeretében a nagyobb dózisú és tartósabb antivirális kezelés indokolt.
- Az 1a szubtypusú betegeinkben szignifikánsan alacsonyabb terápia előtti vírus szintet találtunk. ( $p < 0.01$ ).
- A betegeinkből izolált HCV 1b PKR kötő régió nukleotid szekvencia vizsgálata azt mutatja, hogy a HCV1b magyarországi prototípusa szerkezetét tekintve különbözik a nemzetközileg elfogadott HCV 1b-J (japán) prototípustól.
- A HCV1b ISD régió aminosav szubsztitúciókon alapuló típusa és az IFN terápiára mutatott reagálás között szignifikáns összefüggés van. A 2218 pozíciójú aminosav hisztidinről argininre történő cseréjét a terápiára nem reagáló, non responder csoportra jellemzőnek találtuk.
- Az IFN terápia eredményességét alapvetően befolyásoló virális és gazdai tényezők: a kezelés előtti vírus titer nagysága, a terápia alatti vírus clearance sebessége, az anti HCV IgM pezisztálása, a HCV szubtypus és a májbiopszia HAI staging score.

## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

- Köszönettel és hálával tartozom Dr. Varró Vince Professzor Úrnak, aki pályám kezdetén lebilincselő egyéniségével a belgyógyászat és a gasztroenterológia mellett a kutatómunkát is megszerettette velem és az utána következő évtizedekben is támogatott és segített.
- Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Gógl Árpádnak, főorvosomnak, akinek a támogatásával jött létre laboratóriumunk és a vezetése alatt eltöltött két évtized színes, változatos és magas színvonalú gyógyító munkája képezte disszertációm alapját.
- Hálásan köszönöm témavezetőmnek Dr. Tulassay Zsolt Professzor Úrnak szakmai tanácsait, támogatását és az irányomba megnyilvánuló bizalmát.
- Köszönöm Dr. Raskó István Professzor Úrnak, a MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet Igazgatójának szakmai tanácsait és az intézetében végzett munkám támogatását.
- Köszönöm leányomnak, Juditnak, társszerzőmnek és lektoromnak a szakmai segítséget és az építő kritikákat.
- Kiemelt köszönetet szeretnék mondani asszisztensnőimnek, Papp Istvánnénak, Szabóné, Bartha Katalinnak, és Bakiné, H. Erikának a sok éves együttműködésünk alatt végzett pontos, lelkes és lelkiismeretes munkájukért.
- Köszönöm Czibula Ágnes és Kalmár Tibor biológusoknak és fiamnak, Gábornak munkámhoz nyújtott technikai segítségüket és szakmai tanácsaikat.
- Köszönettel tartozom Dr. Endrőczy Elemér Professzor Úrnak, aki mint az Országos Laboratóriumi Intézet Igazgatója támogatta laboratóriumi tevékenységünket.
- Hálás köszönet osztályunk orvosainak, főnővérünknek, László Bélánénak, részlegünk nővéreinek és minden dolgozójának, hogy munkámhoz nyugodt és megbízható „háterszágot” biztosítottak. Köszönöm adminisztrátorunknak, Rieder Zsuzsának a disszertáció kivitelezéséhez nyújtott segítségét.
- Köszönöm a Fejér Megyei Szent György Kórház vezetésének tudományos munkám támogatását.
- És utoljára, de nem utolsó sorban férjemnek szeretném megköszönni mindazt a szeretetet, a türelmet, támogatást és megértést, amellyel mindig is körülvett és mellyel nagyban segítette munkámat is.

## **7. IRODALOMJEGYZÉK**

1. Beasley RP: Hepatitis B vírus: the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988; 61:1942-1956.
2. Blum E. Hubert: Variants of Hepatitis B, C and D Viruses: Molecular Biology and Clinical Significance. *Digestion* 1995; 56:85-95.
3. Swenson D.P., Van Geyt C., Russel Alexander E., és mtsai: Hepatitis B Virus Genotypes and HBsAg Subtypes in Refugees and Injection Drug Users in the United States Determined by LiPA and Monoclonal EIA. *J Med Virol* 2001;64:305-311.
4. Anna S.F. Lok and Brian J. McMahon: Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34:1225-1241.
5. Roure C.: Overview of epidemiology and disease burden of hepatitis B in the European region. *Vaccine* 1995;13.(Suppl.):S18-21.
6. Péter Cs., Boldizsár M, Fodor E.: A transzfúziológia népegészségügyi vonatkozásai Szabolcs-Szatmár-Bereg Megyében 1993-1998 között. *Kórház* 7; 1:37-40.
7. Berencsi Gy.: A hepatitis B-vírus fertőzésről. *Magyar Orvos* 2002; X: 46-47.
8. Dömök I.: Az influenzától az AIDS-ig: eredmények, elemzések, aggályok. *Egészségtudomány* 1997; 41:194-210.
9. Tóth I., Wágenhoffer K., Vörös K.: Adonorok vírusszerológiai szűréseinek (HIV, HCV, HsAg) tapasztalatai a Petz Aladár Megyei Kórház Vértranszfúziós Osztályán (1986-1997). *Transzfúzió* 1998; 31:107-110.
10. Kékesi Zs., Nika M., Mikola I.: A terhesek hepatitis B szűrésével és a vírus vertikális transzmissziójával szerzett tapasztalataink. *Orvosi Hetilap* 1993;.134:1515-1520.
11. Lehel F., Csajbókné B.M., Hangyál Zs.: Hepatitis vírusfertőzések jelentősége kórházi dolgozók körében. *Orvosi Hetilap* 1998; 139: 115-119.

12. Budai József: Vírushepatitisek elleni védőoltások. *Medicus Anonymus* 1996; 4:17.
13. Realdi G., Fattovich G., Hadziyannis S., Schalm S.W., Almasio P., Sanchez-Tapias J., Christensen E., et al: Survival and prognostic factors in 366 patients with compensated cirrhosis type B: a multicenter study. The investigators of the European Concerted Action of Viral Hepatitis (EUROHEP). *J Hepatol* 1994;21:656-666.
14. De Jongh F.E., Janssen H.L.A., De Man F.A., Hop W.C.J., Schalm S.W., Van Blankenstein M.V.: Survival and prognostic indicators in hepatitis B surface antigen-positive cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1992;102:1630-1635.
15. Ternák G. és mtsai.: A delta antitest előfordulása különböző HBsAg pozitív májbeteggekben. *Orvosi Hetilap* 1985;12:1075.
16. Horváth G. és mtsai.: A hepatitis delta vírus klinikai jelentősége és előfordulása B víruspozitív idült májbetegségekben. *Orvosi Hetilap* 1992;133. Suppl. I: 39-24.
17. Gaeta G.B., Stroffolini T., Chiaramonte M. és mtsai.: Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study. *Hepatology* 2000; 32:824-827
18. Lai M.M., Lee C.M., Bih Fy, Govindarajan S.: The molecular basis of heterogeneity of hepatitis delta virus. *J Hepatol* 1991;13 (suppl 4): S121-S124.
19. Simmonds P., Alberfi A., Alter J.H. és mtsai.: A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;5:1321-1324.
20. Okamoto H., Kurai K., Okada S.I., Yamamoto K., Lizuka H., Tanaka T., et al: Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: Comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 1992;188:331-341.
21. Dusheiko G., Schmilovitz-Weiss H., Brown D., McOmish F., Yap P.L., Sherlock Sheila et al: Hepatitis C virus genotypes: An investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994;19:13-18.

22. Maertens G., Stuyver L.: Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: The molecular medicine of viral hepatitis. Harrison T.J, Zuckerman A.J. (editors) London: John Wiley & Sons Ltd 1997. pp. 183-233.
23. Bréchet C.: Hepatitis C virus. Molecular biology and genetic variability. Digest Dis Sci 1996; 41(suppl):6S-21S.
24. Beard M.R., Abell G., Honda M., Carroll A., Gartland M., Clarke B. et al: An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus. Hepatology 1999;30:316-324.
25. Mellor J., Holmes E., Jarvis L., Yap P., Simmonds P.: Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. J Gen Virol 1995;76:2493-2507.
26. Tokita H., Okamoto H., Iizuka H., Kishimoto J., Tsuda F. et al: Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. J Gen Virol 1996;77: 293-301.
27. Martinot-Peignoux M., Roudot-Thoroval F., Mendel I., Coste J., Izopet J., Duverlie G. et al: Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. J Viral Hepatitis 1999;6:435-443.
28. Vince A., Palmovic D., Kutela N., Sonicky Z., Jeren T., Radovani M.: HCV genotypes in patients with chronic hepatitis C in Croatia. Infection 1998;26:173/37-177/41.
29. Saracco G., Rizzetto M.: Predictors of response to interferon therapy. Digest Dis Sci 1996; 41:115S-120S.
30. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. J Hepatol 1999;30:956-961.

31. Webster G., Barnes E., Brown D., Dusheiko G.: HCV genotypes – role in pathogenesis of disease and response to therapy. In: *Baillière's Clinical Gastroenterology. Hepatitis C*. Tytgat G.N.J., Forster G.R.(editors). London: Harcourt Publishert Ltd; 2000. pp. 229-240.
32. Bréchet C.: Hepatitis C virus genetic variability: Clinical implications. *Am J Gastroenterol* 1994;89: S41-S47.
33. Féray C., Gigou M., Didier S., Paradis V., Mishiro S., Maertens G et al: Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995;108:1088-1096.
34. Gane J. E., Naoumov V. N., Qian Ke-Ping, Mondelli U. M., Maertens G., Portmann C. et al: A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* 1996;110:167-177.
35. Prieto M., Berenguer M., Rayón M. J, Cordoba J., Argüello L., Carrasco D. et al: High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: Relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29:250-256.
36. Saito I., Miyamura T., Ohbayashi A., Harada H., Katayama T., Kikuchi S. et al: Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6547-6549.
37. Silini E., Bottelli R., Asti M., Bruno S., Candusso M. E., Brambilla S. et al: Hepatitis C virus genotypes in cirrhosis:A case-control study. *Gastroenterology* 1996;111:199-205.
38. Kiyosawa K., Tanaka E., Sodeyama T.: Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma. In:*Hepatitis C virus*. Reesink HW (editor). Basel: Karger; 1998. pp.161-180.
39. Zeuzem S., Lee Jung-Hun, Franke A., Rüter B., Prümmer O., Herrmann G. et al. Quantification of the initial decline of serum hepatitis C virus RNA and response to interferon alfa. *Hepatology* 1998;27:1149-1156.

40. Brouwer J. T., Nevens F., Kleter B., Elewaut A., Adler M., Brenard R., Chamuleau R. A. et al: Efficacy of interferon dose and prediction of response in chronic hepatitis C: Benelux study in 336 patients. *J Hepatol* 1998;28:951-959.
41. Pár A., Gervain J., Gógl Á.: Hepatitis C virus infection: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Scand J Gastroenterol* 1998;33 Suppl:107-114.
42. McOmish F., Yap P. L., Down B. C., Follett E.A.C., Seed C., Keller A.J. et al: Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: An international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994;32:884-892.
43. Freemann J. A., Dore J. G, Law G. M., Thorpe M., Overbeck J., Lloyd R.A et al: Estimating Progression to Cirrhosis in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* 2001;34:809-816.
44. Mihály I., Lukács A., Telegdy L., Ibrányi E.: Egészségügyi dolgozók C hepatitis szűrővizsgálata a Szent László Kórházban. *Orvosi Hetilap* 1996;137:2791-2794.
45. Kiss A., Lotz G., Kaposi Novák P., Schaff Zs.: Hepatitis vírusok és hepatocarcinogenesis. *Orvosi Hetilap* 2002;143:(2 szám) 83-86.
46. Chi-Jen Chu, Anna Suk-Fong Lok: Clinical utility in quantifying serum HBV DNA levels using PCR assays. *J Hepatol* 2002;36:549-551.
47. Schaff Zs., Kovalszky I., Nagy P., Zalatnai A., Jeney A., Lapsis K.: Human and experimental hepatocarcinogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1998; 228:90-97.
48. Jean-Pierre Villeneuve, Lynn D. Condeay, Bernard Willems és mtsai.: Lamivudine treatment for decompensated cirrhosis resulting from chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000;31: 207-210.
49. Chutima Pramoolsinsup: Management of viral hepatitis B. Quadrennial Review. *J Gastroen. Hepatol* 2002;17(Suppl.):126-146.



50. Chau-Ting Yeh, Rong-Nan Chien, Chia-Ming Chu and Yun-Fan Liaw: Clearance of the Original Hepatitis B Virus YMDD-Motif Mutants With Emergence of Distinct Lamivudine-Resistant Mutants During Prolonged Lamivudine Therapy. *Hepatology* 2000;31:1318-1324.
51. Lieven Stuyver, Caroline Van Geyt, Sija De Gendt és mtsai.: Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-707.
52. Marchelle I. Allen, Josee Gauthier, Manon Deslauriers és mtsai.: Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol* 1999;37:3338-3347.
53. Peter M. Rosenberg MD, Jules L. Dienstag MD: Therapy with nucleoside analogues for hepatitis B virus infection. *Clinics in Liver Disease* 1999;3:349-361.
54. Nanhua Yao, Zhi Hong, Johnson Y. N. Lau: Application of structural biology tools in the study of viral hepatitis and the design of antiviral therapy. *Gastroenterology* 2002; 123:1350-1363.
55. Benhamou Y., Bochet M., Thibault V., és mtsai.: Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine-resistant hepatitis B virus: an open-label pilot study. *Lancet* 2001;358:718-723.
56. Perrillo R., Schiff E., Yoshida E. és mtsai.: Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology* 2000;32:129-134.
57. Leung N.W.Y., Lai C.L., Chang T.T. és mtsai.: Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001;33:1527-1532.
58. Toshihiko Kirishima, Takeshi Okanoue, Yukiko Daimon és mtsai: Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002;37:259-265.

59. Stephan W Aberle, Josef Kletzmayr, Bruno Watschinger és mtsai.: Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine-resistant hepatitis B vírus strains in patients under various clinical conditions. *J Clin Microbiol* 2001;39:1972-1974.
60. Dianzani F.: The Interferon system: definition and types. *The Interferon System*. Helth Sciences Press, English Edition. 1993; 7-40.
61. Ferdinando D.: The interferon system: definition and types. *The Interferon System*. Hels Sciences press. English Edition 1993; 7-45.
62. Martinot-Peignoux M, Marcellin P., Pouteau M. et al: Pretreatment serum hepatitis C vírus RNA levels and hepatitis c vírus genotype are the main and independent progroscopic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995;22:1050-6.
63. Zeuzenn S., Hermann E., Lee J.H, et al: Viral kinetics in atients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha2 $\alpha$ . *Gastroenterology* 2001;120:1438-1447.
64. Durand F., Beauplet A.: Evidence of hepatitis C virus viremia without detectable antibody to hepatitis C virus in a blood donor. *J Intern Med* 2000;133:74.
65. Jean-Michel Pawlotsky, Francoise Darthuy, Jocelyne Rémiré, Claire Pellet, Lauer Udin, Lieven Stuyver et al: Significance of Anti-Hepatitis C Virus Core IgM Antibodies in Patients With Chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology* 1995; 47:285-291.
66. Tassopoulos N.C., Hatzakis A.E., Papatheodoridis G.V., Karvountzis G., Troonen H., Lennartz L.: Early prediction os successful alpha-interferon therapy of chronic hepatitis C by core-IgM antibodies to hepatitis C virus. *J Hepatol* 1994; 20:305-6.
67. Szalay F.: A hepatitis C diagnosztikájának és kezelésének ellentmondásai (Kommentár). *Orvostovábbképző Szemle* 1998;5 (2. szám) 71-74. 76-77.

68. Pár A., Telegdy L., Dalmi L. és mtsai: Therapy for chronic hepatitis C. *J. Physiology-Paris* 95;2001: 399-405.
69. Gervain J., Simon G. jr., Papp I. és mtsa: A magyarországi krónikus „C” vírushepatitises betegek vírustípus- és szubtípus-meghatározása. *Orvosi Hetilap* 2001; 142: 1315-1319.
70. Trépo C., Pradat P.: Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J.Hepatol* 1999; 31:(Suppl.1):80-83.
71. Kato N., Hijikata M., Ootsuyama Y., Nakagawa M., Ohkoshi S., Sugimura T. and Shimotohno K.: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A,non-B hepatitis.*Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9524-8.
72. Enomoto N., Takada A., Nakao T., Date T.: There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:1021-1025.
73. Okamoto H., Okada S., Sugiyama Y., Kurai K., Iizuka H., Machida A et al: Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991;72:2697-2704.
74. Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurosaki M., Murakami T., Yamamoto C. et al: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77-81.
75. Gale M.J., Korth M.J., Tang N.M., Tan S.L., Hopkins D.A., Dever T.E. et al: Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997;230:217-227.
76. Brechot C.: The direct interplay between HCV NS5A protein and infection transduction signal: from clinical to basic science. *J Hepatol* 1999;30:1152-1154.

77. Rispeter K., Lu M., Zibert A., Wiese M., Oliveira J.M. and Roggerdorf M.: The „interferon sensitivity determining region” of hepatitis C virus is a stable sequence element. *J. Hepatol* 1998;29:352-361.
78. Witherell G.W. and Beineke P.: Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J Med Virol* 2001;63:8-16.
79. Zeuzem S., Lee J.H., Roth W.K.: Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alpha. *Hepatology* 1997; 25: 740-744.
80. Squadrito G., Orlando M.E., Cacciola I., Rumi M.G., Artini M., Piciotto A. et al.: Long-term response to interferon alpha is unrelated to „interferon sensitivity determining region” variability in patients with chronic hepatitis C virus-1b infection. *J Hepatol* 1999;30:1023-1027.
81. Nakano I., Fukuda Y., Katano Y., Nakano S., Kumada T., Hayakawa T.: Why is the interferon sensitivity-determining region (ISDR) system useful in Japan? *J Hepatol* 1999;30:1014-1022.
82. Noursbaum J.B., Polyak S.J., Ray S.C., Sullivan D.G., Larson A.M., Carithers R.L. and Gretch D.R.: Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J Virol* 2000;74:9028-9038.
83. Sarrazin C., Berg T., Lee J.H., Teuber G., Dietric C.F., Roth W.K. and Zeuzem S.: Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J. Hepatol* 1999;30:1004-1013.
84. Watanabe H., Enomoto N., Nagayama K., Izumi N., Marumo F., Sato C and Watanabe M.: Number and position of mutations in the interferon (IFN) sensitivity-determining region of the gene for nonstructural protein 5A correlate with IFN efficacy in hepatitis C virus genotype 1b infection. *J Infect Diseases* 2001;183:1195-1203.

85. Ishak K., Baptista A., Bianchi L., Callea F., De Groote J., Gudat F., et al: Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
86. Brandelt H.J., Forster P. and Rohl A.: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
87. Frangeul L., Creasta P., Perrin M., Lunel F., Opolon P., Agut H. and Huraux J.M.: Mutations in NS5A region of hepatitis C virus genome correlate with presence of NS5A antibodies and response to interferon therapy for most common European hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 1998;28:1674-1679.
88. Gervain J., Gógl Á.: Új lehetőségek a krónikus C hepatitis diagnosztikájában (HCV-RNA-PCR: kvalitatív, kvantitatív meghatározás, anti-HCV-IgM, C vírus serotypus). *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 1996;23:3.100
89. J. Gervain, Á. Gógl: Predictive markers of the efficiency of the interferon therapy in chronic hepatitis C. 7<sup>th</sup> International Congress for Infections Diseases, Hong Kong 1996. Abstract book 15.018.
90. J. Gervain: Monitoring of serum HCV RNA in interferon monotherapy and interferon – ribavirin combined therapy in chronic HCV infection. *Z Gastroenterol* 1999;37:418.

## **8. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**

### ***Könyvfejezet:***

- 1. GERVAIN J., GÓGL Á.:** A cirrhosis következményei és szövődményei.. Varró: Gastroenterologia Medicina 1997. 500-507.
- 2. G. LENGYEL, J. FEHÉR (co-ordinators), L. DALMI, K. DÁVID, J. GERVAIN, Á. GÓGL, J. LONOVICS, ZS. OZSVÁR, A. PÁR, F. SCHNEIDER, ZS. TULASSAY:** Recombinant Interferon  $\alpha$ 2b Treatment for Chronic Hepatitis C. A Prospective Multicenter Study in Hungary. Cell Injury and Protection in the Gastrointestinal Tract (Ed: Gy. Mózsik et al.) Kluwer Academic Publishers, Hollandia, 1997. 279-286.
- 3. J. FEHÉR, G. LENGYEL (co-ordinators), L. DALMI, K. DÁVID, J. GERVAIN, Á. GÓGL, J. LONOVICS, ZS. OZSVÁR, A. PÁR, F. SCHNEIDER, ZS. TULASSAY:** Long-term Interferon- $\alpha$ 2b Therapy in Chronic Hepatitis B. A Prospective Multicenter Study in Hungary. Cell Injury and Protection in the Gastrointestinal Tract (Ed: Gy. Mózsik et al.) Kluwer Academic Publishers, Hollandia, 1997. 305-311.

### ***Saját közleményeim jegyzéke:***

- 1. PÁR A., PAÁL M., GÓGL Á., GERVAIN J., SZEKERES J., SIPOS J., BERÓ T., HÜTTER E., BERENCSI GY., KÁDAS I., HEGEDŰS G., BRASCH GY., SZABOLCSI I.:** Klinikai immunológiai megfigyelések és interferon terápia krónikus C hepatitisben. Orvosi Hetilap, 1995. 136. 9-18.
- 2. GERVAIN J., GÓGL Á., KÁDAS I.:** Benignus rekuráló intrahepaticus cholestasis. Orvosi Hetilap, 1995. 136. 833-837.
- 3. FEHÉR J., LENGYEL G. (koordinátorok), DALMI L., DÁVID K., GERVAIN J., GÓGL Á., LONOVICS J., OZSVÁR ZS., PÁR A., SCHNEIDER F., TULASSAY ZS., WEISZ GY.:** Chronicus B hepatitisben szenvedő betegek interferon kezelése. Multicentrikus Tanulmány Gyógyszereink, 1995. 45. 249-253.

4. A. PÁR, M. PAÁL, Á. GÓGL, J. **GERVAIN**, J. SZEKERES-BARTHO, J. SIPOS, T. BERO, E. HÜTTER, GY. BERENCSI, I. HOLLÓSI, I. KÁDAS, G. HEGEDŰS, GY. BRASCH, I. SZABOLCSI, GY. MÓZSIK: Chronic hepatitis C: Clinical and immunological features and the effects of interferon treatment. *Int J Immunother*, 1995. XI(3) 115-127.
5. FEHÉR J., LENGYEL G., (koordinátorok), DALMI L., DÁVID K., **GERVAIN J.**, GÓGL Á., HORVÁTH G., LONOVICS J., LŐCSEI Z., OZSVÁR ZS., PÁR A., SCHNEIDER F., TOLVAJ GY., TULASSAY ZS., WEISZ GY.: Interferon  $\alpha 2b$  kezelés hatása chronicus C hepatitisben. *Orvosi Hetilap*, 1996. 137. 1179-1185.
6. J. FEHÉR, G. LENGYEL (co-ordinators), L. DALMI, K. DÁVID, **J. GERVAIN**, Á. GÓGL, G. HORVÁTH, Z. LŐCSEI, J. LONOVICS, ZS. OZSVÁR, A PÁR, F. SCHNEIDER, GY. TOLVAJ, ZS. TULASSAY, GY. WEISZ: Recombinant interferon  $\alpha 2b$  treatment for chronic hepatitis C. A prospective multicenter study in Hungary. *Folia Hepatologica*, 1996. 1. 1-5.
7. G. LENGYEL, J. FEHÉR (co-ordinators), L. DALMI, K. DÁVID, **J. GERVAIN**, Á. GÓGL, G. HORVÁTH, Z. LŐCSEI, J. LONOVICS, ZS. OZSVÁR, A PÁR, F. SCHNEIDER, GY. TOLVAJ, ZS. TULASSAY, GY. WEISZ: Long-term interferon  $\alpha 2b$  therapy in chronic hepatitis B. A prospective multicenter study in Hungary. *Folia Hepatologica* 1996. 1. 7-11.
8. **GERVAIN J.**, GÓGL Á., SZABÓ G., SIMON G. jr: Mekkora kockázattal jár a személyes kontaktus a C hepatitis vírus terjedésében? *Orvosi Hetilap*, 1997. 138. 607-609.
9. SIMON G. JR., **GERVAIN J.**, GÓGL Á.: Mennyibe kerül ma Magyarországon egy beteg B vírushepatitisének diagnosztikája és kezelése? *Orvosi Hetilap*, 1998. 139. 3155-3156.
10. GÓGL Á., **GERVAIN J.**, IZBÉKI F., REIBER I.: MTA Stratégiai kutatások. Életminőség javítása. Vírushepatitisek 1998. Tanulmánytervezet

11. A. PÁR, J. GERVAIN, Á. GÓGL: Hepatitis C virus infection: pathogenesis, diagnosis and treatment. Scand J Gastroenter, 1998.33 Supplementum 228:107-114.
12. PÁR A., TELEGDY L., GÓGL Á., MÜLLER É. és a Multicentrikus Tanulmány Munkacsoport ... GERVAIN J...: Krónikus vírushepatitisek interferon kezelése Magyarországon: 5 éves tapasztalatok. Multicentrikus tanulmány Orvosi Hetilap, 1999. 140. 1227-1233.
13. FEHÉR J., LENGYEL G., BÁLINT T., és a Multicentrikus Tanulmány Munkacsoport: ... GERVAIN J. ...: Interferon  $\alpha 2b$  és ribavirin kombinált kezelés krónikus C hepatitisben. 100 beteg 1 évig tartó kezelése során szerzett tapasztalatok. Orvosi Hetilap 1999. 140. 1235-1238.
14. GERVAIN J.: Májbetegek vérzési rendellenességei (Kommentár) Orvostovábbképző Szemle 2000; VII. 81-83.
15. GERVAIN J., SIMON G. jr., PAPP I, SZABÓNÉ B. K.: A magyarországi krónikus „C” vírushepatitises betegek vírustípus- és szubtípus- meghatározása. Orvosi Hetilap 2001. 142, 1315-1319.
16. GERVAIN J.: A krónikus C vírushepatitis diagnosztikája. Magyar Belorvosi Archívum 2001. 54, 154-162.
17. G. FIRNEISZ, P.L. LAKATOS, Hungarian Viral Hepatitis Study Group: ... J. GERVAIN ... and F. SZALAY: Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV, CD26) Activity in Chronic Hepatitis C. Scand J Gastroenter, 2001. 8. 877-880.
18. A. PAR, L. TELEGDY, L. DALMI, E. MÜLLER and Hungarian Viral Hepatitis Treatment Study Group: ... J. GERVAIN .....: Therapy for chronic hepatitis C. Journal of Physiology – Paris 95 (2001) 399-405.
19. GERVAIN J.: Krónikus B és Delta vírushepatitis szerológiai és molekuláris biológiai diagnosztikája. Magyar Belorvosi Archívum 2002. (közlésre benyújtva)



**20. GERVAIN J. CZIBULA Á., SIMON J., KALMÁR T.:** Krónikus C hepatitises betegekben izolált HCV 1b NS5A genom RNS-függő protein kináz kötő régiójának szerkezeti analízise és az interferon terápiával való összefüggésének vizsgálata. Orvosi Hetilap 2002. (közlésre elfogadva)

**21. J. GERVAIN, G. SIMON jr., J. SIMON and the Hungarian Viral Hepatitis Group:** Type and subtype distribution of hepatitis C virus in the Hungarian population with chronic viral hepatitis Eur J Gastroenterology 2002. (közlésre elfogadva)

**22. J. GERVAIN, Á. CIBULA, J. SIMON and T. KALMÁR:** Mutations in the Interferon Sensitivity Determining Region of Hepatitis C Virus 1b and response to interferon therapy in Hungarian patients Digestiv and Liver Diseases 2002. (közlésre benyújtva)

**23. GERVAIN J., PAPP I., CSÖNDES M., NEMESÁNSZKY E., RÁCZ I., RIBICZEY P., TELEGDY L., TORNAI I., WEISZ GY.:** Hepatitis B vírus lamivudin rezisztens mutánsainak a meghatározása. Orvosi Hetilap (közlésre elfogadva)

***Folyóiratokban megjelent idézhető előadáskivonatok***

**1. J. GERVAIN, Á. GÓGL, I. KÁDAS:** Benign recurrent intrahepatic cholestasis. Z Gastroenterol, 1991. 05. (Abstracts) 59.

**2. A. PÁR, M. PAÁL, Á. GÓGL, J. SIPOS, J. SZEKERES, J. GERVAIN, T. BERÓ, GY. BRASCH, E. HÜTTER GY. BERENCSI, GY. MÓZSIK:** Clinical and immunological features of patients with chronic hepatitis C and effects of interferon therapy. Magyar Belorvosi Archivum 1994. 47. 2<sup>nd</sup> Supplementum 117.

**3. A. PÁR, M. PAÁL, Á. GÓGL, J. SIPOS, J. SZEKERES, J. GERVAIN, T. BERÓ, GY. BRASCH, E. HÜTTER, G. BERENCSI:** Immunological alterations and HLA phenotypes in patients with chronic hepatitis C. J Hepatol, 1994. 21. Supplementum 1. S141.

4. F. IZBÉKI, T. SZABÓ, I. SZÉKELY, **J. GERVAIN**, Á. GÓGL: Characteristics of portal and splenic venous flow at duplex sonography in patients with esophageal varices. 10<sup>th</sup> Congress of Gastroenterology, 1994. october 2-7. Abstract Book 1597P
5. A. PÁR, M. PAÁL, A. GÓGL, B. SÁFRÁNY, J. SZEKERES-BARTHO, T. BERÓ, **J. GERVAIN**, GY. BRASCH, GY. MÓZSIK: Chronic hepatitis C: Lymphocyte subset and HLA studies and predictors of response to interferon treatment. 10<sup>th</sup> Congress of Gastroenterology, 1994. october 2-7. Abstract Book 2200P
6. GERVAIN J.: Krónikus vírushepatitisek interferon terápiaja. Magyar Belorvosi Archívum 1995. 2. Supplementum 95.
7. **GERVAIN J.**, GÓGL Á.: The diagnosis of chronic hepatitis from the view of the clinician. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 1995. 4. 172.
8. IZBÉKI F., SZABÓ T., SZÉKELY I., **GERVAIN J.**, GÓGL Á.: Portal and splenic venous flow found at duplex sonography in patients with esophageal varices. Z Gastroenterol, 1995. 5. 292.
9. **GERVAIN J.**: Krónikus vírushepatitisek interferon terápiaja. Magyar Belorvosi Archivum. Supplementum, 1995. 2. 95.
10. **J. GERVAIN**, Á GÓGL: Side effects of interferon-alpha treatment in patients with chronic hepatitis. X. International Congress of Liver Diseases. Basel 1995. oct. 19-21. Abstract book 106.
- 11.A. PAÁR, M. PAÁL, Á. GÓGL, **J. GERVAIN**, J. SZEKERES-BARTHO, J. SIPOS, T. BERÓ, E HÜTTER, I. HOLLÓS, GY. BERENCSI, I. KÁDAS, G. HEGEDŰS, GY. MÓZSIK: Clinical and immunological features of patients with chronic hepatitis C and the effect of interferon-alpha2b treatment. X. International Congress of Liver Diseases. Basel 1995. oct. 19-21. Abstract book 132.
12. **GERVAIN J.**, GÓGL Á.: Új lehetőségek a chronicus C hepatitis diagnosztikájában (HCV-RNA-PCR: kvalitatív, quntitatív meghatározás, anti-HCV-IgM, C vírus serotypus). Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 1996. 23. 3. 100.

- 13. J. GERVAIN, Á. GÓGL:** Predictive markers of the efficiency of the interferon therapy in chronic hepatitis C. 7<sup>th</sup> International Congress for Infectious Diseases, Hong Kong, 1996. június 10-13. Abstract book 15.018
- 14. GERVAIN J., GÓGL Á.:** A krónikus vírushepatitisek szerológiai diagnosztikai protokollja. Magyar Belorvosi Archivum, 1996. 49. Supplementum 2. 150.
- 15. J. GERVAIN, Á. GÓGL., G. SZABÓ, Z. THAN, T. KOVÁCS, M. ÜKÖS, I. SZIRMAI, A. MOLNÁR:** Rare diseases-diagnostic difficulties .Z Gastroenterol 1997. 35. 377.
- 16. GERVAIN J.:** Hogyan ésszerűsítsünk? Magyar Belorvosi Archivum, 1997. Supplementum 2.125.
- 17. SIMON G. jr., GERVAIN J., GÓGL Á., PINTÉR S.:** Mennyibe kerül a B, C és Delta hepatitis diagnosztikája ma Magyarországon? Klinikai és Kísértletes Laboratóriumi Medicina 1997. 24. 3. 153.
- 18. A. PÁR, L. TELEGDY, A. GÓGL, E. MÜLLER, The Hungarian HCV Study Group: ... J. GERVAIN...:** Five-year experiences on interferon treatment of 1029 patients with chronic viral hepatitis. Digestion, 1998. 59. Supplementum 3. 312.
- 19. A. PÁR, L. TELEGDY, Á. GÓGL, ... J. GERVAIN:** Five-years experiences on interferon treatment of 1029 patients with chronic viral hepatitis. Digestion, Supplementum, 1998. 59. 312.
- 20. A. PÁR, (co-ordinator) and .... J. GERVAIN:** Experiences on Interferon treatment of patients with chronic viral hepatitis in Hungary during a five-year period. Diges Surg 1999. 16. Supplementum 1. 40.
- 21. J. GERVAIN:** Monitoring of serum HCV RNA in interferon monotherapy and interferon - ribavirin combined therapy in chronic HCV infection. Z Gastroenterol, 1999. 37. 418.

22. G. FIRNEISZ, P.L. LALATOS, GY. RÁKÓCZI, M. HORÁNYI, **J. GERVAIN**, F. SZALAY: Serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV, CD26) activity in patients with chronic hepatitis C. *Z Gastroenterol*, 1999. 37. 416.
23. G. LENGYEL, T. BÁLINT, J. FEHÉR, Hungarian Multicenter Study Group: ... **J. GERVAIN**, ...: Ribavirin plus interferon alfa 2b combined therapy for 52 weeks in patients with chronic hepatitis C virus infection. Interim report on the Hungarian parallel study arm. *Z Gastroenterol*, 1999. 37. 431.
24. A. PÁR, L. TELEGDY, A. GÓGL, E. MÜLLER (coordinators) and Hungarian Viral Hepatitis Study Group: ... **J. GERVAIN** ...: Five-years experiences on interferon treatment for chronic viral hepatitis B and C in Hungary. *Z Gastroenterol*, 1999. 37. 439.
25. A. PÁR, L. TELEGDY, A. GÓGL, E. MÜLLER (co-ordinators) and ... **J. GERVAIN** ...: A nationwide, multicentre study on chronic viral hepatitis results of interferon alpha treatment in Hungary (1993-1997). *European J. of Internal Medicine* 1999. Vol. 10, Supplementum 1. S128.
26. **GERVAIN J.**, PAPP I., SZABÓNÉ B.K.: Magyarországi krónikus C hepatitises betegek C vírus genotípus analízise. *Magyar Gasztroenterológiai Társaság. Newletter*, 2000. 6. 101.
27. LENGYEL G., FEHÉR J., ... **GERVAIN J.** ...: Combined interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. Final results of a prospective multicenter study. *Z Gastroenterol*, 2000. 38. 5.
28. **GERVAIN J.**, PAPP I., SZABÓNÉ B.K.: A krónikus vírushepatitiszek diagnosztikai protokollja. *Magyar Belorvosi Archivum*, 2000. supplementum 1. 17.
29. **GERVAIN J.**, PAPP I., SZABÓNÉ B.K.: Betegeink hepatitis C vírus szerotípus és genotípus analízise. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 2000. 27. 3. 87.
30. **GERVAIN J.**, PAPP I., SZABÓNÉ B. K.: Magyarországi krónikus „C” hepatitises betegek vírusstipizálási eredményei. *Magyar Belorvosi Archivum*, 2000. Supplementum 3. 81.

31. G. SZABÓ, S. ÓDOR, G. KOVÁCS A. SZILÁGYI, **J. GERVAIN**, : Results of ultrasound guided biopsies of undefined hepatic focal lesions: carcinoids of the liver. *Z Gastroenterol*, 2002. 60. 357.
32. **J. GERVAIN**, Á. CZIBULA, T. KALMÁR, J. SIMON, I. PAPP and KB. SZABÓ: Mutations of the NS5A domain of HCV subtype 1 b and response to interferon therapy in Hungarian patients. *Z Gastroenterol*, 2002. 40. 334.
33. L. GAJDÁN, G. SZABÓ, G. KOVÁCS, S. ÓDOR, F. IZBÉKI, L. KÓBORI: J. VARGA, **J. GERVAIN J.**: Liver transplantation as therapeutic option for our patients. *Z Gastroenterol*, 2002. 40. 333.
34. PÁR A., ABONYI M., DALMI L., DÁVID K., **GERVAIN J.**, IBRÁNYI E., NEMESÁNSZKY E., RÁCZ I., RIBICZEI P., SZALAY F., TELEGDY L., HORÁNYI M.: High induction daily dosing therapy with interferon alpha-2b in chronic hepatitis C. *Z Gastroenterol*, 2002. 40. 351.
35. PAPP I., SZABÓNÉ BK, **GERVAIN J.**: A hepatitis C vírus (HCV) típus és szubtypus meghatározásának módszertana. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 2002. 29. 26.
36. **GERVAIN J.**, NEMESÁNSZKY E., RIBICZEY P., TELEGDY L., TORNAI I., WEISZ GY.: Lamivudine terápia alatt megjelenő hepatitis B vírus polimeráz gén C és B domain mutánsainak meghatározása. *Magyar Belorvosi Archívum*, 2002. LV. (3. Supplementum) 60.