

A humán parvovírus B19 szeroepidemiológiája (2018-2024) és a 2023/2024-ben járványosan terjedő variánsának meghatározása hazánkban

XXXVII. OTDK Biológia Szekció

Készítette: **MOSER TÍMEA**
biológia BSc III szakos hallgató

Témavezető: **Prof. Dr. Reuter Gábor**
Társtémavezető: **Dr. Boros Ákos**

PTE Klinikai Központ, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani
Intézet



Pécs, 2025

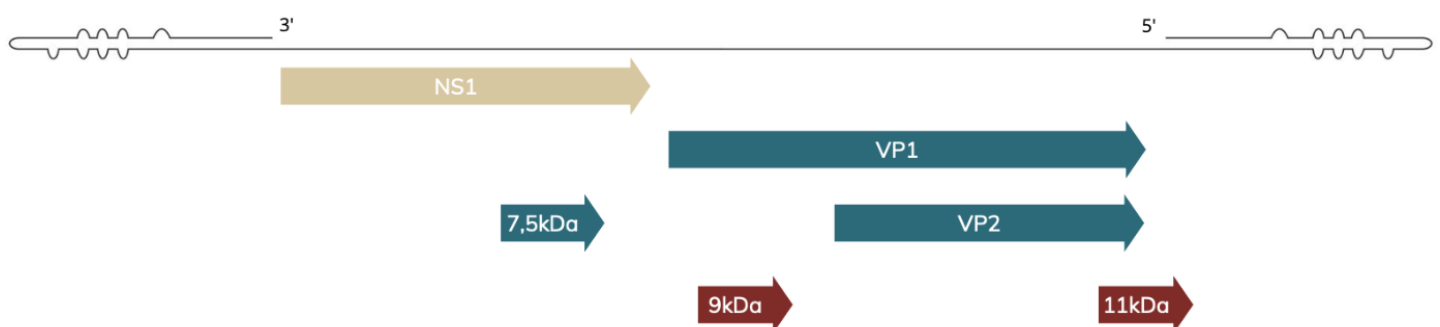
Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	3
1.1.	A parvovírus B19 (B19V) és a virális genom	3
1.2.	Genotípusok.....	4
1.3.	A vírus sejttropizmusa és receptora.....	4
1.4.	Epidemiológia és a vírus-fertőzés átvitele.....	4
1.5.	A B19V fertőzés klinikai megjelenési formái	5
1.6.	Immunitás	7
1.7.	Mikrobiológiai laboratóriumi diagnosztika.....	7
1.8.	Kezelés és megelőzés	8
2.	Célkitűzések	9
3.	Anyag és módszer	10
3.1.	Vizsgálati minták	10
3.2.	Szerológiai vizsgálat.....	10
3.3.	Nukleinsav (DNS) kivonás.....	10
3.4.	Nested polimeráz láncreakció (nested-PCR).....	11
3.5.	Agaróz gélelektroforézis	14
3.6.	DNS szekvenálás	14
3.7.	Szekvencia és adatelemzésekhez használt programok	15
4.	Eredmények.....	16
4.1.	A B19V szerológiai vizsgálatok száma és eredményei	16
4.2.	A B19V IgG szeropozitivitás a korcsoportok függvényében	16
4.3.	A B19V PCR vizsgálatok eredményei	18
4.4.	A B19V genotípus meghatározása és filogenetikai elemzése	20
4.5.	A hazai B19V törzsek szekvencia elemzése.....	21
5.	Megbeszélés	23
6.	Köszönetnyilvánítás	26
7.	A témához kapcsolódó saját publikációk	26
8.	Irodalomjegyzék.....	27
9.	Rövidítések jegyzéke.....	34

1. Bevezetés

1.1. A parvovírus B19 (B19V) és a virális genom

A *Parvoviridae* család, *Erythroparvovírus* nemzetségbe tartozó parvovírus B19 (B19V) egy burok nélküli, lineáris, egyszálú, ~5,6 kb. hosszúságú DNS genommal rendelkező, emberi kórokozó vírus (1. ábra). A virális genom két végét nem kódoló, hajtúyszerűen összekapcsolódó, palindrom nukleotid szekvenciák alkotják (Cotmore et al., 2019; Toppinen et al., 2015). A vírus az eredeti egyszálú virális DNS-t duplaszálú DNS-sé egészíti ki a replikáció során. A virális genom kódoló részéről kapszid fehérjék (VP1 és VP2), illetve nem szerkezeti fehérjék (NS1, 11kDa, 9kDa, 7,5kDa) íródnak át (Yong et al., 2015) két fő nyílt leolvasó keretben (open reading frame, ORF) (Zakrzewska et al., 2023). Az NS1-et kódoló ORF több doménből álló fehérjét kódol, amely egy nukleáz domént, egy helikáz domént és egy transzaktivációs domént tartalmaz. A kapszid fehérjéket (VP1 és VP2) a genom 5' részén elhelyezkedő ORF kódolja. A B19V vírus kapszid alkotó fehérjeinek a jelentős részét a VP2 alkotja, és csak kisebb részben a VP1 protein. E két – eltérő aminosav hosszúságú - strukturális fehérje ugyanazon a C-terminálison osztozik, de eltérő N-terminálisuk van. A VP1 N-terminális régiójában, az úgynevezett egyedi (unique) régió (VP1u) 273 aminosavval hosszabb. A VP1u foszfolipáz A2 aktivitást mutat, amely valószínűleg a virionok nukleáris bejuttatásában játszanak szerepet. Más, kisebb méretű ORF-ek további nem strukturális fehérjét is kódolnak, ezek közül a 11kDa-os fehérje jellemzett a legjobban, amely részt vesz a vírus patogenezisében (Chen et al., 2010; Zakrzewska et al., 2023).



1. ábra: A B19V sematikus genomszerkezete a vírusfehérjék fő kódoló régióinak jelölésével. NS1: nem szerkezeti fehérje (non-structural protein); VP1/VP2: szerkezeti fehérjék (structural proteins); 7,5 kDa, 9 kDa, 11 kDa: kisebb nem szerkezeti fehérjék kilodaltonban. Az azonos színnel jelölt nyilak, az azonos nyílt leolvasó keret álltat kódolt fehérjéket jelzi. A szerző által készített ábra.

1.2. Genotípusok

A humán parvovírus B19-et jelenleg 3 genotípusba (gt) sorolhatjuk. A prototípus vírussal azonos szekvenciákat 1-es genotípusba soroljuk. Emellett léteznek a 2-es genotípusú (A6- és LaLi-szerű) és a 3-as genotípusú (V9-szerű) B19V vírusok is. Az 1-es és a 3-as genotípusokon belül további, összesen négy szubgenotípust (gt1a, gt1b, gt3a és gt3b) különböztetünk meg (Toppinen et al., 2015). A B19V gt1a további két (gt1a1 és gt1a2) alvariánsra osztására is megjelent egy közlemény (Molenaar-de Backer et al., 2012). A három genotípus ~10%-ban különbözik egymástól. Az NS1 génen belül a szekvencia eltérések a három genotípus között ~13% nukleotid szinten és ~6% aminosav szinten. A 2-es és a 3-as genotípusok ~9% és ~12%-ban különböznek az 1-es genotípustól, viszont aminosav szinten csak 1,1% és 1,4%-os eltérés tapasztalható (Ekman et al., 2007). Világszerte az 1-es genotípus a leggyakrabban kimutatott (Ekman et al., 2007). A jelen tudásunk szerint mind a három B19V genotípusról az feltételezhető, hogy hasonló biológiai tulajdonságokkal, patogenitással és átviteli utakkal jellemezhetőek (Bonvicini et al., 2013).

1.3. A vírus sejttropizmusa és receptora

A parvovírus B19 a gyorsan osztódó erytroid sejtvonal sejtjeinek (például: pronormoblast, normoblast) felszínén található glikoszfingolipid (Gb4), a globozidként vagy más néven P vércsoport antigénként azonosított receptorhoz kötődik (Heegaard et al., 2002). Azok az egyének, akiknél genetikailag hiányzik a P-antigén, természetes úton ellenállnak a B19V fertőzésnek. A vírus VP1u protein része a víruskapszid immundomináns része, csak a globozid receptorral való kölcsönhatása után válik hozzáférhetővé (Leisi et al., 2013), hogy ezután kölcsönhatásba léphessen további koreceptorokkal is (Rogo et al., 2014; Zakrzewska et al., 2023).

1.4. Epidemiológia és a vírus-fertőzés átvitele

A B19V egy gyakori vírusfertőzés, amely világszerte előfordul. A szeroprevalencia aránya kortól és földrajzi elhelyezkedéstől függően változik. A szeroprevalencia az életkorral növekszik, így az óvodáskorúak 15%-a, a felnőttek 50%-a és az idősebb korosztály körülbelül 85%-a mutat szerológiai pozitivitást (Heegaard et al., 2002). A fejlődő országokban a szeroprevalencia valamivel magasabb, de elszigetelt törzsi környezetben a szeroprevalencia 10% alatt is maradhat (Broliden et al., 2006).

A B19V elsődleges átviteli útja légúti váladékkal, cseppfertőzéssel történik, de terjedése vérrel és vérképzőszövetek transzfúziójával és transzplacentális úton (az anyáról a magzatra) is lehetséges (Heegaard et al., 2002). A vér- és vérképzőszöveteket B19V vírusra nem szűrik. A B19V környezeti faktoroknak igen jól ellenáll, a hőkezelést jól tűri (Gallinella, 2013). A B19V fertőzések számának van éves szezonális ingadozása, a fertőzések csúcsa főként a késő tél és tavaszi (április-május) hónapokban vannak (Tolfvenstam et al., 2009). Ugyanakkor a B19V járványok általában 3-6 éves ciklust is követnek, amikor is látványosan megnő az esetszám az adott populációban (Lamont et al., 2011). A B19V vírus legutolsó járványos előfordulása 2016/2017-es évben történt Európában (Russcher et al., 2024). A B19V fertőzés Európában és hazánkban sem bejelentendő betegség, így pontos adatokkal a fertőzések és a megbetegedések számáról és arányairól nem rendelkezünk.

1.5. A B19V fertőzés klinikai megjelenési formái

A B19V fertőzést követően különböző betegségek kialakulhatnak, amelyek függenek többek között a gazdaszervezet immunállapotától (Rogo et al., 2014). A fertőzések kb. 40-50%-a tünetmentes. A tünetekkel járó fertőzések esetén megkülönböztetjük az 1) erythema infectiosumot (vagy 5. betegséget), mint az egyik legjellegzetesebb kisgyermekkor kiütéssel járó betegséget, 2) a transzplacentális átvitelhez kötött magzati – esetenként súlyos kimenetelű - fertőzéseket, illetve a 3) egyéb alapbetegségekhez kapcsolódó szövődményeket.

1) Tünetekkel járó erythema infectiosum esetén a B19V kétfázisú klinikai lefolyást mutat. A virémia a fertőzés kezdetétől számítva a 8.-9. nap után éri el a csúcspontját, ekkor a virion koncentrációja 10^{11} virion/ml értéket is elérheti a vérben. Ebben a fázisban láz, rossz közérzet, izomfájdalmak és viszketés jelentkezik. Egy átmeneti – néhány napos - javulás, és körülbelül három héttel a fertőzés után, a tünetek második fázisa jelentkezik a B19V fertőzésre jellemző bőrkiütésekkel és néhány esetben ízületi gyulladással (Broliden et al., 2006). Az erythema infectiosum egy tipikus megnyilvánulása a vírusnak a gyermekek körében, amely testszerte márványos vörös rajzolattal és az arcon kétoldali erythemával („slapped cheek”, az utóbbi években a magyar köznyelvben elterjedt a – nem hivatalos - „lepkehimlő” kifejezés) társulhat. Felnőtt korban bekövetkező primer fertőzés esetén ritkán előfordulhat, hogy a bőrkiütések csak a kesztyű és a zokni által lefedett bőrfelületeken jelentkeznek („kesztyű-zokni” szindróma).

2) A vertikális átvitel az első vagy második trimeszterben a legvalószínűbb, mivel a placenta által expresszált P-antigén szintje a terhességi kor előrehaladtával egyre csökken

(Broliden et al., 2006). A vertikális átvitel az estek 20-50%-ában fordul elő az első 20 várandósági hétben, a magzati korosodás kialakulásának kockázata pedig 2-18% (Bertoldi et al., 2022). A B19V nem okoz fejlődési rendellenességet, a súlyos klinikai kórkép az oxigénhiányos (hypoxia) állapotból következik (Ornoy et al., 2017). A vírus a magzatban is megfertőzi az erytroid progenitor sejteket a májban és/vagy a csontvelőben a terhességi kortól függően, illetve kimutatható számos szövet ereiben keringő erytroid sejtekből, továbbá az endotéliális placenta sejtekben és a magzatvízben is (Gallinella, 2018). A nagy számban elpusztuló vörösvértest előalakok miatt anémia alakul ki, amely elégtelen szöveti oxigenizációt eredményez egy olyan fejlődési időszakban, amikor éppen jelentős oxigén igényre van szüksége – szövetek és szervek kialakulásához - a gyorsan osztódó magzati sejteknek. A lehetséges szövődmények a méhen belüli magzati elhalálozás és a magzati hydrops fetalis kialakulása (Zakrzewska et al., 2023). A legjellemzőbb kóros állapotok a májkárosodás (hepatomegalia), a szívkárosodás (cardiomegalia), az ischémiás agykárosodás, a generalizált ödéma, az ascites, a vaslerakódás (haemosziderózis), és a meconium peritonitis (Puccetti et al., 2012). Ugyanakkor a terhesség alatti B19V fertőzések az esetek 30-50%-ában teljesen tünetmentesek is lehetnek (Puccetti et al., 2012). A várandós nők akár 50%-a is fogékony lehet a vírusra, a helyi szeroepidemiológiai helyzettől függően.

3) Egészséges hematológiai és immunológiai állapotú embereknél a B19V fertőzés által okozott erytropoézis károsodása általában átmeneti és a fertőzés leküzdésével spontán megszűnik. Ezzel szemben azoknál a betegeknél, akiknél hematológiai alapbetegségek is fennállnak, mint például az örökletes α - vagy β -thalassaemia, spherocytozis, sarlósejtes anémia vagy krónikus autoimmun hemolitikus anémia, a B19V fertőzés tovább fokozza a súlyos vérszegénységet (anémiát), amely átmeneti aplasztikus krízist (transient aplastic crisis) eredményez. Azoknál a betegeknél, akiknek veleszületett vagy szerzett immunológiai rendellenességei vannak, mint például a HIV-fertőzés, kemoterápiás vagy immunszuppresszív kezelések következtében, akik nem képesek semlegesíteni és eltávolítani a vírusokat, a vírusfertőzés perzisztálhat. A B19V elhúzódó replikációja és az erytroid progenitor sejtek progresszív kimerülése különböző súlyosságú krónikus anémiához vezethet (Zakrzewska et al., 2023).

Egyéb szövődmények: Az arthropathiák, amelyek gyakoribbak a felnőtt nőknél, az immunkomplexek bőrben és ízületekben történő lerakódásának következményeként alakulhatnak ki (Zakrzewska et al., 2023). A B19V fertőzés további betegségekkel, például

myocarditisszel, pericarditisszel és szívelégtelenséggel is összefüggésbe hozható (Zádori et al., 2001).

1.6. Immunitás

Specifikus immunglobulin M (IgM) és IgG antitestek képződnek a B19V fertőzés során, amelyek mindkét vírus kapszid fehérje ellen irányulnak. Az IgM antitestek termelése a fertőzést követő 10-12 napon kezdődik. Az IgM általában körülbelül 3 hónapig marad kimutatható a szérummintákban, de előfordulhat, hogy hosszabb ideig is kimutatható. Az IgG ellenanyagok a fertőzés kb. 2. hetétől kimutathatók és élethosszig tartóan eredményezhet védelmet a másodlagos fertőzésekkel szemben (Broliden et al., 2006). Az IgA típusú ellenanyagok is megjelennek, amelyek valószínűleg szerepet játszanak a nasopharyngeális úton történő újrafertőzések megelőzésében (Heegaard et al., 2002). A humorális immunválasz azonban önmagában nem elegendő a vírus eliminálásához, a fertőzés leküzdéséhez a celluláris immunválaszra is nagy szükség van (Rogo et al., 2014). A B19V-specifikus celluláris immunválasz mind a VP1 és VP2 kapszidfehérjék, mind az NS1 nem strukturális fehérje ellen irányul. A kapszid fehérjéket a HLA II. osztályú molekulák mutatják be a CD4+ T-sejteknek. A CD8+ T-sejtes válaszok az akut vírusfertőzés ugyancsak fontos elemei. Mind a VP1/VP2, mind kizárólag csak a VP2 kapszid fehérjék stimulálják a T-helper sejtek IFN- γ és IL-10 felszabadítását, amit arra utal, hogy a VP2 jelenti a fő célpontot a B19V specifikus T-helper sejtek számára. Összeségében a B19V-specifikus T-sejtes válaszok jellegzetesek, amelyek ötvözik a lítikus és a perzisztens fertőzések kialakítására képes vírusokra jellemző tulajdonságokat a pathogenezisben (Zakrzewska et al., 2023).

1.7. Mikrobiológiai laboratóriumi diagnosztika

A B19V-fertőzés mikrobiológiai diagnosztikája elsősorban a specifikus IgM és IgG típusú ellenanyagok vérszérumból való kimutatásán alapulnak ELISA módszer segítségével. A B19V DNS jelenlétének a kimutatása vérből és/vagy szövetmintákból különböző PCR alapú módszerekkel (konvencionális PCR, nested-PCR, valós-idejű PCR, stb.) ugyancsak lehetséges (Broliden et al., 2006). Ez utóbbi eljárásoknál fontos követelmény, hogy a B19V összes genotípusa kimutatható legyen (Gallinella, 2018; Knöll et al., 2002). Érdekes módon a molekuláris módszerek alkalmazására a rutin diagnosztikai gyakorlatban még manapság is csak ritkán kerül sor a B19V fertőzésekben, vagy azok megerősítésében nemzetközi szinten is.

1.8. Kezelés és megelőzés

A kisgyermekkorai B19V-fertőzés az esetek döntő többségében enyhe, önmagától gyógyuló megbetegedés és kezelést nem igényel. Egyes esetekben azonban a betegség lefolyása súlyosabb vagy hosszán tartó lehet, így kórházi kezelés is szóba jöhet (Bonvicini et al., 2017). Specifikus antivirális szer nem áll rendelkezésünkre, a kezelés a tünetek enyhítését szolgálják. Tranziens aplasztikus krízis vagy krónikus vérszegénység esetén sürgős transzfúzióra (vörösvértest) lehet szükség (Zakrzewska et al., 2023). A várandósság alatti fertőzés kezelése a magzati vérszegénység súlyosságától, illetve a terhesség előrehaladottságától függ. Ha a magzati vérszegénység súlyos, akkor a magzatnak adott intrauterin transzfúzió válhat szükségessé. Tiszta vörösvértest apláziában (pure red cell aplasia) szenvedő, immunhiányos betegeknél rövidtávon intravénás immunglobulin (IVIG)-terápia jöhet szóba (Craboli et al., 2013), illetve alternatív megoldásként a hydrops fetalis kezelésére is leírták már az intrauterin IVIG terápiát (Bonvicini et al., 2017). A szövődmenyes arthropathiák fájdalmainak csökkentésére nem-szteroid gyulladás csökkentőket alkalmaznak.

2. Célkitűzések

TDK munkám során célom volt a mikrobiológiai laboratóriumi munka szabályainak és munkafolyamatainak megismerése és elsajátítása, annak érdekében, hogy a későbbiekben biztonságosan, a szabályokat pontosan betartva, önállóan dolgozhassam.

Összesen csak 3 közlemény érhető el a magyarországi B19V fertőzésekről a Pubmed adatbázisban (Mihály et al., 2012; Terhes et al., 2013; Juhász et al., 2014) és nincs információ a hazai B19V szeroepidemiológiai helyzetének leírásáról és a cirkuláló B19V genotípusok azonosításáról az országban. A jelen munka különös aktualitását az adja, hogy 2023-ban és 2024-ben az erythema infectiosum fertőzések száma igen jelentősen – az elmúlt évtizedek járványperiódusaihoz képest is – megemelkedett hazánkban és a klinikai virológiai laboratóriumunk betegellátási körzetében is. Ezt a hazai médiában megjelent hírek, a klinikai diagnózisok és a laboratóriumi módszerekkel megerősített esetek számában is tükröződött.

Cél volt a megemelkedett B19V fertőzésszámmal kapcsolatban a lehetséges okok feltárása, a B19V szeroepidemiológiai helyzetének jellemzése. Meglepő módon azonban nem csak hazánkban nincs adat a B19V genetikai és molekuláris epidemiológiai jellemzéséről, de a kiterjedt európai járvány ellenére Európában sem ismert még a jelenleg cirkuláló B19V törzs vagy törzsek genotípusa, szubgenotípusa.

A konkrét célkitűzéseink a következők voltak:

- A B19V fertőzések szeroepidemiológiai elemzése a B19V laboratóriumi vizsgálatra érkezett humán minták szerológiai (IgM és IgG) eredményei alapján a Dél-Dunántúlon, 2018 és 2024 között.
- Az archivált B19V IgM-pozitív szérummintákból a B19V virális genom kimutatása és megerősítése PCR és nested-PCR módszerekkel.
- Szelektált PCR-pozitív mintákból a B19V közel teljes virális genomjának meghatározása.
- A meghatározott B19V virális genomok szekvencia elemzése/jellemzése, új marker mutációk leírása és a cirkuláló genotípus(ok) meghatározása molekuláris epidemiológiai célból.
- A jellemzett hazai B19V törzsek szekvencia- és filogenetikai elemzése a GenBank adatbázisban elérhető rokon törzsekkel. Ha lehetséges, a hazai és az európai cirkuláló domináns B19V törzs azonosítása a 2023 és 2024 évi epidémiából.

3. Anyag és módszer

3.1. Vizsgálati minták

A B19V vizsgálatokhoz olyan betegektől vett vérmintákat (N=1441db) használtunk, amelyeket a kezelőorvosok (egyetemi/megyei/városi kórházak és háziorvosok) B19V diagnosztikai vizsgálat céljából küldtek laboratóriumunkba, 2018. január 1. és 2024. július 31. között Baranya, Somogy és Tolna megyékből. A szeroepidemiológiai elemzés a B19V IgM és IgG típusú ellenanyagok ELISA módszerrel történt kimutatásának laboratóriumi vizsgálati eredményeinek retrospektív elemzésén alapult. Az egészségügyi statisztikai adatgyűjtési és kutatási engedély száma: KK/3937-1/2024 (Pécsi Tudományegyetem).

3.2. Szerológiai vizsgálat

A szerológiai vizsgálatokat ELISA módszerrel végeztük szérumból, amely a szérumban található B19V IgM és IgG típusú ellenanyagok kimutatására szolgáló enzim-immunoassay. A vizsgálatokhoz a Parvovirus B19 IgM (Dia.Pro Diagnostic Bioprobes, Sesto San Giovanni, Italy) és Parvovirus B19 IgG (Dia.Pro Diagnostic Bioprobes, Sesto San Giovanni, Italy) kiteket használtuk. A vizsgálati eredményeket – a gyártó leírásával egyezően – akkor tekintettük pozitívnak, ha az optikai denzitás (OD) értéke egyenlő, vagy meghaladta ($\geq$) az 1,2 OD/cut-off határértéket. A parvovírus B19 IgM ellenanyagokra pozitív szérummintákat nested-PCR módszerrel, a PCR-pozitív mintákat pedig Sanger-szekvenálással vizsgáltuk tovább.

3.3. Nukleinsav (DNS) kivonás

A szérummintákból a virális nukleinsavat szilika-oszlopos nukleinsav-tisztítási módszerrel, NukleoSpin Viral NA kit-tel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) végeztük el a gyártó utasításai szerint. Az izolálás a következő fő lépésekből állt: A 600 μ l lízis puffert tartalmazó előre feliratozott Eppendorf csövekbe 150 μ l mintát (savó minta) mértünk, majd 20 μ l Proteinase K oldatot (20mg/ml) adtunk hozzá. Az oldatot vortexel elkevertük, majd cseppcentrifugán 2800 rpm-en 5 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk, majd a csöveket hőblokkban 10 percig, 70°C-on inkubáltuk. Ezután 600 μ l 96%-os etanolt adtunk a csövek tartalmához és vortexel elkevertük 10-15 másodpercig. Pipettával két lépésben az oldatot szűrős-oszlopos csövekbe vittük át és 1 percig 8000 x g-n (8000 rcf) centrifugáltuk (Eppendorf,

5424R, Hamburg, Németország) és a végén kiürítettük a gyűjtőcsöveket. A mosást több lépcsőben végeztük el a kit mosópufferével, majd a nukleinsav eluálását előmelegített elúciós pufferrel végeztük el. Két perc várakozást követően a csöveket centrifugáltuk 1 percre, 11.000 x g-n (11.000 rcf). A tisztított nukleinsavat a felhasználásig jégben, illetve a használatot követően -80°C-on tároltuk.

3. 4. Nested polimeráz láncreakció (nested-PCR)

A B19V NS1 és VP1 átfedő protein kódoló régiójának adott szakaszát kétkörös, nested-PCR módszerrel sokszoroztuk fel (2. táblázat). A PCR reakció első körében (PCR1) az össztérfogat 25 µl volt. A reakcióelegy 18 µl nukleáz-mentes vizet, 2,5 µl 10-szeres koncentrációjú, 20mM MgCl₂-t tartalmazó PCR puffert (Dream Taq PCR puffer), 0,5 µl 20 µM forward és reverz primert, 0,5 µl 10 mM dezoxinukleotid-mixet (dATP, dCTP, dGTP, és dTTP), 5 egység (U) DNS-polimeráz enzimet (Dream Taq polymerase, ThermoFisher), illetve 2,5 µl templátként szolgáló előzetesen izolált nukleinsavat tartalmazott. Pozitív kontrollként egy korábbról származó B19V pozitív mintát használtunk. A PCR1 reakcióelegyeket az 1. táblázatban szereplő PCR hőprogramon futtattuk le.

A PCR reakció második körében (PCR2) az össztérfogat szintén 25 µl volt. A reakció komponensei és azok térfogatai megegyeztek az első körben alkalmazottakkal, azzal az eltéréssel, hogy ún. belső/nested forward és reverz primert (az első PCR kör primer-tapadási helyeitől beljebb letapadó) és templátként 1,5 µl-t használtunk az első PCR kör (PCR1) termékéből.

A nested-PCR pozitív minták közül véletlenszerűen kiválasztott mintákon több részletben egy ~4550 nukleotid hosszú, a B19V teljes fehérjét kódoló genom régióját lefedő szakaszt sokszoroztuk fel saját-tervezésű primer-párok (1. táblázat) felhasználásával. A különböző PCR reakciókba alkalmazott PCR primer-párokat (1. táblázat) a B19V genotípusok (gt 1-3) és azok altípusainak szekvencia illesztései alapján terveztük.

A PCR reakciók körülményei				
	lépések	hőmérséklet (°C)	idő (sec/ min)	ismétlések száma
PCR 1	Kezdő denaturáció	95	35 sec	1x
	Denaturáció	95	30 sec	39x
	Annealing (primer-tapadás)	50	20 sec	
	Elongáció	72	1 min	
	Záró elongáció	72	5 min	1x
PCR 2	Kezdő denaturáció	95	35 sec	1x
	Denaturáció	95	30 sec	24 x
	Annealing (primer-tapadás)	55	20 sec	
	Elongáció	72	1 min	
	Záró elongáció	72	5 min	1x

1. táblázat: *A B19V nested-PCR módszer során alkalmazott reakciók körülményei.*

Cél genom-régió	Primer neve	Szekvencia (5' → 3')	Reakció típusa	Termék hossza (bp)	Referencia
NS1-VP1	ParvoB19-e1855-F1	CACTATGAAAACCTGGGCAA	kimutatási nPCR első kör	1239	Servant és mtsai., 2002
NS1-VP1	ParvoB19-3094-R1	GGGAACCTCCGGCAAACCTTCCTTG	kimutatási nPCR első kör		Servant és mtsai., 2002
NS1-VP1	ParvoB19-e1863-F2	AAACTGGGCAATAAACTACAC	kimutatási nPCR második kör	1168	Hübschen és mtsai., 2009
NS1-VP1	ParvoB19-3031-R2	GTAGTCTTTTACTACTTGTGCTTG	Screening nPCR kimutatási kör		Hübschen és mtsai., 2009
VP1	B19-2962-F*	AGACTTACACAAGCCTGGGCAA	VP1 gént célzó nPCR első kör	2007	saját tervezésű
VP1	B19-4969-R*	TTACAATGGGTGCACACGGCT	VP1 gént célzó nPCR első kör		saját tervezésű
VP1	B19-3062-F*	GACAGTGCTGCAAGGATTCAT	VP1 gént célzó nPCR második kör	1879	saját tervezésű
VP1	B19-4941-R*	GTCCACAATTCTTCAGGCTTTT	VP1 gént célzó nPCR második kör		saját tervezésű
5'UTR-NS1	B19-286-F*	TGACGTCACAGGAAATGACGTA	NS1 gént célzó nPCR első kör	1968	saját tervezésű
5'UTR-NS1	B19-2254-R*	GYGTACTAGAGCGCGGGGT	NS1 gént célzó nPCR első kör		saját tervezésű
5'UTR-NS1	B19-355-F*	GCGGCATCTGATTGGTGTCTT	NS1 gént célzó nPCR első kör	1821	saját tervezésű
5'UTR-NS1	B19-2176-R*	CAGAGCTTTCACCACTGCT	NS1 gént célzó nPCR második kör		saját tervezésű

2. táblázat: A vizsgálatokhoz használt B19V oligonukleotid primerek listája, amelyek alkalmasak a teljes fehérjét kódoló régiók (~4550nt) meghatározására. VP1: virális kapszid fehérje 1, NS1: nem strukturális fehérjét kódoló genom régiók, 5' UTR: 5' nem kódoló (transzlálódó) régió. * Az NS1 és VP1 tipizáláshoz használt primerek nevében szereplő számok a forward vagy reverz primerek kötőhelyeinek első vagy utolsó pozíciójára utalnak a humán parvovírus B19 teljes referenciagenomján (NC_000883.2). nPCR: nested PCR.

3.5. Agaróz gélelektroforézis

A PCR reakciók termékeinek jelenlétét és méretét agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki. A PCR termékek méret szerinti elválasztását 1,5%-os agaróz (SeaKem® LE, Lonza, Rockland, USA) gélben végeztük, amit 0,5xTBE oldattal készítettünk. A gélhez ethidium-bromidot adtunk, annak érdekében, hogy a duplaszálú DNS-t (PCR termékeket) UV fény alatt láthatóvá tegyük.

3.6. DNS szekvenálás

A megfelelő méretben lévő (specifikus) PCR termékek nukleotid-sorrendjének meghatározásához Sanger-féle szekvenálási módszert használtunk, amely a következő fő lépésekből állt. A PCR termékek tisztításakor 20 µl PCR termékhez 20 µl 4 M koncentrációjú ammónium-acetát oldatot adtunk. Ezt követően 120 µl 96%-os etanolt adtunk hozzá, majd vortexelést követően 13000 rpm-en, 15 percig 4°C-on centrifugáltuk (MPW-380R, MPW, Varsó, Lengyelország). A felülúszó eltávolítása után 300 µl 70%-os etanollal végeztük a mosást, majd vortexelést követően 13000 rpm-en, és 4°C-on 10 percig centrifugáltuk. Ezután a felülúszót pipettával eltávolítottuk és a mintákat szobahőmérsékleten szárítottuk. A tisztított PCR termékeket 25-100 µl nukleáz mentes vízben oldottuk fel.

A szekvenálási reakció végső térfogata 10 µl volt, amely 2,3 µl nukleáz mentes vizet, 0,7 µl reverz vagy forward primert (0,7 µl/minta), 2 µl BigDye Mixet (2 µl/minta) és 5 µl tisztított PCR terméket tartalmazott. Az így kapott szekvenálási reakció elegyet a gyártói protokollnak megfelelő hőprogramon futtattuk le. Kezdő denaturáció: 96°C, 1 perc, [denaturáció: 96°C, 30 másodperc; annealing (primer-tapadás): 50°C, 7 másodperc; elongáció: 60°C, 4 perc], 25x ismétléssel.

A kapott szekvenálási PCR terméket ismét megtisztítottuk, amelyhez 40 µl nukleáz-mentes vizet adtunk, majd az így kapott oldatot 5 µl 3M nátrium-acetát oldatot és 100 µl etanolt (96%) tartalmazó Eppendorf csőbe mértük át. 1300 rpm-en 30 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk, ezután 300 µl 70%-os etanollal mostuk, ezt követően 1300 rpm-en 15 percig 4°C-on centrifugáltuk és a felülúszót óvatosan pipettával eltávolítottuk. A pelletet 3 percig 50°C-on hőblokkban szárítottuk, végül 20 µl highly deionized (Hi-Di) formamidban oldottuk fel. A mintákat a laboratóriumunk 8-csatornás automata kapilláris szekvenátorában (AB3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Hitachi, Tokyo, Japán) futtattuk meg.

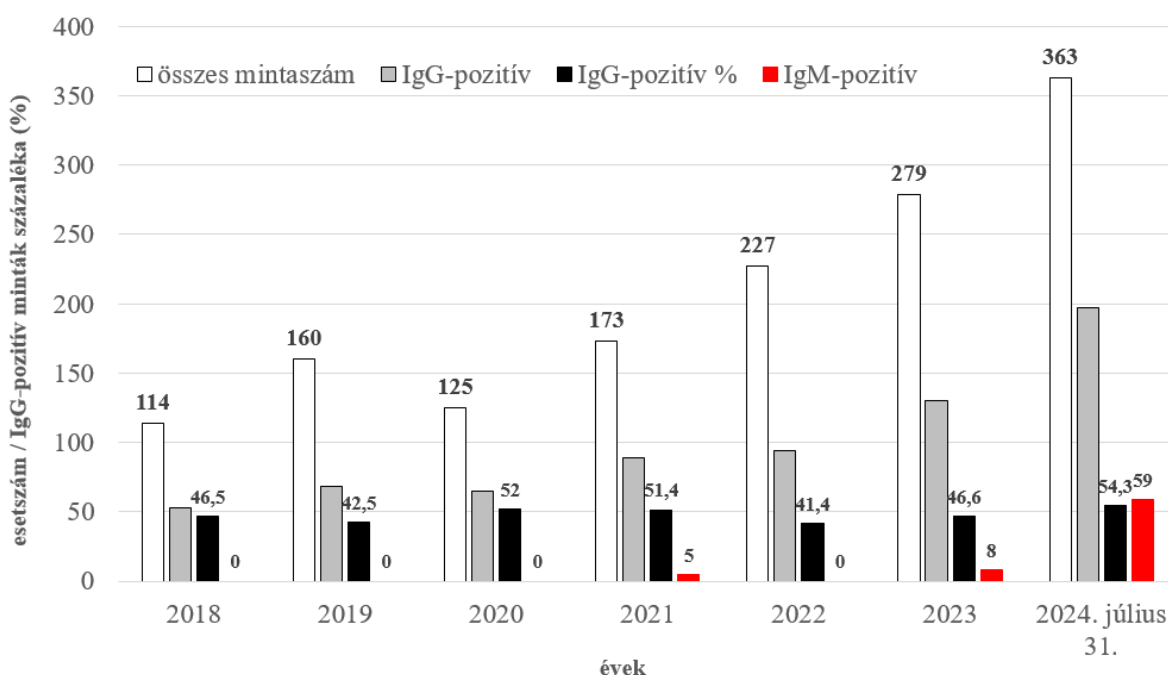
3.7. Szekvencia és adatelemzésekhez használt programok

A kapott elektroferogrammmokat és szekvenciákat Chromas Lite (Technelysium), illetve GeneDoc ver. 2.7 programokkal elemeztük. A filogenetikai vizsgálatokhoz MEGA ver. 1.1 programot használtunk. A filogenetika fák MUSCLE algoritmus (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/muscle?type=protein>) szerinti nukleotid-szekvencia illesztésekből Neighbor-joining módszerrel készültek Tamura-3+G filogenetikai modell felhasználásával. A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS Statistics V024 (Chicago, IL, USA) és a Microsoft Excel 2013 (Redmon, WA, US) szoftverrel végeztük.

4. Eredmények

4.1. A B19V szerológiai vizsgálatok száma és eredményei

Összesen 1441 db vér (szérum) minta érkezett laboratóriumunkban 2018. január 1. és 2024. július 31. között, amelyekből B19V IgM és IgG típusú ellenanyagok jelenlétének kimutatását kérték ELISA módszerrel (2. ábra). A laboratóriumba érkezett vizsgálati minták száma évről évre növekedett, de 2020-ban a SARS-CoV-2 világiárvány első évében a mintaszám átmeneti csökkenése volt megfigyelhető. Az utolsó, nem teljes vizsgálati év első hét hónapjában került sor a legtöbb minta vizsgálatára (N=363). A vizsgált időszak alatt a B19V IgG ellenanyag szeropozitivitása 41,4% (legalacsonyabb 2022-ben) és 53,4% (a legmagasabb 2024-ben) között változott. A vizsgálati idő alatt az átlagos szeroprevalencia 48,4% volt. B19V IgM-pozitív mintákat csak 2021-ben (N=5), 2023-ban (N=8), és nagy számban (N=59) 2024-ben találtunk (1. ábra). A B19V IgM-pozitív mintával rendelkező betegek átlagéletkora 29,96 év (2 hét-85 év) volt, többségük (73,5%) nő volt.

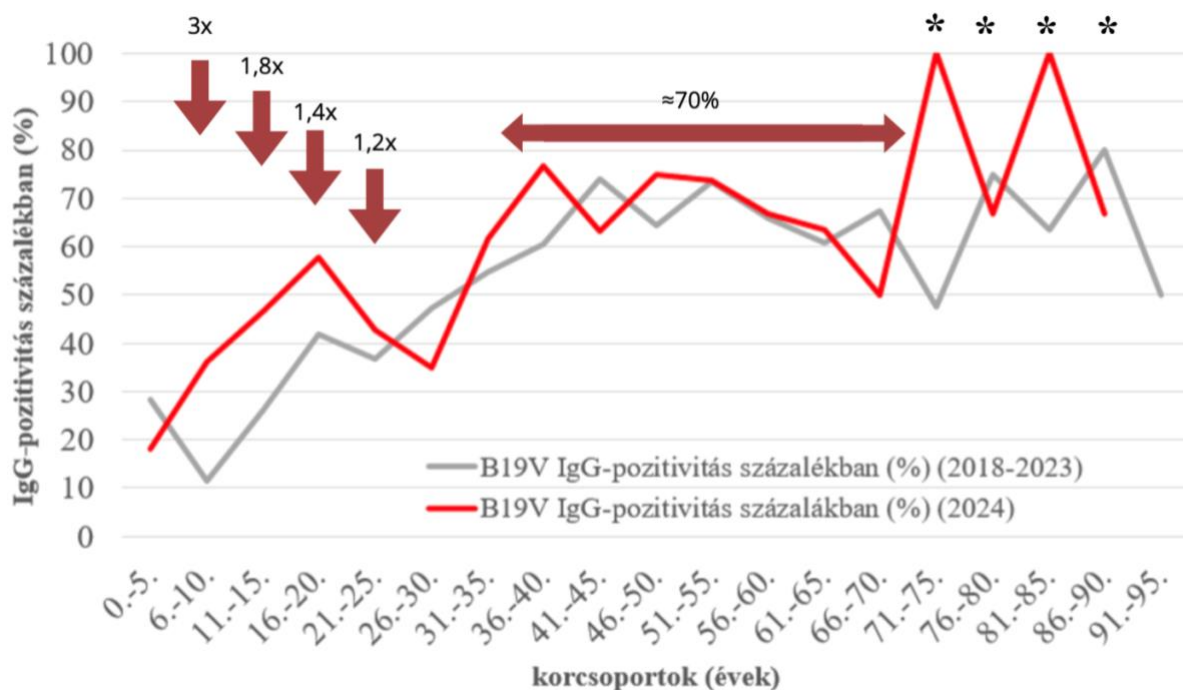


2. ábra: A parvovírus B19 (B19V) IgM és IgG ellenanyagokra vizsgált szérumminták (N=1441) éves száma a Dél-Dunántúlon, 2018 és 2024 között. A fehér és szürke oszlopok a vizsgált, illetve a B19V IgG szeropozitív mintákat teljes számát jelzik. A fekete oszlop a B19V

IgG szeropozitivitás százalékos (%) arányát mutatja évente. A piros oszlop a B19V IgM-pozitív minták (N=72) számát jelenti.

4.2. A B19V IgG szeropozitivitás a korcsoportok függvényében

A B19V IgG szeropozitív személyek korcsoportonkénti kumulált számát vizsgálva a 2018 és 2023 közötti időszak adatait összehasonlítva a 2024-es adatokkal, jól látható, hogy a görbék eltérő mintázatot mutatnak (2. ábra). 2024-ben magasabb B19V IgG szeropozitivitási arányt (%) találtunk a 6-10 éves (3,16-szoros), a 11-15 éves (1,79-szeres), a 16-20 éves (1,39-szeres), és a 21-25 éves (1,16-szoros) korcsoportokban, mint 2018 és 2023 közötti kumulatív adatokban. A 21-25 és 36-40 év közötti szexuálisan aktív korcsoportokban körülbelül 36,8-60,5% a szeropozitivitás, beleértve a várandós nők korcsoportját is 2018 és 2023 között. A szeropozitivitás eléri a 70%-ot a 36-40-től az 56-60 éves korig tartó korcsoportokban. A 71-95 éves korcsoportokban az alacsony elemszám miatt az adatok nem elemezhetőek.



3. ábra: *A parvovírus B19V (B19V) IgG ellenanyag pozitivitás százalékos (%) aránya korcsoportonként 2018 és 2023 között (N=1078; a kumulatív adatok szürke színnel vannak megjelenítve az ábrán) és 2024-ben (N=363, piros színnel vannak megjelenítve az ábrán). Mindegyik korcsoport 5 évet foglal magába 0 éves kortól 95 éves korig. *A 71 és 95 éves korcsoportokban minta elemszáma kisebb, mint 30, ezért ezek az adatok nem elemezhetőek. A piros függőleges nyilak a 2024-es évben mért magasabb IgG szeropozitivitási arányokat mutatják az egyes korcsoportokban a 2018-2023-as összesített adatokhoz képest.*

4.3. A B19V PCR vizsgálatok eredményei

A 72 db B19V IgM-pozitív mintából összesen 68 (94,4%) állt rendelkezésre a molekuláris vizsgálatokhoz (2021-ből, az 5 mintából csak 1). A 68 B19V IgM-pozitív mintából összesen 51-ből (75%) lehetett a B19V vírus DNS-t nested-PCR módszerrel a szűrőprimerek (2. táblázat) alkalmazásával kimutatni (3. táblázat). Az 51 mintából 34 minta esetében csak a PCR 2. köre vált pozitívvá.

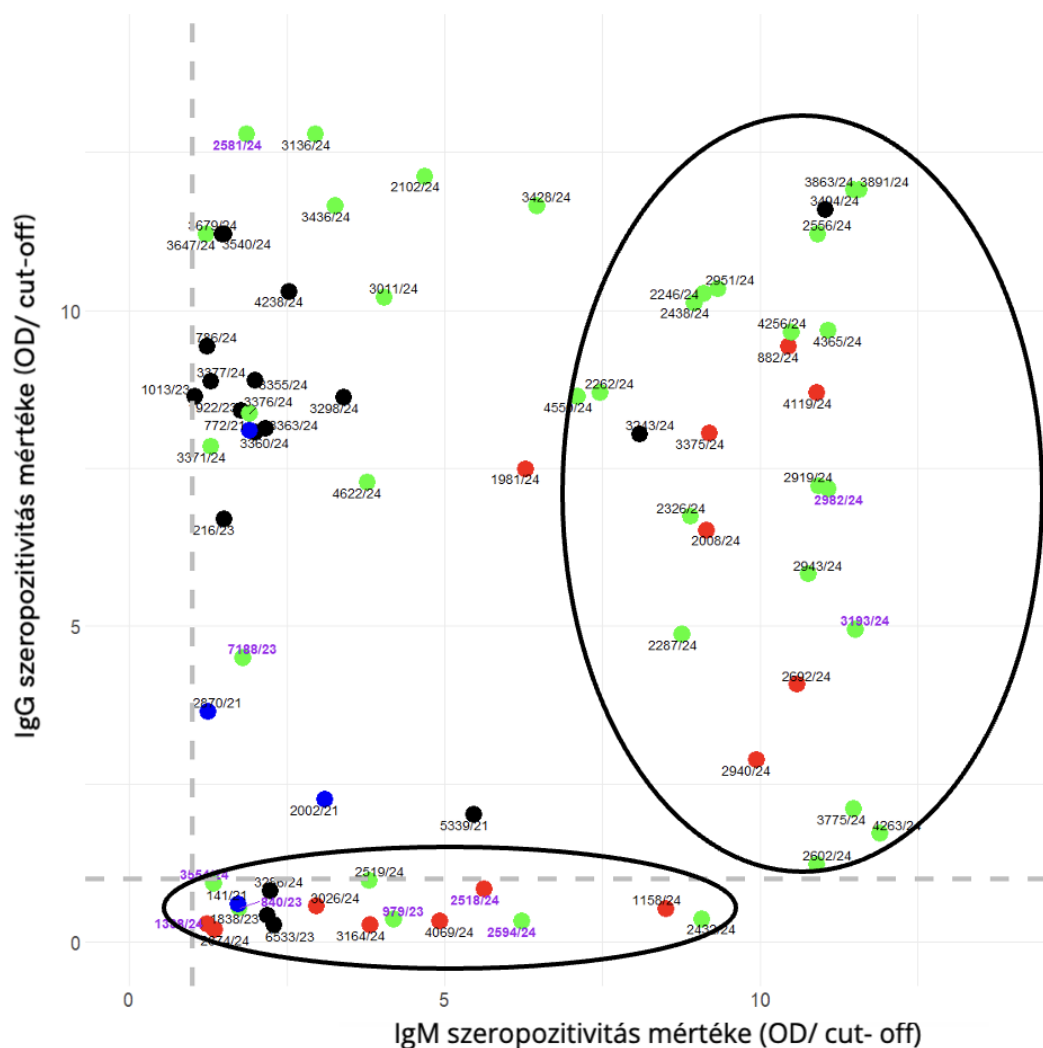
Év	IgM pozitív	Molekuláris vizsgálat (nPCR)	nested PCR*		**Genom meghatározás
			B19V DNS pozitív (első PCR kör)	B19V DNS pozitív (CSAK a második PCR kör)	
2021	5	1	0	0	0
2022	0	-	-	-	-
2023	8	8	0	3	3
2024	59	59	14	34	7
Σ=	72	68 (94,4%)	51 (75,0%)		10

* szűrő primer-párok: Servant és mtsai., J Virol. 2022;76(18):9124-9134.

** saját tervezésű primer-párok

3. táblázat: A B19V PCR vizsgálatok eredményei az B19V IgM-pozitív mintákból.

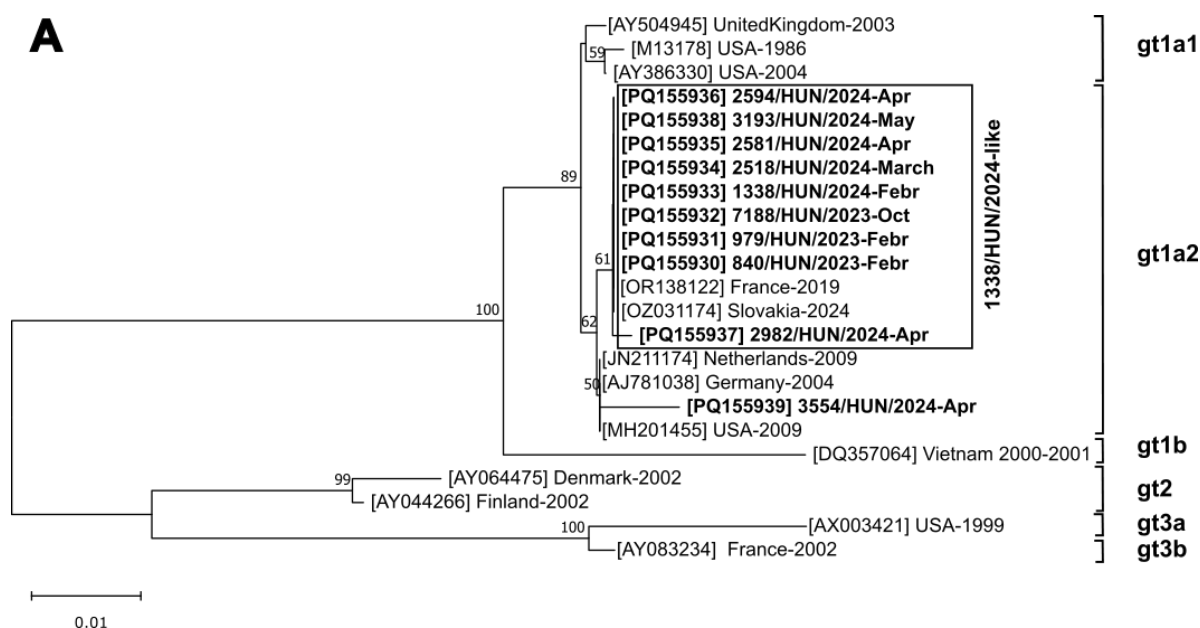
A B19V IgM-pozitív minták szerológiai (x= IgM OD/cut-off és y= IgG OD/cut-off) és nested-PCR (első és második kör) vizsgálati eredményeit egyesítő összehasonlító adatokat az 4. ábrán tüntettük fel (4. ábra). Az első- vagy csak a második körben PCR-pozitív minták elsősorban az IgM-pozitív/IgG-negatív és az erősen IgM-pozitív/IgG-pozitív szerológiai eredményű minták közül kerültek ki.

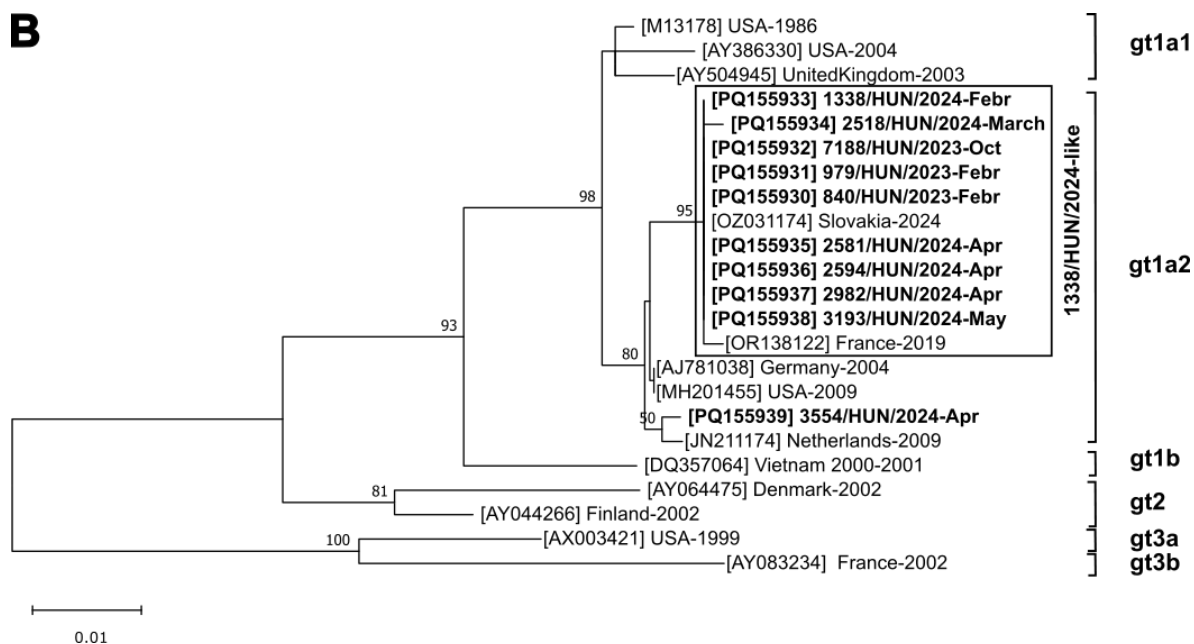


4. ábra: A B19V ELISA IgM (x-tengely) és IgG (y-tengely) optikai denzitás (OD)/cut-off értékek eloszlása a B19V IgM-pozitív szérumminták esetében (N=72), valamint a nested-PCR (első és második kör) eredményei (N=68). Az IgM-pozitív és IgG-pozitív ELISA küszöb értékek a következők: OD/cut-off = 1,20 (szaggatott vonalak). A B19V IgM-pozitív/PCR-negatív mintákat fekete kör jelöli (N=17), az IgM-pozitív/csak a második körben nested-PCR-pozitív mintákat zöld kör jelöli (N=37), az IgM-pozitív/az első- és második körben nested-PCR-pozitív mintákat piros kör jelöli (N=14), az IgM-pozitív/de nested-PCR vizsgálathoz nem elérhető minták kék körrel vannak jelölve (N=4). A teljes kódoló genomrégió jellemzéséhez DNS szekvenálásra kiválasztott mintákat (N=10) félkövér betűkkel és lila színnel jelöltük. A minták jelölése a következő: a minta azonosító száma után a gyűjtés éve szerepel. A két körívvel az IgM-pozitív/IgG-negatív és erősen IgM-pozitív/IgG-pozitív minták lettek jelölve, ezek közül kerültek ki a PCR pozitív minták döntő többsége.

4.4. A B19V genotípus meghatározása és filogenetikai elemzése

Összesen 10 db B19V IgM-pozitív/PCR-pozitív mintát választottunk ki véletlenszerűen 2023-ból (N=3) és 2024-ből (N=7). A szekvencia- és filogenetikai elemzéseket egy összességében ~4550 nt hosszúságú, az NS1 és VP1 génrégiókat teljesen lefedő szakaszon végeztük. A szekvencia- és filogenetikai analízissel mind a 10 elemzett vizsgálati törzs az 1-es genotípusba (gt1), ezen belül a gt1a2 altípushoz tartozott, viszont két szekvencia csoportra oszlik (5. ábra). Kilenc B19V törzs (GenBank azonosító számai: PQ155930-PQ155938) egy klaszterbe sorolhatók (kevesebb, mint 0,3%-os nt különbséggel a ~4,550nt hosszúságú genomban), viszont egy, a B19V 3554/HUN/2024 törzs (GenBank azonosító száma: PQ155939) egy különálló vonalat alkot (5. ábra). A vizsgált klaszter prototípus törzse (1338/HUN/2024, PQ155933) 99,89% és 99,80% nt azonosságot mutat a legközelebbi, nem publikált, csak a GenBankban elhelyezett B19V-törzsekkel, amelyek 2024-ből Szlovákiából (OZ031174) és 2019-ből Franciaországból (OR138122) származnak (5. ábra).

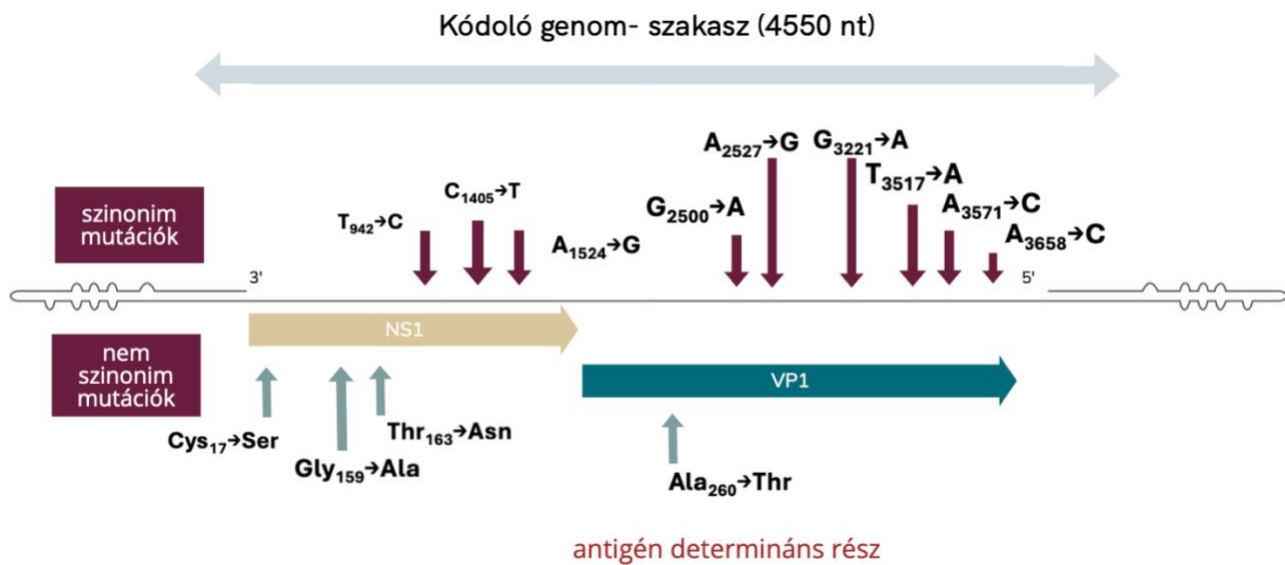




5. ábra: A vizsgált hazai humán parvovírus B19 (B19V) törzsek ($N=10$, félkövér betűkkel jelölve) NS1 (A) és VP1 (B) nukleotid (nt) szekvenciák alapján készült filogenetikai elemzése. A filogenetikai elemzéshez felhasználtuk a GenBank BlastN kereséssel azonosított legközelebbi rokon törzseket és a B19V vírus reprezentatív genotípusai/szubgenotípusait. Az 1338/HUN/2024-szerű járványos B19V törzsek bekeretezve láthatóak. gt: genotípus

4.5. A hazai B19V törzsek szekvencia elemzése

A 1338/HUN/2024-szerű B19V törzsek (azaz a 9 hazai, és az egy-egy szlovákiai és francia törzs) (5. ábra) közös és egyedi genom mutációkkal rendelkeznek az eddig nemzetközileg ismert B19V vírusok genomjaival összehasonlítva (6. ábra). Az 5'UTR-ben (az M13178 referencia B19V törzs 386/387 nt pozíciói között egy plusz guanin (G) inszerció figyelhető meg); nem-szinonim (Cys→Ser 17. aa pozícióban; Gly→Ala a 159. aa pozícióban; Thr→Asn a 163. aa pozícióban) és szinonim (T→C a 942. nt pozícióban, C→T az 1405. nt pozícióban, A→G az 1524. nt pozícióban) mutációk figyelhetők meg a NS1 génben (6. ábra); és nem-szinonim (Ala→Thr a 260. aa pozícióban az antigén determináns részben) és szinonim (G→A a 2500. nt pozícióban, A→G a 2527. pozícióban, G→A a 3221. pozícióban, T→A a 3517 nt pozícióban, A→C a 3571. nt pozícióban, A→C a 3658. nt pozícióban) mutációk figyelhetők meg a VP1-ben (6. ábra), amelyeket korábban még nem észleltek a B19V törzsekben.



6. ábra: A GenBankban elérhető B19V szekvenciákhoz képest egyedi szekvencia-eltérések a 1338/HUN/2024-szerű B19V törzsekben. A felső nyilak a nukleotid szekvencia-eltéréseket mutatják (szinonim mutációk), míg az alsó nyilak az aminosav cserével járó mutációkat (nem szinonim mutációk) jelzik.

5. Megbeszélés

Bár a B19V már 1975 óta ismert humán kórokozó (Cossart et al., 1975), érdekes módon kevés epidemiológiai, és molekuláris epidemiológiai adatokra épített tanulmány érhető el az irodalomban és továbbra is ritkaságszámba megy a B19V PCR-alapú molekuláris kimutatása, genom szekvenálása és genom elemzése. Magyarországról a PubMed adatbázisában összesen 3 közlemény érhető el a B19V fertőzésekről, amelyek közül kettő angol nyelvű esettanulmány egy-egy B19V fertőzés komplikációról (Terhes et al., 2013; Juhász et al., 2014), egy pedig magyar nyelvű, klinikumra épített összefoglaló (Mihály et al., 2012). Mint ahogy Európa más országában, így a B19V-fertőzések hazánkban sem bejelentendők, nincsenek vezetett statisztikai adatok a klinikai megbetegedésekről és azok formáiról és a laboratóriumi módszerekkel igazolt esetek számáról sem. Hazánkban egyáltalán nem ismert a B19V szeroepidemiológiája és nincs információ a cirkuláló B19V genotípusok azonosításáról sem.

A jelen munka különös aktualitását az adja, hogy 2023-ban és 2024-ben az erythema infectiosum fertőzések száma igen jelentősen – az elmúlt évtizedek járványperiódusaihoz képest is – megemelkedett. Bár az első szerológiai és genetikailag igazolt eseteink 2023. februárjára vezethetők vissza, de a járvány 2023 telén - 2024 tavaszán terjedt ki. Ugyancsak szokatlanul nagyszámú B19V megbetegedést jelentettek (személyes információk, média hírek, nem publikált adatok) 2023 végén országszerte, valamint 2023 végén és 2024 elején nemzetközileg Európában is (ECDC, 2024 ápr.; ECDC, 2024 jún.; Nordholm et al., 2024; d’Humières et al., 2024). Érdekes módon ezen tanulmányok egyike sem számolt be a B19V genetikai meghatározásáról.

Tanulmányunk egy hat és féléves időszak során (2018-2024 közepe), a Dél-Dunántúl három vármegyéjéből (Baranya, Somogy és Tolna) diagnosztikai célból küldött vérminták B19V szerológiai vizsgálataira alapuló, első hazai szeroepidemiológiai elemzésére és a 2023/2024-es járványidőszak meghatározó B19V variánsának genomiális azonosításáról szól.

Adataink azt mutatják, hogy 40 éves életkorra a populáció 60-70%-a válik szeropozitívvá a vizsgált populációban és a populáció szinten, az átlagos szeropozitivitás 41-54% közötti az egyes években. A 6-tól a 25 éves korosztályokban (1,2-3-szor) magasabb B19V szeropozitivitási arányt találtunk a 2024-es adatokban, mint a 2018-2023-ból származó kumulatív szeroepidemiológiai adatokban az összehasonlító vizsgálatok során. Az eltérés nagysága a 25 éves korosztálytól a 6 éves korosztály fele haladva növekedett.

A vizsgálat időperióduson belül, 2024. első felében kiugróan nagyszámú B19V-fertőzés került laboratóriumi módszerekkel (ELISA és PCR) igazolásra. Vizsgálatunkban molekuláris vizsgálatokhoz rendelkezésre álló 68 db B19V IgM pozitív mintából, összesen 51 esetben lehetett a vírus DNS-ét is kimutatni, ezen belül 34 db minta esetében csak a nested PCR második körében lett pozitív.

Először került sor hazai B19V törzsek virális genomjának meghatározására. A vizsgált B19V törzsek teljes kódoló genom régiójának elemzése alapján, az összes törzs az 1-es genotípusba (1a2 altípus) tartozott (a prototípus törzs a HUN1338/2024, PQ155933). Genetikailag nagyon hasonló vírus törzseket azonosítottunk a GenBank adatbázisban Szlovákiából (2024-ből) és Franciaországból (2019-ből), amelyek mind földrajzilag, mind pedig időben relevánsak. A GenBank adatbázisban lévő többi B19V genetikailag távolabbi rokonságban áll a prototípus törzsünkkel. Ezek alapján feltételezhető, hogy 2023-ban és 2024-ben a HUN1338/2024-szerű gt1a2 B19V genotípusú törzs a dominánsan keringő járványos törzs a lakosság körében Magyarországon és valószínűleg Európában is (és talán Izraelben is) (ECDC, ápr; ECDC, jún; Mor et al., 2024; d'Humières et al., 2024; Vuković et al., 2024). További, kiterjedtebb nemzetközi összehasonlító vizsgálatokra lenne szükség az aktuálisan cirkuláló B19V törzsek meghatározásához, a tényleges genotípus-eloszlás jellemzésére és a domináns járványtörzs megerősítésére Európában.

A korábbi évekhez képest magas B19V IgM-pozitív (és PCR pozitív) eredmények, valamint a 2024. évi magasabb IgG szeropozitivitási arány egyes korcsoportokban igazolják a B19V széles körű elterjedését a populációban 2024 év folyamán, a Dél-Dunántúlon. Bár a B19V átviteli módjait nem elemeztük részletesen az eseteink körében, de vizsgálatkérő lapokon szereplő adatok alapján volt példa közvetlen kontaktus útján átadott fertőzésre (pl. örökletes spherocitózisban szenvedő ikerpár két tagja átmeneti aplasztikus krízissel: 1338/HUN/2024), transzfúzióval összefüggő átvitel(ek)re (pl. 2518/HUN/2024), és transzplacentális fertőzések is valószínűsíthetőek. Bár a B19V fertőzések lehetnek tünetmentesek vagy enyhe tünetekkel is járhatnak, viszont a várandós nők esetében, immunhiányos betegeknél és krónikus anémiában szenvedő betegeknél súlyosabb szövődményekkel is járhatnak, ezért a járványos időszakban fontos lenne a veszélyeztetett populációk érdekében a megfelelőbb megelőzési stratégiák kidolgozására és pl. vérkészítmények laboratóriumi szűrővizsgálatára is.

Az egyik legfontosabb kérdés, hogy milyen faktorok játszottak szerepet a B19V-fertőzések számának 2023/2024 évi jelentős megemelkedésében, hazánkban és Európában? Számos természetes és emberi tényező ismert (pl. immunológiai naiv populáció aránya, a

járványok 3-6 éves periodicitása, eltérő fertőző betegségek jelentési rendszerek, eltérő vérszűrési stratégiák, stb.), amelyek befolyásolják a járványos B19V-fertőzéseket (Mor et al., 2024; Valeur-Jensen et al., 1999; Mossong et al., 2008; Williams et al., 2022). A legutolsó, dokumentáltan jelentős B19V járványcsúcs 2016/2017 évben volt Európában (Russcher et al., 2024; Nordholm et al., 2024). Az interepidemiás időszak átlagos hosszát a B19V esetében 4 évnek tartják, így a következő 2020/2021 táján lett volna várható. Ez azonban egybeesett a SARS-CoV-2 világjárvány kezdetével Európában. A B19V átviteli dinamikáját a SARS-CoV-2 pandémia alatti izolációs intézkedések befolyásolhatták, így a B19V interepidemiás időszaka megnyúlt, közel megduplázódhatott. Ez a faktor jelentősen hozzájárulhatott a fertőzések és a megbetegedések megnövekedett számához a felszaporodott immunológiailag naiv populáció körében, ahogy azt újabban mások is megfogalmazták a B19V esetében (Russcher et al., 2024; Guillet et al., 2024) és ugyancsak – a hasonló atípusos betegség mintázat alapján – más (virális) fertőzésekben (Abu-Raya et al., 2023; Li et al., 2024).

Az epidemiológia leírásán túl a B19V járvány dinamikája és molekuláris epidemiológiája a patogén genetikai tulajdonságainak az ismeretében értelmezhető helyesen. A prototípus B19V törzs (1338/HUN/2024) és közeli rokonai genomjában összesen 4 szinonim (3 aminosav az NS1-ben és 1 aminosav a VP1-ben) és további 9 nem-szinonim közös- és egyedi genommutációt találtunk a kódoló régióban, illetve egy nukleotid inszerciót az 5'UTR-ben. A genetikai változások időbeli leírása fontos új ismeretekre vezethet - ahogy azt az újonnan felbukkant SARS-CoV-2 variánsoknál láthattuk (Lin et al., 2021; Carabelli et al., 2023) -, de jelenleg a mutációk jelentősége a fertőzések súlyosságában, átvihetőségében, receptor affinitásban, illetve a megbetegedések epidemiológiájában a B19V esetében nem ismert (Seetha et al., 2021; Gallinello et al., 2003).

A B19V fertőzések epidemiológiájának, fertőzési számának és dinamikájának pontosabb alapja lehetne, ha minden országban kötelezően jelentenék a klinikailag és laboratóriumiilag igazolt megbetegedéseket, illetve ha több molekuláris epidemiológiai adat állna rendelkezésre a B19V teljes genom szekvencia információjával a jövőben.

6. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Prof. Dr. Reuter Gábornak, hogy lehetővé tette a dolgozat létrejöttét és tudásával támogatta az előrehaladását.

Köszönettel tartozom Dr. Boros Ákosnak a kísérletek megtervezésében végzett munkájáért és a kísérletek során nyújtott segítségéért, illetve az átadott gyakorlati ismeretekért.

Szeretném megköszönni Dr. Tóth Fruzsínának a kísérletekben nyújtott segítséget és a gyakorlati tudást, amit megosztott velem.

Továbbá szeretném megköszönni a virológiai laboratórium munkatársainak, Garamvölgyi Zsoltnénak, Jankovics Andreának és Wéber Csillának a dolgozathoz kapcsolódó B19V szerológiai vizsgálatok (ELISA) elvégzését és a segítségüket.

Az egészségügyi statisztikai adatgyűjtési és kutatási engedély száma: KK/3937-1/2024 (Pécsi Tudományegyetem).

7. A témához kapcsolódó saját publikációk

Tóth F, **Moser T**, Boros Á, Balázs B, Takáts K, Pankovics P, Reuter G. Seroepidemiology (2018-2024) and epidemic spread of an emerging human parvovirus B19 genotype 1 (subtype 1a2) variant in Hungary, 2023/2024. Archives of Virology, 2025; a kézirat közlésre elfogadva

Moser T. A humán parvovírus B19 szeroepidemiológiája (2018-2024) és a 2023/2024-ben járványosan terjedő variánsának meghatározása hazánkban. Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Házi TDK Konferencia, Pécs, 2024. december 13.

Eredménye: I. helyezés

8. Irodalomjegyzék

Abu-Raya, B., Paramo, M. V., Reicherz, F., Lavoie, P. M. (2023). Why has the epidemiology of RSV changed during the COVID-19 pandemic? *The Lancet*, 61, Article 102089. 10.1016/j.eclinm.2023.102089

Bertoldi, A., Colazo, Salbetti M. B., Rodríguez, G., Tenaglia, M., Hernández, G., Alfaro, J., Riberi, M. I., Olivera, N. L., Pedrantim M., Isa, M. B., Adamo, M. P. (2022). Human parvovirus B19 infection in a pregnant patient resulting in severe hydrops, foetal death and persistent infection. *Access Microbiology*, 4(10). 10.1099/acmi.0.000428

Bonvicini, F., Bua, G., Gallinella, G. (2017). Parvovirus B19 infection in pregnancy — awareness and opportunities. *Current Opinion in Virology*, 27, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.10.003>

Bonvicini, F., Manaresi, E., Bua, G., Venturoli, S., Gallinella, G. (2013). Keeping pace with parvovirus b19 genetic variability: A multiplex genotype-specific quantitative PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11). <https://doi.org/10.1128/jcm.01970-13>

Broliden, K., Tolfvenstam, T., Norbeck, O. (2006). Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *Journal of Internal Medicine*, 260(4), 285-304. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01697.x>

Carabelli, A. M., Peacock, T. P., Thorne, L. G., Harvey, W. T., Hughes, J. de Silva, T. I., Peacock, S. J., Barclay, W. S., de Silva, T. I., Towers, G. J., Robertson, D. L. (2023). SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nature Reviews Microbiology*, 21(3), 162-177. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00841-7>

Chen, A. Y., Zhang, E. Y., Guan, W., Cheng, F., Kleiboeker, S., Yankee, T. M., Qiu, Jianming. (2010). The small 11kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood*, 115(5), 1070-1080. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-215756>

Cossart, Y. E., Cant, B., Field, A. M., Widdows D. (1975). Parvovirus-like particles in human sera. *The Lancet*, 1(7898), 72-3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)91074-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)91074-0)

Cotmore, S. F, Agbandje- McKenna, M., Canuti, M., Chiorini, J. A., Eis- Hubinger, A. M., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Oliastro, M., Péntzes, J. J., Pintel, D. J., Qiu, J., Soderlund- Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *Journal of General Virology*, 100(3), 367-368. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212>

Crabol, Y., Terrier, B., Rozenberg, F., Pestre, V., Legendre, C., Hermine, O., Montagnier- Petrisans, C., Guillevin, L., Mouthon, L. (2013). Intravenous immunoglobulin therapy for pure red cell aplasia related to human parvovirus B19 infection: A retrospective study of 10 patients and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 56(7), 968-977. <https://doi.org/10.1093/cid/cis1046>

d’Humières, C., Fouillet, A., Verdurme, L., Lakoussan, S. B., Gallien, Y., Coignard, C., Hervo Marie, Ebel, A., Soares, A., Visseaux, B., Maire, B., Juan, P. H., Parent du Châtelet, I., Guthmann, J. P., Durand, J. (2024). An unusual outbreak of parvovirus B19 infections, France, 2023 to 2024. *Euro Surveilliance*, 29(25). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.25.2400339>

Ekman, A., Hokynar, K., Kakkola, L., Kantola, K., Hedman, L., Bondén, H., Gessner, M., Aberham, C., Norja, P., Miettinen, S., Hedman, K., Söderlund-Venermo, M. (2007). Biological and Immunological Relations among Human Parvovirus B19 Genotypes 1 to 3. *Journal of Virology*, 81(13). <https://doi.org/10.1128/jvi.02713-06>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Communicable disease threats report. Week 16 14-20 April 2024. Stockholm: ECDC; 2024.

https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/communicable-disease-threats-report-week-16-2024_final.pdf

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Risks posed by reported increased circulation of human parvovirus B19 in the EU/EEA – 5 June 2024. ECDC: Stockholm; 2024. doi:10.2900/453481

Gallinella, G. (2013). Parvovirus B19 achievements and challenges. *International Scholarly Research Notices*, 2013(1). <https://doi.org/10.5402/2013/898730>

Gallinella, G. (2018). The clinical use of parvovirus B19 assays: recent advances. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(9), 821-832. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1503537>

Gallinello, G., Venturati, S., Manaresi, E., Musiani, M., Zerbini, M. (2003). B19 virus genome diversity: epidemiological and clinical correlations. *Journal of Clinical Virology*, 28(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00120-3](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00120-3)

Guillet, M., Bas, A., Lacoste, M., Ricard, C., Visse, C., Barlet, V., Malard, L., Le Cam, S., Morel, P., de Lamballerie, X., Laperche, S., Gallian, P. (2024). New atypical seroepidemiological profile of parvovirus B19 revealed by molecular screening of blood donations, France, Winter 2023/2024. *Euro Surveill*, 29(21). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.21.2400253>

Heegaard, E. D., Brown, K. E. (2002). Human parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 485-505. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.3.485-505.2002>

Hübschen, J. M., Mihneva, Z., Mentis, A. F., Schneider, F., Aboudy, Y., Grossman, Z., Rudich, H., Kasymbekova, K., Sarv, I., Nedeljkovic, J., Tahita, M. C., Tarnagda, Z., Ouedraogo, J. B., Gerasimova, A. G., Moskaleva, T. N., Tikhonova, N. T., Chitadze, N., Forbi, J. C., Faneye, A. O., Otegbayo, J. A., Charpentier, E., Muller, C. P. (2009). Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11). <https://doi.org/10.1128/jcm.01201-09>

Juhász Z, Tiszlavicz L, Kele B, Terhes G, Deák J, Rudas L, et al. Sudden cardiac death from parvovirus B19 myocarditis in a young man with Brugada syndrome. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 25, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2014.04.018>

Knöll, A., Louwen, F., Kochanowski, B., Plentz, A., Stüssel, J., Beckenlehner, K., Jilg, W., Modrow, S. (2002). Parvovirus B19 Infection in Pregnancy: Quantitative Viral DNA Analysis Using a Kinetic Fluorescence Detection System (TaqMan PCR). *Journal of Medical Virology*, 67(2), 259-266. <https://doi.org/10.1002/jmv.2216>

Lamont, R. F., Sobel, J. D., Vaisbuch, E., Kusanovic, J. P., Mazaki-Tovi, S., Kim, S. K., Uldbjerg, N., Romero, R. (2011). Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 118(2), 175-186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02749.x>

Leisi, R., Ruprecht, N., Kempf, C., Ros, C. (2013). Parvovirus B19 uptake is a highly selective process controlled by VP1u, a novel determinant of viral tropism. *Journal of Virology*, 87(24), 13161-13167. <https://doi.org/10.1128/jvi.02548-13>

Li K, Rui J, Song W, Luo L, Zhao Y, Qu H., Wei, H., Zhang, R., Abudunaibi, B., Wang, Y., Zhou, Z., Xiang, T., Chen, T. (2024). Temporal shift in 24 notifiable infectious diseases in China before and during the COVID-19 pandemic. *Nature Communications*, 15, Article 3891. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48201-8>

Lin, L., Liu, Y., Tang, X., He, D. (2021). The disease severity and clinical outcomes of the SARS-CoV-2 variants of concern. *Frontiers in Public Health*, 9(775224).

<https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.775224>

Mihály, I., Trethon, A., Arányi, Z., Lukács, A., Kolozsi, T., Prinz, G., Marosi, A., Lovas, N., Dobner, I. S., Prinz, G., Szalai, Z., Pék T. (2012). Observations on human parvovirus B19 infection diagnosed in 2011. *Orvosi Hetilap*, 153(49), 1948-1957.

<https://doi.org/10.1556/oh.2012.29447>

Molenaar-de Backer, M. W., Lukashov, V. V., van Binnendijk, R. S., Boot, H. J., Zaaijer, H. L. (2012). Global co-existence of two evolutionary lineages of parvovirus B19 1a, different in genome-wide synonymous positions. *PLoS ONE*, 7(8), Article 43206.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043206>

Mor, O., Wax, M., Arami, S. S., Yitzhaki, M., Kriger, O., Erster, O., Zuckerman, N. S. (2024). Parvovirus B19 outbreak in Israel: Retrospective molecular analysis from 2010 to 2023.

Viruses, 16(3). <https://doi.org/10.3390/v16030480>

Mossong, J., Hens, N., Friederichs, V., Davidkin, I., Broman, M., Litwinska, B., Siennicka, J., Trzcinska, A., Van Damme, P., Beutels, P., Vyse, A., Shkedy, Z., Aerts, M., Massari, M., Gabutti, G. (2008). Parvovirus B19 infection in five European countries: Seroepidemiology, force of infection and maternal risk of infection. *Epidemiology and Infection*, 136(8), 1059-1068. <https://doi.org/10.1017/S0950268807009661>

Nordholm, A. C., Trier, M. F., Fischer, R. S., Flink, S. L., Moltke-Prehn, A., Elskær, M. J., Funk, T., Sperling, L., Jeyaratnam, U., Træholt, F. K., Hjort-Pedersen, K., Hjørnet, K. C., Thoft, N. R., Jokelainen, P., Wessman, M. (2024). Epidemic of parvovirus B19 and disease severity in pregnant people, Denmark, January to March 2024. *Euro Surveill*, 29(24).

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.24.2400299>

Ornoy, A., Ergaz, Z. (2017). Parvovirus B19 infection during pregnancy and risks to the fetus. *Birth Defects Research*, 109(5), 311-323. <https://doi.org/10.1002/bdra.23588>

Puccetti, C., Contoli, M., Bonvicini, F., Cervi, F., Simonazzi, G., Gallinella, G., Murano, P., Farina, A., Guerra, B., Zerbini, M., Rizzo, N. (2012). Parvovirus B19 in pregnancy: Possible consequences of vertical transmission. *Prenatal Diagnosis*, 32(9), 897-902. <https://doi.org/10.1002/pd.3930>

Rogo, L. D., Mokhtari-Azad, T., Kabir, M. H., Rezaei, F. (2014). Human parvovirus B19: A review. *Acta Virologica*, 58(3), 199-213. https://doi.org/10.4149/av_2014_03_199

Russcher A, van Boven M, Beninca E, Verweij EJT, Molenaar-de-Backer MWA, Zaajer HL, et al. Changing epidemiology of parvovirus B19 in the Netherlands since 1990, including its re-emergence after the COVID-19 pandemic. (2024). *Scientific Reports*. 14, Article 9630 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59582-7>

Seetha, D., Pillai, H., Nori, S. R. C., Kalpathodi, S. G., Thulasi, V. P., Nair, R. R. (2021). Molecular-genetic characterization of human parvovirus B19 prevalent in Kerala state, India. *Virology Journal*, 18, Article 96. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01569-1>

Servant, A., Laperche, S., Lallemand, F., Marinho, V., De Saint Maur, G., Meritet, J. F., Garbarg-Chenon, A. (2002). Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *Journal of Virology*, 76(18), 9124-9134. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.9124-9134.2002>

Terhes G, Jenei M, Bereg E, Túri S, Deák J. Neurologic consequence of a parvovirus B19 infection. *Journal of Clinical Virology*. 56(2), 156-158. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.10.018>

Tolfvenstam, T., Broliden, K. (2009). Parvovirus B19 infection. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 14(4), 218-221. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2009.01.007>

Toppinen, M., Norja, P., Aaltonen, L. M., Wessberg, S., Hedman, L., Söderlund-Venermo, M., Hedman, K., (2015). A new quantitative PCR for human parvovirus B19 genotypes. *Journal of Virological Methods*, 218, 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.03.006>

Valeur-Jensen, A. K., Pedersen, C. B., Westergaard, T., Jensen, I. P., Lebech, M., Andersen, P. K., Aaby, P., Pedersen, B. N., Melbye, M. (1999). Risk factors for parvovirus B19 infection in pregnancy. *JAMA*, 281(12), 1099-1105. <https://doi.org/10.1001/jama.281.12.1099>

Vuković, V., Patić, A., Ristić, M., Kovačević, G., Cvjetković, I. H., Petrović, V. (2024). Seroepidemiology of human parvovirus B19 infection among the population of Vojvodina, Serbia, over a 16-year period (2008–2023). *Viruses*, 16(2), 180. <https://doi.org/10.3390/v16020180>

Williams, S., Ratcliff, J., Nguyen, D., Simmonds, P., Harvala, H. (2022). Detection frequencies and viral load distribution of parvovirus B19 DNA in blood and plasma donations in England. *Transfusion Medicine*, 32(5), 402-409. <https://doi.org/10.1111/tme.12893>

Yong, L., Qiu, J., (2015). Human parvovirus B19: a mechanistic overview of infection and DNA replication. *Future Virology*, 10(2), 155-167. <https://doi.org/10.2217/fvl.14.103>

Zakrzewska, K., Arvia, R., Bua, G., Margheri, F., Gallinella, G. (2023). Parvovirus B19: Insights and implication for pathogenesis, prevention and therapy. *Aspects of Molecular Medicine*, 1(100007). <https://doi.org/10.1016/j.amolm.2023.100007>

Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M. C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R., Tijssen, P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Developmental Cell*, 1(2), 291-302. 10.1016/S1534-5807(01)00031-4

Rövidítések jegyzéke

5'UTR	nem kódoló régió az 5' genom végen
aa	aminosav
B19V	humán parvovírus B19
ELISA	enzimhez kötött immunszorbens assay
Gb4	globotetraozilceramid
gt	genotípus
HIV	humán immundeficiencia vírus
ITR	fordított vég-ismétlődés (inverted terminal repeat)
IgM	M alosztályú immunglobulin ellenanyag
IgG	G alosztályú immunglobulin ellenanyag
IgA	A alosztályú immunglobulin ellenanyag
kb	kilobázis
kDa	kiloDalton
NS1	nem strukturális fehérje 1
NS1-nuc	nem strukturális fehérje nukleáz doménje
NSBE	nem strukturális fehérje DNS-kötő eleme
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
Ori	replikációs origó
TBE	tris-borát-EDTA puffer
VP1	virális kapszid fehérje 1
VP2	virális kapszid fehérje 2