

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

## **Humán hantavírus fertőzések Magyarországon: szeroprevalencia a rizikócsoportban és klinikai esetek a Dél-Dunántúlon 2011-2015 között**

PhD értekezés tézisei

**Oldal Miklós**

Témavezető

**Dr. Jakab Ferenc**

habil. egyetemi docens



**PÉCS, 2016**

## I. Tudományos előzmények, célkitűzések

A humánpatogén fertőző ágenseknek (ide értve a baktériumokat, vírusokat, gombákat és parazitákat) közelítőleg 60%-a zoonózisok kategóriájába esik (Taylor és mtsai, 2001); melyek az állatokról természetes úton emberre terjedő fertőző betegségek. A világ legismertebb fertőző betegségei közül is számos a zoonózisok közé tartozik, így például a malária, a sárgaláz, az influenza, a veszettség, vagy például az Ebola vírus, mely 2015-ben Nyugat-Afrikában az eddigi legnagyobb kitörését okozta.

A zoonózisok megjelenését és terjedését több tényező határozza meg, melyek közül legfontosabb a növekvő népesség, mely számos további tényezőt von maga után. Ilyen például az urbanizáció, a termőföldek egyre nagyobb térnyerése és az ezzel összefüggő erdőirtás. Egyes tényezők a modern technológiával hozhatók összefüggésbe. Legfőbb példa a légi utazás globális elterjedése, melyen belül divattá vált az egzotikus tájak látogatása is, melyek sok esetben a legveszélyesebb zoonózisok szülőföldjei is egyben. A napjainkban sokat emlegetett klímaváltozás az embertől részben független tényező, de a népvándorlásban, valamint a zoonótikus ágenseket hordozó állatpopulációk eloszlásában döntő szerepet játszik. Mindezek a tényezők együttesen azt eredményezik, hogy az állatok és emberek élőhelye egyre nagyobb mértékben kerül átfedésbe, így növelve a zoonótikus kórokozókval való fertőződés lehetőségét.

Jelen munka középpontjában a hantavírusok állnak, melyek a zoonótikus ágensek jeles képviselői globális mértékben és Magyarországon is. A hantavírusokat rágcsálók terjesztik, a fertőzést pedig kortól, nemtől függetlenül bárki elkaphatja. Éves skálán hazánkban nem tekinthető gyakorinak a fertőzés (évi 6-16 eset, Heyman és mtsai, 2011), ám a megbetegedések számos esetben igen súlyos lefolyásúak. A hazai hantavírus kutatás gyerekcipőben jár, kevés információnk van a fertőzések klinikai jellegéről, valamint azok országos eloszlásáról, különös tekintettel a rizikócsoportra. Utóbbi alatt értjük azon emberek csoportját, akik foglalkozásuk révén a hantavírusokat terjesztő rágcsálók élőhelyén, vagy annak közvetlen közelében dolgoznak (vadászok, erdészeti dolgozók).

A Magyarországon cirkuláló hantavírusok közül a Dobrava-Belgrade (DOBV) és Puumala vírus (PUUV) tekinthető patogén jellegűnek. A fertőzések diagnosztikája világszerte elsősorban immunológiai módszereken alapul, vizsgálatainkban is főként ezen módszereket alkalmazzuk (ELISA és Western blot), kiegészítve a fertőző ágens pontosabb tipizálását lehetővé tevő real-time PCR módszerekkel, esetünkben TaqMan reverz-transzkriptáz PCR (TaqMan RT-PCR) segítségével.

A jelen munka betekintést szeretne adni a hazai hantavírus fertőzések klinikai jellegzetességeibe, valamint a fertőzés rizikó csoporton belüli előfordulására. Fentieknek megfelelően a célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- PUUV nukleokapszid fehérje előállítás *E. coli* expressziós rendszerben
- DOBV és PUUV alapú ELISA assay optimalizálása nagyszámú minta vizsgálata céljából
- Western blot assay optimalizálása az ELISA megerősítésére, illetve az akut fertőzések diagnosztikájára
- Akut humán fertőzések esetén a minták tesztelése Western blot és TaqMan RT-PCR módszerrel
- A TaqMan RT-PCR módszerek detektált vírusok molekuláris jellemzése
- A vadászok és erdészeti dolgozóktól 2011 és 2013 között gyűjtött vérminták screening vizsgálata ELISA módszerrel, az eredmények megerősítése Western blot analízissel.
- A rizikó csoport mintáinak feldolgozása alapján szeroprevalencia országos eloszlásának meghatározása
- A Dél-Dunántúlon a 2011 és 2015 közötti időszakban az AKI kritériumoknak megfelelő betegminták feldolgozása, a hantavírus fertőzés etiológiájának igazolása, együttműködésben a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ I.sz. Belgyógyászati Klinika illetve a Klinikai Központ II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum intézményekkel.

## **II. Anyag és módszer**

### **Humán minták**

A humán minták gyűjtését két részletben mutatjuk be. A vadászok és erdészeti dolgozók véradása önkéntes alapon történt. A mintavételi helyek az egyes erdészetek adott régióhoz tartozó központjai voltak. A mintavétel előtt minden önkéntes véradó kérdőívet töltött ki, melyen az epidemiológiai adatok mellett (születési hely, idő, lakóhely) kíváncsiak voltunk a terepen végzett munkaidőre, a korábbi fertőzésekre, ezek kezelésére, a szedett gyógyszerekre és az állatokkal történő kontaktusra (harapás, sérülés, háziállatok). A mintagyűjtés az Egészségügyi Tudományos Tanács jóváhagyásával történt (ETT-TUKEB No#2213-0/2010-1018EKU).

A klinikai minták gyűjtése a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ I.sz. Belgyógyászati Klinika illetve a Klinikai Központ II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum intézményekkel történő együttműködés keretében történt. A vizsgálatba vont személyek azok voltak, akik a klinikai tünetek, illetve a hospitalizálás során végzett labor diagnosztikai értékek alapján megfeleltek az akut vesekárosodás, azaz Acute Kidney Injury (AKI) kritériumainak. Ezek:

- urológiai problémák (kevés vizelet)
- emelkedett fehérvérsejtszám
- a hospitalizáció napján mért legalább 125  $\mu\text{mol/l}$ -es szérum kreatinin koncentráció, ennek további 1,5-szörös emelkedése 7 napon belül
- trombocitopénia (alacsony vérlemezke szám)
- emelkedett szérum transzamináz szintek
- fehérje és/vagy vörösvértest jelenléte a vizeletben

### **Virális antigén-fehérje expresszió**

Az ELISA és Western blot tesztekben virális antigénként a DOBV és PUUV vírusok nukleokapszid fehérjéjét (Nucleocapsid Protein – NP) használtuk, az emberi szervezet immunválasza ugyanis ezen fehérjék ellen a legkifejezettebb. A DOBV NP korábbi munka keretében rendelkezésre állt (Németh és mtsai, 2011). A PUUV NP létrehozásához sejtenyészlet-felülúszóból származó Sotkamo hantavírus törzs genomjának S szegmensét (1290 bázispár) amplifikáltuk fel, mely a virális nukleokapszid fehérjét kódolja. A termelő konstrukcióval (pET28a vektor, 1290 nukleotid hosszúságú NP-gén inszert) *E. coli* BL21 Rosetta (DE3)pLysS kompetens sejteket transzformáltunk, ezt követően 30  $\mu\text{g/ml}$  kanamicin és 35  $\mu\text{g/ml}$  chloramfenicol tartalmú LB tápoldatban inkubáltuk őket 37°C-on, rázótermosztátban, percenként 200 fordulatszámon. A tenyészet log fázisának elérésekor ( $\text{OD}_{600} = 0.8-1.0$ ), a sejteket 1.0 mM IPTG-vel indukáltuk, 15°C-on, 20 órán át (overnight). IPTG indukció után a sejtek feltárását és a fehérje tisztítását denaturáló körülmények között végeztük. Az NP-t HIS Select® HF Nickel Affinity Gel (Sigma Aldrich) oszlopon tisztítottuk, az eluálás egyes pH frakcióit SDS-poliakrilamid gélelektroforézis és Comassie Blue festés használatával vizualizáltuk.

## **ELISA és Westren blot assay**

A ELISA screening kivitelezéséhez 96 lyukú mikrotiter plate-eket használtunk (Maxisorp Nunc-Immuno Plate, Nunc). A plate-eket 2 órán át, 37°C-on érzékenyítettük DOBV és PUUV fehérjék keverékével. Mosás, majd blokkolás következett 2 órán át, 37°C-on, 5% sovány tejpor (Blotting-Grade Blocker, BIO-RAD) és 5% szukróz (Merck) tartalmú PBS-sel (phosphate-buffered saline). A szérum mintákat 2,5% sovány tejpor tartalmú PBS-ben 1:100 arányban hígítva vittük a lemezekre. Egy óra 37°C-on történő inkubáció és mosás után a HRP-konjugált szekunder anti-humán IgM és IgG antitesteket (DakoCytomation) 0.05% Tween-20 (Sigma) tartalmú PBS-ben (PBS-T), 1:4000 hígításban vittük fel. További egy óra 37°C inkubáció és mosás után a lemezek előhívása 100 µl of 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin szubsztrát (BD OptEIA), hozzáadásával történt sötétben, szobahőmérsékleten, 15 percig. A színreakciót 100 µl, 2M kénsav oldattal állítottuk le.

A Western blot esetében a DOBV-PUUV fehérje keveréket Mini-PROTEAN® Precast Gels (BIO-RAD) gyárilag előkészített poliakrilamid gélbe vittük fel, egyenként 2000 ng mennyiségben. 180V feszültségen, 30 percig történő elektroforézis után Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) készülékkel, 170 mA áramerősségen, 30 percig végeztük a blottolást. Ezután a nitrocellulóz membránt 30 percen át 5% sovány tejjel blokkoltuk, majd a szérum mintákat 0.1% BSA (bovine serum albumin) és 0.05% Tween-20 tartalmú TBS-ben (tris-buffered saline, pH 7.5), 1:100 hígításban adtuk a membránhoz. Másodlagos antitestként HRP-konjugált, nyúlban termeltetett anti-humán IgG-t (1:2000) és rabbit anti-humán IgM-et (1:1000) (DakoCytomation) használtunk. Minden inkubáció 1 órán át történt szobahőmérsékleten. Az elsődleges és másodlagos antitestek felvitele után 3 x 10 percig mostuk a membránokat, TBS-Tween-20 (pH 7.5) használatával. A színreakció előhívása diamino-benzidin és 50 mM Tris (pH 7.5) és 0.3% Nickel(II)-klorid (Sigma) keverékével történt.

## **TaqMan RT-PCR**

Humán minták esetében a virális RNS kivonása 200 µl szérum mintából történt, QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A DOBV és PUUV vírusok kimutatásához korábban publikált primereket alkalmaztunk, a szerzők által leírt PCR programok alkalmazásával (Weidmann és mtsai, 2005, Garin és mtsai, 2001). Az egylépéses PCR reakciókat a QIAGEN OneStep RT PCR Kit (QIAGEN) alkalmazásával futtattuk.

## **Szekvenálás**

A pozitív PCR terméket 2,5%-os agaróz gélbe vittük fel, a fragmenteket QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) kit segítségével izoláltuk a gélből, a gyártó ajánlása szerint. A szekvenálási PCR Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) használatával történt, gyári protokoll szerint. Az amplifikált DNS-t 3M nátrium-acetát és abszolút alkohol precipitáció után Hi-Di™ formamidban (Applied Biosystems) reszuszpendáltuk, majd ABI prism 310 Genetic Analyzer készülékkel szekvenáltuk.

## **Statisztikai és filogenetikai analízis**

Az országosan megállapított nagyobb régiók közötti szeroprevalencia adatok elemzésére Chi<sup>2</sup> tesztet alkalmaztunk. A különbséget  $p \leq 0,05$  érték esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A minták randomizálását a Microsoft Excel 2010 beépített randomizáló algoritmusával végeztük.

## **III. Eredmények**

### **Virális antigének**

A PUUV NP mérete Agilent 2100 Bioanalyzer-rel történt mérés alapján 59 kDa, a DOBV NP 55 kDa méretűnek adódott. A NP fehérjékkal ezután az ELISA és Western blot assay-t a kereskedelemben forgalmazott NovaLisa™ ELISA kittel (NovaTec) szemben validáltuk, melynek eredményeképp mind az ELISA, mind a Western blot specificitása és szenzitivitása 90% felettinek adódott.

### **Klinikai minták**

2011 januárja és 2015 decembere között az együttműködő klinikákról 94 betegminta érkezett laboratóriumunkba, melyek közül hét esetben (7,4%) tudtuk igazolni a hantavírus etiológiát, egyidejű, specifikus IgM és IgG antitestek detekálása révén. A hét betegből egy esetben tudtuk TaqMan RT-PCR módszerrel is megerősíteni a kórokozó ágenst, mely DOBV típus volt. Bár a pusztán immunológiai tipizálás keresztreakciókat eredményezhet, esetünkben a további hat beteg esetében is a szerológia a jelintenzitás alapján egyértelmű DOBV fertőzést

igazolt. Az érintettek vezető klinikai tünetei a láz, hastáji fájdalom, hányás és a jelentősen csökkent vizeletürítés (oliguria) voltak. A hantavírus fertőzés egységes laboratóriumi indikátoraiként emelkedett szérumban kreatinin koncentrációt és trombocitopéniát detektáltunk, emellett hat beteg esetében fehérje és vörösvértest is kimutatható volt a vizeletben.

### **Szeroprevalencia a rizikócsoporthoz**

A 2011 január és 2013 február közötti időszakban összesen 32 mintavételi ponton, 106 erdészethez tartozó dolgozótól 835 natív vérmintát gyűjtöttünk. Közülük 750 volt férfi és 85 nő, átlagéletkoruk 45 év (tartomány: 25-65 év). Az adatok feldolgozása során a régiókon belüli eltérő mintaszám okán normalizálást hajtottunk végre, 100 mintát random módon kiválasztva az egyes régiókból. A összesített szeroprevalencia 5,5%; az egyes régiókban pedig a gyakoriság a következők szerint alakult: 2% a Duna-Tisza közén, 3% a Dél-Dunántúlon, 7% Észak-Dunántúlon, 10% az Északi-középhegységben.

## **IV. Eredmények megvitatása és záró gondolatok**

A jelen dolgozatban bemutatott eredményeket az alábbiakban foglalhatjuk össze. A szerológiai tesztek alapjául szolgáló PUUV nukleokapszid fehérjét sikerült megfelelő tisztaságban előállítani *E. coli* alapú bakteriális expressziós rendszer alkalmazásával. A fehérje mind denaturált, mind renaturált (mi utóbbit használtuk) állapotában is működőképes az immunológiai reakció folyamán. A DOBV és PUUV fehérjék alkalmazásával optimalizáltunk egy ELISA detektáló rendszert, mely nagy mennyiségű minta screening tesztelésére alkalmas. A ELISA teszt eredmények megerősítésére Western blot (WB) analízist használtunk, melyet előzőleg szintén optimalizáltunk. Mind az ELISA, mind a WB analízis kellő specifitást és szenzitivitást mutattak a gyűjtött humán vérszérumból származó minták vizsgálatának kivitelezéséhez.

A 2011-2015 között gyűjtött, akut vesekárosodás (AKI – Acute kidney injury) kritériumainak megfelelő betegminták betekintést nyújtanak a dél-dunántúli régió hantavírus fertőzéseinek gyakoriságába. A klinikai tüneteket, súlyosabb megbetegedést okozó fertőzés aránylag ritka (a vizsgált 94 beteg 7,4%-a); ugyanakkor jellemző, hogy a hospitalizációt igénylő megbetegedések mögött minden esetben a DOBV típusú hantavírus fertőzés áll. Ezen megfigyelésünk egyezik a Balkán országokban leírt tapasztalatokkal, ahol a súlyos esetek

háttérben szintén túlnyomó többségben a DOBV áll, míg a PUUV okozta fertőzések gyakran egyáltalán nem kerülnek diagnosztizálásra.

A hantavírus fertőzések szempontjából rizikócsoporthoz tekinthető önkéntesektől (erdészeti dolgozók, vadászok) összesen 835 mintát gyűjtöttünk. Ezt a mintamennyiséget országunk méretéhez képest és a hasonló tanulmányok adatait is figyelembe véve kellően reprezentatívnak tartjuk. A regionális szeroprevalencia legmagasabb értékét az Északi-középhegység területén mértük (10%), melyet a területen élő hantavírus-hordozó rágcsálók (főként a sárganyakú erdeiegér) populációk nagy méretével hozzuk összefüggésbe. A teljes vizsgált mintamennyiségre vetített összesített szeroprevalencia összesen 5,5%. Utóbbi értéket egy korábbi (2003-ban publikált) hasonló tanulmányhoz viszonyítottuk, ahol az ország egész területéről, 20 évnél idősebb, egészséges emberektől random módon gyűjtött minták immunológiai tesztelése során a teljes szeroprevalencia 10%-nak adódott (Ferenczy és mtsai., 2003). Eredményeinket az említett tanulmányhoz hasonlítva diszkrépancia adódik. Nullhipotézisünket, mely szerint a hantavírus fertőzések gyakorisága a rizikócsoporthoz nagyobb mértékű, mint a háttérpopulációban, nem kívánjuk elvetni. Utóbbi megállapítást ugyanis számos tanulmány megerősíti (Antoniadis és mtsai, 1987, Hukic és mtsai, 2010, Heyman és mtsai, 2011, Avšič Županc és mtsai, 2014). A 2003-as tanulmány totál szeroprevalencia értéke és jelenlegi munkában talált maximális érték közötti egyezés egyik magyarázata lehet a két időszakban esetlegesen jelentősen eltérő gazdaállat abundancia, illetve a vizsgálati módszerek érzékenysége, illetve specificitása közötti eltérés.

Végezetül, a célkitűzésben foglalt pontok teljesítését sikeresnek tartjuk. A rizikócsoporthoz tagjaiként tekinthető dolgozók közötti hantavírus fertőzések szerológiai felmérése hiánypótló jellegű, a feldolgozott minta mennyiség és az eredmények jól illeszkednek a környező országok felméréseihez, ezekhez viszonyítva Magyarországon a hantavírus szeroprevalencia közepes mértékű.



## Irodalomjegyzék

- Antoniadis A, Le Duc JW, Daniel-Alexiou S (1987): Clinical and epidemiological aspects of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Greece. *Eur J Epidemiol*; 3(3):295-301.
- Avšič Županc T, Korva M, Markotić A (2014). HFRS and hantaviruses in the Balkans/South-East Europe. *Virus Res* 2014 Jul 17;187:27-33.
- Ferenczi E, Rácz G, Szekeres J, Balog K, Tóth E, Takács M, Csire M, Mezey I, Berencsi G, Faludi G (2003): New data for the public health importance of hantaviruses in Hungary. *Orv Hetil*; 144(109):467-74.
- Garin D, Peyrefitte C, Crance JM, Le Faou A, Jouan A, Bouloy M. Highly sensitive Taqman PCR detection of Puumala hantavirus. *Microbes Infect* 2001;3:739–45.
- Heyman P, Ceianu CS, Christova I, Tordo N, Beersma M et al. (2011): A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Euro Surveill*; 16(36).
- Hukic M, Nikolic J, Valjevac A, Seremet M, Tesic G, Markotic A (2010): A serosurvey reveals Bosnia and Herzegovina as a Europe's hotspot in hantavirus seroprevalence. *Epidemiol Infect*;138(8):1185-93.
- Németh V, Madai M, Marácz A, Bérczi B, Horváth G, Oldal M, Kisfali P, Bányai K, Jakab F (2011): Detection of Dobrava-Belgrade hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR Green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Arch Virol*; 156(9):1655-60.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME (2001): Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond Series B Biol Sc*; 356(1411): 983–989.
- Weidmann M, Schmidt P, Vackova M, Krivanec K, Munclinger P, Hufert FT (2005): Identification of genetic evidence for dobrava virus spillover in rodents by nested reverse transcription (RT)-PCR and TaqMan RT-PCR. *J Clin Microbiol*; 43(2):808-12.