



Záró beszámoló az OTKA-PD-77977 számú „A hantavírus-fertőzések hazai előfordulásának felmérése elsősorban erdészeti és mezőgazdasági dolgozók vérmintáinak szerológiai vizsgálata alapján.” című projekt elért eredményeiről.

1. *Escherichia coli* expressziós rendszer laboratóriumi kidolgozása, optimalizálása és alkalmazása.

Az optimalizált biológiai, expressziós rendszerben viszonylag gyorsan és egyszerűen lehetett a számunkra szükséges rekombináns virális fehérjét létrehozni. Ezekhez a kísérletekhez pET28a expressziós vektort használtunk, amit BL21 *Escherichia coli* sejtekbe transzformálva, a továbbiakban a sejteket az általunk kívánt rekombináns virális fehérje termelésére serkentettük. Mivel a célfehérjéhez egy hat aminosavból álló hisztidin tag (6xHis) is kapcsolt, a letermelt fehérjét a sejtek feltárása után Nikkel-kelet (Nikkel-NTA) oszlopon preparáltuk, majd dialízissel töményítettük, tisztítottuk. A tisztított fehérjét a továbbiakban SDS-PAGE, Western blot és ELISA rendszerekben teszteltük. Az SDS-PAGE elektroforézisekből kiderült, hogy az általunk várt, hozzávetőlegesen 45 illetve 47 kDa molekulatömegű virális kapszid-fehérjét (vírus típustól függően) sikerült kellő mennyiségben letermeltetni. Az ELISA valamint a Western blot immunológiai vizsgálatok eredményeiből pedig arra a következtetésre jutottunk, hogy a termelt fehérje immunológiailag aktív, tehát további szerológiai vizsgálatokhoz jól használható.

Vizsgálatainkhoz a két leggyakoribb hazai hantavírus típusból származó rekombináns kapszid-fehérjére volt szükségünk. Így a pályázat időtartama alatt mind a Dobrava-Belgrade (DOBV), mind pedig a Puumala (PUUV) hantavírusok fehérjéit sikeresen expresszáltuk. A pályázatban vállalt felmérés korrekt elvégzéséhez szükségünk volt mind a két vírus rekombináns antigénjére.

A vizsgálatok során, a gyűjtött rágcsáló és humán vérmintákból mutattuk ki a DOBV és PUUV ellen termelt IgG típusú antitesteket. A tesztekben használt, saját fejlesztésű ELISA módszerünknek először megállapítottuk a szenzitivitási és specificitási értékeit. Ehhez a kereskedelemben is kapható ELISA tesztet (NovaLisTM ELSIA kit) használtunk, mint referencia. Az ELISA és Western blot (WB) tesztjeink specificitásának és szenzitivitásának meghatározására előzőleg igazolt, 10 DOBV-pozitív, 10 PUUV-pozitív, valamint 40, hantavírus-negatív mintát használtunk. Western blotnál a specificitás és szenzitivitás egyaránt 100% DOBV esetében, illetve 100% és 97% PUUV esetében. Az „in-house ELISA”-nál a szenzitivitás 98%, a specificitás 89% mind DOBV, mind pedig PUUV esetében. Az eredmények alapján tesztünket kellően érzékenynek és megbízhatónak találtuk a vizsgálatok folytatásához.

- Németh et al. *Archives of Virology*, 2011
- Németh et al. *Vector-Borne and Zoonotic Disease*, 2013

2. Erdészeti dolgozóktól történő vérminta gyűjtése.

A pályázat legnehezebben kivitelezhető része volt az önkéntesektől történő vérvételek elvégzése. A legfőbb nehézség abból adódott, hogy az erdészetek folyamatos gazdasági és strukturális átalakításai miatt, nagyon sok terepi munkát végző alkalmazottjától kellett az erdészeteknek megválnia. Ezeknek az embereknek a helyét főleg az újonnan meginduló „közmunka” programból az erdészetekhez került alkalmi munkásokkal kellett feltölteni. Másik fő vonal az emberek pótlására, a magánvállalkozó fakitermelők által foglalkoztatott erdészeti munkások voltak. Az előbb említett csoportok tagjait értelemyszerűen nem, vagy csak igen nehezen lehetett a véradás fontosságáról meggyőzni. Ennek megfelelően a tényleges, régóta az erdészetnél dolgozó kollégák száma jelentősen csökkent. Sajnos, az



önkéntes résztvevők számát nem tudtuk befolyásolni, így természetesen voltak olyan erdészeti alkalmazottak is, akik nem kívántak részt venni a kutatásban.

A második finanszírozási évben megkezdtük a célpopuláció (erdészek, vadászok, mezőgazdasági dolgozók) önkénteseitől származó vérminták gyűjtését. Felvettük a kapcsolatot az Országos Erdészeti Egyesület elnökével, Zambó Péter erdőmérnök úrral, akinek segítségével szerveztük a vérvételeket. Az erdészetek látogatásának keretében rövid előadást tartunk a hantavírusok hazai jelentőségéről, majd az önkéntesektől vérvételt végzünk. Minden véradó esetében gyűjtöttünk háttéradatokat is a későbbi epidemiológiai, klinikai adatok elemzéséhez. Mivel a szervezés és a látogatások nagyon nehézkesen mentek, a vérvételeket a pályázat teljes időtartama alatt végeztük.

A projekt keretében 106 erdészeti és vadászárság tagjaitól összesen 835 db vérszérum minta gyűlt össze. A mintavételi területek a következők szerint oszthatók fel: Észak-Dunántúl (248 minta), Dél-Dunántúl (321 minta), Duna-Tisza Köze (107 minta), valamint az Északi-középhegység (159 minta). Az egyes területekről származó minták eltérő számának oka a véradás önkéntes jellege. A 835 véradó közül 750 volt férfi és 85 nő, átlagos életkoruk 42 év, míg az átlagos terepen töltött munkaidejük 16 év volt.

3. Új diagnosztikai/szerológiai módszerek kidolgozása, alkalmazása: ELISA és Western-blot vizsgálatok.

Az expresszált virális antigének szolgáltatják az alapot új, idő- és költséghatékony diagnosztikai/szerológiai módszerek (ELISA, WB) kifejlesztéséhez, optimalizálásához. Mind az ELISA, mind pedig a Western-blot módszer alkalmasnak bizonyult mind állati, mind pedig humán minták tesztelésére.

2/1. Humán (vadász, erdész) szeroepidemiológiai vizsgálatok eredményei

Az előbbieken leírt módon és helyszíneken gyűjtött vérmintákból elvégeztük a szeroepidemiológiai (IgG alapú) szűréseket. A vizsgálatokhoz az általunk optimalizált ELISA majd WB tesztekkel használtuk. A 835 mintából összesen 46 (5,5%) lett pozitív ELISA módszerrel, ezek közül pedig 38 (4,6%) minta WB megerősítő analízissel is. Területi megoszlás szerint a prevalencia 5,2% Észak-Dunántúlon (13/248 minta), 3,1% a Dél-Dunántúl régióban (10/321 minta), 8,2% az Északi-középhegységben (13/159 minta) és 1,9% a Duna-Tisza köze területén (2/107 minta). A hantavírus fertőzésen átesett személyek nagy része férfi (34 férfi és négy nő), átlagos életkoruk 45 év. A vizsgált önkéntesek közül három férfi anamnézise közvetlenül is utal az átvészelt súlyos lefolyású fertőzésre (ismeretlen eredetű emelkedett szérumkreatinin koncentráció, vesegyulladás, vizeleti panaszok), egy személy pedig az idiopátiás veseelégtelenség következtében dialízis kezelésre szorult. Bár az erdészethez kötődő munkákban jellegzetesen férfiakat találunk, a fertőzések százalékos aránya az adott nemtől vett mintaszámot tekintve igen hasonló: 4,5% a férfiaknál (34/750) és 4,7% a nőknél (4/85). A szeroprevalencia értékei összefüggést mutatnak a hazánkban található nagyobb összefüggő erdőségekkel. A DOBV és PUUV hantavírusokat hordozó rágcsálók (*Apodemus flavicollis*, *A. agrarius*, és *Myodes glareolus*) nem kizárólag erdei fajok, legnagyobb populációik azonban zárt erdőkhez kötődnek. Utóbbi megfigyelést a Duna-Tisza közén tapasztalt alacsonyabb prevalencia is alátámasztani látszik.

- Oldal et al. *Eurosurveillance*, 2013 (publikálásra beküldve)



2/2 Rágcsálók (hordozó állat) szerológiai és molekuláris vizsgálatainak eredményei

Bár szigorúan nem tartozott a pályázat eredeti céljai közé, mégis a régióban gyűjtött rágcsálók mintáinak tesztelésére is lehetőséget adott a pályázat. Összesen 125 *Apodemus* rágcsálóból (DOBV elsődleges hordozója) gyűjtött vérmintát teszteltünk. A szerológiai tesztekkel párhuzamosan, SYBR Green alapú valós idejű PCR vizsgálattal is próbáltuk kimutatni a virális nukleinsavat, ugyanezen rágcsálók tüdőmintájából. 5 vizsgált állat esetében PCR és anti-DOBV IgG pozitívítást, szintén 5 állatnál csak PCR pozitívítást, míg 11 rágcsáló esetében csak anti-DOBV IgG ellenanyagot tudtunk kimutatni. A két párhuzamos vizsgálattal tehát, összesen 21 állatot (17%) találtunk pozitívnak, így megállapítottuk, hogy a vírus sokkal gyakoribb rágcsálók körében, mint azt az előzetes, hazai vizsgálatok mutatták. Az eddigi hazai és nemzetközi gyakorlatban a rágcsálók vizsgálatokor egy szerológiai előszűrést végeztek, és csak az IgG pozitív állatok mintáiból mutatták ki a virális nukleinsavat, így becsülve meg a vírus gyakoriságát. Jelen vizsgálatunkban öt olyan állatot is találtunk, amelyek IgG negatívak voltak, de a DOBV nukleinsav már kimutatható volt a rágcsáló mintájából. Ha vizsgálatainkkal követtük volna az eddigi gyakorlatot, ezeket az állatokat már a szerológia előszűrés során negatívnak tekintettük volna, csökkentve ezzel a ténylegesen pozitív rágcsálók számát. A szerológiai és molekuláris vizsgálatok eredményei közti különbség a vírusfertőzés kinetikájával magyarázható: a fertőzés első szakaszában a vírus ugyan nagy mennyiségben van jelen a tüdőben, de az állat szervezetében még jelentős antitest termelés nem indul meg. Ekkor a tényleges pozitívítás csak molekuláris vizsgálattal azonosítható. A fertőzés előrehaladtával, a vírus jelenléte mind szerológiai, mind pedig molekuláris úton is igazolható, míg a fertőzés utolsó szakaszában a virális nukleinsav már nem, vagy csak nehezen mutatható ki a szervezetben, így ilyenkor kizárólag a szerológiai vizsgálatok vezetnek egyértelmű pozitív eredményhez. Vizsgálatainkkal tehát rávilágítottunk arra is, hogy a DOBV tényleges, valós gyakoriságának becsléséhez molekuláris biológiai és szerológiai vizsgálatokat is párhuzamosan el kell végezni.

• *Németh et al. Virus Genes, 2013*

4. Klinikai vizsgálatok

A projekt keretein belül sikerült néhány tanulságos klinikai esetet is feldolgozni, elemezni. A pályázat lehetőséget adott egyaránt, új valamint az elmúlt években már felderített klinikai esetek további vizsgálatára.

Retrospektív vizsgálataink során, az előzetesen gyűjtött és tárolt mintákat a kidolgozott vizsgálati módszereinkkel (ELISA, Western-blot) újra tudtuk tesztelni és a pozitív minták esetében a klinikai vizsgálatokat le tudtuk folytatni. Ennek keretén belül közel 30 beteg teljes klinikai vizsgálata történt meg, ami elsősorban a vírus által okozott tünetek jobb megértését szolgálta. A vizsgálat során komoly hangsúlyt fektettünk a fertőzés eredményeként megváltozott laboratóriumi paraméterek vizsgálatára. Szignifikáns összefüggést tapasztaltunk a thrombocita szám változás, valamint a haemoglobin szint és a kialakult betegség súlyossága között. Bár ezt a jelenséget hantavírus fertőzés esetén más kutatók is leírták már, okát ezidáig nem sikerült kideríteni. Eredményeink azt igazolják, hogy előfordulhat olyan fertőzés is, amikor a betegség nem specifikus tünetek kíséretében zajlik le, így sem a klinikus sem pedig a beteg nem is tudja meg a tünetek tényleges okát, lévén hantavírus fertőzésre nem is gondol. Jó példa erre, hogy először sikerült igazolnunk és leírnunk DOBV fertőzés mimikálta akut appendicitist. A felderített eset is azt igazolja, hogy a DOBV fertőzés számos, nem specifikus tünet kíséretében is végbemehet.



A prospektív vizsgálataink keretében a régióban előforduló, akut veseelégtelenségben szenvedő betegek mintáit tudtuk vizsgálni, szintén az általánosan kidolgozott módszerekkel. (Fontos megemlíteni, hogy vizsgálataink nem diagnosztikai célúak voltak, hivatalos eredményközlést a klinikus kollégák felé nem végeztünk. Minden esetben felhívtuk a figyelmet arra, hogy a vizsgálat kizárólag a kutatást segíti elő, virológiai eredményt csak az erre hivatott referencia laboratórium adhat ki.) A pécsi Klinikai Központ II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrumába a vizsgálati időszakban összesen 188 személy került felvételre akut veseelégtelenséggel. Közülük a klinikai tünetek, a laboratóriumi eredmények és az anamnézis alapján 20 betegnél merült fel hantavírus fertőzés gyanúja. A 20 beteg (13 férfi és 7 nő) mindegyike negatív volt *Leptospira* fertőzésre. Közülük három személy esetében (15%) a WB tesztek mind IgM, mind IgG antitestekre nézve pozitívak lettek, így náluk igazolható volt az akut hantavírus fertőzés. Az akut fertőzöttek között két nő, 29 és 67 évesek, valamint egy 33 éves férfi volt. További két esetben, egy 56 éves férfi és egy ismeretlen korú női beteg szérumból csak IgG antitesteket lehetett hantavírus ellen kimutatni, ők feltehetően jóval korábban estek át a fertőzésen. Az akut fertőzöttek mind a nyári hónapokban kerültek kórházba. Klinikai tüneteik egybeestek a jellegzetes hantavírus fertőzés tüneteivel (láz, hastáji fájdalmak, hasmenés, trombocitopenia, emelkedett szérum-kreatinin szint, valamint fehérje, ill. vörösvértest jelenléte a vizeletben). Egy akut beteg esetében (67 éves nő) a szérumból sikerült hantavírus RNS-t kimutatni one-step TaqMan RT-PCR módszerrel is. A 106 nukleotid hosszú PCR amplikon szekvenálása és filogenetikai elemzése DOBV hantavírus fertőzést igazolt.

- *Jakab et al. Journal of Clinical Virology, 2011*
- *Oldal et al. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013 (publikálásra beküldve)*

5. Vírustenyésztési kísérletek, vírusok izolálása

A pályázat ideje alatt átadásra került a Pécsi Tudományegyetem (PTE) újonnan létrehozott kutatóközpontja, a Szentágotthai János Kutatóközpont (SzKK). A központban kapott helyet egy BSL-3 (kabinet BSL-4) biztonsági szintű virológiai laboratórium is, ami a kor színvonalának maximálisan megfelelő labor-technológiai és gépészeti megoldásokkal került kivitelezésre. A laboratórium birtokában, lehetőségünk nyílt a hantavírus törzsek biztonságos körülmények között történő izolálására, mivel a fertőzőképes hantavírral történő munka megköveteli a minimum hármas biztonsági szintet. Szaporítási kísérleteinket elsősorban VeroE6 sejtvonalon kezdtük meg, amelyet több hantavírus kutatócsoport is sikeresen alkalmazott ezidáig. Izolálási kísérleteinket több vizsgálati mintával végeztük: i) humán vérmintából, ii) rágcsálók tüdő-szuszpenziójából. Bár a vírus izolálása több szempontból is fontos a hantavírus kutatás területén, jelen pályázat szempontjából elsősorban a vírustenyésztés pontos szerotípusának megállapítása miatt elsődlegesen érdekes. A jelenleg használt, kereskedelmi forgalomban kapható, illetve kutató-laboratóriumokban fejlesztett módszerek képesek ugyan megállapítani a hantavírus fertőzés tényét, azonban a különböző szerotípusok között kialakuló jelentős keresztreakciók miatt a vírus pontos típusáról nem adnak információt. Fontos megemlíteni azt is, hogy szerotípus pontos ismerete nemcsak a klinikai jellegű kutatások számára fontos információ, de jelentős eredményeket szolgáltat az epidemiológiai, járványügyi felmérésekhez is. A pontos szerotípus meghatározás jelenlegi egyetlen megbízható módja: a fókusz-redukciós neutralizációs teszt (FRNT), amelynek azonban előfeltétele a vírus szövetkultúrán történő szaporítása. Bár a hantavírusok prevalenciája jelentős az ország bizonyos területein, egyértelmű típusmegoszlást az alkalmazott módszerekkel mi sem tudunk megállapítani. A FRNT vizsgálatot a pályázat ideje alatt nem tudtuk teljesíteni (ez pályázati célként nem is szerepelt), részben az BSL-3 labor kezdeti hiánya, részben pedig a hantavírusok igen nehéz



szaporíthatósága miatt.

Bár a modern molekuláris virológia lassan kezdi kiszorítani a klasszikus módszereket a virológiai kutatásokból, mégis meggyőződésünk, hogy virológiai vizsgálatokhoz szükség van a vírus in vitro izolálására. Jelen pályázat a minták gyűjtésével, az előzetes ELISA és WB tesztek eredményeivel, valamint a vírus izolálási munkák alapjainak megteremtésével (az elért eredményeken felül) lehetőséget adott további vizsgálatok tervezésére, mint például a vírushelyettesítés pathomechanizmusának tanulmányozására. Ennek megfelelően, vírusizolálási kísérleteket a jövőben is folytatni kívánjuk.



Összefoglaló:

A pályázatban megfogalmazott célok a következők voltak:

1. Rekombináns, virális fehérjén alapuló vizsgálati módszer kidolgozása, optimalizálása.
2. A vírus gyakoriságának feltérképezése a fertőzésnek leginkább kitett, erdészeti dolgozók körében.
3. Tudományos tanulmányok, publikációk készítése.

A pályázat során elért eredmények rövid felsorolása:

1. Beállítottunk és optimalizáltunk egy bakteriális expressziós illetve fehérje tisztítási rendszert, amellyel nagy mennyiségű, tiszta rekombináns, virális fehérjét lehet termeltetni.
2. Sikeresen expresszáltunk DOBV és PUUV kapszid fehérjét, amit a további vizsgálatokban hasznosítottunk.
3. Kidolgoztunk egy ELISA és egy Western-blot módszert, amiket mind IgG, mind pedig IgM alapú vizsgálatok elvégzéséhez optimalizáltunk. Ennek megfelelően, az említett módszereket mind szeroepidemiológiai vizsgálatokhoz, mind pedig az akut fertőzést igazoló kutatásokhoz hasznosítani tudtuk.
4. Felmértünk a vírus gyakoriságát a hazai erdészetekben dolgozó szakemberek körében. Megállapítottuk, hogy a vírus gyakorisága relatív magas, 4,9%, amely az ország egyes területein változó lehet. A legalacsonyabb százalékos eloszlás (1,9%) a Duna-Tisza Közében volt tapasztalható, míg az Északi-középhegység területén az átfertőzöttség aránya elérte a 8,2%-ot.
5. Felhasználva újonnan optimalizált vizsgálati módszereinket, pro-és retrospektív klinikai tanulmányokat végeztünk az igazoltan hantavírus fertőzött betegek körében.
6. Megteremtettük a vírus biztonsági laboratóriumban történő izolálásának feltételeit és megkezdtük az izolálási kísérleteket. Ezzel biztosítottuk további komplex vizsgálatok (pl.: pathomechanizmus, virális genom-analízis) alapját.
7. A pályázat ideje alatt összesen 16 publikáció született és további 4 kéziratot publikálásra benyújtottunk. Ezek közül összesen 11, a pályázó első- illetve utolsó szerzőségével született. További 13 konferencia közlemény és 4 könyvfejezet jelent meg az adott időszakban.



Dr. habil. Jakab Ferenc
egyetemi docens
Virologiai Kutatócsoport vezetője

Pécs, 2014. január 09.