

Virus Dobra – posnetek z elektronskim mikroskopom

(Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, 2011)

Do not follow where the trail may lead,

Rather go where there is no trail and leave a path...

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Miša KORVA

**VPLIV GENETSKE VARIABILNOSTI V HLA
LOKUSU IN HANTAVIRUSNEGA TIPNA NA
PATOGENEZO HEMORAGIČNE MRZLICE Z
RENALNIM SINDROMOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANA
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Miša KORVA

**VPLIV GENETSKE VARIABILNOSTI V HLA LOKUSU IN HANTAVIRUSNEGA
TIPA NA PATOGENEZO HEMORAGIČNE MRZLICE Z RENALNIM
SINDROMOM**

Doktorska disertacija

**THE ROLE OF GENETIC VARIABILITY IN HLA LOCI AND THE HANTAVIRUS
TYPE ON THE PATHOGENESIS OF HAEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL
SYNDROME**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2011

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 2. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 11. 2. 2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina ter opravljanje doktorata znanosti s področja mikrobiologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicina s področja mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz, ter na Centru za tipizacijo tkiv na Zavodu RS za transfuzijsko medicino.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Miroslav PETROVEC, dr. med

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 22.12.2011

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Miša Korva

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 578.76.083+578.5.083:616.9(043)=163.6
KG	virusi/hantavirusi/Puumala/Dobrava/hemoragična mrzlica z renalnim sindromom/HMRS/človeški levkocitni antigeni/HLA/virusno breme/genetska raznolikost/patogeneza
AV	KORVA, Miša, univ. dipl. mikr.
SA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicine, področje mikrobiologija
LI	2011
IN	VPLIV GENETSKE VARIABILNOSTI V HLA LOKUSU IN HANTAVIRUSNEGA TIPA NA PATOGENEZO HEMORAGIČNE MRZLICE Z RENALNIM SINDROMOM
TD	Doktorska disertacija
OP	XII, 101 str. 16 pregl., 18 sl., 11 pril., 185 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Hantavirusi v Sloveniji povzročajo hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS), njen potek pa se razlikuje od blage oblike bolezni do smrtne izida. Kljub temu, da na potek HMRS vpliva v veliki meri tip hantavirusa, še ni poznana natančna patogeneza okužb, saj ni na voljo primernega živalskega modela. Z doktorsko disertacijo smo skušali opredeliti vpliv genetske raznolikosti v lokusu HLA in virusnega genoma na potek bolezni pri posamezniku. V študijo smo vključili 160 bolnikov in jih razdelili v skupine glede na potek bolezni. Pomembno vlogo pri poteku HMRS pri posamezniku, naj bi imela predstavitev virusnih peptidov preko molekul HLA, ki lahko vzbudijo primeren ali pretiran imunski odziv. Pri bolnikih s HMRS v primerjavi z zdravo slovensko populacijo nismo dokazali nobene značilne razlike v frekvencah alelov HLA. V skupini bolnikov okuženih z virusom DOB, predstavlja skupina alelov HLA-B*35 tveganje za težji potek bolezni. Dejavnik tveganja za razvoj težje oblike bolezni pri bolnikih okuženih z virusom PUU, bi lahko bila skupina alelov HLA-DRB1*13. Zaščitno vlogo v slovenski populaciji, pred okužbo z virusom PUU, bi lahko imeli aleli HLA-B*07 in HLA-DRB1*15. Ugotovili smo tudi, da se različni hantavirusi v isti populaciji predstavljajo na različne načine. Poleg dejavnikov humane genetike smo analizirali tudi nukleotidne in aminokislinske značilnosti virusov ter izmerili višino virusnega bremena neposredno v akutnem vzorcu bolnikov z različnim potekom bolezni. Virusno breme smo dokazali pri 69,4% bolnikov, okuženih z virusom DOB, in 77,3% bolnikov, okuženih z virusom PUU. Izmerjene koncentracije virusne RNA pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, so bile značilno višje kot pri bolnikih, okuženih z virusom PUU. Za analizo nukleotidnih zaporedij smo dokazali, da kroži v Sloveniji več genetskih linij virusa PUU in DOB, ki se združujejo v zemljepisno ločene monofiletske linije. Dokazali smo več aminokislinskih zamenjav v tarčnih odsekih virusa, vendar pa nismo ugotovili nobene povezave med genetskimi različicami virusa in potekom bolezni pri bolniku oziroma višjim virusnim bremenom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	UDC 578.76.083+578.5.083:616.9(043)=163.6
CX	viruses/hantaviruses/Puumala/Dobrava/hemorrhagic fever with renal syndrome/HFRS/human leukocyte antigen/HLA/viral load/genetic diversity/pathogenesis
AU	KORVA, Miša
AA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Study Programme in Biomedicine, field Microbiology
PY	2011
Ti	THE ROLE OF GENETIC VARIABILITY IN HLA LOCI AND THE HANTAVIRUS TYPE ON THE PATHOGENESIS OF HAEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROM
DT	Doctoral dissertation
NO	XII, 101 p. 16 tab., 18 fig., 11 app., 185 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	<p>Several studies have shown that in hemorrhagic fever with renal syndrome patients, the disease outcome is determined by a complex interaction between the virus and immunopathologic and human genetic factors. HFRS patients with different disease outcome were included in our study and the determination of HLA haplotype and virus sequence was made. Comparison of HLA frequencies between healthy individuals and HFRS patients showed no strong association with the susceptibility for hantaviral infection. Significant associations were recognized when the patient group was separated according to the virus responsible for the infection. DOB virus infected patients have a significantly higher frequency of HLA-B*35 in contrast with the frequency of HLA-DRB1*13, where this phenotype was more frequent in PUU virus infected patients, especially in the severe form of the disease. Therefore this haplotype might be a genetic risk factor in Slovenian population. On the other hand, HLA-B*07 could play a protective role in PUU virus caused HFRS in the Slovenian population. Presumably, different hantaviruses are presented differently through the same HLA molecules and this might lead to either a more severe or a milder form of the disease. Viral load was demonstrated in 77,3% patients infected with PUU virus and 69,4% infected with DOB virus. Not only that higher viral load levels were demonstrated in patients infected with DOBV, but also a significant correlation between a higher viral load level and the severity of the disease was shown. Additionally, a virus sequence was determined directly from an acute human sample. In Slovenia several genetic lineages of PUU virus and DOB virus are circulating the country and they form different monophyletic clusters based on their geographical origin. Despite the fact that several SNP were established in different lineages and that some of them even lead to the amino acid change, no correlation between severity of the disease and the virus genetic variant was found.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED.....	3
2.2 OSNOVNE ZNAČILNOSTI HANTAVIRUSOV	5
2.3 EKOLOGIJA HANTAVIRUSOV	7
2.4 EPIDEMIOLOGIJA HMRS IN HCPS.....	10
2.4.1 HMRS v Sloveniji	12
2.5 KLINIČNA SLIKA HMRS.....	15
2.6 PATOGENEZA IN IMUNOST HMRS	19
2.6.1 Vpliv genotipa človeških levkocitnih antigenov na potek HMRS	20
2.6.2 Vpliv celičnega imunskega odziva na potek HMRS	22
2.6.3 Vpliv protitelesnega imunskega odziva na potek HMRS	23
2.6.4 Vpliv virusnega bremena in mutacij v virusnem genomu na potek HMRS	24
2.7 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA HMRS	25
3 METODE IN PREISKOVANCI.....	27
3.1 PREISKOVANCI.....	27
3.2 METODE DELA.....	27
3.2.1 Metoda posredne imunofluorescence za določanje specifičnih protiteles razreda IgG proti virusu DOB oz. PUU	27
3.2.2 Encimsko-imunska metoda za določanje specifičnih protiteles razreda IgM proti virusu DOB oz. PUU	28
3.2.3 Encimsko-imunska metoda za določanje specifičnih protiteles razreda IgG proti virusu DOB oz. PUU	28

3.2.4	Osamitev genomske DNA	29
3.2.5	Osamitev celokupne RNA	29
3.2.6	Tipizacija lokusa HLA	30
3.2.6.1	Subtipizacija lokusa HLA-B*35	30
3.2.7	Določanje virusnega bremena	31
3.2.8	Določitev nukleotidnega zaporedja virusa DOB in PUU neposredno iz vzorca bolnika	31
3.2.8.1	Pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu S virusa DOB	34
3.2.8.2	Pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu M virusa DOB	35
3.2.8.3	Pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu S virusa PUU	36
3.2.8.4	Pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu M virusa PUU	37
3.2.9	Določevanje nukleotidnega zaporedja pridelekov PCR	38
3.2.10	Analiza nukleotidnih zaporedij	39
3.2.11	Statistična analiza rezultatov	40
4	REZULTATI.....	41
4.1	KLINIČNE ZNAČILNOSTI IN RAZDELITEV BOLNIKOV	41
4.2	DOLOČANJE VIRUSNEGA BREMENA PRI BOLNIKI S HMRS	44
4.3	GENETSKA RAZNOLIKOST V LOKUSU HLA BOLNIKOV S HMRS.....	46
4.3.1	Genetska raznolikost v lokusu HLA pri bolnikih s HMRS	46
4.3.2	Primerjava polimorfizma v lokusu HLA pri bolnikih s HMRS in različnim potekom bolezni	48
4.3.2.1	Vpliv polimorfizma v lokusu HLA pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, na potek bolezni	48
4.3.2.2	Vpliv polimorfizma v lokusu HLA pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, na potek bolezni	50
4.3.3	Subtipizacija skupine alelov HLA-B*35 pri bolnikih s HMRS	52
4.3.4	Vpliv molekul HLA na višino virusnega bremena	54
4.4	NUKLEOTIDNE ZNAČILNOSTI HANTAVIRUSOV DOB IN PUU POMNOŽENIH IZ AKUTNIH VZORCEV BOLNIKOV S HMRS	57
4.4.1	Nukleotidne in aminokislinske značilnosti tarčnega odseka na segmentu S virusa DOB	57
4.4.1.1	Pomnoževanje tarčnega odseka	58
4.4.1.2	Analiza nukleotidnih zaporedij	60
4.4.1.3	Analiza aminokislinskih zaporedij.....	61
4.4.2	Nukleotidne in aminokislinske značilnosti tarčnega odseka na segmentu M virusa DOB	62

4.4.2.1	Pomnoževanje tarčnega odseka	62
4.4.2.2	Analiza nukleotidnih zaporedij	63
4.4.2.3	Analiza aminokislinskih zaporedij.....	64
4.4.3	Nukleotidne in aminokislinske značilnosti tarčnega odseka na segmentu S	
	virusa PUU	65
4.4.3.1	Pomnoževanje tarčnega odseka	65
4.4.3.2	Analiza nukleotidnih zaporedij	68
4.4.3.3	Analiza aminokislinskih zaporedij.....	69
4.4.4	Nukleotidne in aminokislinske značilnosti tarčnega odseka na segmentu M	
	virusa PUU	69
4.4.4.1	Pomnoževanje tarčnega odseka	70
4.4.4.2	Analiza nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij	71
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	73
5.1	Klinične značilnosti bolnikov s HMRS	73
5.2	Vpliv genotipa HLA	74
5.3	Nukleotidne in aminokislinske značilnosti virusov DOB in PUU pomnoženih neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov	78
5.4	SKLEPI	82
6	POVZETEK	84
7	SUMMARY	87
8	VIRI	89
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz zemljepisne razširjenosti hantavirusov po svetu.. .. .	8
Preglednica 2: Lestvica za oceno poteka bolezni pri bolnikih s HMRS (Kuzman in sod., 2003).. .. .	18
Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v doktorski disertaciji za določevanje nukleotidnih zaporedij virusov DOB pri bolnikih v Sloveniji.	32
Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v doktorski disertaciji za določevanje nukleotidnih zaporedij virusov PUU pri bolnikih v Sloveniji.	33
Preglednica 5: Razdelitev bolnikov s HMRS v skupine, glede na potek bolezni.....	42
Preglednica 6: Izbrani klinični in laboratorijski kazalci, ki smo jih zabeležili najpogosteje pri bolnikih s HMRS, okuženih z virusom DOB ali PUU, in različnim potekom bolezni	43
Preglednica 7: Frekvence skupine alelov HLA-B in HLA-DRB1, ki smo jih dokazali pri bolnikih s HMRS in kontrolni skupini zdravih ljudi.	47
Preglednica 8: Frekvence skupine alelov HLA-B in HLA-DRB1, ki smo jih dokazali pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, in primerjava s skupino zdravih ljudi ter analiza vpliva polimorfizma v lokusu HLA na potek bolezni.	49
Preglednica 9: Frekvence skupine alelov HLA-B in HLA-DRB1, ki smo jih dokazali pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, in primerjava s skupino zdravih ljudi ter analiza vpliva polimorfizma v lokusu HLA na potek bolezni.	51
Preglednica 10: Frekvence alelov HLA-B*35, ki smo jih dokazali pri bolnikih s HMRS.	52
Preglednica 11: Frekvence alelov HLA-B*35, ki smo jih dokazali pri bolnikih s HMRS in primerjava s kontrolno skupino.	53
Preglednica 12: Razporeditev višine virusnega bremena glede na skupine alelov HLA-B in HLA-DRB pri bolnikih s HMRS.	55
Preglednica 13: Bolniki, okuženi z virusom DOB, pri katerih smo pomnožili virusni segment S.....	59
Preglednica 14: Bolniki, okuženi z virusom DOB, pri katerih smo pomnožili virusni segment M.	63
Preglednica 15: Bolniki, okuženi z virusom PUU, pri katerih smo pomnožili virusni segment S.....	67
Preglednica 16: Bolniki, okuženi z virusom PUU, pri katerih smo pomnožili virusni segment M.	71

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz hantavirusa (Saksida, 2011).....	5
Slika 2: Kroženje hantavirusov v naravi in prenos virusa na človeka (Saksida, 2011).....	9
Slika 3: Zemljepisna razporeditev hantavirusnih okužb, s približno letno pojavnostjo bolezni.....	11
Slika 4: Zemljepisna razširjenost hantavirusov v Sloveniji v naravnem gostitelju.....	13
Slika 5: Zemljepisna razporeditev bolnikov s HMRS po Sloveniji.....	15
Slika 6: Shematski prikaz kliničnega poteka HMRS (Vapalahti in sod., 2003).....	16
Slika 7: Genska mapa odseka HLA na 6. človeškem kromosomu (Mehra in Kaur, 2003).....	20
Slika 8: Določitev virusnega bremena pri bolnikih s HMRS, okuženimi z virusom DOB, in bolnikih, okuženimi z virusom PUU.	44
Slika 9: Primerjava virusnega bremena pri bolnikih s HMRS, okuženimi z virusom DOB, ali virusom PUU, in različnim potekom bolezni.....	45
Slika 10: Filogenetska razmerja med hantavirusi v Evropi, Aziji in Ameriki.....	57
Slika 11: Prikaz poteka pomnoževanja segmenta S virusa DOB iz akutnih vzorcev bolnikov ..	58
Slika 12: Filogenetsko drevo tarčnega odseka segmenta S virusa DOB, pomnoženega neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov	60
Slika 13: Prikaz pomnoženega odseka segmenta M (1281 bp) virusa DOB, neposredno iz akutnega vzorca bolnikov.	62
Slika 14: Filogenetsko drevo tarčnega odseka segmenta M virusa DOB pomnoženega neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov	64
Slika 15: Prikaz poteka pomnoževanja segmenta S virusa PUU iz akutnih vzorcev bolnikov.	66
Slika 16: Filogenetsko drevo tarčnega odseka segmenta S virusa PUU, pomnoženega neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov	68
Slika 17: Prikaz poteka pomnoževanja segmenta M virusa PUU iz akutnih vzorcev bolnikov	70
Slika 18: Filogenetsko drevo tarčnega odseka segmenta M virusa PUU pomnoženega neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov	72

KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica bolnikov, okuženih z virusom DOB, ki smo jih vključili v raziskavo

Priloga B: Preglednica bolnikov, okuženih z virusom PUU, ki smo jih vključili v raziskavo

Priloga C: Poravnava nukleotidnega zaporedja tarčnega odseka na segmentu S virusa DOB

Priloga D: Poravnava aminokislinskega zaporedja tarčnega odseka na segmentu S virusa DOB

Priloga E: Poravnava nukleotidnega zaporedja tarčnega odseka na segmentu M virusa DOB

Priloga F: Poravnava aminokislinskega zaporedja tarčnega odseka na segmentu M virusa DOB

Priloga G: Poravnava nukleotidnega zaporedja tarčnega odseka na segmentu S virusa PUU

Priloga H: Poravnava aminokislinskega zaporedja tarčnega odseka na segmentu S virusa PUU

Priloga I: Poravnava nukleotidnega zaporedja tarčnega odseka na segmentu M virusa PUU

Priloga J: Poravnava aminokislinskega zaporedja tarčnega odseka na segmentu M virusa PUU

Priloga K: Objavljen članek, ki zajema izsledke doktorske disertacije

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. DeoxyriboNucleic Acid)
DOB	virus Dobrava
HMRS	hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (angl. Haemorrhagic Fever with Renal Syndrom)
HCPS	hantavirusni srčno-pljučni sindrom (angl. Hantavirus Cardio-Pulmonary Syndrome)
HLA	človeški levkocitni antigeni (angl. Human Leukocyte Antigen)
HTN	virus Hantaan
IFT	metoda posredne imunofluorescence (angl. Indirect Immunofluorescent Assay)
NE	<i>nephropathia epidemica</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PUU	virus Puumala
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic acid)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (angl. Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcriptase)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. Single Nucleotide Polimorphizm)
SWS	virus Seewis

1 UVOD

Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (HMRS) je oznaka za skupino klinično podobnih bolezní, ki se pojavljajo v Evropi in Aziji že od 19. stoletja (Gajdusek, 1962), vendar je prepoznavanje in razumevanje hantavirusov, ki so povzročitelji te bolezní, napredovalo predvsem v zadnjem desetletju (Heyman in sod., 2009). Hantavirusi sodijo v družino *Bunyaviridae* in se ohranjajo v naravi s kroženjem med glodavci in žužkojedi. Večino okužb v Evropi povzročata hantavirusa Puumala (PUU) in Dobrava (DOB), ki se ohranjata v gozdni voluharici, *Myodes glareolus*, in rumenogrli miši, *Apodemus flavicollis*. Bolezen se pojavlja na endemičnih območjih, in prizadene samo v Evropi več kot deset tisoč posameznikov letno. Prav zato sodi med virusne bolezní, ki imajo velik vpliv na socialne in ekonomske razmere v družbi (Heyman in sod., 2009).

V Sloveniji krožijo hantavirusi tako med glodavci kot tudi žužkojedimi gostitelji. Med glodavci krožijo kar 4 tipi hantavirusov: PUU, DOB, Saaremaa (SAA) in Tula (TUL) (Avsic-Zupanc in sod., 2000; Avsic-Zupanc in sod., 2007; Korva in sod., 2009a). Nedavno smo v gozdni rovki, *Sorex araneus*, dokazali tudi hantavirus Seewis (SWS) (neobjavljeni podatki). V Sloveniji povzročata HMRS le hantavirusa PUU in DOB. Virus PUU povzroča blažjo obliko bolezní, imenovano tudi »*nephropathia epidemica*«, ki zaradi nespecifičnih znakov, pogosto spominja na vročinsko bolezen z bolečinami v trebušni votlini. Okužba z virusom DOB povzroči težjo obliko bolezní ter doseže do 16% smrtnost. Potek bolezní vključuje širok spekter kliničnih simptomov od blagega vročinskega stanja do fulminantnega hemoragičnega poteka z akutno odpovedjo ledvic in šokom (Avsic-Zupanc in sod., 1999; Pal in sod., 2005).

Patogeneza HMRS je ne poznana predvsem zaradi ko-evolucije virusa z naravnim gostiteljem, ni na voljo primerne živalskega modela. Večina študij je omejenih na pogoje *in vitro*, ki zahtevajo laboratorij tretje stopnje biološke varnosti (Bray, 2005). Kljub temu so z različnimi laboratorijskimi in kliničnimi raziskavami nakazali, da ima v patogenezi HMRS pomembno vlogo imunski odziv posameznika (Khaiboullina in St Jeor, 2002; Maes in sod., 2004; Markotic, 2003; Schonrich in sod., 2008).

1.1 NAMEN DELA

Z doktorsko disertacijo smo želeli opredeliti vpliv genetske raznolikosti v lokusu HLA na potek HMRS pri bolnikih v Sloveniji. Rezultate tipizacije lokusa HLA pri bolnikih s HMRS smo primerjali s frekvencami skupine alelov HLA v slovenski populaciji. Nameravali smo ugotoviti morebitni rizični ali zaščitni haplotip HLA za okužbo s hantavirusi in za izid bolezni. Bolnike s HMRS smo razdelili v skupine glede na potek bolezni in primerjali haplotip HLA-B in HLA-DRB1 ter mutacije v nukleotidnem zaporedju virusa glede na izid bolezni. Pri posameznih bolnikih smo pomnožili tarčne odseke na virusnih segmentih S in M ter opisali mutacije, ki so se pojavile v virusnem genomu. Analizirali smo mesta, kjer se pojavljajo mutacije pogosteje ter njihov vpliv na aminokislinsko zaporedje virusa.

Zanimalo nas je, ali lahko povežemo potek bolezni in virusno breme z genetskimi predispozicijami posameznika ali s specifičnimi mutacijami v genomu virusa oziroma medsebojne povezave.

HIPOTEZE:

- 1) Določeni haplotipi HLA pogojujejo občutljivost ali odpornost na okužbo s hantavirusoma DOB in PUU v slovenski populaciji.
- 2) Haplotip HLA lahko po okužbi z virusom DOB ali PUU vpliva na potek HMRS pri bolniku.
- 3) V hantavirusnem genomu obstajajo različne točkovne mutacije, ki vplivajo na spremembo aminokislinskega zaporedja virusa in s tem lahko vplivajo tudi na patogenezo HMRS.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

HMRS se je pojavila v Aziji že pred tisoč leti. Prvi zapisi, ki opisujejo prvo znano epidemijo na območju današnje Rusije segajo v leto 1913 (Casals in sod., 1970). Bolezen je postala prepoznavnejša šele med leti 1950 in 1953, ko se je med korejsko vojno z njo okužilo preko 3000 ameriških vojakov. Kljub temu, da so že leta 1940 ruski in japonski znanstveniki sumili, da gre za virusno bolezen, je šele leta 1976 korejski virolog Ho Wang Lee s sodelavci uspel iz pljučnega tkiva dimaste miši, *A. agrarius*, izolirati povzročitelja HMRS. Virus so poimenovali Hantaan (HTN), po bližnji reki, kjer so ulovili miši (Lee in sod., 1978). Postal je tipska vrsta za rod *Hantavirus* (Schmaljohn in sod., 1985).

V Evropi so se skandinavski zdravniki srečevali s podobno boleznijo, vendar se je ta izražala v veliko blažji obliki (Peters in sod., 1999). Leta 1980 so na Finskem iz gozdne voluharice, *M. glareolus*, izolirali virus PUU in ga prepoznali kot povzročitelja bolezni, imenovane »*nephropathia epidemica*« (Brummer-Korvenkontio in sod., 1980). Temu so sledila odkritja drugih hantavirusov v Evropi in Aziji: virus Seoul (SEO) iz podgane vrste *Rattus norvegicus* (Lee in sod., 1980), virus DOB iz rumenogrle miši (Avsic-Zupanc in sod., 1992), virus SAA iz dimaste miši (Nemirov in sod., 1999), virus TUL iz poljske voluharice, *M. arvalis* in *M. rossiaemeridionalis* (Plyusnin in sod., 1994) ter mnogi drugi.

Leta 1993 se je v Združenih državah Amerike pojavila epidemija, ki je vodila do odkritja novega hantavirusa, virusa Sin Nombre (SN). Bolezen se je razlikovala od HMRS predvsem po tem, da so bila namesto ledvic prizadeta pljuča in srčno-žilni sistem. Zato, so jo poimenovali hantavirusni srčno-pljučni sindrom (HCPS, angl. hantavirus cardio-pulmonary syndrom); (Nichol in sod., 1993). Kljub temu, da so odkrili povzročitelje HCPS šele pred dobrimi 10 leti, to ne pomeni, da gre za nove viruse. Zgodovinski viri indijanskega plemena opisujejo bolezen, ki se je pojavila ob povečani gostoti glodavcev na območju, kjer so živeli Indijanci. Tudi leta 1993, ob epidemiji HCPS, je prišlo do ekoloških sprememb, ki so prisilile glodavce, da so se zatekli v okolico ljudi zaradi potrebe po hrani. Posledica je bil izbruh bolezni z značilnimi znaki hemoragične mrzlice in pljučnega edema (Mertz in sod., 1997). Kasneje so tako imenovane »hantaviruse novega sveta« odkrili v mnogih glodavcih, tako v

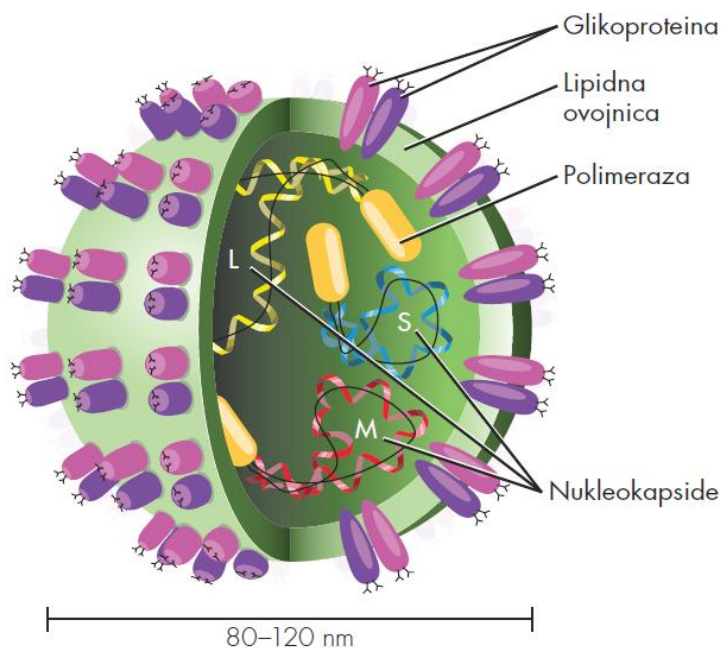
Severni kot tudi Južni Ameriki (Jones in sod., 2008; Schmaljohn in Hjelle, 1997). Prav v Južni Ameriki so leta 1999 odkrili hantavirus Andes (AND), ki povzroča HCPS z visoko smrtnostjo v Argentini (Calderon in sod., 1999) in je edini hantavirus pri katerem so opisali neposredni prenos s človeka na človeka (Martinez in sod., 2005; Padula in sod., 1998). Po letu 1993, so na ameriškem kontinentu odkrili preko 30 novih vrst hantavirusov, med katerimi je mnogo patogenih za človeka (Jonsson in sod., 2010; Kruger in sod., 2001).

Novo presenetljivo odkritje je sledilo leta 2006, ko so Klempa in sodelavci odkrili hantavirus Sangassou (SANG) v tkivu afriške lesne miši, *Hylomyscus simus*, ujete v Gvineji (Klempa in sod., 2006). Odkritje je dalo nov zagon raziskovalcem, saj so kmalu po tem odkrili še en hantavirus na afriški celini, ki pa je postavil nov mejnik v raziskovanju. Hantavirus Tanganya (TGN) so odkrili v Teresini rovki, *Crocidura theresae*, prav tako v Gvineji (Klempa in sod., 2007). Ravno z odkritjem hantavirusov v žužkojedih gostiteljih se je odprlo čisto novo poglavje v raziskovanju hantavirusov.

Pravzaprav je bil prvi hantavirus, virus Thottapalayam (TPM), izoliran že leta 1971 iz tkiva azijske rovke, *Suncus murinus* (Carey in sod., 1971; Zeller in sod., 1989). Vendar so ga šele desetletje kasneje uvrstili v hantavirusni rod (Xiao in sod., 1994; Zeller in sod., 1989). Prav zato je dolgo veljalo, da je virus TPM izjema v rodu Hantavirus saj virus ni povezan z glodavcem, ampak z žužkojedim rezervoarjem. Kljub temu, so se nadaljevale raziskave na tem področju in danes poznamo že več kot 10 žužkojedih gostiteljev, med katere spadajo tako rovke kot tudi krti. Hantaviruse, povezane z žužkojedim rezervoarjem so odkrili povsod po svetu: virus Camp Ripley v kratkorepi rovk, *Blarina brevicauda*, (Arai in sod., 2007), virus Ash River v maskirani rovk, *Sorex cinereus*, v Severni Ameriki (Arai in sod., 2008a), virus Cao Bang v kitajski krti rovk, *Anourosorex squamipes*, v Vietnamu (Song in sod., 2007b), virus Asama v japonski krti rovk, *Urotrichus talpoides*, (Arai in sod., 2008b) ter virus SWS v gozdni rovk, *S. araneus*, v Švici (Song in sod., 2007a). Prav zadnji je zemljepisno zelo razširjen v Evropi (Kang in sod., 2009; Yashina in sod., 2010). Kljub številnim novim odkritjem pa še vedno ni znano ali so ti hantavirusi patogeni za človeka ali ne (Arai in sod., 2008a; Arai in sod., 2007; Klempa, 2009).

2.2 OSNOVNE ZNAČILNOSTI HANTAVIRUSOV

Hantavirusi so ovalne oblike, veliki od 80 do 120 nm (Slika 1). Virus je obdan z lipidno ovojnico. Površina ima značilen mrežast vzorec, ki je razpoznaven pod elektronskim mikroskopom. Znotraj nukleokapside se nahaja negativno polarna enovijačna segmentirana ribonukleinska kislina (RNA, angl. ribonucleic acid). Sestavljajo jo trije deli: velik (L, angl. large), srednji (M, angl. medium) in majhen (S, angl. small). Na 5' in 3' koncih vsakega segmenta so močno ohranjena zaporedja, ki omogočajo tvorbo zanke. Tako segment doseže navidezni učinek krožne molekule. Prav te strukture ločijo hantaviruse od drugih bunjavirusov in naj bi imele vlogo pri razmnoževanju virusa v gostiteljski celici (Plyusnin, 2002).



Slika 1: Shematski prikaz hantavirusa (Saksida, 2011)

Velikost segmentov se razlikuje glede na hantavirusni tip, in sicer je segment L velik približno 6500 bp in ima zapis za od RNA odvisno RNA-polimerazo (RdRP), ki ima vlogo replikaze, transkriptaze, endonuklaze in verjetno tudi RNA-helikaze. Frekvenca mutacij v hantavirusnem genomu je približno 1×10^{-3} , kar je primerljivo z ostalimi RNA-virusi (Plyusnin in sod., 1996; Ramsden in sod., 2008). Segment M je velik približno 3700 bp in ima zapis za prekursor površinskih glikoproteinov G_c in G_n , ki nastaneta po proteolitski cepitvi med

translacijo. Glikoproteina sta odgovorna za prepoznavanje hantavirusnih receptorjev na tarčnih celicah (Hart in Bennett, 1999; Plyusnin, 2002). Na segmentu S, 1800 bp, je zapis za nukleoprotein, ki tvori nitasto vijačno nukleokapsido okrog genoma (Mertz in sod., 1997), hkrati pa sproži antigenski odziv (Kallio-Kokko in sod., 1993). Hantavirusi, ki jih povezujemo z glodavci iz poddružine *Murine* (npr. virusi DOB, HTN, SEO), imajo na segmentu S le en bralni okvir in zato nimajo zapisa za nestrukturno beljakovino (Ns), ki je pogosto prisotna pri ostalih bunjavirusih (Schmaljohn in sod., 1986). V nasprotju s tem, so odprt bralni okvir (ORF, angl. Open Reading Frame) odkrili pri hantavirusih, ki imajo naravni rezervoar v glodavcih iz poddružin *Sigmodontinae* (npr. virusi SN, AND) in *Arvicolinae* (npr. virusi PUU, TUL). Odprt bralni okvir omogoča prepis nestrukturne beljakovine, ki naj bi pri virusu PUU zaviral delovanja promotorja interferona β v gostiteljski celici in tako uravnaval imunski odziv gostitelja (Jaaskelainen in sod., 2007; Jaaskelainen in sod., 2008).

Po okužbi se vežejo hantavirusi z glikoproteinom G_n na celične receptorje na površini endotelijskih, epiteljskih in dendritičnih celic ter limfocitov (Mackow in Gavrilovskaya, 2001; Markotic in sod., 2007; Raftery in sod., 2002; Zaki in sod., 1995). Patogeni hantavirusi vstopajo v celico z od klatrina odvisno endocitozo preko integrinskega receptorja β_3 , medtem ko nepatogeni hantavirusi vstopajo preko integrinskega receptorja β_1 (Gavrilovskaya in sod., 1998; Jonsson in Schmaljohn, 2000; Mackow in Gavrilovskaya, 2009). Po vstopu v celico se hantavirusi razmnožujejo v citoplazmi: najprej poteče prepis nukleoproteina in RdRP. Nukleoprotein je najštevilčnejša virusna beljakovina v celici, ki tvori nitasto vijačno nukleokapsido (Mertz in sod., 1997), poleg tega pa je pomembna tudi za prepis virusa, signalizacijo in pakiranje virusnih delcev (Jonsson in sod., 2010). Kljub temu, da sproži antigenski odziv (Kallio-Kokko in sod., 1993) ima hkrati pomembno vlogo tudi pri modulaciji vnetnega imunskega odziva (Taylor in sod., 2009a; Taylor in sod., 2009b). Hantavirusni nukleoprotein omeji interferonski odziv v gostiteljski celici, tako da prepreči aktivacijo TNF- α z vezavo NF-kappaB v citoplazmi celice (Taylor in sod., 2009a). Sinteza glikoproteinskih prekurzorjev poteka v endoplazmatskem retikulumu, kjer po proteolitski cepitvi nastaneta glikoproteina G_n in G_c (Hart in Bennett, 1999; Mertz in sod., 1997). Po prenosu v Golgijev aparat ti tvorijo heterodimere, ki vežejo integrinske receptorje na tarčnih celicah (Plyusnin, 2002). Zorenje virusnih delcev poteka na membranah Golgijevega aparata ali na membrani

gostiteljske celice, kar je odvisno od hantavirusnega tipa (Jonsson in sod., 2010; Vapalahti in sod., 2003).

2.3 EKOLOGIJA HANTAVIRUSOV

Hantavirusi so razširjeni po vsem svetu in so domnevno prisotni v našem okolju že stoletja. Razvijali so se skupaj s svojimi naravnimi gostitelji in se prilagajali okoljskim spremembam, zato danes ugotavljamo med njimi veliko genetsko raznolikost. Za razliko od ostalih virusov v družini *Bunyaviridae* hantavirusi nimajo znanega členonožnega vektorja in se ohranjajo v naravi v trajno okuženih gostiteljih (Plyusnin in Morzunov, 2001). Hantavirusi se prenašajo med gostitelji in tudi na človeka z aerosoliziranimi izločki (Vapalahti in sod., 2003).

Teorija o ko-evoluciji hantavirusov pravi, da se ohranja v naravi vsak hantavirus v točno določenem glodavcu, zato lahko pri filogenetskih analizah hantavirusov opazimo ko-evolucijo virusa in gostitelja. To se odraža tudi v zemljepisni razširjenosti virusov, ki sovpada z ekološko nišo njihovih gostiteljev (Plyusnin, 2002). Kljub temu, da filogenetske analize odražajo vez med naravnim gostiteljem in evolucijo hantavirusov, pa lahko pri podrobnejših analizah opazimo določene »nepravilnosti«, ki nakazujejo, da je med evolucijo prišlo do zamenjave gostitelja (Plyusnin in sod., 2001; Ramsden in sod., 2009).

Danes vemo, da je ekologija hantavirusov mnogo kompleksnejša kot so sprva predvidevali, saj ne le glodavci, temveč tudi žužkojedi (rovke in krti) lahko služijo kot naravni rezervoar virusa, s čimer je virus pridobil mnogo širšo ekološko nišo. K temu sodi tudi odkritje, da so hantavirusi poleg v Aziji, Evropi in Ameriki razširjeni tudi v Afriki (Preglednica 1); (Jonsson in sod., 2010; Klempa, 2009).

Preglednica 1: Prikaz zemljepisne razširjenosti hantavirusov po svetu. Virusi v odebeljenem tisku povzročajo bolezen pri ljudeh.

VIRUS	NARAVNI GOSTITELJ	ZEMLJEPIŠNA RAZŠIRITEV
EVROPA		
virus Dobrava	<i>Apodemus flavicollis</i>	Balkan, srednja Evropa, Rusija
virus Seoul	<i>Rattus rattus</i>	po celem svetu
virus Saaremaa	<i>Apodemus agrarius</i>	Estonija, Rusija, Slovenija, Madžarska, Slovaška
virus Puumala	<i>Myodes glareolus</i>	Skandinavija, Evropa
virus Tula	<i>Microtus arvalis</i>	srednja Evropa, evropski del Rusije
virus Seewis	<i>Sorex araneus</i>	Švica, Madžarska, Slovenija
AZIJA		
virus Hantaan	<i>Apodemus agrarius</i>	Kitajska, Južna Koreja, Rusija
virus Seoul	<i>Rattus rattus</i>	Koreja, Japonska, Kitajska
virus Amur	<i>Apodemus peninsulae</i>	daljnovzhodna Rusija
Soochong virus	<i>Apodemus peninsulae</i>	Južna Koreja
virus Khabarovsk	<i>Microtus fortis</i>	daljnovzhodna Rusija
virus Muju	<i>Myodes regulus</i>	Južna Koreja
virus Topografov	<i>Lemmus sibiricus</i>	Sibirija
virus Tobetsu	<i>Myodes rufocanus</i>	Japonska
virus Bat	<i>Rhinolophus ferrum-equinum</i>	Koreja
virus Thottapalyam	<i>Suncus murinus</i>	Indija
virus Thailand	<i>Bandicota indica</i>	jugovzhodna Azija
virus Vladivostok	<i>Microtus fortis</i>	daljnovzhodna Rusija in Kitajska
virus Hokkaido	<i>Myodes rufocanus</i>	Japonska
virus Fusong	<i>Myodes rufocanus</i>	Kitajska
virus Cao Bang	<i>Anourosorex squamipes</i>	Vietnam
virus Asama	<i>Urotrichus talpoides</i>	Japonska
AMERIKA		
virus Seoul	<i>Rattus rattus</i>	ZDA, Brazilija
virus Prospect Hill	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	ZDA, Kanada
virus Isla Vista	<i>Microtus californicus</i>	zahodna ZDA
virus Sin Nombre	<i>Peromyscus maniculatus</i>	ZDA, Mehika
virus Black Creek Canal	<i>Sigmodon hispidus</i>	jugovzhodna in južna ZDA, Mehika, centralna Amerika
virus Bayou	<i>Oryzomys palustris</i>	vzhodna ZDA
virus Limestone Canyon	<i>Peromyscus boylii</i>	severna Amerika
virus Playa de Oro	<i>Oryzomys couesi</i>	Mehika
virus Catacamas	<i>Oryzomys couesi</i>	Honduras
virus Choclo	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	Panama
virus Calabazo	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Panama
virus Río Segundo	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	Kostarika
virus Cano Delgadito	<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela
virus Andes	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	Argentina, Čile
virus Bermejo	<i>Oligoryzomys chocoensis</i>	Argentina
virus Pergamino	<i>Akodon azarae</i>	Argentina
virus Lechiguanas	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Argentina
virus Maciel	<i>Bolomys obscurus</i>	Argentina
virus Oran	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	Argentina
virus Laguna Negra	<i>Calomys laucha</i>	Paragvaj, Bolivija, Argentina
virus Alto Paraguay	<i>Holochilus chacoensis</i>	Paragvaj, Argentina
virus Ape Aime	<i>Akodon montensis</i>	vzhodni Paragvaj
virus Itapúa	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	vzhodni Paragvaj
virus Río Mamore	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Bolivija, Peru, Paragvaj, Argentina
virus Araraquara	<i>Bolomys lasiurus</i>	Brazilija
virus Juquitiba	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Brazilija
virus Jaborá	<i>Akodon montensis</i>	Brazilija, Paragvaj
virus Bloodland Lake	<i>Microtus ochrogaster</i>	ZDA, Kanada
virus Leaky	<i>Mus musculus</i>	ZDA, Mehika
virus Monongahela	<i>Peromyscus maniculatus nubiterrae</i>	vzhodna ZDA, Kanada
virus New York	<i>Peromyscus leucopus</i>	ZDA, Kanada, Mehika
virus Blue River	<i>Peromyscus leucopus</i>	centralna ZDA
virus El Moro Canyon	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	ZDA, Kanada, Mehika
virus Muleshoe	<i>Suncus hispidus</i>	jugovzhodna in južna ZDA, Mehika, centralna Amerika
virus Camp Ripley	<i>Blarina brevicauda</i>	ZDA
virus Ash River	<i>Sorex cinereus</i>	ZDA
virus Jemez Springs	<i>Sorex monticolus</i>	ZDA
AFRIKA		
virus Sangassou	<i>Hylomyscus simus</i>	Gvineja
virus Tanganya	<i>Crocidura theresae</i>	Gvineja
virus Seoul	<i>Rattus rattus</i>	Egipt

Hantavirusi povzročajo trajno okužbo pri naravnem gostitelju brez razvoja klinične slike, v celičnih kulturah pa se razmnožujejo brez pojava značilnega citopatogenega učinka (Klein in Calisher, 2007). Kljub temu, da poteka okužba v naravnem gostitelju brez bolezenskih znakov, pa so pokazale nekatere študije, da virus vseeno zmanjša preživetje gostitelja čez zimo (Kallio in sod., 2007). Pri posameznih primerkih lahko celo povzroča manjše bolezenske spremembe na pljučih, vendar te vseeno ne vodijo v razvoj bolezni, ki jo opazimo pri ljudeh (Lyubsky in sod., 1996; Netski in sod., 1999). Po okužbi sledi kratkotrajna viremija, nato pa razsoj virusa v skoraj vse notranje organe, kjer se virus razmnožuje vse življenje, tudi po razvoju specifičnih protiteles (Gavrilovskaya in sod., 1983; Korva in sod., 2009b; Lee in sod., 1981). Okuženi glodavci izločajo virus v slini, fecesu in urinu tudi mesec dni po okužbi (Bernshtein in sod., 1999; Botten in sod., 2002; Hutchinson in sod., 1998; Lee in sod., 1981). Poleg tega, so hantavirusi zelo obstojni v okolju (Kallio in sod., 2006), zato posreden prenos virusa preko okuženih izločkov, na naključnega gostitelja, kot je človek, ni presenetljiv (Slika 2).



Slika 2: Kroženje hantavirusov v naravi in prenos virusa na človeka (Saksida, 2011).

Človek je naključni gostitelj v kroženju hantavirusov v naravi. S hantavirusi se lahko okuži na dva načina: najpogostejša pot vnosa virusa je vdihavanje kužnih aerosolov iz izločkov glodavcev, ali neposredno, z ugrizom okužene podgane (Douron in sod., 1984). Prenos virusa iz človeka na človeka je zelo redek in so ga opisali le pri virusu AND, ki velja za enega najbolj patogenih hantavirusov (Padula in sod., 1998; Wells in sod., 1997). Tudi pri virusu PUU so našli raziskovalci virusno RNA v vzorcu sline bolnika s HMRS, vendar niso dokazali kužnih virusnih delcev (Pettersson in sod., 2008).

2.4 EPIDEMIOLOGIJA HMRS IN HCPS

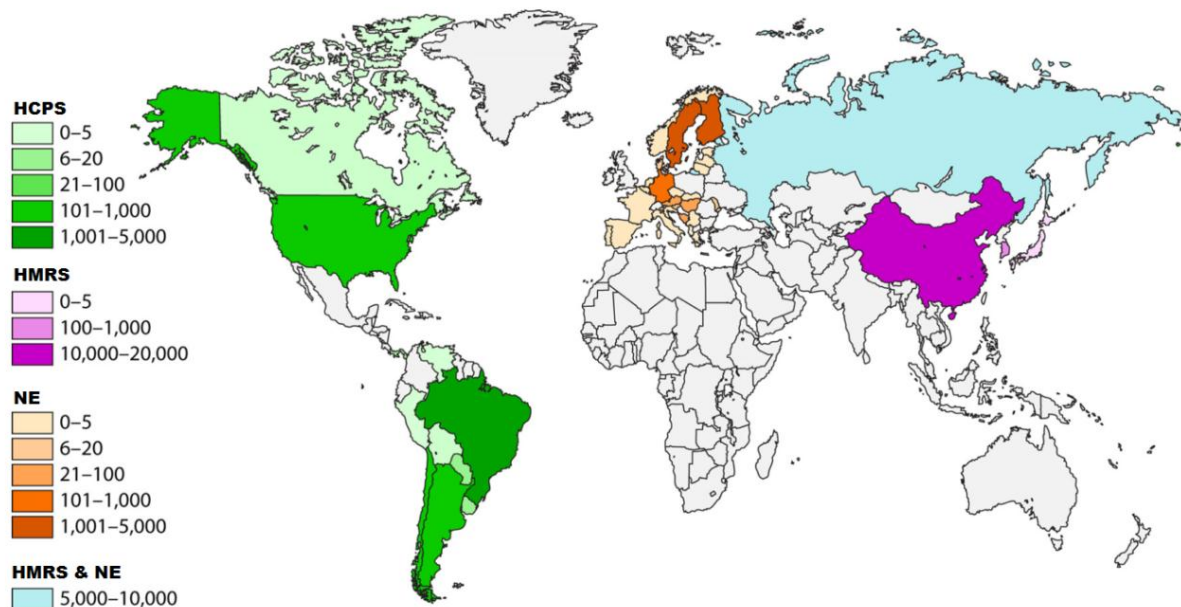
Hantavirusi povzročajo dva bolezenska sindroma: HMRS v Evropi in Aziji (Vapalahti in sod., 2003), ter HCPS v Ameriki (Klein in Calisher, 2007; Nichol in sod., 1993).

Bolezen je endemična na področjih, kjer ljudje sobivajo z naravnimi gostitelji virusa, do izbruha pa lahko pride zaradi nenadnega okoljskega pojava, ki prisili glodavce, da se zatečejo v človekovo bližino (Jonsson in sod., 2010; Vapalahti in sod., 2003). Posamezni primeri bolezni se večinoma pojavijo pozno spomladi in poleti ter ob jesenski ohladitvi. Takrat je človek dejavnejši v naravi in je verjetnost stika z naravnimi gostitelji večja, hkrati pa se zaradi prihajajoče zime glodavci selijo v naselja, kjer je hrane v izobilju (Avšič-Županc in Petrovec, 2003; Heyman in sod., 2009); (Slika 3).

Letno poročajo o okoli 150.000 bolnikih s HMRS po celem svetu, pri čemer okoli 70% bolezni zabeležijo na Kitajskem (Zhang in sod., 2004). V Evropi poročajo o 9.000 primerih bolezni letno. Toda, večino okužb povzroča v Evropi virus PUU, zato ostaja velik delež bolnikov neprepoznan, saj so brezsimptomni ali imajo le blage, gripi podobne znake. Po nekaterih ocenah tako letno v Evropi podcenijo število primerov HMRS za kar 30% (Brummer-Korvenkontio in sod., 1999; Heyman in sod., 2009). V Severni in Južni Ameriki zabeležijo le 1000 primerov HCPS letno, vendar je smrtnost kar 40% (Jonsson in sod., 2010; Jonsson in sod., 2008).

HMRS, ki jo povzročajo virusi HTN, AMR, SEO, PUU, TUL, SAA in DOB se endemično pojavlja na evrazijski celini (Slika 3). Izbruhe HMRS v Aziji povezujemo predvsem z virusi HTN, AMR in SEO, pri zadnjem je potek bolezni blažji. Virus HTN je endemičen v Koreji,

na Kitajskem, v Mongoliji, Rusiji in Mjanmaru. Virus SEO je edini hantavirus, ki se je zaradi svojih gostiteljev, navadne in črne podgane, uspel razširiti po vsem svetu, vendar je bolezen endemična predvsem na Kitajskem, Japonskem in v JV Aziji (Lee in van der Groen, 1989).



Slika 3: Zemljepisna razporeditev hantavirusnih okužb, s približno letno pojavnostjo bolezni (Jonsson in sod., 2011)

V Evropi krožijo štiri patogeni hantavirusi PUU, DOB, SAA in TUL (Preglednica 1); (Heyman in sod., 2009; Plyusnin in sod., 2001). Večino okužb povzroča virus PUU, ki je odgovoren za blažjo obliko bolezni t.i. *nephropathia epidemica*, s smrtnostjo < 2% (Heyman in Vaheri, 2008; Vapalahti in sod., 2003). Največ primerov zabeležijo na Finskem, Švedskem in v zahodni Rusiji. Poleg tega o primerih poročajo še v Belgiji, na Norveškem, Nizozemskem, v Nemčiji, Avstriji in Sloveniji ter nekaterih drugih zahodnoevropskih državah (Heyman in Vaheri, 2008).

Znotraj živalske vrste *Apodemus sp.* krožijo v Evropi kar trije hantavirusi, ki povzročajo HMRS pri ljudeh, vendar se razlikujejo po poteku bolezni. Težjo obliko bolezni, s smrtnostjo do 16%, povzroča virus DOB, ki v naravi kroži med rumenogrlimi mišmi, *A. flavicollis*, in je razširjen po celotnem Balkanskem polotoku (Avsic-Zupanc in sod., 2000; Heyman in sod., 2009). O bolnikih so poročali v Albaniji (Eltari in sod., 1987), Bolgariji (Vasilenko in sod., 1987), Romuniji (Manasia in sod., 1977), Grčiji (Papa in sod., 1998), na Hrvaškem, v Bosni

in Hercegovini, Srbiji, Črni Gori, Makedoniji (Gligic in sod., 1992) in Sloveniji (Avsic-Zupanc in sod., 1999; Avsic-Zupanc in sod., 1992). Virus SAA je razširjen po centralni in vzhodni Evropi in se ohranja v naravi v dimastih miših, *A. agrarius* (Nemirov in sod., 1999; Sironen in sod., 2005). O bolnikih so poročali iz Rusije (Garanina in sod., 2009; Klempa in sod., 2008; Plyusnin in sod., 1999), Nemčije (Klempa in sod., 2003), Estonije (Golovljova in sod., 2000), Danske (Nemirov in sod., 2004) ter Slovaške (Sibold in sod., 1999). Virus povzroča blažjo obliko HMRS, brez znanih smrtnih primerov. Nedavno so v Rusiji, v regiji Sochi, kjer poročajo o bolnikih s srednje težkim do težkim potekom HMRS, odkrili še en tip virusa DOB, ki se ohranja v naravi v miših vrste *A. ponticus* (Klempa in sod., 2008).

Na Češkem, v Švici in Nemčiji so poročali o seroloških dokazih, da naj bi HMRS v Evropi povzročal tudi virus TUL, vendar do danes še niso dokazali virusnega genoma v bolniku z akutnim HMRS (Klempa in sod., 2003; Schultze in sod., 2002; Vapalahti in sod., 1996).

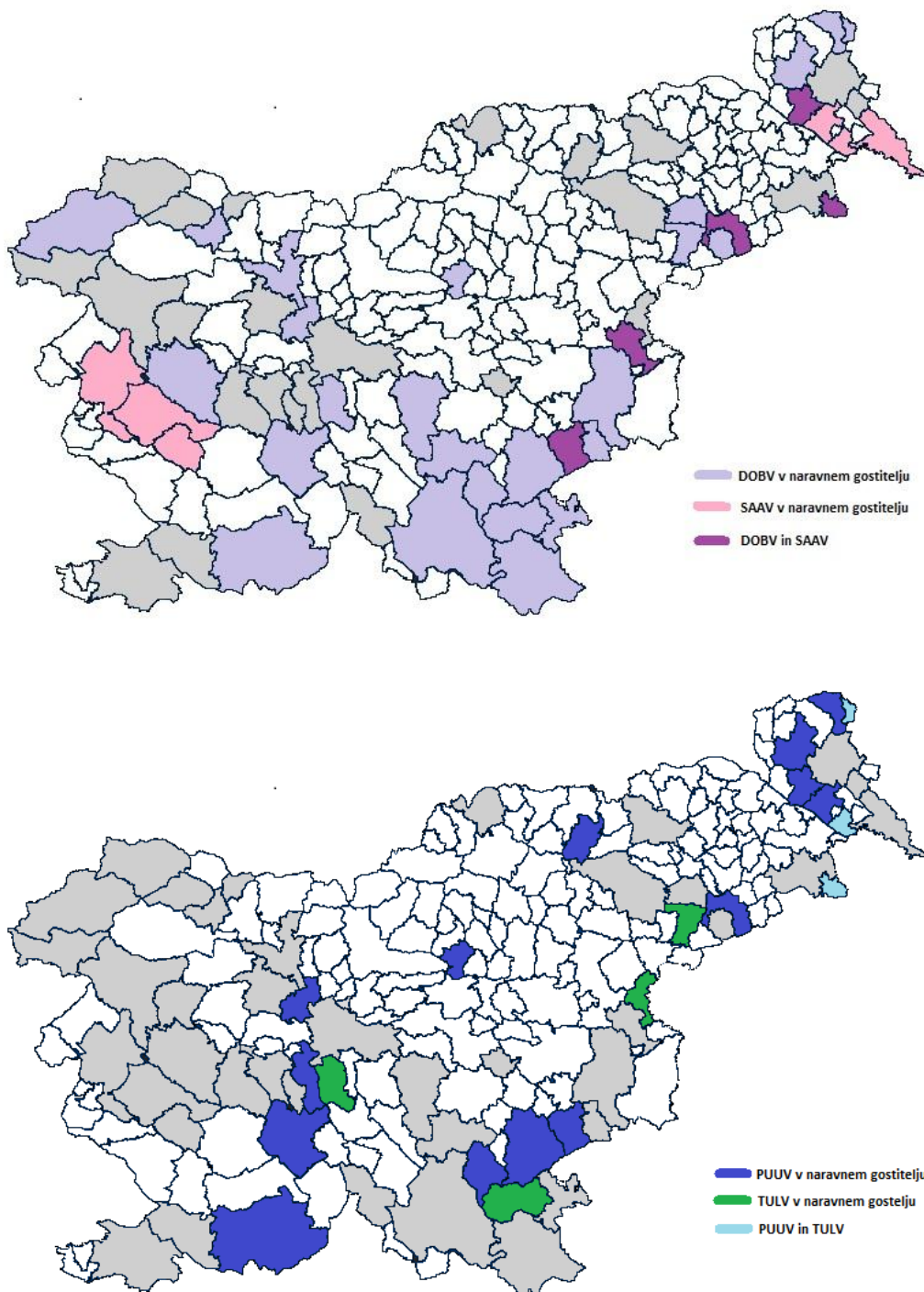
Po odkritju virusa SN v ZDA leta 1993 o primerih HCPS poročajo še iz Argentine, Bolivije, Kanade, Paname, Paragvaja, Čila in Urugvaja (Jonsson in sod., 2010). Skupaj v Južni in Severni Ameriki letno poročajo o približno 1000 primerih HCPS, ki pa jih lahko povzroča kar 15 različnih hantavirusov (Preglednica 1). Najhujšo obliko bolezni povzroča virus AND, ki je razširjen predvsem v Južni Ameriki in dosega kar 40% smrtnost (Jonsson in sod., 2010; Padula in sod., 1998).

Prvi dokazi o kroženju hantavirusov na afriški celini segajo že v leto 1984, ko je Gonzalez s sodelavci dokazal protitelesa proti hantavirusom med prebivalci Benina, Burkine Faso, centralne Afriške Republike in Gabona (Gonzalez in sod., 1984). Kasneje so o posrednih dokazih o kroženju hantavirusov v Afriki poročali še iz drugih držav (Klempa, 2009), vendar do danes še niso uspeli dokazati nobenega akutnega primera HMRS ali HCPS.

2.4.1 HMRS v Sloveniji

Slovenija je biotsko zelo raznovrstna saj omogoča življenje mnogim sesalcem, ti pa imajo tudi različne viruse. Tako med glodavci v Sloveniji krožijo štiri tipi hantavirusov: PUU, DOB, TUL in SAA (Avsic-Zupanc in sod., 2000; Avsic-Zupanc in sod., 2007; Korva in sod., 2009a); (Slika 4). Poleg tega smo hantavirus, ki je podoben virusu SWS, dokazali v gozdni

rovki, *Sorex araneus*. S tem smo ugotovili, da v Sloveniji hantavirusi ne krožijo le med glodavci, temveč tudi žužkojedimi gostitelji.



Slika 4: Zemljepisna razširjenost hantavirusov v Sloveniji v naravnem gostitelju.

Najbolj razširjen hantavirus je virus DOB, ki izvira iz Slovenije. Odkrili so ga v rumenogrli miši, ujeti v vasi Dobrava na Dolenjskem (Avsic-Zupanc in sod., 1992). Virus DOB in njegovega gostitelja lahko najdemo povsod po Sloveniji, vendar večina primerov bolezni izvira predvsem iz dolenjske in ljubljanske regije (Avsic-Zupanc in sod., 2000). Poleg omenjenega virusa je v Sloveniji prisoten tudi virus SAA, ki kroži v naravi med dimastimi mišmi, razširjenimi predvsem v Prekmurju in na Goriškem (Avsic-Zupanc in sod., 2000). V obeh regijah so virus SAA dokazali v naravnem gostitelju, med tem ko ga iz bolnikov niso osamili (Avsic-Zupanc in sod., 2000).

V Prekmurju in na Štajerskem lahko v naravnem gostitelju, poljski voluharici, najdemo virus TUL. Ta izvira iz Rusije in naj bi bil patogen tudi za človeka (Klempa in sod., 2003; Vapalahti in sod., 1996), vendar smo ga dokazali v Sloveniji le v naravnem gostitelju (Korva in sod., 2009a). Večino primerov HMRS v Sloveniji, tako kot po vsej Evropi, povzroča virus PUU, ki se ohranja v naravi v gozdni voluharici, razširjeni povsod po Sloveniji (Avsic-Zupanc in sod., 2007).

Prvi primer HMRS so v Sloveniji zabeležili že leta 1954 (Radosevic in Mohacek, 1954). Do danes je prijavljenih več kot 310 bolnikov, ki so bili sporadični primeri HMRS ali bolniki v manjših epidemijah (Slika 5). V Sloveniji se pojavlja HMRS v dveh oblikah. Prvo, blažjo obliko bolezni, *nephropathia epidemica*, povzroča virus PUU. Druga oblika bolezni, ki jo povzroča virus DOB, pa ima veliko resnejše simptome in doseže tudi do 16% smrtnost (Avsic-Zupanc in sod., 1999).

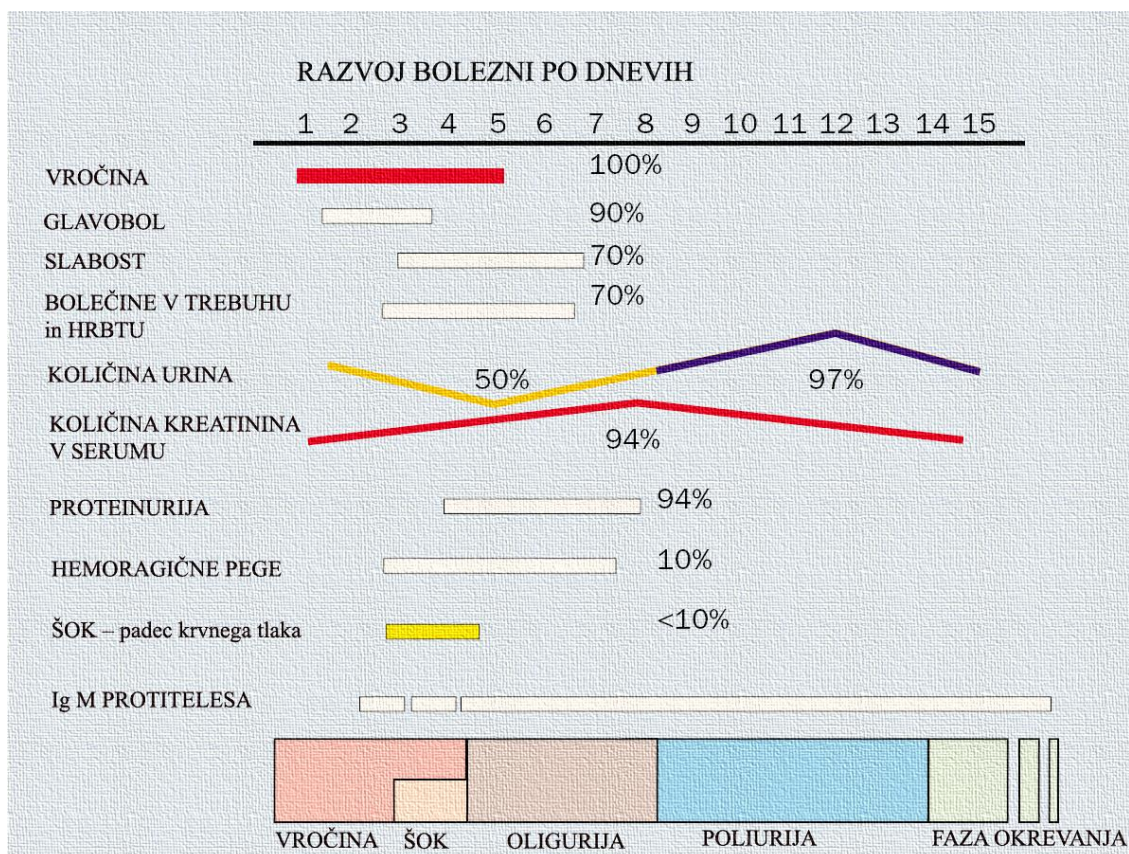
Kljub temu, da se pojavlja HMRS v Sloveniji po vsej državi, je večina bolnikov iz treh endemičnih regij: Ljubljane z okolico, dolenjske regija in Prekmurja (Slika 5).



Slika 5: Zemljepisna razporeditev bolnikov s HMRS po Sloveniji. Vsaka rdeča pika predstavlja enega bolnika.

2.5 KLINIČNA SLIKA HMRS

Potek okužbe s hantavirusi je odvisen od tipa hantavirusa, ki lahko prizadene predvsem pljučne kapilare (HCPS), ali ledvične kapilare (HMRS). Poleg razvoja dveh sindromov pri okužbah s hantavirusi opazimo tudi zelo različen potek bolezni: od brezsimptomne oziroma zelo blage oblike bolezni do bolezni s težkim potekom, s krvavitvami in šokom ali celo smrtnim izidom. Blažje oblike bolezni so navadno povezane z okužbo z virusom PUU, SAA in SEO, težje pa predvsem z virusom HTN in DOB (Avsic-Zupanc in sod., 1999; Linderholm in Elgh, 2001; Schmaljohn in Hjelle, 1997).



Slika 6: Shematski prikaz kliničnega poteka HMRS (Vapalahti in sod., 2003)

Značilen potek HMRS lahko razdelimo na pet faz: vročinska, hipotenzivna, oligurična, diuretična faza in faza okrevanja (Vapalahti in sod., 2003) (Slika 6). Po 2-3 tednih inkubacijske dobe nenadno izbruhnejo bolezenski znaki: vročina, mrzlica, glavobol in drugi simptomi, ki spominjajo na gripo. Sledijo težave s prebavili, bolečine v trebuhu, zaspanost in motnje vida (Settergren in sod., 1991). Pojavijo se lahko tudi manjše krvavitve sluznice v prebavilih, rdečice obraza, injicirane konjunktive, petehije in hematurija. V tej fazi bolezni je značilna tudi akutna trombocitopenija, ki se slabša do konca vročinske faze. Hipotenzivna faza nastopi hitro, s padcem krvnega tlaka, ki je posledica povečane prepustnosti žilnega epitelija. Pri hujših primerih bolezni lahko v tej fazi bolnik pade v šok, kar vodi v odpoved srca in smrt. Po 3-4 dneh se pojavijo znaki okvare ledvic (oligurija, anurija) s proteinourijo, elektrolitskim neravnovesjem, povišanjem serumskega kreatinina in bolečinami v hrbtu. Pri težjih bolnikih je potrebno začasno zdravljenje s hemodializo. Sledi diuretična faza, kjer se ledvična funkcija postopoma izboljšuje, ponovno se vzpostavi elektrolitsko ravnovesje. Faza

popolnega okrevanja lahko traja nekaj tednov ali celo mesecev (Schmaljohn in Hjelle, 1997; Schonrich in sod., 2008; Vapalahti in sod., 2003). Pri okužbi z virusom PUU so faze bolezni med seboj težko ločljive, saj le pri 5% bolnikov pride do akutne odpovedi ledvic in porušitve elektrolitskega ravnovesja v telesu, kar zahteva bolnišnično zdravljenje in dializo (Mustonen in sod., 1994; Rollin in sod., 1994). Do resnih zapletov zaradi krvavitev pride le pri 10% bolnišnično zdravljenih bolnikov (Alexeyev in sod., 1994; Nuutinen in sod., 1992).

Kljub različnim potekom bolezni, tako znotraj skupine bolnikov okuženih s posameznim hantavirusom, kot tudi med bolniki, okuženimi z različnim hantavirusi, so določeni klinični znaki skupni vsem: povišana prepustnost žilnega epitelija, ki vodi v hipotenzijo, hemokoncentracija, vazodilatacija, akutna trombocitopenija, aktivacija CD8⁺ limfocitov T, levkocitoza in povišano število nezrelih levkocitov (Schonrich in sod., 2008). Dodatno so pogosti tudi naslednji laboratorijski kazalci: povišane vrednosti serumskega kreatinina, C-reaktivnega proteina in jetrnih transaminaz (Kuzman in sod., 2003; Schonrich in sod., 2008; Vapalahti in sod., 2003).

Velja, da povzročajo hantavirusi v Evropi akutno odpoved ledvic, kljub temu pa zdravniki opazajo vse več bolnikov s hudo dihalno stisko (Linderholm in sod., 1992; Linderholm in sod., 1997; Rasmuson in sod., 2011) ali nenavadnimi kardiološkimi izvidi (Makela in sod., 2009), ki so značilni za HCPS. Pogosto, predvsem pri bolnikih z virusom DOB, opisujejo tudi nevrološke spremembe, od delnih parez obraza do epileptičnih napadov (Cerar in sod., 2007; Kuzman in sod., 2003). Vse to pojasnjuje dejstvo, da veliko število bolnikov, predvsem tistih z nespecifičnimi vročinskimi znaki bolezni, ostane neprepoznanih.

Prav na podlagi kliničnih in laboratorijskih kazalcev so Kuzman in sodelavci v največji epidemiji HMRS na Hrvaškem leta 2002, izdelali točkovno lestvico za oceno poteka bolezni (Kuzman in sod., 2003), (Preglednica 2).

Preglednica 2: Lestvica za oceno poteka bolezn pri bolnikih s HMRS (Kuzman in sod., 2003).

Pokazatelji poteka bolezn	Število točk
1. ŠOK, HIPOTENZIJA *	
Šok (nemerljiv tlak)	10
Hipotenzija, sistolični tlak < 90 mm Hg	5
Tahikardija, pulz > 120/min	2
2. KRVAVITVE*	
Obilne: potrebna transfuzija	5
Notranje (melena, hematemeza, hemoptoa, intrakranialno)	3
Epistaksa	2
Na koži (petehije) in sluznicah (subkonjunktivalno, enantem)	1
3. SPLOŠNI SIMPTOMI	
Temperatura > 40 °C	2
Epileptični napad	2
Motnje (zamegljenost) vida	1
Izrazito močne bolečine v ledvenem delu	1
Bruhanje in driska	1
4. LABORATORIJSKI IZVIDI	
Urea in/ali kreatinin	> 5-krat večji od normale 5
	> 4-krat večji od normale 4
	> 3-krat večji od normale 3
	> 2-krat večji od normale 2
Trombociti	< 20 x 10 ⁹ /L 2
	< 50 x 10 ⁹ /L 1
AST/ALT	> 5-krat večji od normale 2
	> 3-4-krat večji od normale 1
RTG pljuč	pneumonitis 2
	plevralni izliv 1
EKG	mioperikarditis 1

*Iz skupin 1 in 2 se točkuje samo en pokazatelj (tisti z najvišjim številom točk)

Na podlagi zbranih točk so bolnike razdelili v štiri skupine glede na potek bolezni: blag potek (< 7 točk), srednje težek potek (8-14 točk), težek potek (15-21 točk) in zelo težek potek bolezni (> 22 točk). Točkovno lestvico so ovrednotili Cebalo in sodelavci, ki so v retrospektivni študiji ocenili potek bolezni pri bolnikih s HMRS na Hrvaškem od leta 1995 do 2000 in ugotovili, da povzroči večino zelo težkih in težkih oblik HMRS virus DOB. Kljub temu, da zboli več bolnikov s HMRS zaradi okužbe z virusom PUU, pa ta povzroči navadno blažjo obliko bolezni. Ne glede na to so pri 11% bolnikov okuženih z virusom PUU dokazali težji potek bolezni, kar potrjuje ugotovitve, da lahko tudi virus PUU povzroči težko obliko bolezni (Cebalo in sod., 2003).

Predlagano točkovno lestvico smo uporabili tudi pri ocenjevanju poteka bolezni slovenskih bolnikov s HMRS. V retrospektivni študiji smo zajeli bolnike, ki so bili bolnišnično zdravljeni v Slovenji med leti 1988 in 2006. Skupno smo v raziskavo vključili 152 bolnikov s HMRS, 69 okuženih z virusom DOB in 83 z virusom PUU. Glede na točkovno lestvico smo, priredili kriterije tako, da smo bolnike okužene z virusom DOB razvrstili v 3 skupine, pri čemer so se uvrstili v skupino z najtežjim potekom bolezni bolniki s hudo trombocitopenijo, krvavitvami, anurijo oz. oligurijo, vsaj 4-krat povišanimi vrednostmi serumskega kreatinina ali sečnine, in/ali s potrebo po dializnem zdravljenju. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, kjer je potek bolezni navadno blažji, smo priredili kriterije za ocenjevanje poteka bolezni tako, da smo uvrstili v skupino s težjim potekom bolezni bolnike, ki so potrebovali dializno zdravljenje oz. sta bila prisotna vsaj dva izmed naslednjih kazalcev: krvavitve, anurija/oligurija ter vsaj 3-krat povišane vrednosti serumskega kreatinina ali sečnine (Saksida, 2008; Saksida in sod., 2008).

2.6 PATOGENEZA IN IMUNOST HMRS

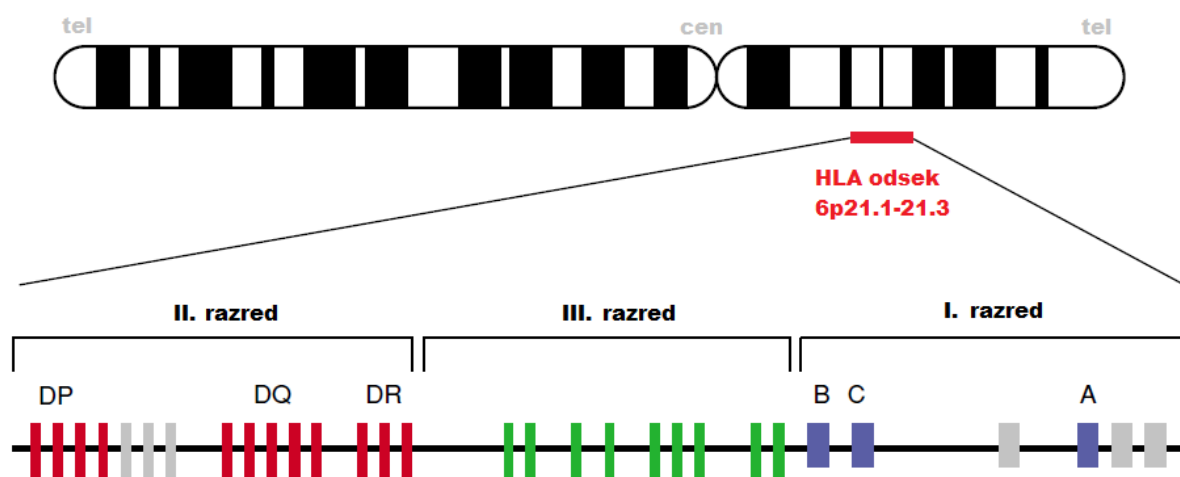
Patogeneza HMRS je nepoznana, zlasti zato, ker zaradi tesne ko-evolucije virusa z naravnim gostiteljem ni na voljo primernega živalskega modela. Kljub omejenim pogojem si raziskovalci pri raziskovanju patogeneze pomagajo z nekaterimi živalskimi modeli, kot so model hrčka za okužbe z virusom AND (Hooper in sod., 2001), modeli sesajočih miši (Ebihara in sod., 2000) ter rezus opic za proučevanje patogeneze HMRS (Klingstrom in sod.,

2002; Sironen in sod., 2008). Večina študij je kljub temu omejena na pogoje *in vitro*, ki zahtevajo laboratorij tretje varnostne stopnje ali na redke klinične študije (Bray, 2005).

2.6.1 Vpliv genotipa človeških levkocitnih antigenov na potek HMRS

Osnova celičnega imunskega odziva je kompleks tkivne skladnosti (MHC, angl. Major Histocompatibility Complex), ki ga imenujemo pri ljudeh tudi človeški levkocitni antigeni (HLA, angl. Human Leukocyte Antigen). Molekule MHC so odkrili in proučevali v zvezi z zavrnitvijo presaditvenih organov. Ugotovili so, da so molekule v tem kompleksu odgovorne za prepoznavanje lastnih in tujih peptidov in da predstavljajo začetek niza dogodkov v imunskem odgovoru (Kindt in sod., 2007).

6. človeški kromosom



Slika 7: Genska mapa odseka HLA na 6. človeškem kromosomu. Klasični geni v vsaki regiji so obarvani z značilno barvo: I. razred – modro, II. razred – rdeče, III. razred – zeleno. Med klasične gene uvrščamo tiste, ki neposredno sodelujejo pri imunskem odzivu, z vezavo virusnih antigenov. Poleg njih pa so sivo obarvani neklasični geni v posameznem razredu. Funkcija neklasičnih genov HLA po večini ni še poznana (Mehra in Kaur, 2003).

Genetski zapis za molekule HLA je na krajšem kraku 6. človeškega kromosoma in je organiziran v tri razrede: geni v I. razredu imajo zapis za glikoproteine, ki so prisotni na vseh celicah z jedrom in predstavljajo peptide citotoksičnim limfocitom T (T_C), geni v II. razredu imajo zapis za glikoproteine, ki so prisotni le na antigen predstavitvenih celicah in predstavljajo peptide limfocitom T-pomagalkam (T_H), in geni v III. razredu pa imajo zapis za

ostale beljakovine, ki sodelujejo v imunskem odzivu, kot so molekule komplemента, vnetni citokini in dejavnik tumorske nekroze (Klein in Sato, 2000a), (Slika 7). Molekule HLA nadalje delimo še v podrazrede in sicer: molekule v I. razredu delimo na membranske glikoproteine HLA-A, HLA-B in HLA-C, ki vežejo različne virusne antigene in jih predstavljajo naivnim limfocitom T (CD8+). Tako vzbudijo njihovo aktivacijo in nastanek citotoksičnih limfocitov T. Geni, zbrani v II. razredu, imajo zapis za glikoproteine, ki jih najdemo le na makrofagih, limfocitih B in zrelih dendritičnih celicah; delimo jih v 3 podrazrede: HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR. Izražanje teh je močno uravnano, saj z aktivacijo limfocitov T-pomagalk sprožijo vsesplošni imunski odziv, ki je lahko v napačnem trenutku tudi zelo škodljiv (Kindt in sod., 2007). Molekule MHC se na površini celic izražajo kodominantno, s tem pa zagotavljajo veliko število kombinacij glikoproteinskih molekul, ki lahko vežejo različne peptide. Do vezave peptida in molekule HLA pride v endoplazmatskem retikulumu, potem skupaj potujeta na površino celice. Različne kombinacije molekule HLA in peptida sprožijo različno hiter in močan celični odgovor (Thorsby, 1997). Poleg vpliva molekul HLA na celično imunost, pa v zadnjem času ugotavljajo, da imajo le-te vlogo tudi pri naravni imunosti, saj aktivirajo celice ubijalke preko receptorja KIR (KIR, angl. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor); (Blackwell in sod., 2009). Vse kaže na to, da je predstavitev virusnih peptidov z molekulami MHC in aktivacija imunskega odgovora na več ravneh, kompleksen in občutljiv niz dogodkov, ki morajo biti strogo uravnani, da ne pride do škodljivih učinkov. Vse to pa izkoriščajo tudi virusi, da si zagotovijo okolje za razmnoževanje. Kljub velikemu napredku v humani genetiki, je raziskovanje genetskega vpliva posameznika za občutljivost ali odpornost na posamezno virusno okužbo ter njen potek še vedno na začetku svoje poti (Coffey in sod., 2009).

Raziskava haplotipa HLA pri bolnikih s HMRS v Skandinaviji (virus PUU) je nakazala na pozitivno povezavo med težjim potekom bolezni in haplotipom HLA-B*08-DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (Makela in sod., 2002; Mustonen in sod., 1996; Plyusnin in sod., 1997). Posamezniki s haplotipom HLA-B*08-DRB1*03:01 so nagnjeni k preobčutljivosti, povišanemu protitelesnemu odzivu, ovirani aktivaciji limfocitov T in znižanem nivoju regulatornih citokinov (Candore in sod., 1994; Hashimoto in sod., 1989). V nasprotju s tem so povezali posameznike s skupino alelov HLA-B*27 z blažjo obliko okužbe z virusom PUU.

Frekvenca skupine alelov HLA-B*27 je bila med bolnišnično zdravljenimi bolniki s HMRS nižja kot v povprečju v finski populaciji, nihče od bolnikov v skupini s težjim potekom bolezni ni imel tega alela. To odraža zaščitno vlogo skupine alelov HLA-B*27 pri okužbi z virusom PUU v finski populaciji (Mustonen in sod., 1998). V nasprotju z zaščitno vlogo pri virusnih okužbah, so isti haplotip povezali z razvojem različnih avtoimunskih bolezni (Klein in Sato, 2000b). Tudi v čilski populaciji so težji potek HCPS, ki ga povzroča virus AND, povezali s skupino alelov HLA-B*08. Blažji potek bolezni, pa s skupino alelov HLA-DRB1*15 (Ferrer in sod., 2007). Posamezniki z alelom HLA-B*35:01 naj bi bili nagnjeni k težjim potekom bolezni in celo smrtnim izidom HCPS, ki ga povzroča okužba s hantavirusom SN v Ameriki (Kilpatrick in sod., 2004).

Mehanizem povezave haplotipa HLA in poteka bolezni pri posamezniku ni znan, vendar pa maloštevilne študije na tem področju predvidevajo, da HLA vpliva tako na aktivacijo kot tudi na uravnavanje imunskega odziva s spreminjanjem nivoja citokinov (Makela in sod., 2002). Dejstvo, da so različni geni imunskega odziva tesno povezani med seboj in se tudi vezano dedujejo, dodatno potrjuje hipotezo, da so določeni posamezniki s svojim genskim zapisom lahko nagnjeni k občutljivosti ali odpornosti proti različnim virusnim okužbam (Hill, 1999; Thorsby, 1997).

2.6.2 Vpliv celičnega imunskega odziva na potek HMRS

Pri razvoju HMRS ima poleg virusa v patogenezi pomembno vlogo tudi imunski odziv posameznika, saj je izid virusne okužbe kompleksna povezava med virusnimi značilnostmi in imunskim odzivom bolnika (Khaiboullina in St Jeor, 2002; Maes in sod., 2004; Markotic in sod., 2002; Schonrich in sod., 2008). Glavni dokaz okužbe s hantavirusi je poškodba žilnega endotelija in s tem višja prepustnost žilnih sten, vendar neposrednega delovanja hantavirusov na mesto poškodbe niso mogli dokazati (Cosgriff in sod., 1991; Kim in sod., 1993; Terajima in sod., 2007; Zaki in sod., 1995). Primarno mesto razmnoževanja hantavirusov so endotelijske celice pljuč in ledvic ter makrofagi, kljub temu lahko virusni antigen dokažemo v mnogih različnih tkivih (Hughes in sod., 1993; Schmaljohn in Hjelle, 1997). Glavno vlogo pri razširjanju hantavirusov po telesu naj bi imele nezrele dendritične celice. Hantavirusi vstopijo preko integrinskih receptorjev v nezrele dendritične celice in jih s tem aktivirajo, da le-te

potujejo proti limfatičnim organom, kjer sprožijo aktivacijo limfocitov T in makrofagov (Peebles in Graham, 2001; Raftery in sod., 2002). Zato predvidevajo, da vnetni citokini sprožijo pretiran imunski odziv in s tem poškodbe žilnega endotelija (Khaiboullina in St Jeor, 2002; Maes in sod., 2004; Markotic, 2003; Schonrich in sod., 2008). Pri bolnikih z akutno odpovedjo ledvic, zaradi okužbe z virusom PUU, so v biopsijskem vzorcu ledvice dokazali virusni antigen ter manjše poškodbe endotelija, ki niso bile zadostne za razlago ledvične odpovedi (Temonen in sod., 1996; Terajima in sod., 2007). Hkrati so v teh vzorcih dokazali tudi veliko število vnetnih celičnih infiltratov, pri čemer predvidevajo, da hantavirusno pomnoževanje v endoteljskih celicah sproži močan lokalni imunski odziv, ki povzroči končno okvaro tarčnega organa (Groeneveld in sod., 1995; Linderholm in sod., 1996; Temonen in sod., 1996). Večina virusov, ki povzročajo hemoragične mrzlice, skuša ovirati zorenje dendritičnih celic in tako preprečijo aktivacijo limfocitov T. Hantavirusi pa še dodatno vzbudijo dendritične celice in izzovejo tako močan imunski odziv, da porušijo ravnovesje med celicami T-pomagalkami in citotoksičnimi celicami T, v prid zadnjim (Chen in Yang, 1990; Huang in sod., 1994; Kilpatrick in sod., 2004; Tuuminen in sod., 2007). Prav porušeno ravnovesje med celičnim in protitelesnim imunskim odzivom, visok nivo vnetnih citokinov ter zaviranje regulatornih citokinov vodi v težko obliko HMRS (Chen in Cosgriff, 2000; Schonrich in sod., 2008). Celični imunski odziv deluje proti vsem trem virusnim strukturnim beljakovinam (N, G_c, G_n), vendar pa je nukleoprotein najbolj ohranjen in verjetno zato glavna tarča citotoksičnih limfocitov T (Kaukinen in sod., 2005). Visoko koncentracijo spominskih limfocitov T, v glavnem usmerjenih proti hantavirusnemu nukleoproteinu, so dokazali tudi pri bolnikih, ki so pred 15 leti preboleli okužbo z virusom PUU. Presenetilo je dejstvo, da so tako visoke količine spominskih limfocitov T po navadi prisotne pri virusih, ki ali povzročajo trajne okužbe ali pa se z njimi srečamo večkrat v življenju (Schonrich in sod., 2008; Van Epps in sod., 2002). Visok nivo spominskih limfocitov T je lahko tudi posledica močnega imunskega odziva pri akutni okužbi, saj so višje količine limfocitov T našli pri posameznikih, ki so preboleli težjo obliko bolezni (Kilpatrick in sod., 2004).

2.6.3 Vpliv protitelesnega imunskega odziva na potek HMRS

Podobno kot pri celičnem imunskem odzivu, tudi pri protitelesnem odzivu okužba s hantavirusi vzbudi močan in dolgotrajen imunski odziv. Navadno so pri bolnikih s HMRS ob

pojavo simptomov prisotna tudi protitelesa razreda IgM, usmerjena proti virusnemu nukleoproteinu in beljakovinama G_c in G_n (Lundkvist in sod., 1993; Lundkvist in sod., 1997b). Pri večini bolnikov, okuženih z virusom PUU, pri prihodu k zdravniku lahko v serumu že dokažemo protitelesa razreda IgA, IgM in IgG proti virusnemu nukleoproteinu (Vapalahti in sod., 2001). Nevtralizirajoča protitelesa usmerjena proti beljakovinama G_c in G_n, nastanejo po 15 dneh po okužbi in najverjetneje nudijo doživljenjsko zaščito (Lundkvist in sod., 1993; Vapalahti in sod., 2001).

Hantavirusi spodbudijo protitelesni odziv, po navadi značilen za viruse, ki povzročajo trajno okužbo pri človeku (virus hepatitis B, virus varičela-zoster, herpesvirus ...), kljub temu pa morebitne dolgotrajne okužbe s hantavirusi niso potrdili ne z molekularnimi tehnikami ne z dokazom antigena v biopsijskih vzorcih (Vapalahti in sod., 2001).

2.6.4 Vpliv virusnega bremena in mutacij v virusnem genomu na potek HMRS

Ne glede na vse raziskave, ki kažejo v smer, da je potek HMRS v večji meri odvisen od imunskega odziva posameznika kot od virusa samega, pa to vseeno ne pojasni zakaj povzročajo nekateri hantavirusi težjo obliko bolezni (virus AND) (Padula in sod., 1998), drugi le blago obliko bolezni z manj kot 2% smrtnostjo (Vapalahti in sod., 2003), tretji pa so za človeka nepatogeni. S proučevanjem razlik med patogenimi in nepatogenimi hantavirusi so ugotovili, da slednji pri vstopu v celico izkoriščajo različne β -integrinske receptorje (Gavrilovskaya in sod., 1999; Gavrilovskaya in sod., 2002; Mackow in Gavrilovskaya, 2001). Nadalje so prišli do spoznanja, da hantavirusi (virusa DOB, SN), ki povzročajo težje oblike bolezni, dosegajo višje virusno breme v krvi bolnikov (Saksida in sod., 2008; Xiao in sod., 2006). Pri bolnikih, okuženih z virusom AND, so v prospektivni študiji dokazali virusno RNA dva tedna pred pojavom simptomov oziroma protiteles ter nato tudi do 35 dni po razvoju HCPS (Ferres in sod., 2007). V nasprotju s tem so pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, ki povzroča blažjo obliko HMRS, virusno RNA dokazali v krvi bolnikov le med 4. in 9. dnevom bolezni, kar je sovpadalo s porastom titra protiteles razreda IgM in IgG (Evander in sod., 2007). Kljub dokazom, da višje virusno breme pri nekaterih hantavirusih poveča verjetnost za težji potek bolezni, ostaja vprašanje ali je dokazano višje virusno breme posledica virulence virusa ali imunskega odziva.

Glavni mehanizmi mikroevolucije hantavirusa PUU v naravnem rezervoarju virusa so točkovne mutacije in genomska prerazporeditev virusnih segmentov. Pri analizi vseh treh virusnih segmentov so ugotovili, da se največje število točkovnih mutacij pojavi na segmentu L. Večina mutacij je tihih in le redke se izrazijo v zamenjavi aminokislina (Razzauti in sod., 2008). Pri analizi segmenta S virusa PUU, na katerem je zapis za nukleoprotein, so dokazali sekundarni odprti bralni kodon na mestu +1, ki naj bi imel vlogo v patogenezi okužb hantavirusov (Schonrich in sod., 2008). Nukleoprotein je najpomembnejši virusni antigen in je v gostiteljski celici prisoten v relativno velikem številu kopij. Poleg tvorbe nitaste vijačne nukleokapside, sodeluje tudi pri razmnoževanju in transkripciji virusa tako z vezavo virusne polimeraze RNA, kot tudi s posredovanjem v metabolnih poteh gostiteljske celice (Kaukinen in sod., 2005). Pri analizi genetskih linij hantavirusa PUU v Sloveniji so pri prvič opisali delecijo na segmentu S, izoliranem iz gozdne voluharice (Avsic-Zupanc in sod., 2007). Pri gojenju virusa PUU v celičnih linijah VeroE6 so opazili, da celično prilagojena različica virusa izgubi prvotno virulentnost in ni sposobna ponovnega razmnoževanja v naravnih gostiteljih. Pri analizi genoma celično prilagojenih različic so zaznali, da se mutacije pojavijo v vseh treh segmentih virusnega genoma. V segmentih S in M se mutacije pojavljajo le v nekodirajočih regijah, v segmentu L pa se je na mestu 2053 pojavila fenotipsko značilna mutacija zamenjave aminokislina fenilalanin s serinom (Lundkvist in sod., 1997a; Nemirov in sod., 2003a). Za višjo virulentnost virusa HTN v sesajočih miškah naj bi bila odgovorna zamenjava enega nukleotida v zaporedju segmenta M, ki je povzročila zamenjavo aminokislina treonin v izolevcin. Ta virusna različica se je razmnoževala hitreje in je dosegla višje virusno breme v vseh organih, kar so povezali z boljšo sposobnostjo membranske fuzije (Ebihara in sod., 2000).

2.7 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA HMRS

Klinični potek hantavirusne okužbe je zelo raznolik, od blagega vročinskega stanja do fulminantnega hemoragičnega poteka z akutno odpovedjo ledvic in šokom (Avsic-Zupanc in sod., 1999; Pal in sod., 2005). Prav zato je potrditev diagnoze mogoča le s pravilno laboratorijsko diagnostiko. Poleg neznačilne klinične slike, je na istem endemskem področju mogoča okužba z različnimi hantavirusi, kar brez laboratorijske potrditve še dodatno onemogoča pravilno diagnostiko (Avsič-Zupanc in Petrovec, 2003).

S serološkimi metodami navadno dokazujemo specifična protitelesa razredov IgM in IgG. V rutinski diagnostiki uporabljajo najpogosteje metodo posredne imunofluorescence (IFA, angl. Immunofluorescent Assay) in encimsko-immunski test (EIA, angl. Enzyme Immuno Assay) (Avšič-Županc in Petrovec, 2003). Diagnostika temelji na porastu titra specifičnih protiteles IgG, zato je treba preiskati vsaj dva vzorca seruma bolnika, enega v akutni fazi in drugega v fazi okrevanja (Vapalahti in sod., 2003). Z EIA lahko določimo tudi specifična protitelesa razreda IgM, ki se za razliko od protiteles razreda IgG, pojavijo že v prvih dneh po okužbi. Zvišana raven protiteles IgM ostane prisotna le nekaj tednov, medtem ko protitelesa IgG zaznamo celo življenje (Niklasson in Kjellsson, 1988). Protitelesa proti hantavirusom navzkrižno reagirajo predvsem znotraj skupin HTN/SEO/DOB/SAA in PUU/PH/TUL, zato s temi metodami ni mogoče natančno določanje tipa virusne okužbe znotraj posameznih skupin (Kruger in sod., 2001). Tip hantavirusne okužbe lahko določimo z nevtralizacijskim testom redukcije plakov (PRNT angl. Plaque Reduciton Neutralization Test) ali z molekularnimi metodami (Avšič-Županc in Petrovec, 2003; Bowen in sod., 1997; Chu in sod., 1995). Ker je PRNT zelo zahtevna in časovno zamudna metoda, se v zadnjem času pogosteje uporabljajo različne inačice verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkriptazo v realnem času (RT-PCR, angl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Kljub temu, da molekularne metode omogočajo hitro in natančno diagnostiko ter tudi kvantifikacijo virusnega bremena pri posameznem bolniku (Evander in sod., 2007; Ferres in sod., 2007; Saksida, 2008), pa študije kažejo, da ob sprejemu bolnika v bolnišnico lahko dokažemo virusno RNA le pri manj kot polovici bolnikov (Horling in sod., 1995b; Kruger in sod., 2001).

3 METODE IN PREISKOVANCI

3.1 PREISKOVANCI

V študijo smo vključili bolnike s HMRS, ki so se med leti 1996-2011 bolnišnično zdravili v Sloveniji. Skupno smo vključili v raziskavo 160 bolnikov s HMRS, od tega 72 okuženih z virusom DOB in 88 z virusom PUU. Okužbo smo potrdili pri vseh bolnikih z dokazom protiteles proti hantavirusu PUU ali DOB, s posredno imunofluorescenčno metodo. Za vse bolnike smo zbrali popise zdravljenja in jih glede na glavne laboratorijske in klinične kazalce točkovali ter razdelili v skupine z blažjim ali težjim potekom bolezni oziroma smrtnim izidom (Kuzman in sod., 2003; Saksida, 2008).

3.2 METODE DELA

3.2.1 Metoda posredne imunofluorescence za določanje specifičnih protiteles razreda IgG proti virusu DOB oz. PUU

Z metodo posredne imunofluorescence smo dokazali protivirusna protitelesa v serumu bolnikov s HMRS. Specifična protitelesa iz bolnikovega seruma se najprej vežejo z virusnim antigenom, ki je pritrjen na predmetnik. Kompleksu dodamo s fluorokromom označena sekundarna protitelesa, ki prepoznajo primarna bolnikova protitelesa, vezana v imunski kompleks z antigenom. Nastali sekundarni imunski kompleks opazujemo z mikroskopom. Rezultate testiranja izrazimo s titrom protiteles.

Uporabili smo predmetna stekelca s pritrjenimi antigeni virusa DOB in virusa PUU, na katere smo nanесли s fosfatnim pufrom redčene serume bolnikov v razmerjih 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256, 1 : 512, in 1 : 1024. Za dokazovanje nastalih imunskih kompleksov smo uporabili s fluoresceinom označena kozja protitelesa proti človeškim protitelesom razreda IgG. Kot mejni titer smo določili redčino 1 : 16.

3.2.2 Encimsko-immunska metoda za določanje specifičnih protiteles razreda IgM proti virusu DOB oz. PUU

Specifična protitelesa razreda IgM proti virusu DOB oz. PUU, v serumu bolnikov, smo določili s komercialnima kompletoma: Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgM EIA in Reagena PUUMALA IgM EIA (Reagena International Oy Ltd, Toivala, Finska), po navodilih proizvajalca.

Za določevanje protiteles razreda IgM je test pripravljen tako, da so v vdolbinice mikrotitrsko ploščice vezana protitelesa proti človeškim protitelesom razreda IgM (usmerjena proti μ -verigi protiteles IgM). Vzorce bolnikov redčimo v pufru za redčenje v razmerju 1 : 201, in jih v dveh ponovitvah naneseemo na mikrotitrsko ploščico ter dodamo kontroli. Nato dodamo sekundarna protitelesa, ki imajo vezan rekombinantni nukleoprotein virusa HTN oz. PUU, ter konjugiran encim hrenovo peroksidazo. Po dodatku substrata se razvije barvna encimska reakcija. Intenziteta obarvanosti je sorazmerna s količino specifičnih protiteles v bolnikovem serumu proti virusu DOB oz. PUU. Količino protiteles določimo z merjenjem absorbance pri 450 nm. Iz absorbance dobimo rezultat (R) tako, da absorbanco pri vzorcu delimo z absorbanco pri kontroli ter množimo s konstanto, ki jo določi proizvajalec. Kot pozitivne prepoznamo tiste vzorce, pri katerih je $R > 1$. Pri vzorcih, ki imajo R med 0,8 in 1, moramo ponoviti testiranje, oziroma, če je to mogoče, pridobiti še dodaten vzorec za testiranje.

3.2.3 Encimsko-immunska metoda za določanje specifičnih protiteles razreda IgG proti virusu DOB oz. PUU

Specifična protitelesa razreda IgG proti virusu DOB oz. PUU, v serumu bolnikov, smo določili s komercialnima kompletoma: Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgG EIA in Reagena PUUMALA IgG EIA (Reagena International Oy Ltd, Toivala, Finska), po navodilih proizvajalca.

Test izvajamo na mikrotitrski ploščici, na katero je vezan rekombinantni nukleoprotein virusa HTN oz. PUU. Vzorce bolnikov redčimo v pufru za redčenje v razmerju 1 : 201, in jih v dveh ponovitvah naneseemo na mikrotitrsko ploščico ter dodamo kontroli. Specifična protitelesa razreda IgG v serumu bolnika se vežejo na pritrjeni antigen. Nato dodamo sekundarna

protitelesa, ki so usmerjena proti človeškim protitelesom razreda IgG in so konjugirana z encimom hrenovo peroksidazo. Po dodatku substrata se razvije barvna encimska reakcija. Intenziteta obarvanosti je sorazmerna s količino specifičnih protiteles v bolnikovem serumu proti virusu DOB oz. PUU. Količino protiteles določimo z merjenjem absorbance pri 450 nm. Iz absorbance dobimo rezultat (R) tako, da absorbanco pri vzorcu delimo z absorbanco pri kontroli, kar množimo s konstanto, ki jo določi proizvajalec. Kot pozitivne prepoznamo tiste vzorce, pri katerih je $R > 1,2$. Pri vzorcih, ki imajo R med 0,8 in 1,2, moramo ponoviti testiranje, oziroma, če je to mogoče, pridobiti še dodaten vzorec za testiranje.

3.2.4 Osamitev genomske DNA

Za osamitev genomske DNA iz vzorcev krvi bolnikov s HMRS smo uporabili avtomatsko osamitev s komercialnim kompletom reagentov EZ1 DNA Blood 350 μ l Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Osamitev smo izvedli po navodilih proizvajalca. V prvem koraku poteče liza celic, nato se prosta genomska DNA, v prisotnosti kaotropnih soli, veže na delce silike. V naslednjem koraku z magnetom aparat loči delce silika z vezano DNA od ostalih nečistoč in tako dobimo, v elucijskem pufri, čisto ter visoko kvalitetno izolirano DNA.

Za osamitev genomske DNA iz seruma bolnikov s HMRS, kjer je prisotnih malo celic in je zato potrebna zelo občutljiva metoda, smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Osamitev smo izvedli po navodilih proizvajalca. V prvem koraku smo vzorcu dodali proteinazo K, ki lizira celice. Nato smo vso vsebino prenesli na priložene kolone z membrano silika, ki veže prosto genomsko DNA. V naslednjih korakih smo vzorec spirali s pufri za spiranje, s čimer smo se znebili nečistoč v vzorcu. Na koncu smo dodali elucijski puffer, ki je spral genomsko DNA iz membrane in zagotavlja optimalno okolje za nadaljnje shranjevanje izolirane DNA.

3.2.5 Osamitev celokupne RNA

Celokupno RNA smo osamili iz serumskih vzorcev bolnikov s HMRS po izboljšanjem postopku Chomczynskega in Sacchija (Chomczynski in Sacchi, 1987). Metoda temelji na fenol-kloroform-alkoholni osamitvi celokupne RNA iz vzorca. Uporabili smo reagent TRIZOL LS (raztopino gvanidin izotiocianata in fenola), (Invitrogen Life Technologies™,

Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki ohranja integriteto RNA, kljub temu, da lizira celice in celične komponente. Poleg tega ščiti izolirano RNA pred RNAzami v nadaljnjih postopkih, kar omogoča lažje rokovanje in boljše rezultate. Osamljeno RNA smo raztopili v sterilni vodi, ki je primerna za molekularno detekcijo, in jo shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.6 Tipizacija lokusa HLA

Tipizacijo lokusa HLA pri bolnikih s HMRS, ki smo jih vključili v našo študijo smo izvedli na Centru za tipizacijo tkiv, na Zavodu RS za transfuzijsko medicino.

Tipizacijo lokusa HLA-B in HLA-DRB smo izvedli na aparatu Luminex (LABScan™ 100, Luminex Corporation, Austin, Teksas, ZDA) s komercialnima kompletoma LABType® SSO B Locus in LABType® SSO DRB1 (One Lambda, Canoga Park, Los Angeles, ZDA). Tipizacijo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Princip metode sloni na pomnoževanju genomske DNA bolnika z metodo PCR ter detekcijo prideleka s sekvenčno-specifičnimi lovkami, ki so vezane na fluorescentno označene mikrokroglice. Po osamitvi genomske DNA smo pomnožili tarčni odsek na 6. človeškem kromosomu, pri čemer smo uporabili skupinsko specifične začetne oligonukleotide. Pridelek smo označili z biotinom, kar nam je omogočilo njegovo prepoznavanje po končani reakciji. Nato smo hibridizirali pridelek s sekvenčno-specifičnimi lovkami, ki so bile označene s fluoresceinom in vezane na mikrokroglice. Vsaka mikrokroglica je označena tudi s fikoeritriinom, ki absorbira svetlobo v modrem delu spektra ter oddaja rdečo svetlobo. Kombinacija obeh fluoresceinov nam je omogočila, da smo ob potovanju mikrokroglic skozi pretočni citometer razbrali ali je vzorec pozitiven in kateri genotip je prisoten.

3.2.6.1 Subtipizacija lokusa HLA-B*35

Pri bolnikih, ki so imeli skupino alelov HLA-B*35, smo se odločili za subtipizacijo tipa HLA do posameznega alela natančno. Tipizacijo smo izvedli z molekularnim kompletom Olerup SSP, HLA-B*35, 101.522-24u (OlerupSSP, Stockholm, Švedske), po navodilih proizvajalca. Molekularni test temelji na reakciji PCR in hibridizaciji vzorca s skupinsko specifičnimi lovkami, ki omogočajo prepoznavanje prideleka. Vsak vzorec pomnožimo z 48 različnimi reakcijami, v katerih so specifični začetni oligonukleotidi, skupinsko specifične lovke ter kontrolni par začetnih oligonukleotidov, za preverjanje uspešnosti reakcije. Po končani

reakciji lahko, glede na vzorec hibridizacije in navodila proizvajalca, določimo subtip HLA-B*35.

3.2.7 Določanje virusnega bremena

Za določanje virusnega bremena v serumu bolnikov s HMRS smo uporabili metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo in reverzno transkriptazo v realnem času (RT-PCR, angl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), ki smo jih vpeljali v laboratorij v predhodnih študijah (Korva in sod., 2009b; Saksida, 2008; Saksida in sod., 2008).

3.2.8 Določitev nukleotidnega zaporedja virusa DOB in PUU neposredno iz vzorca bolnika

Za določitev nukleotidnih zaporedij segmenta S in M virusov DOB in PUU v vzorcih bolnikov smo uporabili že objavljene kot tudi izvirne začetne oligonukleotide, ki smo jih naredili na podlagi že znanih zaporedij virusov, izoliranih v Sloveniji (DOB), (Preglednica 3), ali na Balkanu (PUU), (Preglednica 4). Genom virusa smo skušali pomnožiti v vzorcih krvi in seruma bolnikov, ki so bili akutno okuženi z virusom, in smo pri njih predhodno že izmerili virusno breme.

Za optimizacijo metode RT-PCR za posamezni par začetnih oligonukleotidov smo uporabili naslednje komercialne komplete reagentov:

- SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
- SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
- Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija)
- RobusT II RT-PCR KIT (Thermo Scientific Finnzymes, Vantaa, Finska)

Za optimizacijo metode vgnezdene PCR smo uporabili komercialni komplet reagentov Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v doktorski disertaciji za določevanje nukleotidnih zaporedij virusov DOB pri bolnikih v Sloveniji.

VIRUS DOBRAVA			
	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE 5' - 3'	PRIDELEK PCR	REFERENCA
SEGMENT S			
DOB-SF2	ACT CCC TAA AGA GCA CTA CA	705 bp	izvirni
DOB-SR2	AAA CCC AAU CAC ACU CA		
DOB-SF1	CCT GTT CTT GTC AAT GCC CAA T	654 bp	izvirni
DOB-SR1	CAA CUG CCU CUU UUC CCC		
DOB-SF	GCA TGG CAG AGC TAG GT	618 bp	izvirni
DOB-SR	GGU AGU AGU UGU UGA GGU		
MS120C	GGA TGCA GAA AAI CAG TAT GA	1051 bp	(Papa in sod., 1998)
MS1170R	AGT TGT ATI CCC ATI GAT TGT		
MS363C	GAI ATT GAT GAA CCT ACA G	599 bp	(Papa in sod., 1998)
MS986R	GAI ATT GAT GAA CCT ACA G		
SEGMENT M			
RT-DOB	TTC TGC AGT AGT AGT AKR CTC CCT AAA RAG	3647 bp	(Schmaljohn in sod., 1986)
DOB-M1F	CAA AAT CCC ACA TAC TGC AA	1281 bp	izvirni
DOB-M1R	AGT CTC CCA TCA AAC CAA		

Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v doktorski disertaciji za določevanje nukleotidnih zaporedij virusov PUU pri bolnikih v Sloveniji.

VIRUS PUUMALA			
	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE 5' - 3'	PRIDELEK PCR	REFERENCA
SEGMENT S			
RT-PUU	TAG TAG TAG ACT CCT TGA AAA G	1850 bp	(Schmaljohn in sod., 1986)
PUU-BF	AGA AGG CAG TGG AAA TGG A	1614 bp	izvirni
PUU-BR	AGT GGT GAA AAA GGA AAA GG		
PUU-BM*	GGA TGG CTG AAC TTG GTG	1481 bp	izvirni
PUU-SF	AAG AGA AGA ATG GCA GA		
PUU-SR	GGU GAA AAG GAA AGG GAU AG	1596 bp	izvirni
PUUS126F	AGA GAA GGC AGT GGA AAT		
PUUS1722R	AGT GGT GAA AAA GGA AAA GG	615 bp	izvirni
PUUS699F	GAT GGG GGT TAT AGG ATT		
PUUS1314R	GGC TCC TGG TTA GAT ATT	653 bp	(Bowen in sod., 1997)
PPT334C	TAT GGI AAT GTC CTT GAT GT		
PPT986R	GCA CAI GCA AAI ACC CA		
SEGMENT M			
PUU-M1F	AGU ACA GGG GAU UGC AUU U	1166 bp	izvirni
PUU-M1R	TTG TTC GTT TGC TGG GTT		
PUU-M2F	GGA AAG GUG ACA GGA AAG	1414 bp	izvirni
PUU-M2R	GAT TAC AAC CCC AAC CAG		
MOF103	GGA CCA GGT GCA GCT TGT GAA GC	490 bp	(Chu in sod., 1995)
MOR204	ACC TCA CAA ACC ATT GAA CC		
PUUG1F	GTG TCC AGA GAT TCC GTG GT	324 bp	(Chu in sod., 1995)
PUUG1R	GAA CAT AAG TAT GCG AAT GCA A		
PUUF1	GGT GCA GAG CAA CAA ATC AA	200 bp	(Avsic-Zupanc in sod., 2007)
PUUR1	CAT TGT AGC CCA GCC ATG TA		
A1	AAT CCA TCT GAG GCT ACA CCG TCT	1237 bp	(Horling in sod., 1995a)
C2	CCA ACT CCT GAA CCC CAT GC		
HG2F1	TGG GCT GCA AGT GC	365 bp	(Xiao in sod., 1994)
HG2R1	CAA CCC CAG CTA GTY TCA		

3.2.8.1 Pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu S virusa DOB

Za analizo nukleotidnega zaporedja segmenta S virusa DOB, pomnoženega neposredno iz vzorca bolnika, smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov.

S parom začetnih oligonukleotidov DOB-SF2 in DOB-SR smo pomnožili 1617 bp dolg odsek na segmentu S virusa DOB. Zato smo uporabili komplet reagentov SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), reakcija pa je potekala v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 25 µl 2-krat koncentriranega reakcijskega pufra,
- 0,5 µl začetnih oligonukleotidov DOB-SF2 (50 µM) in DOB-SR (50 µM),
- 2 µl encimske mešanice SSIII RT/Platinum® Taq Mix,
- 17 µl sterilne deionizirane vode,
- 5 µl RNA.

Reverzni prepis RNA v cDNA je potekal 30 min pri 50 °C. Nato smo z 2 min segrevanjem pri 94 °C inaktivirali delovanje reverzne transkriptaze in razdvojili nastale dvojne vijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 40 ciklov reakcije PCR (30 s pri 94 °C, 1 min pri 45 °C, 2 min pri 68 °C) ter 7 min pri 68 °C.

Prideleke PCR smo nato pomnoževali z notranjima začetnima oligonukleotidoma MS120C in MS1170R ter pomnožili 1051 bp dolg odsek na segmentu S virusa DOB. Zato smo uporabili komplet reagentov Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Reakcija je potekala v aparaturi Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 45 µl 1,1-krat koncentriranega reakcijskega pufra,
- 2 µl začetnih oligonukleotidov MS120C (10 µM) in MS1170R (10 µM),
- 3 µl prideleka PCR.

Temperaturna reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji: 2 min pri 94 °C, sledilo je 35 ciklov reakcije PCR (20 s pri 94 °C, 30 s pri 50 °C, 1,5 min pri 68 °C) ter 5 min pri 68 °C.

Prisotnost pridelekov PCR smo ugotavljali z elektroforezo v agaroznem gelu. Molekule DNA smo ločevali v 2% agaroznem gelu (agaroza NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 x koncentriranega pufra TAE (pufer Tris Acetat EDTA; vsebuje bazo tris, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH = 8,3).

3.2.8.2 Pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu M virusa DOB

Za analizo nukleotidnega zaporedja segmenta M virusa DOB, pomnoženega neposredno iz vzorca bolnika, smo uporabili začetna oligonukleotida DOB-M1F in DOB-M1R. Z njima smo pomnožili 1281 bp dolg odsek na segmentu M virusa DOB. Za to smo uporabili komplet reagentov SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), reakcija pa je potekala v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 25 µl 2-krat koncentriranega reakcijskega pufra,
- 0,5 µl začetnih oligonukleotidov DOB-M1F (50 µM) in DOB-M1R (50 µM),
- 2 µl encimske mešanice SSIII RT/Platinum® Taq Mix,
- 17 µl sterilne deionizirane vode,
- 5 µl RNA.

Reverzni prepis RNA v cDNA je potekal 30 min pri 50 °C. Nato smo z 2 min segrevanjem pri 94 °C inaktivirali delovanje reverzne transkriptaze in razdvojili nastale dvojne vijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 40 ciklov reakcije PCR (15 s pri 94 °C, 30 s pri 57 °C, 1 min pri 68 °C) ter 7 min pri 72 °C.

Prisotnost pridelkov PCR smo ugotavljali z elektroforezo v agaroznem gelu. Molekule DNA smo ločevali v 2% agaroznem gelu (agaroza NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 x koncentriranega pufra TAE (pufer Tris Acetat EDTA; vsebuje bazo tris, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH = 8,3).

3.2.8.3 Pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu S virusa PUU

Za analizo nukleotidnega zaporedja segmenta S virusa PUU, pomnoženega neposredno iz vzorca bolnika, smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov.

S parom začetnih oligonukleotidov PUU-SF in PUU-SR smo pomnožili 1481 bp dolg odsek na segmentu S virusa PUU. Za to smo uporabili komplet reagentov SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), reakcija pa je potekala v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 25 µl 2-krat koncentriranega reakcijskega pufra,
- 0,5 µl začetnih oligonukleotidov PUU-SF (50 µM) in PUU-SR (50 µM),
- 2 µl encimske mešanice SSIII RT/Platinum® Taq Mix,
- 17 µl sterilne deionizirane vode,
- 5 µl RNA.

Reverzni prepis RNA v cDNA je potekal 45 min pri 50 °C. Nato smo z 2 min segrevanjem pri 94 °C inaktivirali delovanje reverzne transkriptaze in razdvojili nastale dvojne vijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 40 ciklov reakcije PCR (15 s pri 94 °C, 30 s pri 53 °C, 2 min pri 68 °C) ter 7 min pri 68 °C.

Pridelke PCR smo naprej pomnoževali z vgnezenim PCR, kjer smo z notranjima začetnima oligonukleotidoma PPT334C in PPT986R pomnožili 653 bp dolg odsek na segmentu S virusa PUU. Za to smo uporabili komplet reagentov Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Reakcija je potekala v aparaturi Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 45 µl 1,1-krat koncentriranega reakcijskega pufra,
- 0,5 µl začetnih oligonukleotidov PPT334C (50 µM) in PPT986R (50 µM),
- 2 µl prideleka PCR.

Temperaturna reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji: 2 min pri 94 °C, sledilo je 40 ciklov reakcije PCR (20 s pri 94 °C, 30 s pri 45 °C, 1 min pri 68 °C) ter 5 min pri 68 °C.

Prisotnost pridelkov PCR smo ugotavljali z elektroforezo v agaroznem gelu. Molekule DNA smo ločevali v 2% agaroznem gelu (agaroz NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 x koncentriranega pufra TAE (pufer Tris Acetat EDTA; vsebuje bazo tris, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH = 8,3).

3.2.8.4 Pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu M virusa PUU

Za analizo nukleotidnega zaporedja segmenta M virusa PUU, pomnoženega neposredno iz vzorca bolnika, smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov.

S parom začetnih oligonukleotidov MOF103 in MOR204 smo pomnožili 490 bp dolg odsek na segmentu M virusa PUU. Za to smo uporabili komplet reagentov SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), reakcija pa je potekala v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 25 µl 2-krat koncentriranega reakcijskega pufra,
- 0,5 µl začetnih oligonukleotidov DOB-SF2 (50 µM) in DOB-SR (50 µM),
- 2 µl encimske mešanice SSIII RT/Platinum® Taq Mix,
- 17 µl sterilne deionizirane vode,
- 5 µl RNA.

Reverzni prepis RNA v cDNA je potekal 45 min pri 50 °C. Nato smo z 2 min segrevanjem pri 94 °C inaktivirali delovanje reverzne transkriptaze in razdvojili nastale dvojne vijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 40 ciklov reakcije PCR (15 s pri 94 °C, 30 s pri 50 °C, 30 s pri 68 °C) ter 5 min pri 68 °C.

Pridelke PCR smo naprej pomnoževali z vgnednim PCR, kjer smo z notranjima začetnima oligonukleotidoma PUUF1 in PUUR1 pomnožili 200 bp dolg odsek na segmentu M virusa PUU. Za to smo uporabili komplet reagentov Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen Life

Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Reakcija je potekala v aparaturi Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 45 µl 1,1-krat koncentriranega reakcijskega pufra,
- 2 µl začetnih oligonukleotidov PUUF1 (50 µM) in PUUR1 (50 µM),
- 2 µl prideleka PCR.

Temperaturna reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji: 2 min pri 94 °C, sledilo je 35 ciklov reakcije PCR (20 s pri 94 °C, 30 s pri 53 °C, 30 s pri 68 °C) ter 5 min pri 68 °C.

Prisotnost pridelkov PCR smo ugotavljali z elektroforezo v agaroznem gelu. Molekule DNA smo ločevali v 2% agaroznem gelu (agaroza NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 x koncentriranega pufra TAE (pufer Tris Acetat EDTA; vsebuje bazo tris, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH = 8,3).

3.2.9 Določevanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR

Dobljene prideleke smo analizirali z gelsko elektroforezo (UltraPure™ Agarose, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Po rezanju pridelkov iz gela smo jih očistili s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA). Čiščenje temelji na vezavi DNA na delce silicijevega dioksida v membrani kolone in spiranju nečistoč s pufri. DNA smo iz kolone sprali s sterilno vodo brez nukleaz, segreto na 56 °C. Očiščene prideleke PCR smo ponovno nanegli na gelsko elektroforezo in glede na količino pridelka semikvantitativno ocenili koncentracijo DNA. Količino DNA smo ovrednotili z oceno od 1 do 5, sorazmerno s količino prideleka, ki smo ga nato dodali sekvenčni reakciji.

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili komercialni komplet reagentov BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Princip temelji na Sangerjevi metodi določevanja nukleotidnega zaporedja, kjer je vsak terminator označen s svojim barvilom. V vsaki sekvenčni reakciji smo uporabili en začetni oligonukleotid, v reakcijski mešanici pa je poleg fluorescentno označenih

dideoksi teminatorjev tudi mešanica neoznačenih dNTP-jev in polimeraza FS. Sekvenčna reakcija je potekala v aparaturi Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Glede na količino prideleka PCR smo izbrali ustrezno število ciklov sekvenčne reakcije (od 25 do 50 ciklov), med tem ko smo pustili temperaturne pogoje takšne, kot jih priporoča proizvajalec (20 s pri 96 °C, 10 s pri 50 °C, 3 min pri 60 °C).

Po končani sekvenčni reakciji smo očistili prideleke s komercialnim kompletom reagentov BigDye XTerminator® Purification Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki veže neporabljene terminatorje na silika delce v raztopini te pa smo nato posedli s centrifugiranjem na dno mikrotitrne ploščice.

Vzorcem smo nukleotidno zaporedje določili z avtomatskim genetskim analizatorjem ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), s programskim paketom BDx Standard Sequencing Reaction (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

3.2.10 Analiza nukleotidnih zaporedij

Dobljeno nukleotidno zaporedje virusov smo računalniško obdelali s programskim paketom CLC Main Workbench, verzija 6.1 (CLC bio, Aarhus, Danska). Zaporedja posameznih začetnih oligonukleotidov smo sestavili v soglasno zaporedje, odrezali začetke in konce zaporedij ter preverili mesta morebitnih neujemanj. Zato, da smo zagotovili natančne rezultate, smo določevali nukleotidno zaporedje pridelekov vsakega posameznega bolnika v dveh ponovitvah. Nukleotidna zaporedja smo preverili v genski banki preko medmrežnega servisa BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA). Nukleotidna zaporedja virusa iz posameznega bolnika smo poravnali, analizirali smo mesta mutacij, ter nukleotidno zaporedje prevedli v aminokislinsko zaporedje v programu MEGA 5.05 (Tamura in sod., 2011).

Filogenetska drevesa smo izrisali s programom MEGA 5.05 (Tamura in sod., 2011). Za izračun razdalj med nukleotidnimi zaporedji virusov smo uporabili Kimurin dvoparametrični model in model Tamura-Nei. Filogenetska drevesa smo izrisali z metodo največje verjetnosti

(MLE, angl. Maximum Likelihood Estimation Method), pri tem smo uporabili tudi statistično metodo vezanja s 1000 poskusi (angl. Bootstrap method). Filogenetska drevesa smo obdelali v programu TreeDyn (GEMI Bioinformatics, Montpellier, Francija), kjer smo dodali nukleotidnim in aminokislinskim zaporedjem opis (potek bolezni, višina virusnega bremena, zemljepisni izvor okužbe) in to prikazali na filogenetskem drevesu.

3.2.11 Statistična analiza rezultatov

Za analizo nominalnih rezultatov smo uporabili programski paketom PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ZDA). Za osnovni opis značilnosti smo uporabili parametrične metode. Za testiranje razlik med skupinami smo uporabili za numerične spremenljivke t-test. Kot statistično značilne smo upoštevali razlike z vrednostmi $p < 0,05$.

Analizo tipizacije lokusa HLA pri bolnikih s HMRS smo opravili na Centru za tipizacijo tkiv, Zavoda RS za transfuzijsko medicino (CTT). Rezultate smo analizirali s posebnim programskim paketom, ki so ga razvili v ta namen na CTT. Za primerjalno analizo frekvenc skupine alelov med različnimi skupinami bolnikov ter kontrolno skupino smo uporabili χ^2 - test ter izračunali relativni rizik (RR) za razvoj in potek bolezni. Za analizo frekvenc skupine alelov HLA-B*35 smo uporabili Wolf-Haldanov izračun. Kot statistično značilne rezultate smo upoštevali razlike z vrednostmi $p < 0,05$.

Analizo nukleotidnih sprememb v virusnem genomu smo analizirali s programom MEGA 5 (Tamura in sod., 2011), kjer smo poravnali nukleotidna zaporedja in jih prevedli v aminokislinska zaporedja.

4 REZULTATI

4.1 KLINIČNE ZNAČILNOSTI IN RAZDELITEV BOLNIKOV

Med leti 1988 in 2011 so v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo potrdili HMRS pri 316 bolnikih. Od tega jih je bilo 121 okuženih z virusom DOB, 195 pa z virusom PUU.

V našo študijo smo vključili 160 bolnikov s HMRS, ki so bili zdravljeni bolnišnično. Po končanem zdravljenju smo, v sodelovanju z lečečimi zdravniki, lahko pridobili popis poteka bolezni, v laboratoriju pa smo imeli dovolj vzorca krvi in seruma, da smo izolirali genomsko DNA in virusno RNA. Tako smo vključili v raziskovalno nalogo 72 bolnikov, okuženih z virusom DOB, in 88 bolnikov, okuženih z virusom PUU.

Pri bolnikih smo potek bolezni točkovali glede na laboratorijske in klinične parametre, ki so jih opisali Kuzman in sodelavci (Preglednica 2) (Kuzman in sod., 2003), ter jih razdelili v 3 skupine glede na predhodno študijo (Saksida, 2008; Saksida in sod., 2008).

Bolnike, okužene z virusom PUU, smo razdelili v 3 skupine: bolniki s težkim potekom bolezni (več kot 15 točk), bolniki s srednje težkim potekom bolezni (8-14 točk) in bolniki z blagim potekom bolezni (manj kot 7 točk) (Preglednica 5). Med bolnike s težkim potekom bolezni smo uvrstili tiste, ki so izpolnjevali naslednje pogoje: vsaj 1 x v času okrevanja so potrebovali dializno zdravljenje ali pa so imeli prisotna vsaj dva od naslednjih kazalcev: krvavitve, oligurija, vsaj 3 x povišane vrednosti sečnine in/ali kreatinina. Glede na to smo prepoznali težko obliko bolezni pri 37 bolnikih (42%), srednje težek potek bolezni je imelo 9 bolnikov (10%) in blag potek bolezni 42 bolnikov (48%). Noben bolnik ni umrl zaradi okužbe z virusom PUU.

Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, smo imeli v skupini kar 7 smrtnih primerov, kar je 9,8% smrtnost. Ostale bolnike smo razdelili v 3 skupine: bolniki s težkim potekom bolezni (več kot 15 točk), bolniki s srednje težkim potekom bolezni (8-14 točk) in bolniki z blagim potekom bolezni (manj kot 7 točk). Glede nato, da virus DOB povzroča težjo obliko bolezni in ima višjo smrtnost (Avsic-Zupanc in sod., 1999; Pal in sod., 2005; Saksida, 2008), smo zaostriili kriterije za uvrstitev v skupino bolnikov s težkim potekom bolezni. Kot znake težke

oblike bolezni smo upoštevali hudo trombocitopenijo, prisotnost krvavitev in znake akutne ledvične odpovedi (prisotnost anurije ali oligurije ter vsaj 4 x povišane vrednosti kreatinina in/ali sečnine). 24 bolnikov (33,3%), okuženih z virusom DOB, smo uvrstili v skupino z blažjim potekom bolezni 9 bolnikov smo uvrstili v skupino s srednje težkim potekom bolezni (12,5%), 32 bolnikov je imelo težek potek bolezni (44,4%) (Preglednica 5).

Preglednica 5: Razdelitev bolnikov s HMRS v skupine, glede na potek bolezni.

BOLNIKI	OBLIKA BOLEZNI			
	smrtni izid	težek potek	srednji potek	blag potek
okuženi z virusom DOB	7 (9,8 %)	32 (44,4 %)	9 (12,5 %)	24 (33,3 %)
okuženi z virusom PUU	/	37 (42,0 %)	9 (10,0 %)	42 (48,0 %)

Najpogostejši razlog za napotitev bolnikov s HMRS v bolnišnico, je visoka temperatura in spremljajoča mrzlica ter izrazito močne bolečine v ledvenem delu. Pri bolnišnično zdravljenih bolnikih okuženih z virusom PUU, ki so bili vključeni v našo študijo, so bile izrazito močne bolečine ledvenem delu izražene pri kar 78,4% bolnikov, sledi trombocitopenija pri 32,9% bolnikov in motnje vida (13,6%). Razlike med skupinama bolnikov s težjim oz. blažjim potekom bolezni so prikazani v Preglednici 6. V skupini bolnikov s težkim potekom bolezni se anurija oz. oligurija razvije pri 59,5% bolnikov, medtem ko se razvije v skupini bolnikov z blagim potekom le pri 9,5%. Drugi najpogostejši klinični kazalec okužbe s hantavirusi je razvoj trombocitopenije. Do hude trombocitopenije je prišlo v kar 45,9% bolnikov s težkim potekom okužbe in le v 19% pri bolnikih z blagim potekom okužbe. Prav tako prihaja pogosteje do krvavitev pri bolnikih s težko obliko bolezni (16,2% vs. 4,8%). Med laboratorijskim kazalci akutne odpovedi ledvic so najpogostejši znaki povišane vrednosti sečnine in serumskega kreatinina. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, se gibljejo vrednosti serumskega kreatinina med 55 in 1420 $\mu\text{mol/l}$. Izmerjene vrednosti sečnine se gibljejo med 2,5 in 48,2 $\mu\text{mol/l}$. Kar 40% bolnikov je imelo najvišjo izmerjeno vrednost serumskega kreatinina ali/in sečnine 4 x višjo od normalne vrednosti.

Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, smo imeli v skupini bolnikov s težkim potekom bolezni 7 takih s smrtnim izidom bolezni. Ti bolniki so imeli najobsežnejše krvavitve, poleg tega so bili hipotenzivni in tahikardni. Smrt je navadno nastopila zaradi dihalne stiske ter odpovedi več organov. V skupini bolnikov s težkim potekom bolezni so bile krvavitve izražene pri kar 59,4% bolnikov, trombocitopenija pri 62,5% bolnikov in kar 68,8% bolnikov je potrebovalo dializo vsaj enkrat v času zdravljenja (Preglednica 6). Pri bolnikih v skupini z blagim potekom bolezni so bile krvavitve prisotne pri 29,2% bolnikov, trombocitopenija pri 22,2% bolnikov in 55,6% bolnikov pa je potrebovalo dializno zdravljenje vsaj enkrat. Izmerjene vrednosti serumskega kreatinina so se gibale med 83 in 991 $\mu\text{mol/l}$. Izmerjene najvišje vrednosti sečnine so bile med 5,2 in 1020 $\mu\text{mol/l}$. Skupno je imelo 63,3% bolnikov najvišje izmerjene vrednosti sečnine oz. serumskega kreatinina kar 4 x višje od normalnih vrednosti. V skupini bolnikov s težkim potekom bolezni je imelo kar 78,1% bolnikov vsaj 4 x višje izmerjene vrednosti sečnine oz. kreatinina od normalnih vrednosti. Med bolniki z blagim potekom bolezni je bilo takšnih bolnikov 41,7%.

Preglednica 6: Izbrani klinični in laboratorijski kazalci, ki smo jih zabeležili najpogosteje pri bolnikih s HMRS, okuženih z virusom DOB ali PUU, in različnim potekom bolezni (vrednosti so prikazane v odstotkih).

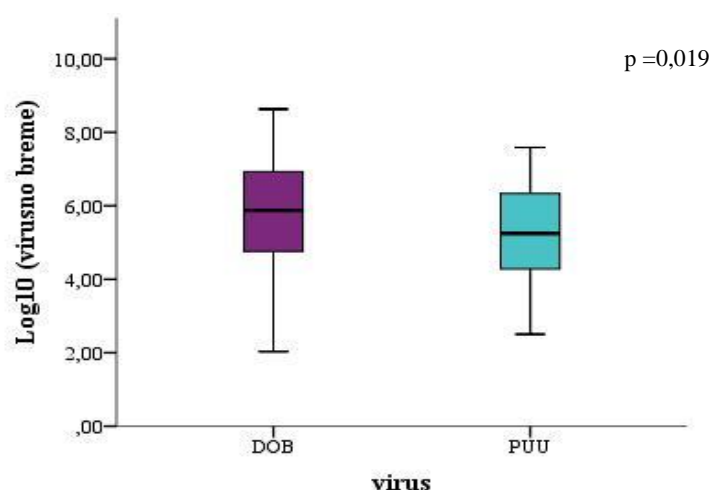
Klinični in laboratorijski kazalci	Bolniki z virusom DOB (%) (n = 72)				Bolniki z virusom PUU (%) (n = 88)		
	smrtni izid n=7	težek potek n=32	srednji potek n=9	blag potek n=24	težek potek n=37	srednji potek n=9	blag potek n=42
ŠOK	28,6	9,4	/	/	8,1	/	/
HIPOTENZIJA	71,4	21,9	33,3	12,5	13,5	11,1	2,3
TAHIKARDIJA	/	15,6	/	8,3	13,5	11,1	/
KRVAVITVE*	71,4	59,4	11,1	29,2	16,2	/	4,8
MOTNJE VIDA	14,2	25,0	/	20,8	24,3	11,1	4,8
UREA IN/ALI KREATININ: > 4X	85,7	78,1	33,3	41,7	72,1	22,2	14,3
TROMBOCITOPENIJA: <50X 10 ⁹ /L	71,4	62,5	22,2	33,3	45,9	44,4	19,0
ANURIJA/OLIGURIJA	85,7	71,9	77,8	41,7	59,5	22,2	9,5
DIALIZA	42,9	68,8	55,6	8,3	18,9	/	/
PLEVRALNI IZLIV	71,4	37,5	44,4	16,7	21,6	22,2	9,5

*Najpogostejše krvavitve so: petehije, melena, subkonjunktivalne injekcije

4.2 DOLOČANJE VIRUSNEGA BREMENA PRI BOLNIKIH S HMRS

Pri bolnikih s HMRS, bolezen navadno dokažemo s prisotnostjo specifičnih protiteles proti virusu DOB oz. PUU. V akutnih vzorcih bolnikov s HMRS lahko okužbo dokažemo tudi z molekularnimi tehnikami, med katerimi je najpogostejša metoda RT-PCR v realnem času. Poleg hitrega in občutljivega dokaza povzročitelja metoda RT-PCR omogoča tudi razlikovanje med hantavirusnimi tipi. Kvantitativna različica te metode, ki smo jo uvedli v laboratoriju v predhodnih študijah (Saksida, 2008; Saksida in sod., 2008; Korva in sod., 2009b) pa omogoča tudi določanje koncentracij virusnega bremena virusov DOB in PUU v vzorcih bolnika s HMRS.

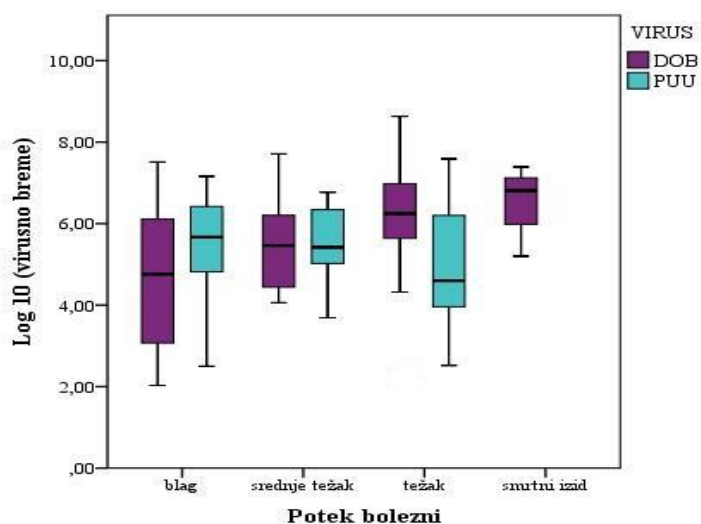
Virusno breme smo merili v vzorcih odvzetih v akutnem obdobju bolezni, tik ob pojavu simptomov (od 2. do 15. dneva bolezni). Virus smo pri bolnikih okuženih z virusom DOB, dokazali pri 50 bolnikih (69,4%), razpon virusnega bremena je bil med 2,03 in 8,63 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, smo virus dokazali pri 68 bolnikih (77,3%), razpon virusnega bremena je bil med 2,50 in 7,59 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca (Slika 8). Izmerjene koncentracije virusne RNA pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, so bile značilno višje kot pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, ($5,72 \pm 1,59$ vs. $5,27 \pm 1,25$, $p = 0,019$).



Slika 8: Določitev virusnega bremena pri bolnikih s HMRS, okuženimi z virusom DOB, in bolnikih, okuženimi z virusom PUU.

Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, in težkim potekom boleznimi smo dokazali virusno RNA pri 78,4% bolnikov (razpon med 2,52 in 7,59 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca), v skupini s srednje težkim potekom boleznimi pri 66,7% (razpon med 3,69 in 6,77 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca) in v skupini z blagim potekom boleznimi pri 78,6% bolnikov (razpon med 2,50 in 7,16 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca). Med skupinami bolnikov, okuženimi z virusom PUU, in različnim potekom boleznimi nismo ugotovili značilnih razlik v višini virusnega bremena (Slika 9).

Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, smo virusno RNA dokazali pri 78,1% bolnikov s težko obliko boleznimi (razpon med 2,15 in 8,63 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca), pri 88,9% bolnikov s srednje težkim potekom boleznimi (razpon med 4,06 in 7,71 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca), in pri 54,2% bolnikov z blagim potekom boleznimi (razpon med 2,03 in 7,51 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca). Pri bolnikih, s smrtnim izidom okužbe z virusom DOB, nismo dokazali virusne RNA pri 4 bolnikih (57,1%), razpon virusnega bremena pa smo izmerili med 5,20 in 7,39 log₁₀ kopij RNA/ml vzorca (Slika 9). Izmerjene koncentracije virusne RNA pri bolnikih, s smrtnim izidom boleznimi, so bile značilno višje od izmerjenih koncentracij virusne RNA pri bolnikih, z blagim potekom boleznimi ($6,55 \pm 0,87$ vs. $4,75 \pm 1,93$, $p = 0,016$). Značilno višje izmerjene koncentracije virusne RNA smo dokazali tudi pri bolnikih s težkim potekom boleznimi v primerjavi z bolniki z blagim potekom boleznimi ($6,15 \pm 1,37$ vs. $4,75 \pm 1,93$, $p = 0,010$).



Slika 9: Primerjava virusnega bremena pri bolnikih s HMRS, okuženimi z virusom DOB, ali virusom PUU, in različnim potekom boleznimi.

4.3 GENETSKA RAZNOLIKOST V LOKUSU HLA BOLNIKOV S HMRS

4.3.1 Genetska raznolikost v lokusu HLA pri bolnikih s HMRS

Pri 160 bolnikih s HMRS, ki smo jih vključili v študijo, smo dokazali 23 različnih skupin alelov HLA-B in 12 različnih skupin alelov HLA-DRB1. Pogostost pojavljanja skupin alelov pri bolnikih s HMRS smo primerjali s pogostostjo pojavljanja skupin alelov v kontrolni skupini. V slednjo smo vključili 131 zdravih posameznikov slovenskega rodu, ki so predstavljali reprezentativno skupino glede na frekvenco določenih skupin alelov HLA v slovenski populaciji. Frekvence skupine alelov HLA-B in HLA-DRB1, ki smo jih ugotovili pri bolnikih s HMRS, smo primerjali s frekvencami v kontrolni skupini in jih prikazali v Preglednici 7.

Preglednica 7: Frekvence skupine alelov HLA-B in HLA-DRB1, ki smo jih dokazali pri bolnikih s HMRS in kontrolni skupini zdravih ljudi.

ALEL	F (%) KONTROLA n=131	F (%) HMRS n=160	F (%) DOB n=72	F (%) PUU n=88	p HMRS/K	p DOB/K	p PUU/K	p DOB/PUU
B*07	24,4	18,1	19,4	18,4	ns	ns	ns	ns
B*08	13,7	11,3	11,9	11,5	ns	ns	ns	ns
B*13	6,9	8,1	6,0	10,3	ns	ns	ns	ns
B*14	3,1	5,6	7,5	4,6	ns	ns	ns	ns
B*15	7,6	8,8	6,0	11,5	ns	ns	ns	ns
B*18	16,0	12,5	9,0	16,1	ns	ns	ns	ns
B*27	13,0	18,8	19,4	19,5	ns	ns	ns	ns
B*35	23,7	24,4	34,3	18,4	ns	ns	ns	0,027
B*37	3,1	0,6	0,0	1,2	ns	ns	ns	ns
B*38	8,4	8,1	7,5	9,2	ns	ns	ns	ns
B*39	3,1	3,1	4,5	2,3	ns	ns	ns	ns
B*40	9,9	8,1	6,0	10,3	ns	ns	ns	ns
B*41	1,5	1,9	1,5	2,3	ns	ns	ns	ns
B*44	17,6	17,5	23,9	13,8	ns	ns	ns	ns
B*47	0,0	1,3	1,5	1,2	ns	ns	ns	ns
B*49	4,6	3,1	3,0	3,5	ns	ns	ns	ns
B*50	3,1	2,5	4,5	1,2	ns	ns	ns	ns
B*51	13,0	17,5	16,4	19,5	ns	ns	ns	ns
B*52	2,3	1,3	0,0	2,3	ns	ns	ns	ns
B*53	3,1	0,0	0,0	0,0	0,040 (0,0)	ns	ns	ns
B*55	4,6	4,4	4,5	4,6	ns	ns	ns	ns
B*56	0,8	1,9	0,0	3,5	ns	ns	ns	ns
B*57	6,9	6,9	6,0	8,1	ns	ns	ns	ns
B*58	3,1	0,6	0,0	1,2	ns	ns	ns	ns
DRB1*01	28,2	29,4	33,8	26,1	ns	ns	ns	ns
DRB1*03	23,7	14,4	16,9	12,5	0,049 (0,737)	ns	0,053* (0,602)	ns
DRB1*04	16,0	17,5	18,3	17,1	ns	ns	ns	ns
DRB1*07	18,3	22,5	22,5	22,7	ns	ns	ns	ns
DRB1*08	3,1	5,0	5,6	4,6	Ns	ns	ns	ns
DRB1*10	0,8	1,3	0,0	2,3	Ns	ns	ns	ns
DRB1*11	26,0	25,6	23,9	27,3	Ns	ns	ns	ns
DRB1*12	0,8	2,5	4,2	1,1	Ns	ns	ns	ns
DRB1*13	20,6	25,6	18,3	31,8	Ns	ns	0,080* (1,392)	0,068*
DRB1*14	8,4	8,8	12,7	5,7	Ns	ns	ns	ns
DRB1*15	22,1	19,4	16,9	21,6	Ns	ns	ns	ns
DRB1*16	16,0	10,6	9,9	11,4	Ns	ns	ns	ns

LEGENDA: F KONTROLA = frekvenca skupine alelov v kontrolni skupini, F HMRS = frekvenca skupine alelov pri bolnikih s HMRS, F DOB = frekvenca skupine alelov pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, F PUU = frekvenca skupine alelov pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, vrednost p, izračunana s Fisherjevim dvostranskim eksaktnim testom, (relativni rizik), ns = ni statistično značilno, * mejna statistična značilnost ($p < 0,1$).

Med molekulami v I. razredu HLA-B smo ugotovili značilno razliko med bolniki s HMRS in kontrolno skupino le pri HLA-B*53 ($p=0,040$), ki je prisotna v slovenski populaciji le pri 3,1% ljudi in je nismo dokazali med bolniki s HMRS. Nižjo frekvenco skupine alelov DRB1*03 smo ugotovili pri bolnikih s HMRS v primerjavi s kontrolno skupino ($p=0,049$). Skupina alelov DRB1*03 je bila najnižja pri skupini bolnikov, okuženih z virusom PUU, glede na kontrolno skupino (12,5% vs. 23,7%), vendar je bila razlika v frekvencah le mejno značilna ($p=0,053$). Med bolniki, okuženimi z virusom DOB, in kontrolno skupino nismo ugotovili nobene značilne razlike. Pri primerjavi frekvenc med obema skupinama smo ugotovili, da je frekvenca skupine alelov B*35 med bolniki, okuženimi z virusom DOB 34,3%, medtem ko je v zdravi populaciji prisotna skupina alelov le pri 23,7% ljudi .

Statistično pomembnejše povezave smo ugotovili, ko smo med bolniki s HMRS primerjali tiste, okužene z virusom PUU, in tiste, okužene z virusom DOB (Preglednica 7). Pri primerjavi obeh skupin bolnikov smo dokazali skupino alelov B*35 večkrat pri bolnikih, okuženih z virusom DOB (34,3 % vs. 18,4 %, $p=0,027$). V nasprotju s tem imajo bolniki, okuženi z virusom PUU, pogosteje skupino alelov HLA-DRB1*13 (18,3% vs. 31,8%, $p=0,068$).

4.3.2 Primerjava polimorfizma v lokusu HLA pri bolnikih s HMRS in različnim potekom bolezni

4.3.2.1 Vpliv polimorfizma v lokusu HLA pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, na potek bolezni

Vpliv polimorfizma v lokusih HLA-B in HLA-DRB1 na potek HMRS smo proučevali pri 88 bolnikih, ki so bili bolnišnično zdravljeni, zaradi okužbe z virusom PUU. Klinična slika bolnikov je nihala od blage okužbe preko srednje težke okužbe do težkega poteka bolezni. Zaradi podobnih kliničnih in laboratorijskih rezultatov bolnikov z blago in srednje težko okužbo in zaradi majhnega števila bolnikov, smo ti dve skupini združili: da bi povečali moč študije. Rezultati tipizacije molekul HLA pri teh bolnikih so prikazani v Preglednici 8.

Preglednica 8: Frekvence skupine alelov HLA-B in HLA-DRB1, ki smo jih dokazali pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, in primerjava s skupino zdravih ljudi ter analiza vpliva polimorfizma v lokusu HLA na potek bolezni.

ALEL	F (%) KONTROLA n=131	F (%) težek n=37	F (%) blag n=51	p t/b	p b/k	p t/k
B*07	24,4	8,1	26,0	0,049 (0,392)	ns	0,038 (0,335)
B*08	13,7	18,9	6,0	0,090* (1,797)	ns	ns
B*13	6,9	13,5	8,0	ns	ns	ns
B*14	3,1	2,7	6,0	ns	ns	ns
B*15	7,6	18,9	6,0	0,090* (1,703)	ns	0,062* (2,073)
B*18	16,0	13,5	18,0	ns	ns	ns
B*27	13,0	21,6	18,0	ns	ns	ns
B*35	23,7	13,5	22,0	ns	ns	ns
B*37	3,1	0,0	2,0	ns	ns	ns
B*38	8,4	13,5	6,0	ns	ns	ns
B*39	3,1	2,7	2,0	ns	ns	ns
B*40	9,9	5,4	14,0	ns	ns	ns
B*41	1,5	0,0	4,0	ns	ns	ns
B*44	17,6	13,5	14,0	ns	ns	ns
B*47	0,0	2,7	0,0	ns	ns	ns
B*49	4,6	5,4	2,0	ns	ns	ns
B*50	3,1	2,7	0,0	ns	ns	ns
B*51	13,0	18,9	20,0	ns	ns	ns
B*52	2,3	0,0	4,0	ns	ns	ns
B*53	3,1	0,0	0,0	ns	ns	ns
B*55	4,6	5,4	4,0	ns	ns	ns
B*56	0,8	8,1	0,0	0,073* (2,471)	ns	0,034 (3,458)
B*57	6,9	0,0	14,0	0,019 (0,0)	ns	ns
B*58	3,1	2,7	0,0	ns	ns	ns
DRB1*01	28,2	18,9	31,4	ns	ns	ns
DRB1*03	23,7	18,9	7,8	ns	0,020 (0,359)	ns
DRB1*04	16,0	24,3	11,8	ns	ns	ns
DRB1*07	18,3	21,6	23,5	ns	ns	ns
DRB1*08	3,1	2,7	5,9	ns	ns	ns
DRB1*10	0,8	5,4	0,0	ns	ns	ns
DRB1*11	26,0	32,4	23,5	ns	ns	ns
DRB1*12	0,8	2,7	0,0	ns	ns	ns
DRB1*13	20,6	43,2	23,5	0,065* (1,633)	ns	0,010 (2,215)
DRB1*14	8,4	2,7	7,8	ns	ns	ns
DRB1*15	22,1	8,1	31,4	0,009 (0,320)	ns	0,060* (0,375)
DRB1*16	16,0	13,5	9,8	ns	ns	ns

LEGENDA: F KONTROLA = frekvenca skupine alelov v kontrolni skupini, F težek = frekvenca skupine alelov pri bolnikih s težjim potekom bolezni, F blag = frekvenca skupine alelov pri bolnikih z blažjim potekom bolezni, t = težek potek bolezni, b = blag potek bolezni, k = kontrolna skupina, vrednost p, izračunana s Fisherjevim dvostranskim eksaktnim testom, (relativni rizik), ns = ni statistično značilno, * mejna statistična značilnost ($p < 0,1$).

V skupini bolnikov s težkim potekom bolezni smo dokazali višjo frekvenco skupine alelov HLA-B*08 (18,9% vs. 6,0%, $p=0,090$), HLA-B*15 (18,9% vs. 6,0%; $p=0,090$) in HLA-B*56 (8,1% vs. 0,0%; $p=0,073$) v primerjavi s skupino bolnikov z blagim potekom bolezni. Frekvenca skupine alelov HLA-B*56 je bila značilno višja v skupini bolnikov s težko obliko bolezni v primerjavi s kontrolno skupino (8,1% vs. 0,8%; $p=0,034$), kar nakazuje nato, da je HLA-B*56 dejavnik tveganja za okužbo z virusom PUU ter za razvoj težke oblike bolezni. V nasprotju s tem smo ugotovili, da je v skupini bolnikov s težko obliko bolezni frekvenca skupine alelov HLA-B*07 značilno manj pogosta kot v skupini bolnikov z blagim potekom bolezni in kontrolni skupini (8,1% vs. 26,0%; $p=0,049$). V skupini bolnikov z blagim potekom bolezni smo ugotovili višjo frekvenco skupine alelov HLA-B*57, tako v primerjavi s skupino bolnikov s težko obliko bolezni (14,0% vs. 0,0%; $p=0,019$), kot tudi v primerjavi s kontrolno skupino (14,0 % vs. 6,9 %). V nasprotju s tem, smo v skupini bolnikov z blagim potekom bolezni ugotovili nižjo frekvenco skupine alelov HLA-DRB1*03; v primerjavi s skupino bolnikov s težkim potekom bolezni (7,8% vs. 23,7%; $p=0,020$). Poleg skupine alelov HLA-DRB1*03 lahko nudi zaščitno vlogo v slovenski populaciji tudi skupina alelov HLA-DRB1*15, ki je prav tako manj pogosta v skupini bolnikov s težkim potekom bolezni (8,1% vs. 31,4%; $p=0,009$). Kot morebitni dejavnik tveganja za razvoj težke oblike bolezni po okužbi z virusom PUU smo prepoznali skupino alelov HLA-DRB1*01, ki se je pogosteje pojavljala v skupini bolnikov s težko obliko bolezni kot v skupini bolnikov z blago obliko bolezni (43,2% vs. 23,5%, $p=0,065$) oz. v kontrolni skupini (43,2 % vs 20,6 %, $p = 0,010$).

4.3.2.2 Vpliv polimorfizma v lokusu HLA pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, na potek bolezni

Za ugotavljanje polimorfizma v lokusu HLA na potek bolezni pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, smo vključili v študijo 72 bolnikov. V primerjavi z bolniki, okuženimi z virusom PUU, so bile pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, razlike v skupinah alelov HLA, ki bi lahko vplivali na potek bolezni zanemarljive (Preglednica 9).

Preglednica 9: Frekvence skupine alelov HLA-B in HLA-DRB1, ki smo jih dokazali pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, in primerjava s skupino zdravih ljudi ter analiza vpliva polimorfizma v lokusu HLA na potek bolezni.

ALEL	F (%) KONTROLA n=131	F (%) SMRTNI n=7	F (%) TEŽEK n=31	F (%) BLAG n=29	p f/s	p f/m	P s/m	p f/c	p s/c	p m/c
B*07	24,4	14,3	29,0	10,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*08	13,7		12,9	13,8	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*13	6,9	14,3		10,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*14	3,1		6,5	10,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*15	7,6	14,3	6,5	3,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*18	16,0	14,3	9,7	6,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*27	13,0	14,3	25,8	13,8	ns	ns	ns	ns	0,096* (1,906)	ns
B*35	23,7	57,1	32,3	31,0	ns	ns	ns	0,069* (3,924)	ns	ns
B*38	8,4		9,7	6,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*39	3,1		3,2	6,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*40	9,9		6,5	6,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*41	1,5			3,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*44	17,6		29,0	24,1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*47	0,0			3,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*49	4,6		3,2	3,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*50	3,1		3,2	6,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*51	13,0		12,9	24,1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*55	4,6	14,3	3,2	3,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B*57	6,9	28,6	3,2	3,5	0,081* (4,667)	0,090* (4,340)	ns	0,098* (4,618)	ns	ns
DRB1*01	28,2	42,9	34,4	31,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*03	23,7		18,8	18,8	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*04	16,0		18,8	21,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*07	18,3	28,6	21,9	21,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*08	3,1		3,1	9,4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*11	26,0	42,9	25,0	18,8	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*12	0,8		3,1	6,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*13	20,6		18,8	21,9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*14	8,4	14,3	9,4	15,6	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*15	22,1	14,3	18,8	15,6	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DRB1*16	16,0	14,3	9,4	9,4	ns	ns	ns	ns	ns	ns

LEGENDA: F KONTROLA = frekvenca skupine alelov v kontrolni skupini, F težek = frekvenca skupine alelov pri bolnikih s težjim potekom bolezni, F blag = frekvenca skupine alelov pri bolnikih z blažjim potekom bolezni, t = težek potek bolezni, b = blag potek bolezni, k = kontrolna skupina, vrednost p, izračunana s Fisherjevim dvostranskim eksaktnim testom, (relativni rizik), ns = ni statistično značilno, * mejna statistična značilnost ($p < 0,1$).

Kljub temu, da ni bilo značilnih razlik med skupinami bolnikov, pa smo ugotovili, v skupini bolnikov s smrtnim izidom bolezni, višje frekvence haplotipov HLA-B*35, HLA-B*57, HLA-DRB1*01 in HLA-DRB1*11. V primerjavi s kontrolno skupino je bila frekvenca skupine alelov HLA-B*35 močno povišana v skupini bolnikov s smrtnim izidom (57,1% vs.

23,7%, $p=0,069$). Prav tako je bila povišana frekvenca skupine alelov HLA-B*57 v skupini bolnikov s smrtnim izidom bolezni v primerjavi s skupino bolnikov z blagim (28,6% vs 3,5%, $p=0,090$) in s težkim potekom bolezni (28,6 % vs. 3,2 %, $p=0,081$). V skupini bolnikov s težkim potekom bolezni je bila frekvenca skupine alelov HLA-B*27 dvakrat višja glede na kontrolno skupino (25,8% vs. 13,0% $p=0,096$). Med molekulami v II. razredu HLA nismo ugotovili nobene razlike med bolniki, okuženimi z virusom DOB, in različnim potekom bolezni.

4.3.3 Subtipizacija skupine alelov HLA-B*35 pri bolnikih s HMRS

Glede na rezultate tipizacije polimorfizma v lokusu HLA pri bolnikih s HMRS, smo ugotovili zanimivo razliko med bolniki, okuženimi z virusom DOB in PUU, ter kontrolno skupino v skupini alelov HLA-B*35. Najvišjo frekvenco skupine alelov HLA-B*35 smo določili v skupini bolnikov, okuženih z virusom DOB, s smrtnim izidom bolezni (Preglednica 9).

Zato smo se odločili, da bomo pri bolnikih, ki imajo molekulo HLA-B*35, to subtipizirali in skušali ugotoviti, ali je kateri od alelov iz te skupine značilno povezan s težkim potekom bolezni (Preglednica 10). Med bolniki s HMRS, vključenimi v študijo, je imelo 32 bolnikov skupino alelov HLA-B*35, od tega jih je bilo 17 okuženih z virusom DOB in 15 z virusom PUU. Med bolniki, okuženimi z virusom DOB, smo subtipizirali molekulo HLA-B*35 pri 2 bolnikih s smrtnim izidom, 8 bolnikih s težkim potekom bolezni in 7 bolnikih z blagim potekom bolezni. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, smo subtipizirali molekulo HLA-B*35 pri 4 bolnikih s težkim potekom bolezni in 11 bolnikih z blagim potekom bolezni.

Preglednica 10: Frekvence alelov HLA-B*35, ki smo jih dokazali pri bolnikih s HMRS.

ALEL	BOLNIKI OKUŽENI Z VIRUSOM DOB n=17			BOLNIKI OKUŽENI Z VIRUSOM PUU n=15	
	smrtni izid n=2	težek p. n=8	blag p. n=7	težek p. n=4	blag p. n=11
B*35:01	2	3	5	1	3
B*35:02				2	2
B*35:03		5	2	2	5
B*35:08		1		1	1

Zaradi majhnih skupin bolnikov z različnim potekom bolezni ni bila možna statistična analiza vzorcev. Kljub temu smo ugotovili, da sta imela oba bolnika s smrtnim izidom bolezni alel HLA-B*35:01. V skupini bolnikov, ki so bili okuženi z virusom DOB in so imeli težek potek bolezni, je imelo največ bolnikov alel HLA-B*35:03. Isti alel je bil najpogostejši tudi v skupini bolnikov, ki so bili okuženi z virusom PUU in so imeli blag potek bolezni. Med bolniki s težkim potekom bolezni, ki ga je povzročil virus PUU, nismo ugotovili nobene povezave s skupino alelov HLA-B*35.

Ker nismo ugotovili povezave med skupno alelov HLA-B*35 in potekom bolezni pri bolnikih s HMRS, smo primerjali frekvence alelov med bolniki in kontrolno skupino (Preglednica 11). Najpogostejša alela pri bolnikih s HMRS sta HLA-B*35:01 in HLA-B*35:03 (oba 43,8%), ki sta zelo pogosta v slovenski populaciji (55,2% in 31,0%). Alel HLA-B*35:01 manj pogost v skupini bolnikov, okuženih z virusom PUU, kot pri bolnikih, okuženih z virusom DOB (26,7% vs. 58,8%, $p = 0,071$) ali v kontrolni skupini (26,7% vs. 55,2%, $p = 0,076$). Alel HLA-B*35:08 je prisoten v slovenski populaciji le pri 3,4% prebivalstva, medtem ko je med bolniki, okuženimi z virusom PUU, prisoten kar v 13,3%. Kljub temu razlika v pogostosti pojavljanja alela med bolniki in kontrolno skupino ni značilna. Značilna je bila le razlika v pogostosti pojavljanja alela HLA-B*35:02 med bolniki, okuženimi z virusom PUU oz. DOB, saj pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, nismo dokazali tega alela. Poleg tega je bil ta alel v skupini bolnikov, okuženih z virusom PUU, več kot dvakrat pogostejši kot v kontrolni skupini (26,7% vs. 10,3%, $p = 0,024$) (Preglednica 11).

Preglednica 11: Frekvence alelov HLA-B*35, ki smo jih dokazali pri bolnikih s HMRS in primerjava s kontrolno skupino.

ALEL	F (%) KONTROLA n=29	F (%) HMRS n=32	F (%) DOB n=17	F (%) PUU n=15	p HMRS/K	p DOB/K	p PUU /K	p DOB/PUU
B*35:01	55,2	43,8	58,8	26,7	ns	ns	0,076* (0,320)	0,071*(0,280)
B*35:02	10,3	12,5	0,0	26,7	ns	ns	ns	0,024 (13,7)
B*35:03	31,0	43,8	41,2	46,7	ns	ns	ns	ns
B*35:08	3,4	9,4	5,9	13,3	ns	ns	ns	ns

LEGENDA: F KONTROLA = frekvenca skupine alelov v kontrolni skupini, F HMRS = frekvenca skupine alelov pri bolnikih s HMRS, F DOB = frekvenca skupine alelov pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, F PUU = frekvenca skupine alelov pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, vrednost p, izračunana z Woolf-Haldanovim testom, (relativni rizik), ns = ni statistično značilno, * mejna statistična značilnost ($p < 0,1$).

4.3.4 Vpliv molekul HLA na višino virusnega bremena

V študiji smo ugotavljali ali katera od skupin alelov HLA-B oz. HLA-DRB1 vpliva na višje virusno breme pri bolnikih ter na možnost dokaza virusne RNA v akutnem vzorcu (Preglednica 12).

Za primerjavo višine virusnega bremena in skupine alelov HLA-B in HLA-DRB1 smo razdelili bolnike v 4 skupine:

- 1) bolniki, pri katerih nismo dokazali virusne RNA,
- 2) bolniki z nizkim virusnim bremenom ($2,03-3,96 \log_{10}$ kopij RNA/ml vzorca),
- 3) bolniki s srednje visokim virusnim bremenom ($4,01-5,93 \log_{10}$ kopij RNA/ml vzorca),
- 4) bolniki z visokim virusnim bremenom ($6,02-8,63 \log_{10}$ kopij RNA/ml vzorca).

Preglednica 12: Razporeditev višine virusnega bremena glede na skupine alelov HLA-B in HLA-DRB pri bolnikih s HMRS.

ALEL	BOLNIKI, OKUŽENI Z VIRUSOM DOB				BOLNIKI, OKUŽENI Z VIRUSOM PUU			
	F (%) NEG n=44	F (%) nizko brema n=12	F (%) srednje brema n=42	F (%) visoko brema n=46	F (%) NEG n=40	F (%) nizko brema n=21	F (%) srednje brema n=64	F (%) visoko brema n=51
B*07	2,4		7,3	5,7	5,0	2,4	3,3	7,3
B*08	1,2		4,9	4,5	3,8		3,3	3,1
B*13	1,2	5,0	1,2	2,3	1,3	7,1	3,3	1,0
B*14	1,2		2,4	2,3	3,8	2,4		
B*15	2,4	5,0		1,1	1,3	2,4	3,3	5,2
B*18	2,4		2,4	2,3	2,5	4,8	5,0	3,1
B*27	3,7	5,0	6,1	4,5	5,0	4,8	5,0	5,2
B*35	12,2	10,0	6,1	9,1	3,8	9,5		
B*37					1,3			
B*38	1,2	5,0	1,2	2,3	2,5	2,4	3,3	1,0
B*39	1,2		1,2		1,3		0,8	
B*40	2,4		2,4		2,5		4,2	2,1
B*41				1,1				2,1
B*44	6,1		7,3	5,7	1,3	4,8	3,3	6,3
B*47		5,0			1,3			
B*49	1,2		1,2		1,3		0,8	2,1
B*50	1,2		2,4					1,0
B*51	6,1	5,0	2,4	3,4	7,5	7,1	3,3	4,2
B*52					1,3			1,0
B*55				2,3	2,5		1,7	
B*56						2,4	0,8	1,0
B*57	2,4			2,3	1,3		5,0	
B*58								1,0
DRB1*01	9,8	5,0	8,5	12,5	5,0	7,1	10,0	8,3
DRB1*03	2,4		6,1	5,7	6,3		2,5	3,1
DRB1*04	9,8	5,0	2,4	4,5	5,0	2,4	3,3	7,3
DRB1*07	4,9	10,0	8,5	6,8	2,5	9,5	8,3	5,2
DRB1*08	2,4	15,0	2,4		1,3		0,8	2,1
DRB1*10						2,4		1,0
DRB1*11	7,3	10,0	4,9	5,7	8,8	14,3	4,2	7,3
DRB1*12	1,2		2,4			2,4		
DRB1*13	2,4	5,0	4,9	8,0	10,0	2,4	10,8	9,4
DRB1*14	3,7	5,0	2,4	2,3	2,5	2,4	0,8	1,0
DRB1*15	4,9	5,0	6,1	2,3	6,3	2,4	9,2	5,2
DRB1*16	2,4		2,4	3,4	2,5	4,8	3,3	3,1

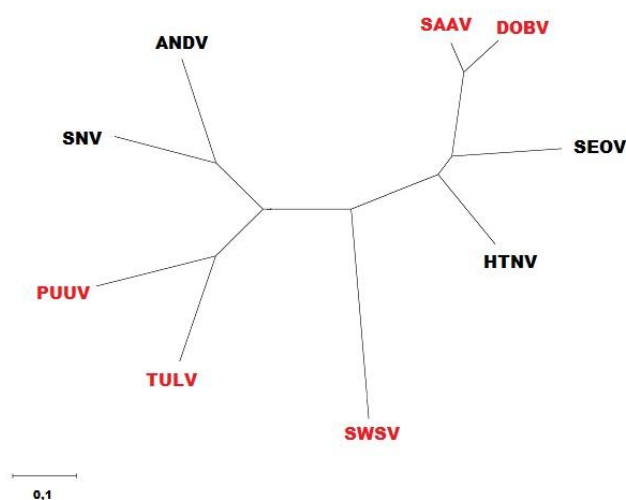
LEGENDA: F NEG = frekvenca skupine alelov pri bolnikih, kjer virusne RNA nismo dokazali, F nizko brema = frekvenca skupine alelov pri bolnikih z nizkim virusnim bremenom, F srednje brema = frekvenca skupine alelov pri bolnikih s srednje visokim virusnim bremenom, F visoko brema = frekvenca skupine alelov pri bolnikih z visokim virusnim bremenom.

Značilnih povezav med določeno skupino alelov HLA-B oz. HLA-DRB1 in dokazom virusne RNA v akutnih vzorcih bolnikov nismo dokazali. Prav tako nismo ugotovili značilne povezave med višino virusnega bremena v vzorcu in posamezno skupino alela HLA.

Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, smo dokazali visoko virusno breme pogosteje pri bolnikih s HLA-B*44 in HLA-B*55 ter HLA-DRB1*01 in DRB1*13. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, smo dokazali višje virusno breme pogosteje pri tistih bolnikih, ki imeli HLA-B*41, HLA-B*50 in HLA-B*58. V nasprotju s tem pri bolnikih, ki so bili okuženi z virusom DOB, in so imeli HLA-B*35 pogosteje nismo dokazali virusne RNA v vzorcu (neg vs. poz = 12,2% vs. 7,9%). Podobno smo dokazali tudi pri bolnikih s haplotipom HLA-B*51 (neg vs. poz=6,1% vs. 3,2%) in HLA-DRB1*04 (neg vs. poz=9,7% vs. 3,7%). Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, smo manjkrat dokazali virusno RNA pri bolnikih s haplotipom HLA-B*51 (neg vs. poz=7,5% vs. 4,3%) ali HLA-DRB1*03 (neg vs. poz=6,3% vs. 2,3%) za razliko od bolnikov s tipom HLA-DRB1*07, pri katerih smo dokazali virusno RNA pogosteje (neg vs. poz=2,5% vs. 7,4%).

4.4 NUKLEOTIDNE ZNAČILNOSTI HANTAVIRUSOV DOB IN PUU POMNOŽENIH IZ AKUTNIH VZORCEV BOLNIKOV S HMRS

V Sloveniji krožijo v naravnem okolju vsaj 4 hantavirusi: DOB, PUU, TUL in SAA (Slika 10). Nedavno smo pri gozdnih rovkah našli hantavirus soroden virus SWS, kar dokazuje, da hantavirusi ne krožijo v Sloveniji le med glodavci, temveč tudi med žužkojedimi gostitelji. HMRS v Sloveniji povzročata le hantavirusa PUU in DOB, ki ju najdemo po celi državi in povzročata bolezen, ki niha od blage oblike do smrtnih izidov.



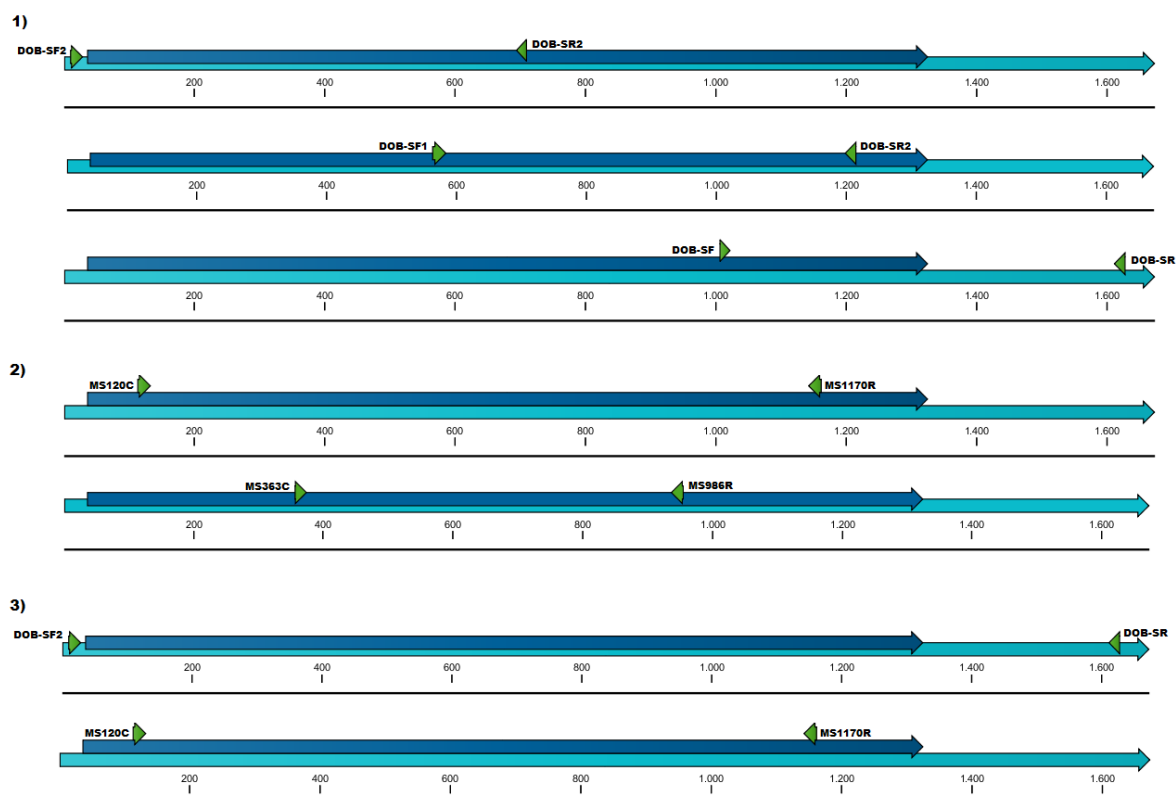
Slika 10: Filogenetska razmerja med hantavirusi v Evropi, Aziji in Ameriki. Hantaviruse označene z rdečo barvo smo dokazali v naravnih gostiteljih tudi v Sloveniji.

4.4.1 Nukleotidne in aminokislinske značilnosti tarčnega odseka na segmentu S virusa DOB

Pri bolnikih v Sloveniji smo za analizo genoma virusa DOB virusno RNA pomnoževali neposredno iz vzorcev bolnikov. Tako smo se želeli izogniti nastanku morebitnih mutacij, ki se pojavijo ob razmnoževanju virusa na celičnih kulturah. Virusno RNA smo skušali pomnožiti pri 50 bolnikih okuženih z virusom DOB, pri katerih smo s kvantitativnim RT-PCR v realnem času izmerili virusno breme.

4.4.1.1 Pomnoževanje tarčnega odseka

Za pridobitev nukleotidnega zaporedja segmenta S pri virusu DOB smo uporabili več začetnih oligonukleotidov (Preglednica 3), saj smo želeli pomnožiti vseh 1667 baznih parov segmenta S. Postopek pomnoževanja virusa DOB smo prikazali na Sliki 11.



Slika 11: Prikaz poteka pomnoževanja segmenta S virusa DOB iz akutnih vzorcev bolnikov: 1) prvi poskus pomnoževanja: 1667 bp virusnega segmenta S v treh ločenih reakcijah PCR; 2) drugi poskus pomnoževanja v dveh zaporednih korakih z začetnimi oligonukleotidi objavljenimi v literaturi; 3) tretji poskus pomnoževanja v dveh zaporednih korakih: v prvi PCR reakciji smo uporabili naše začetne oligonukleotide, vgnezden PCR pa smo naredili z že objavljenimi začetnimi oligonukleotidi, ki pomnožijo pridelek velik 1051 bp.

V prvem poskusu smo oblikovali, na podlagi znanega nukleotidnega zaporedja virusa DOB, izoliranega iz rumenogrle miši, ujete v vasi Dobrava (HNVNPSS), 6 začetnih oligonukleotidov, s katerimi smo želeli v treh reakcijah PCR pomnožiti celoten segment S (Slika 11; 1). Zaradi neuspeha smo v drugem poskusu uporabili začetne oligonukleotide, ki so jih opisali že v literaturi (MS120C/MS1170R in MS343C/MS986R), (Papa in sod., 1998), (Slika 11; 2). Z njimi smo pri 10 bolnikih dobili pridelek PCR, velik 599 bp. Ker smo želeli

analizirati čim daljši odsek na virusnem segmentu S, smo v tretjem poskusu uporabili metodo vgnezdenega PCR, tako da smo uporabili v prvi reakciji začetne oligonukleotide, ki smo jih oblikovali sami; pomnožijo celoten segment S (DOB-SF2/DOB-SR), v vgnezdeni reakciji pa začetna oligonukleotida MS120C/MS1170R (Papa in sod., 1998), (Slika 11; 3).

S tem postopkom smo pomnožili tarčni odsek na segmentu S pri 23/50 bolnikih, okuženih z virusom DOB. Nukleotidno zaporedje virusa smo določili pri bolnikih iz vseh 4 skupin (glede na potek bolezni) iz različnih zemljepisnih lokacij (Preglednica 13). Nukleotidna zaporedja virusov smo določili iz vseh vzorcev bolnikov, ki so imeli srednje težek potek bolezni, in le iz tretjine tistih, ki so imeli težek potek bolezni. Pri skupini bolnikov z blagim potekom bolezni smo določili nukleotidno zaporedje virusov pri tistih, ki so imeli več kot 10^4 kopij virusne RNA/ml vzorca.

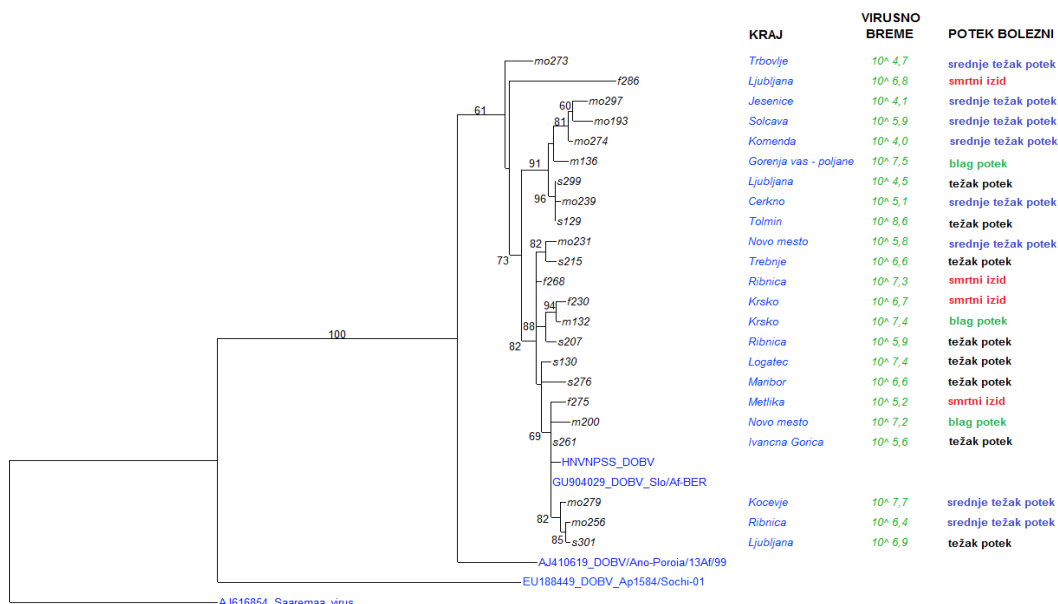
Preglednica 13: Bolniki, okuženi z virusom DOB, pri katerih smo pomnožili virusni segment S.

BOLNIK	LOKACIJA	POTEK BOLEZNI	VIRUSNO BREME [log ₁₀ kopij RNA/ml vzorca]
m200	Novo mesto	Blag	7,22
m132	Krško	Blag	7,47
m136	Gorenja vas – Poljane	Blag	7,51
mo274	Komenda	srednje težek	4,06
mo297	Jesenice	srednje težek	4,10
mo273	Trbovlje	srednje težek	4,78
mo239	Cerkno	srednje težek	5,12
mo231	Novo mesto	srednje težek	5,80
mo193	Solčava	srednje težek	5,93
mo256	Ribnica	srednje težek	6,48
mo279	Kočevje	srednje težek	7,71
s299	Ljubljana	Težek	4,54
s261	Ivančna Gorica	Težek	5,66
s207	Ribnica	Težek	5,92
s215	Trebnje	Težek	6,61
s276	Maribor	Težek	6,64
s301	Ljubljana	Težek	6,98
s130	Logatec	Težek	7,48
s129	Tolmin	Težek	8,63
f275	Metlika	smrtni izid	5,20
f230	Krško	smrtni izid	6,77
f286	Ljubljana	smrtni izid	6,85
f268	Ribnica	smrtni izid	7,39

4.4.1.2 Analiza nukleotidnih zaporedij

Iz poravnave nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetska drevesa z metodo največje verjetnosti (Slika 12). Nukleotidna zaporedja virusa DOB pomnožena iz akutnih vzorcev slovenskih bolnikov so se med seboj razlikovala od 0-4%. Večina zaporedij se je med seboj razlikovala le v 1-2% nukleotidov. Najbolj oddaljeno zaporedje virusa DOB smo pomnožili iz vzorca bolnika s smrtnim izidom bolezni (f286). Od ostalih zaporedij virusa se je razlikovala v 3-4% nukleotidov.

Na podlagi filogenetskega drevesa smo ugotovili, da je v Sloveniji prisotnih več monofiletskih skupin virusa DOB, ki se med seboj ločujejo glede na zemljepisni izvor okužbe in ne glede na potek bolezni ali višino virusnega bremena. Tipska vrsta virusa DOB sodi v monofiletsko skupino, ki združuje zaporedja virusov, pomnoženih iz vzorcev bolnikov iz Metlike, Kočevja, Ribnice, Ivančne Gorice, Novega mesta in Ljubljane. Svojeviti genetski liniji tvorita virusa pomnožena iz vzorca bolnika iz Trbovelj in že prej omenjenega vzorca bolnika s smrtnim izidom iz Ljubljane. Virusi, pomnoženi iz vzorcev bolnikov iz gorenjske regije tvorijo tretjo genetsko linijo virusa DOB.



Slika 12: Filogenetsko drevo tarčnega odseka segmenta S virusa DOB, pomnoženega neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov. Kot referenčne seve virusa DOB smo uporabili nukleotidna zaporedja, ki smo jih

dobili v genski banki PubMed: HNVNPSS – prvotno zaporedje virusa DOB, izoliranega iz rumenogrlje miši, ujete v vasi Dobrava; GU904029 – zaporedje virusa HNVNPSS po pasiranju na celicah VeroE6; AJ410619 – sev virusa DOB, izoliranega iz tkiva rumenogrlje miši, ujete v Grčiji; EU188449 – sev virusa DOB izoliranega iz tkiva miši vrste *A. ponticus*, v kraju Sochi v Rusiji; A616854 – virus Saaremaa.

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka segmenta S virusov DOB, pomnoženih neposredno iz bolnikov, in tipskega seva virusa izoliranega iz rumenogrlje miši, ujete v vasi Dobrava, smo primerjali med seboj (Priloga C). Na 981 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili kar 81 polimorfnihih mest, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 8% variabilnih mest. V vseh primerih je to polimorfizem posameznega nukleotida (SNP, angl. Single Nucleotide Polimorfizem). Na mestu 29 smo ugotovili insercijo adenina pri 16 zaporedjih virusov pomnoženih iz bolnikov, ki jih ni v zaporedju tipskega seva DOB. Insercija je prisotna tudi v zaporedju virusnega izolata GU904029, ki je ponovni izolat tipskega virusa DOB na celični kulturi. Na mestih 884 in 885 je pri vseh zaporedjih, razen tipskem, prišlo do inverzije nukleotidov TG v GT. Na vseh ostalih polimorfnihih mestih, so se pojavljali SNP v več zaporedjih, ki smo jih pomnožili iz vzorcev bolnikov z različnimi poteki bolezni. Nukleotidni zaporedji virusov z največ SNP sta bili pomnoženi iz vzorcev bolnika s smrtnim izidom bolezni (f286) in srednje težkim potekom bolezni (m2073).

4.4.1.3 Analiza aminokislinskih zaporedij

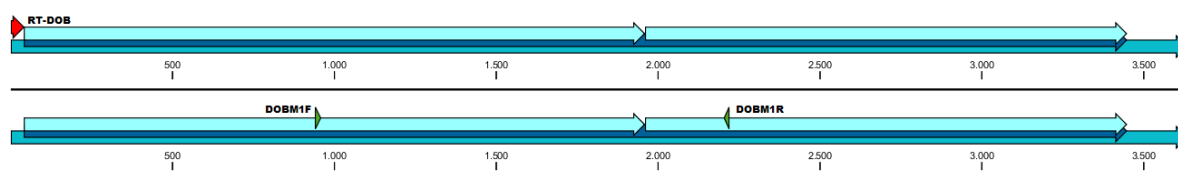
Nukleotidna zaporedja tarčnih odsekov smo prevedli v aminokislinsko zaporedje nukleoproteina N, ker nas je zanimalo, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokislinske. Pomnoženo zaporedje smo prevedli s standardnim genetskim kodonom v zaporedje, dolgo 319 aminokislinskih (Priloga D). Celoten nukleoprotein N je velik 428 aminokislinskih, kar pomeni, da smo uspeli pomnožiti 75% zaporedja nukleoproteina virusa DOB. Ugotovili smo 9 aminokislinskih zamenjav, in sicer: insercijo serina (-10S), zamenjavo izolevcina v valin (I85V, I132V, I163V), valina v levcin (V186L), treonina v alalin (T192A), serina v alanin (S221A), asparagina v serin (N227S) in cisteina v valin (C295V). V skupini bolnikov s smrtnim izidom bolezni smo ugotovili pri bolniku f286 zamenjavo aminokislinske S221A. V skupini bolnikov z blagim potekom bolezni smo ugotovili pri bolniku m200 zamenjavo alanin na mestu 192 v treonin in pri bolniku m132 na mestu 227 zamenjavo asparagina v serin.

4.4.2 Nukleotidne in aminokislinske značilnosti tarčnega odseka na segmentu M virusa DOB

Pri bolnikih v Sloveniji smo za analizo segmenta M virusa DOB virusno RNA pomnoževali neposredno iz vzorcev bolnikov. Tako smo se želeli izogniti nastanku morebitnih mutacij, ki se pojavijo ob razmnoževanju virusa na celičnih kulturah. Celoten segment M virusa DOB je dolg 3644 bp in ima zapis za glikoproteina G_n in G_c . Po prevodu nukleotidnega zaporedja nastane peptid dolg 1134 aminokislin, ki se posttranslacijsko razreže na dva glikoproteina. Glede na predhodne raziskave smo se odločili, da bi bilo za študijo najzanimiveje proučiti tarčni odsek virusnega segmenta, kjer se polipeptid razreže na glikoproteina.

4.4.2.1 Pomnoževanje tarčnega odseka

Za določitev tarčnega odseka smo, na podlagi nukleotidnega zaporedja segmenta M virusa DOB, izoliranega iz rumenogrle miši (HNVD0BMS), oblikovali začetne oligonukleotide DOB-M1F/DOB-M1R (Slika 13), s katerimi smo pomnožili 1281 baznih parov dolg odsek (Preglednica 3). Zaradi težav s pomnoževanjem virusnega segmenta S smo v prvi reakciji uporabili začetni oligonukleotid RT-DOB, ki se veže na močno ohranjena zaporedja na koncih vsakega segmenta. S tem smo zagotovili več pridelka v naslednji reakciji, v kateri smo pomnožili tarčni odsek s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi.



Slika 13: Prikaz pomnoženega odseka segmenta M (1281 bp) virusa DOB, neposredno iz akutnega vzorca bolnikov.

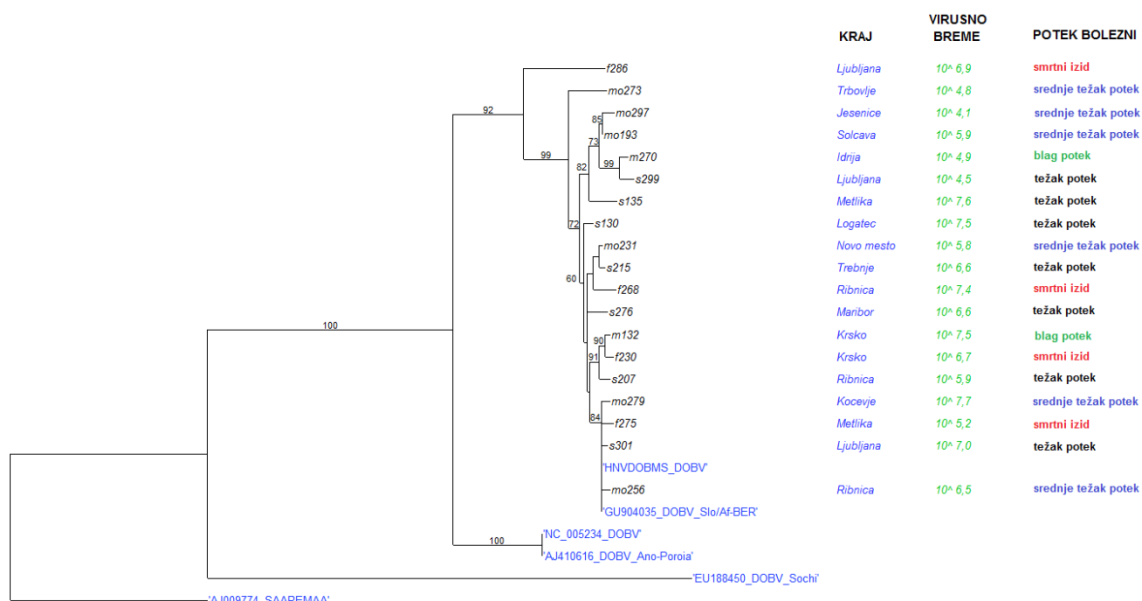
Tarčni odsek na segmentu M virusa DOB, neposredno iz akutnega vzorca smo uspeli pomnožiti pri 19/50 bolnikih (Preglednica 14). Ne glede na to, ali smo vzorec predhodno pomnoževali z začetnim oligonukleotidom RT-DOB ali ne, smo bili v naslednji reakciji PCR, uspešni pri istih bolnikih. Tarčni odsek virusa smo določili pri bolnikih iz vseh 4 skupin (glede na potek bolezni) in različnih zemljepisnih lokacij. Virus smo pomnožili samo pri bolnikih, ki so imeli več kot 10^4 kopij virusne RNA/ml vzorca.

Preglednica 14: Bolniki, okuženi z virusom DOB, pri katerih smo pomnožili virusni segment M.

BOLNIK	LOKACIJA	POTEK BOLEZNI	VIRUSNO BREME [log ₁₀ kopij RNA/ml vzorca]
m132	Krško	blag	7,47
m270	Idrija	blag	4,90
mo193	Solčava	srednje težek	5,93
mo231	Novo mesto	srednje težek	5,80
mo256	Ribnica	srednje težek	6,48
mo273	Trbovlje	srednje težek	4,78
mo279	Kočevje	srednje težek	7,71
mo297	Jesenice	srednje težek	4,10
s130	Logatec	težek	7,48
s135	Metlika	težek	7,61
s206	Cerkno	težek	7,33
s207	Ribnica	težek	5,92
s215	Trebnje	težek	6,61
s276	Maribor	težek	6,64
s299	Ljubljana	težek	4,54
s301	Ljubljana	težek	6,98
f230	Krško	smrtni izid	6,77
f268	Ribnica	smrtni izid	7,39
f275	Metlika	smrtni izid	5,20
f286	Ljubljana	smrtni izid	6,85

4.4.2.2 Analiza nukleotidnih zaporedij

Iz poravnave nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetska drevesa z metodo največje verjetnosti (Slika 14). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka segmenta M virusa DOB so se med seboj razlikovala od 0-6%. Razporeditev zaporedij virusov DOB, pomnoženih iz akutnih vzorcev bolnikov, na filogenetskem drevesu je zelo podobna razporeditvi zaporedij glede na poravnave segmenta S virusa DOB, kar pomeni, da med virusi ni prišlo do izmenjave virusnih segmentov. Pomnožena zaporedja virusov se delijo v več monofiletskih skupin, ki se združujejo glede na zemljepisni izvor okužbe in ne glede na potek bolezni, ki ga povzročijo pri ljudeh. Najbolj oddaljeno zaporedje virusa DOB je bilo pomnoženo iz vzorca bolnika s smrtnim izidom bolezni (f286), iz Ljubljane, ki se od ostalih zaporedij razlikuje v 5-6% nukleotidov. Svojevstveno genetsko linijo tvori tudi zaporedje virusa DOB pomnoženega iz vzorca bolnika s srednje težkim potekom bolezni, iz Trbovelj (mo273).



Slika 14: Filogenetsko drevo tarčnega odseka segmenta M virusa DOB pomnoženega neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov. Kot referenčne seve virusa DOB smo uporabili zaporedja, ki smo jih dobili v genski banki PubMed: HNVDOBMS – prvotno zaporedje virusa DOB, izoliranega iz rumenogrle miši, ujete v vasi Dobrava; GU904035 – zaporedje virusa HNVDOBMS po pasiranju na celicah VeroE6; NC_005234 in AJ410616 – sev virusa DOB, izoliranega iz tkiva rumenogrle miši, ujete v Grčiji; EU188450 – sev virusa DOB, izoliranega iz tkiva miši vrste *A. ponticus*, v kraju Sochi v Rusiji; AJ009774 – virus Saaremaa.

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka segmenta M virusov DOB pomnoženih neposredno iz vzorcev bolnikov in tipskega seva virusa smo primerjali med seboj (Priloga E). Na 1163 bp dolgem odseku genoma smo ugotovili kar 139 SNP, kar pomeni, da je na tem odseku virusa kar 12% variabilnih mest. Večina mutacij je bila prisotna v več zaporedjih virusa DOB pomnoženih iz vzorcev bolnikov z različnimi poteki bolezni. Večina nukleotidnih zaporedij virusov pomnoženih iz vzorcev bolnikov je v primerjavi s tipskim sevom imela naslednje mutacije: A197G, G826A, T994C, C1017T. Kar 30 SNP mutacij se je pojavilo izključno pri nukleotidnih zaporedjih virusov pomnoženih neposredno iz vzorcev bolnikov s smrtnim izidom okužbe. Večino mutacij smo dokazali le pri enem bolniku.

4.4.2.3 Analiza aminokislinskih zaporedij

Nukleotidna zaporedja tarčnih odsekov smo prevedli v aminokislinsko zaporedje glikoproteina, ker nas je zanimalo, ali privede katera od mutacij do spremembe aminokislinske

(Priloga F). Pomnoženo zaporedje smo prevedli s standardnim genetskim kodonom v zaporedje, dolgo 387 aminokislin. S tem smo analizirali 34% peptida, ki ga kodira segment M. Od 139 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka na segmentu M, jih je bilo 130 tih mutacij, 9 jih je povzročilo zamenjavo aminokislina, in sicer: zamenjavo serina v asparagin (S10N), prolina v histidin (P14H), valina v izolevcin (V32I, V330I) in izolevcina v valin (I189V, I205V), asparagina v serin (N329S) ter lizina v arginin (K367R). Pri bolniku s smrtnim izidom (f286) so bile prisotne kar tri od naštetih mutacij (I189V, N329S, K367R).

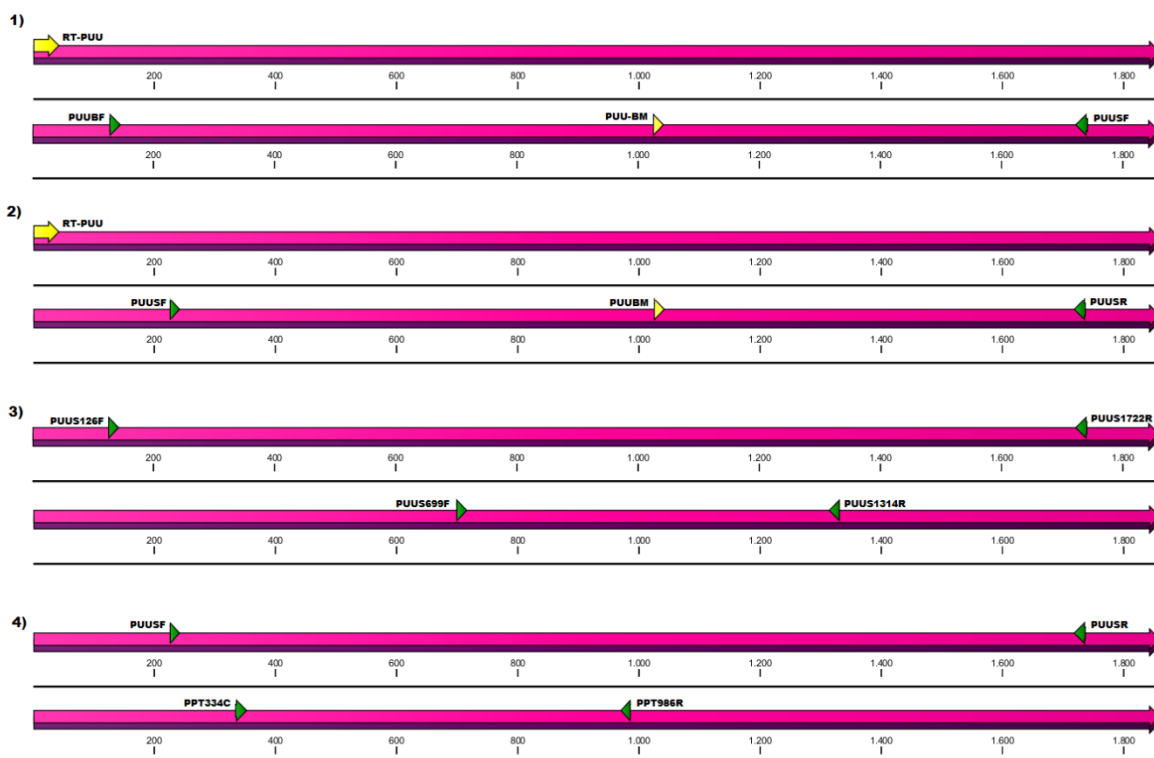
4.4.3 Nukleotidne in aminokislinske značilnosti tarčnega odseka na segmentu S virusa PUU

Za analizo segmenta S virusa PUU pri bolnikih v Sloveniji, smo skušali pomnožiti virusno RNA pri 68 bolnikih okuženih z virusom PUU, pri katerih smo izmerili s kvantitativnim RT-PCR v realnem času virusno breme.

V nasprotju z virusom DOB, ki je bil prvič opisan v Sloveniji, izvira virus PUU iz vasi Puumala na Finskem in je bolj razširjen po Evropi. Prav zaradi zemljepisne razširjenosti virusa od severa do Balkana, je v genski banki shranjenih veliko zaporedij virusa, ki se med seboj močno razlikujejo. Za oblikovanje začetnih oligonukleotidov smo uporabili soglasno zaporedje virusov PUU, izoliranih na Balkanu in Madžarskem (FN37782, AJ314600), saj smo glede na zemljepisno raznolikost virusa pričakovali, da so ti virusi najbolj sorodni našim. Oblikovane začetne oligonukleotide smo optimizirali na vzorcih gozdnih voluharic, ki smo jih ujeli na različnih lokacijah po Sloveniji (Slika 4).

4.4.3.1 Pomnoževanje tarčnega odseka

Za pridobitev nukleotidnega zaporedja segmenta S virusa PUU smo uporabili več začetnih oligonukleotidov (Preglednica 4), saj smo želeli pomnožiti vseh 1850 baznih parov. Postopek pomnoževanja virusa PUU smo prikazali na Sliki 15.



Slika 15: Prikaz poteka pomnoževanja segmenta S virusa PUU iz akutnih vzorcev bolnikov: 1) prvi poskus pomnoževanja: 1614 bp; 2) drugi poskus pomnoževanja: 1481 bp; 3) tretji poskus pomnoževanja, v dveh zaporednih korakih: 615 bp; 4) četrti poskus pomnoževanja: najprej smo uporabili začetne oligonukleotide PUU-SF/PUU-SR, s katerimi smo že dobili virus pri slovenskih bolnikih; za vgnezditi PCR smo uporabili v literaturi že objavljene začetne oligonukleotide (Bowen in sod., 1997) in dobili pridelek PCR, dolg 653bp.

V prvem poskusu smo uporabili začetni oligonukleotid RT-PUU, ki se veže na močno ohranjena zaporedja na koncih segmenta. Nato, smo pomnožili 1614 bp dolg tarčni odsek s parom začetnih oligonukleotidov PUU-BF/PUU-BR, vendar so bili vsi vzorci bolnikov negativni. Oblikovali smo nove začetne oligonukleotide, na podlagi soglasnega zaporedja virusov PUU iz Balkana, Madžarske in gozdne voluharice TT80/98 ujete v Prekmurju. Nukleotidno zaporedje virusa PUU iz gozdne voluharice smo pomnožili s prejšnjima paroma začetnih oligonukleotidov.

Nov par začetnih oligonukleotidov (PUU-SF/PUU-SR) smo postavili na ohranjena mesta v soglasnemu odseku genoma. Uspešni smo bili pri 6/68 bolnikih, ki so imeli več kot 10^4 kopij virusne RNA/ml vzorca (Preglednica 15). Virusna zaporedja smo uspeli pomnožiti pri 5

bolnikih z blagim potekom bolezni in enem bolniku s srednje težkim potekom bolezni. Pri bolnikih s težkim potekom bolezni, ki so imeli višje virusno breme, nismo dobili nobenega prideleka PCR.

Na podlagi novo pridobljenih zaporedij virusa PUU iz slovenskih bolnikov smo oblikovali tretji par začetnih oligonukleotidov. Tokrat smo oblikovali specifične začetne oligonukleotide (PUUS126F/PUUS1722R) za prvo reakcijo RT-PCR in vgnezen PCR (PUUS669F/PUUS13214R), s katerim smo skušali pomnožiti 615 bp virusnega segmenta S. Kljub temu, da smo oblikovali začetne oligonukleotide na virusnih zaporedjih iz vzorcev bolnikov in smo med optimizacijo uspešno pomnožili virus iz teh vzorcev bolnikov in vzorcev gozdnih voluharic, nismo pridobili nobenega novega zaporedja virusa PUU.

Ker smo želeli pomnožiti virus pri vseh treh skupinah bolnikov z različnim potekom bolezni smo uporabili v četrtem poskusu pomnoževanja virusa kombinacijo začetnih oligonukleotidov PUU-SF/PUU-SR in PPT334C/PPT986R (Bowen in sod., 1997; Avsic-Zupanc in sod., 2007). Tarčni odsek, velik 653 bp, smo pomnožili še pri 6 bolnikih (2 z blagim potekom bolezni, 1 s srednje težkim potekom bolezni in 4 bolniki s težkim potekom bolezni), (Preglednica 15). Bolniki, pri katerih smo pomnožili virus PUU v 4. poskusu, so imeli virusno breme od 10^3 do 10^6 kopij virusne RNA/ml vzorca.

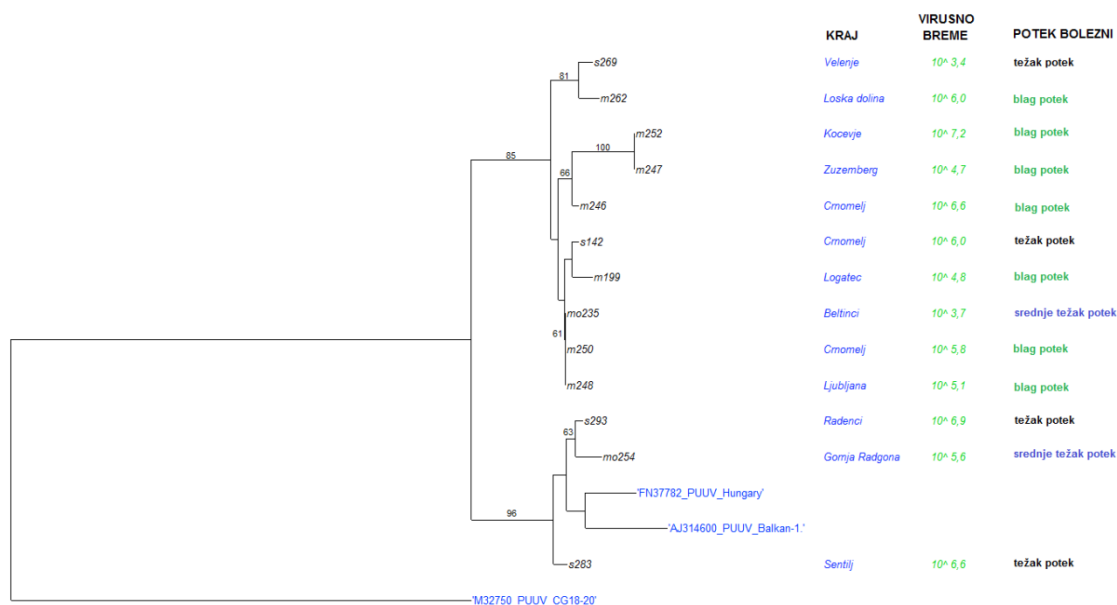
Preglednica 15: Bolniki, okuženi z virusom PUU, pri katerih smo pomnožili virusni segment S.

BOLNIK	LOKACIJA	POTEK BOLEZNI	VIRUSNO BREME [log ₁₀ kopij RNA/ml vzorca]
m199	Logatec	blag	4,82
m247	Žužemberk	blag	4,72
m248	Ljubljana	blag	5,09
m250	Črnomelj	blag	5,83
m252	Kočevje	blag	7,16
m262	Loška dolina	blag	6,03
mo235	Beltinci	srednje težek	3,69
mo254	Gornja Radgona	srednje težek	5,60
s142	Črnomelj	težek	6,03
s269	Velenje	težek	3,43
s283	Šentilj	težek	6,60
s293	Radenci	težek	6,93

4.4.3.2 Analiza nukleotidnih zaporedij

Iz poravnave nukleotidnih zaporedij virusov PUU pomnoženih iz vzorcev bolnikov smo izrisali filogenetska drevesa z metodo največje verjetnosti (Slika 16). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka segmenta S virusa PUU so se razlikovala med seboj 0-7%.

Nukleotidna zaporedja virusa PUU, pomnoženega iz akutnih vzorcev slovenskih bolnikov, se ločijo na dve genetski liniji: ena obsega zaporedja virusa pomnožena iz vzorcev bolnikov iz štajerske in pomurske regije in je bolj sorodna virusu PUU, izoliranemu na Madžarskem, druga genetska linija združuje zaporedja pomnožena iz vzorcev bolnikov iz dolenjske regije in osrednje Slovenije ter se deli na več monofiletskih linij. Kljub temu, da kaže virus PUU zemljepisno razporeditev zaporedij na filogenetskem drevesu, pa ta ni tako jasna kot pri virusu DOB. Tudi pri virusu PUU nismo opazili združevanja nukleotidnih zaporedij virusov glede na višino virusnega bremena pri bolnikih ali glede na potek bolezni.



Slika 16: Filogenetsko drevo tarčnega odseka segmenta S virusa PUU, pomnoženega neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov. Kot referenčne seve virusa smo uporabili zaporedja, ki smo jih dobili v genski banki PubMed: FN37782 – virus PUU, izoliran iz gozdne voluharice na Madžarskem; AJ314600 – virus PUU izoliran iz gozdne voluharice na Balkanu in M32750 – virus PUU, sev Hällnäs B1.

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka segmenta S virusov PUU, pomnoženih neposredno iz bolnikov, in najbolj sorodnega virusa PUU, izoliranega iz gozdne voluharice na Balkanu, smo primerjali med seboj (Priloga G). Glede na referenčni sev (AJ314600) smo ugotovili na 1045 bp dolgem odseku genoma kar 100 SNP (9,5% variabilnih mest). Ko smo primerjali med seboj le nukleotidna zaporedja virusov pomnoženih neposredno iz vzorcev slovenskih bolnikov smo ugotovili na enakem odseku 86 SNP. Večina mutacij je bila prisotna v več nukleotidnih zaporedjih virusov v primerjavi z referenčnim sevom, ne glede na to, da smo jih pomnožili iz vzorcev bolnikov z različnim potekom bolezni. Dve mutaciji smo ugotovili samo pri bolnikih s težkim potekom bolezni: T351C in C601T, vendar tudi ti dve nista bili prisotni pri vseh zaporedjih virusov PUU.

4.4.3.3 Analiza aminokislinskih zaporedij

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka smo prevedli v zaporedje, dolgo 348 oz. 232 aminokislin (Priloga H). S tem smo analizirali 18,8% oz. 12,5% nukleoproteina N. Od 86 mutacij v nukleotidnem zaporedju, smo ugotovili le eno aminokislinsko spremembo. Na mestu 161 je prišlo pri treh sekvencah do zamenjave glutaminske kisline v aspartatno kislino (E161D).

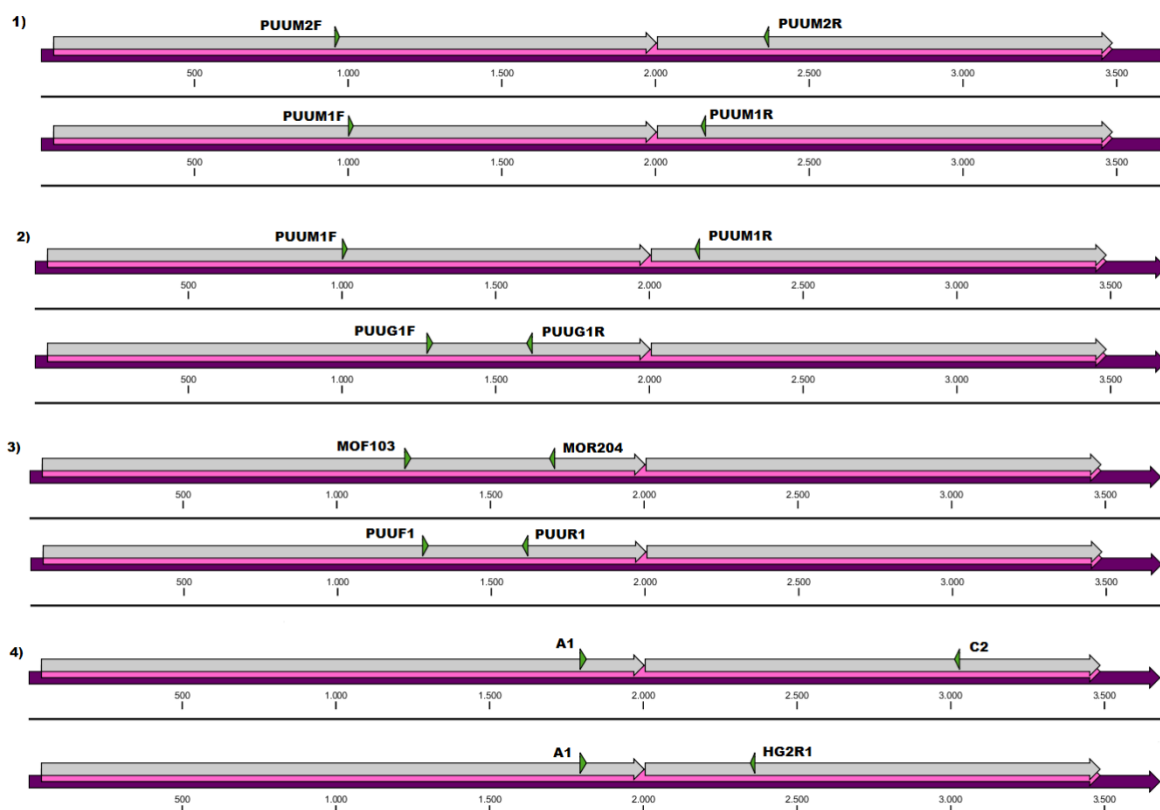
4.4.4 Nukleotidne in aminokislinske značilnosti tarčnega odseka na segmentu M virusa PUU

Za analizo segmenta M virusa PUU pri bolnikih v Sloveniji, smo skušali pomnožiti virusno RNA pri 68 bolnikih okuženih z virusom PUU, pri katerih smo izmerili s kvantitativnim RT-PCR v realnem času virusno breme.

Pomnožiti smo želeli tarčni odsek na segmentu M, kjer pride posttranslacijsko do cepitve poliproteina, na glikoprotein G_n in G_c . Pri oblikovanju začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje tarčnega odseka na segmentu M smo imeli težavo izbrati ustrezn referenčni tip virusa, na katerem bi oblikovali začetne oligonukleotide, saj je v genski banki PubMed shranjenih le 15 različnih sevov, vsi pa izvirajo iz zemljepisno oddaljenih krajev. V Sloveniji smo imeli določenih le nekaj krajših odsekov virusa PUU, tako iz vzorcev gozdnih voluharic, kot tudi bolnikov (Avsic-Zupanc in sod., 2007).

4.4.4.1 Pomnoževanje tarčnega odseka

Za pridobitev tarčnega odseka na segmentu M virusa PUU smo uporabili več začetnih oligonukleotidov (Preglednica 4 in Slika 17). Na podlagi poravnave virusnih zaporedij za smo oblikovali dva para začetnih oligonukleotidov PUU-M2F/PUU-M2R in PUU/M1F/PUU-M1R, ki smo ju uporabili v dveh zaporednih reakcijah PCR in skušali pomnožiti 1166 bp dolg tarčni odsek. Vsi vzorci bolnikov so bili negativni, vendar smo pomnožili virusno RNA iz vzorca gozdne voluharice TT80/98, ki je bila ujeta v Prekmurju.



Slika 17: Prikaz poteka pomnoževanja segmenta M virusa PUU iz akutnih vzorcev bolnikov: 1) prvi poskus pomnoževanja v dveh zaporednih korakih: 1166 bp; 2) drugi poskus pomnoževanja krajšega odseka genoma: 324 bp; 3) tretji poskus pomnoževanja po postopku, ki so ga že opisali v literaturi (Avsic-Zupanc in sod., 2007): 200 bp; 4) četrti poskus pomnoževanja z začetnimi oligonukleotidi, ki so jih opisali v literaturi (Horling in sod., 1995a; Xiao in sod., 1994) in pomnožijo drugi del segmenta M.

V naslednjem poskusu smo uporabili začetna oligonukleotida MOF103/MOR204 in PUUG1F/PUUG1R (Chu in sod., 1995), s katerimi smo skušali pomnožiti 324 bp dolg tarčni odsek, vendar so bili vsi vzorci bolnikov negativni.

Nato smo uporabili začetne oligonukleotide, s katerimi pomnožimo 200 bp dolg tarčni odsek segmenta M virusa PUU (Avsic-Zupanc in sod., 2007). Uspešno smo pomnožili virus pri 8 bolnikih, ki so imeli več kot 10^3 kopij virusne RNA/ml vzorca. Šest bolnikov s težkim potekom bolezni, en bolnik s srednje težkim in en bolnik z blagim potekom bolezni (Preglednica 16).

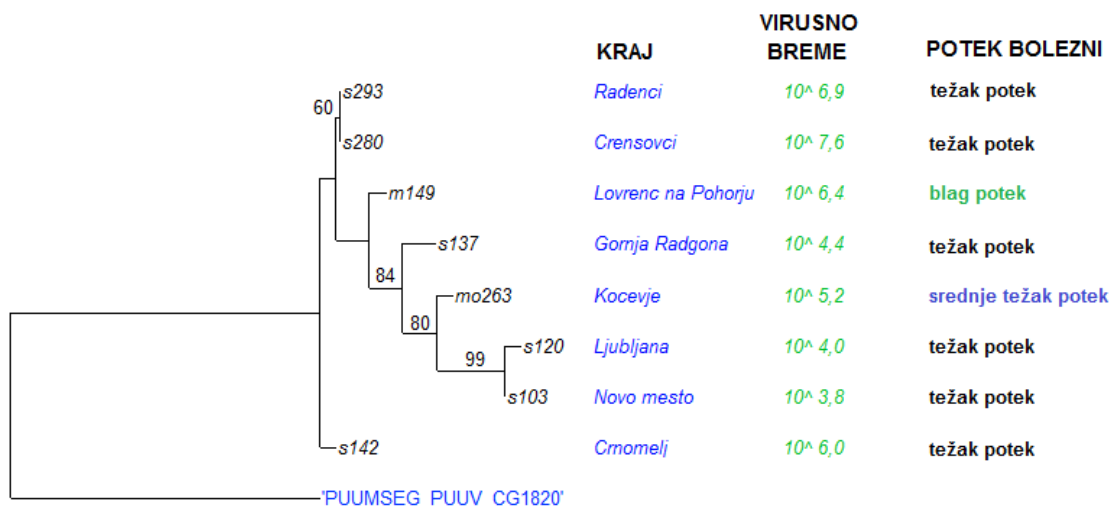
Preglednica 16: Bolniki, okuženi z virusom PUU, pri katerih smo pomnožili virusni segment M.

BOLNIK	LOKACIJA	POTEK BOLEZNI	VIRUSNO BREME [log ₁₀ kopij RNA/ml vzorca]
m149	Lovrenc na Pohorju	blag	6,42
mo263	Kočevje	srednje težek	5,24
s103	Novo mesto	težek	3,82
s120	Ljubljana	težek	4,01
s137	Gornja Radgona	težek	4,39
s142	Črnomelj	težek	6,03
s293	Radenci	težek	6,93
s280	Črenšovci	težek	7,57

Kljub temu, da so imeli tudi drugi bolniki virusno breme nad 10^3 kopij virusne RNA/ml vzorca in v vzorcih ni bilo prisotne inhibicije, vseeno nismo pomnožili virusne RNA. Dodatno smo poskusili še z enim parom začetnih oligonukleotidov, ki so jih opisali Hörling in Xiao ter sodelavci (Horling in sod., 1995a; Xiao in sod., 1994), vendar prav tako nismo bili uspešni.

4.4.4.2 Analiza nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij

Iz poravnave nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetska drevesa z metodo največje verjetnosti (Slika 16). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka segmenta M virusa PUU so se razlikovala med seboj 0-7%. Ker smo pomnožili virus PUU le pri 8 bolnikih, na filogenetskem drevesu niso jasno vidne različne genetske linije, saj je kljub kratkemu tarčnemu odseku prisotnih kar nekaj mutacij. Vseeno je iz drevesa razvidno, da se nukleotidna zaporedja virusa PUU združujejo glede na zemljepisni izvor okužbe.



Slika 18: Filogenetsko drevo tarčnega odseka segmenta M virusa PUU pomnoženega neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov. Kot referenčni sev smo uporabili zaporedje, ki smo ga dobili v genski banki PubMed: M32750 – virus PUU, sev Hällnäs B1.

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka segmenta M virusov PUU pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov, smo primerjali med seboj in na 172 dolgem odseku ugotovili kar 16 SNP (Priloga I), ki so bile prisotne v več zaporedjih. Po prevajanju v aminokislinsko zaporedje smo dokazali eno mutacijo, ki je vodila v zamenjavo aminokislinske (Priloga J). Pri bolniku s težkim potekom bolezni je na mestu 45 aminokislino valin zamenjal izolevcin (V45I).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Potek HMRS vključuje širok spekter kliničnih simptomov, ki se različno močno izražajo pri okužbah z različnimi tipi virusov. Vsi bolniki ne razvijejo klasičnega hemoragičnega sindroma, nekateri razvijejo le blago, gripi podobno obliko bolezni, spet drugi čutijo nevrološke težave, pri nekaterih pa okužba povzroči odpoved več organov ter smrt. Potek bolezni je odvisen od virulence virusa, načina prenosa, infektivnega odmerka ter tudi dejavnikov gostitelja. Patogeneza HMRS je nepoznana predvsem zaradi tesne ko-evolucije virusa z naravnim gostiteljem, zaradi česar ni na voljo primernega živalskega modela, klinične študije pa so izjemno redke (Bray, 2005). Kljub temu velja, da je potek bolezni v večji meri odvisen od imunskega odziva posameznika kot od virusnega tipa (Khaiboullina in St Jeor, 2002; Maes in sod., 2004; Markotic, 2003; Schonrich in sod., 2008).

Z doktorsko disertacijo smo skušali opredeliti vpliv genetske raznolikosti v lokusu HLA in virusnega genoma na patogenezo HMRS ter potek bolezni pri posamezniku. V ta namen smo preučili polimorfizem v lokusu HLA-B in HLA-DRB1 ter določili nukleotidno zaporedje virusov PUU in DOB, pomnoženih neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov.

5.1 Klinične značilnosti bolnikov s HMRS

V študijo smo vključili 160 bolnikov, ki so se zdravili bolnišnično zaradi HMRS ter jih razdelili v skupine glede na klinične in laboratorijske parametre, s katerimi smo ocenili potek bolezni. Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, smo ugotovili, da so pogosteje kot pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, izraženi simptomi, kot so: obsežne krvavitve, huda trombocitopenija, šok in plevralni izliv. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, smo kot najpogostejši simptom opazili hude bolečine v ledvenem predelu, trombocitopenijo in motnje vida. S tem smo potrdili izsledke v literaturi, da virus DOB v Sloveniji povzroča težjo obliko HMRS (Avsic-Zupanc in sod., 1999; Pal in sod., 2005; Saksida, 2008). Med bolniki, okuženimi z virusom DOB, smo dokazali 9,8% smrtnost, ki je bila najpogosteje posledica odpovedi delovanja srca. Kljub temu, da smo zabeležili nižji odstotek smrtnosti, kot so ga opisali Avšič in sodelavci v 10-letni študiji na dolenjskem (Avsic-Zupanc in sod., 1999), je to verjetno posledica tega, da se v zadnjem času zmanjšuje število okužb z virusom DOB ter da

je v slovenskih bolnišnicah poznavanje poteka bolezni vse boljše, s tem pa je tudi podporno zdravljenje bolnika hitrejša in učinkovitejša.

5.2 Vpliv genotipa HLA

Kljub pestri klinični sliki, ki jo povzročajo okužbe s hantavirusi sta glavna simptoma okužbe akutna odpoved ledvične funkcije in pojav drobnih krvavitev na koži, ki so posledica poškodbe žilnega endotelija. Neposrednega delovanja hantavirusov na mesto poškodbe še vedno niso dokazali, vendar pa ugotavljajo, da lahko hantavirusi delujejo posredno na povečanje prepustnosti žilnih sten, preko vezave na integrinske receptorje, ki uravnavajo vazodilatacijo in vazokonstrikcijo (Gavrilovskaya in sod., 2002; Martinez-Lemus in sod., 2003). Patogeni hantavirusi se pri vezavi na β 3-integrine vežejo na domeno PSI (pleksin-smeformin-integrin), za katero so dokazali, da lahko povzroči nastanek avtoprotiteles, ki povzročijo imunsko posredovano trombocitopenijo (Raymond in sod., 2005; Xiong in sod., 2004). Pomembno vlogo v patogenezi naj bi imeli tudi vnetni citokini, ki sprožijo pretiran imunski odziv (Khaiboullina in St Jeor, 2002; Maes in sod., 2004; Markotic in sod., 2002; Markotic in sod., 2003); ker ne pride do povratnega uravnavanja mehanizma, to vodi v neravnovesje med celičnim in protitelesnim imunskim odgovorom (Chen in Cosgriff, 2000). Pridobljen imunski odgovor se začne s predstavitvijo virusnih peptidov preko človeških levkocitnih antigenov, ki vzbudijo naivne limfocite T. Molekule HLA v I. razredu so prisotne na vseh nuklearnih celicah in spodbudijo imunski odziv preko aktivacije citotoksičnih limfocitov T. Molekule HLA v II. razredu so prisotne le na antigen predstavitvenih celicah in vzbudijo imunski odziv preko aktivacije limfocitov T-pomagalk, ki sprožijo izločanje vnetnih citokinov, ti pa spodbudijo zorenje citotoksičnih limfocitov T, limfocitov B in makrofagov (Klein in Sato, 2000a; Klein in Sato, 2000b). Pri bolnikih s HMRS smo v primerjavi z zdravo slovensko populacijo opazili nižjo frekvenco skupine alelov HLA-B*53 in HLA-DRB1*03, vendar so bile razlike le mejno značilne, zato menimo, da te skupine alelov nimajo zaščitne vloge v slovenski populaciji pred okužbo s hantavirusi. Prepoznavnejše razlike smo ugotovili, ko smo razdelili bolnike na skupino, okuženo z virusom PUU, in skupino, okuženo z virusom DOB. V skupini bolnikov, okuženih z virusom DOB, smo ugotovili značilno razliko v frekvenci HLA-B*35, predvsem pri bolnikih s smrtnim izidom bolezni, zato menimo, da skupina alelov HLA-B*35 predstavlja tveganje za težek potek bolezni. Isto skupino alelov

povezujejo tudi s hitrejšim prehodom iz okužbe z virusom HIV v AIDS (Itescu in sod., 1992). Poleg tega so povezali alel HLA-B*35:01 s težkim potekom bolezni in celo smrtnim izidom ob okužbi z virusom SN (Kilpatrick in sod., 2004). Zato smo se odločili, subtipizirati skupino alelov HLA-B*35. Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, smo določili 3 tipe alelov HLA-B*35 (HLA-B*35:01, HLA-B*35:03 in HLA-B*35:08), medtem ko smo pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, določili še alel HLA-B*35:02. V primerjavi z zdravo slovensko populacijo smo ugotovili nižjo frekvenco alela HLA-B*35:01, ki je drugače zelo pogost alel v slovenski populaciji. Značilno razliko smo ugotovili tudi pri frekvenci alela HLA-B*35:02, ki smo ga dokazali samo pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, in je bil v primerjavi z zdravo slovensko populacijo kar dvakrat pogostejši. Zaradi majhnih skupin bolnikov, ki imajo skupino alelov HLA-B*35 in so bili okuženi s hantavirusi, ni bila možna statistična analiza pojavljanja alelov HLA pri bolnikih z različnim potekom bolezni. Kljub temu smo ugotovili, da sta oba bolnika (okužena, z virusom DOB, in smrtnim izidom bolezni) imela alel HLA-B*35:01. Isti alel je bil pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, najpogostejši v skupini bolnikov z blagim potekom bolezni. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, smo ugotovili višjo frekvenco skupine alelov HLA-B*08 pri bolnikih s težkim potekom bolezni. Enako povezavo so opisali tudi v finski populaciji bolnikov, okuženih z virusom PUU, kjer so težek potek bolezni povezali s skupino alelov HLA-B*08 DRB1*03 (Makela in sod., 2002; Mustonen in sod., 2004; Mustonen in sod., 1996). Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, smo ugotovili značilno višjo frekvenco skupine alelov HLA-B*56 pri bolnikih s težkim potekom bolezni, kar pomeni, da ta skupina alelov verjetno predstavlja rizični dejavnik za razvoj težke oblike bolezni po okužbi z virusom PUU. Za razliko od finske populacije, kjer so kot rizični dejavnik za razvoj težke oblike bolezni prepoznali skupino alelov HLA-DRB1*03, smo v naši študiji ugotovili, da je ta v skupini bolnikov s težkim potekom bolezni enako pogosta kot v zdravi slovenski populaciji in manj pogosta pri bolnikih z blagim potekom okužbe. To nakazuje na zaščitno vlogo omenjenega alela v slovenski populaciji. Rizični dejavnik za razvoj težke oblike bolezni pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, bi bila lahko tudi skupina alelov HLA-DRB1*13, ki jo v kitajski populaciji Han povezujejo z blagim potekom okužbe z virusom HTN (Wang in sod., 2009). Razvoj blage oblike bolezni po okužbi z virusom AND v čilski populaciji so povezali s skupino alelov HLA-DRB1*15 (Ferrer in sod., 2007). Tudi v naši študiji smo to skupino alelov povezali z blagim potekom bolezni, po okužbi z virusom

PUU, vendar nismo ugotovili razlik v primerjavi z zdravo slovensko populacijo, zato menimo, da skupina alelov nima zaščitne vloge pred okužbo z virusom PUU. V nasprotju s študijami v finski (Mustonen in sod., 1998) in čilski populaciji (Kilpatrick in sod., 2004), med našimi bolniki s HMRS nismo potrdili zaščitne vloge skupine alelov HLA-B*27, smo pa ugotovili povezavo med blago obliko bolezni pri bolnikih, okuženimi z virusom PUU, ki so imeli skupino alelov HLA-B*07.

Zanimivo je, da smo ugotovili razliko v vlogah molekul HLA-B in HLA-DRB1 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU ali DOB v slovenski populaciji, kar pomeni, da se različni hantavirusi v isti populaciji predstavljajo na različne načine. To potrjujejo tudi ugotovitve drugih raziskovalcev, ki so nakazali na mnogo povezav med potekom bolezni in okužbo z različnimi hantavirusi, vendar pa so bile v posameznih populacijah značilne različne povezave (Ferrer in sod., 2007; Kilpatrick in sod., 2004; Makela in sod., 2002; Mustonen in sod., 2004; Mustonen in sod., 1996; Mustonen in sod., 1998; Wang in sod., 2009). Molekule HLA v I. in II. razredu s predstavitvijo različnih virusnih peptidov krmilijo med primernim in pretiranim imunskim odzivom, tako da zamejijo virusno okužbo, a ne poškodujejo tkiva (Wang in sod., 2009). Zanimivo je, da v kitajski populaciji Han, kjer kroži virus HTN, niso ugotovili močnih povezav med molekulami HLA in potekom bolezni (Wang in sod., 2009). Virus HTN je molekularno najbolj soroden virusu DOB, ki povzroča HMRS v Sloveniji. V naši študiji prav tako nismo dokazali močnih povezav med molekulami HLA in potekom bolezni. Za razliko od virusa PUU, kjer so bile tako v finski kot tudi naši populaciji, povezave med potekom bolezni in določenimi skupinami alelov HLA značilnejše. V študiji, ki so jo opravili v kitajski populaciji Han, Wang in sodelavci ugotavljajo, da so najpogostejši aleli HLA (HLA-B*08 DRB1*03 in HLA-B*46 DRB1*09) hkrati tudi dejavnik tveganja za razvoj težke oblike HMRS. To deloma potrjuje tudi naša študija, v kateri smo dokazali, da je skupina alelov HLA-B*35, ki je zelo pogosta v slovenski populaciji, tudi najpogostejša med bolniki s smrtnim izidom bolezni, po okužbi z virusom DOB. Spodbujanje različnega imunskega odgovora in posledično različnega poteka bolezni z vezavo različnih tipov hantavirusov oz. njihovih peptidov na iste alele HLA podpira tudi ugotovitev, da je alel HLA-B*35:03 poostejši pri večini bolnikov, okuženih z virusom DOB, ki so imeli težek potek bolezni in hkrati pri večini bolnikom, z virusom PUU, ki so imeli blag potek okužbe.

Poleg poteka okužbe pri bolnikih s HMRS, nas je zanimalo tudi, ali vplivajo razlike v genotipu HLA na dokaz virusne okužbe z molekularnimi metodami oziroma na višino virusnega bremena. Hantavirusno okužbo navadno potrdimo z dokazom specifičnih protiteles, ki so v serumu bolnika prisotna ob pojavu kliničnih simptomov (Saksida, 2008; Vapalahti in sod., 2001), zato ni bilo prave potrebe po molekularnem dokazu okužbe, razen v primeru tipizacije virusnega povzročitelja. Šele z razvojem metode kvantitativne RT-PCR v realnem času, se je pokazala možnost uporabe molekularnih tehnik za merjenje virusnega bremena v akutnih vzorcih bolnikov. Pri bolnikih s HMRS so, za razliko od večine ostalih hemoragičnih mrzlic, ugotovili, da kljub prisotnosti protiteles lahko istočasno dokažemo v vzorcu krvi bolnikov tudi virusno RNA (Cosgriff in Lewis, 1991). Visoke koncentracije virusne RNA so dokazali pri bolniku, okuženem z virusom PUU, in smrtnim izidom bolezni (Evander in sod., 2007) ter pri bolnikih, okuženih z virusom SN, in težkim potekom bolezni (Terajima in sod., 1999). Soodvisnost težkega poteka bolezni in višjega virusnega bremena v krvi bolnikov, okuženih z virusom DOB, smo dokazali tudi v Sloveniji (Saksida in sod., 2008). V omenjeni študiji so ugotovili, da je virusno breme, pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, dokazljivo le pri 55,9% bolnikov v akutni fazi bolezni. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, pa v 67,5% bolnikov (Saksida, 2008). V naši študiji smo dokazali virusno breme pri 69,4% bolnikov, okuženih z virusom DOB, in 77,3% bolnikov, okuženih z virusom PUU. Višji odstotek dokazljivosti virusnega bremena pri bolnikih vključenih v našo študijo je verjetno vzrok tudi v tem, da smo virus pomnoževali v bolj svežih vzorcih bolnikov. Plyusnin in sodelavci so v študij med bolniki s HMRS na Finskem dokazali povezavo med haplotipom HLA-B*08 DRB1*03 in dokazljivostjo virusa z molekularnimi tehnikami (Plyusnin in sod., 1997). V nasprotju s tem, v naši študiji nismo ugotovili nobene značilne povezave med skupinami alelov HLA-B ali HLA-DRB1 in molekularnim dokazom virusne RNA v bolnikovi krvi. Prav tako nismo ugotovili nobene značilne povezave med višino virusnega bremena in haplotipi HLA. Višje virusno breme smo dokazali pri bolnikih s haplotipom HLA-DRB1*13, ki smo ga povezali z razvojem težke oblike bolezni po okužbi z virusom PUU, vendar značilnih razlik med skupinami ni bilo. V študiji, ki so jo opisali Plyusnin in sodelavci, so zajeli le 17 bolnikov s HMRS, med katerimi jih je kar 6 imelo haplotip HLA-B*08 DRB1*03 (Plyusnin in sod., 1997), medtem ko smo v naši študij zajeli 160 bolnikov. Večje število bolnikov je sicer v prid študiji hkrati pa s tem zveča število dejavnikov, ki lahko vplivajo na izid bolezni.

5.3 Nukleotidne in aminokislinske značilnosti virusov DOB in PUU pomnoženih neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov

Kljub številnim dokazom, da je patogeneza hantavirusov pri ljudeh osnovana na imunskih mehanizmih nekatere študije ugotavljajo, da lahko *in vitro* okužba človeških embrionalnih ledvičnih celic in celic Vero E6 povzroči apoptozo ter nastanek citopatskih učinkov (Li in sod., 2004; Markotic in sod., 2003). To pomeni, da lahko hantavirusi neposredno vplivajo na propad okuženih celic. Zato smo v naši študiji, poleg dejavnikov humane genetike, analizirali tudi nukleotidne in aminokislinske značilnosti virusov pomnoženih neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov z različnim potekom bolezni. Na takšen način smo se želeli izogniti postopkom, ki bi lahko povzročili dodatne mutacije v virusnem genomu, kot je izolacija virusa na celičnih kulturah. Ne glede na to, da dokažemo s kvantitativnim RT-PCR v realnem času virus pri dobrih dveh tretjinah okuženih bolnikov (Saksida in sod., 2008), pa je, v genski banki shranjenih neverjetno malo virusnih izolatov iz vzorcev bolnikov. Pri virusu PUU, ki povzroča 5000 primerov letno v Evropi, najdemo v genski banki PubMed nekaj manj kot 60 nukleotidnih zaporedij virusov pomnoženih neposredno iz vzorcev bolnikov, vse krajše od 500 bp. Večina virusnih zaporedij prihaja iz epidemije virusa PUU v regiji Udmurtia v Rusiji, ostale pa so še iz bolnikov iz Finske, Švedske in Slovenije (Avsic-Zupanc in sod., 2007; Horling in sod., 1995b; Pettersson in sod., 2008; Plyusnin in sod., 1997). Pri virusu DOB, ki povzroča manj primerov HMRS v Evropi, najdemo v genski banki le 3 nukleotidna zaporedja, ki so pomnožena neposredno iz vzorcev bolnikov iz Albanije, Grčije ter Slovenije in so krajše od 300 bp (Antoniadis in sod., 1996; Avsic-Zupanc in sod., 1994).

V doktorski disertaciji smo pomnožili 958 bp dolg odsek na segmentu S virusa DOB, neposredno iz akutnih vzorcev 23 bolnikov, in 1163 bp dolg odsek na segmentu M virusa DOB, iz akutnih vzorcev 19 bolnikov. Kar pomeni, da smo pomnožili skoraj 1000 bp dolga odseka virusa DOB v 38% vzorcev bolnikov v akutni fazi HMRS. Pri pomnoževanju virusa PUU neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov smo bili manj uspešni, saj smo 1045 bp dolg odsek na segmentu S pomnožili le pri 6 bolnikih. Dodatno smo pomnožili krajši odsek virusa (653 bp) še pri 7 bolnikih. Skupno smo bili tako uspešni v 19%. Še več težav smo imeli pri pomnoževanju segmenta M virusa PUU neposredno iz vzorcev bolnikov. Kljub mnogim poskusom in optimizaciji metode na gozdnih voluharicah ujetih v Sloveniji, smo uspeli

pomnožiti le 173 bp dolg odsek pri 8 bolnikih (11%). Pa vendar, so naši rezultati povsem primerljivi z objavljeno študijo na Finskem, kjer so virus PUU (274 bp segmenta S) pomnožili pri 6 bolnikih od 20 (Plyusnin in sod., 1997) in v Rusiji, kjer so uspešno pomnožili virusni segment S pri 10% bolnikov (Horling in sod., 1995b). Kljub temu, da virus DOB pri bolnikih, pri katerih smo uspeli pomnožiti virusne segmente, ni dosegal bistveno višjih virusnih bremen, kot virus PUU, smo uspešno pomnožili veliko več in tudi daljše odseke genoma. Tako, kot pri predstavitvi virusnih peptidov skozi molekulo HLA, smo tudi tukaj ugotovili velike razlike med obema hantavirusoma, ki povzročata HMRS v Sloveniji. Presenetilo nas je tudi dejstvo, da smo z začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih oblikovali sami, brez težav pomnožili virus PUU iz vzorcev tkiva in tudi krvnega strdka gozdnih voluharic, ki so naravni gostitelji virusa. Izmerjeno virusno breme v vzorcu ledvice je bilo $8,19 \times 10^6$ kopij in v vzorcu krvnega strdka gozdne voluharice $2,83 \times 10^2$ kopij virusne RNA/ml vzorca (Korva in sod., 2009). Vrednosti, ki smo jih izmerili v vzorcu krvi in tkiva gozdne voluharice, so bile povsem primerljive izmerjenimi vrednostmi virusnega bremena v serumih bolnikov, okuženih z virusom PUU. Kljub temu, virusa nismo mogli pomnožiti s klasičnimi metodami RT-PCR. Pri gojenju virusa PUU v celičnih linijah Vero E6 so opazili, da celično prilagojena različica virusa izgubi prvotno virulentnost in ni sposobna ponovnega razmnoževanja v naravnih gostiteljih. Pri analizi genoma celično prilagojenih različic, so opazili, da se pojavijo mutacije v vseh treh segmentih virusnega genoma (Lundkvist in sod., 1997a; Nemirov in sod., 2003b). Najverjetneje se virus tudi po okužbi človeka prilagodi na novega gostitelja: od tod razlike pri uspešnosti pomnoževanja iz akutnih vzorcev bolnika.

Genetske analize hantavirusov v Sloveniji so bile v večini opravljene na vzorcih naravnih gostiteljev virusa, torej na rumenogrli miši in gozdni voluharici. Pokazale so, da pri nas kroži več genetskih linij virusa DOB in PUU, ki kažejo značilno zemljepisno združevanje v monofiletske linije (Avsic-Zupanc in sod., 2000; Avsic-Zupanc in sod., 2007). Pri analizi filogenetskih dreves posameznih segmentov virusov DOB in PUU smo ugotovili, da kažeta oba segmenta enako filogenetsko sorodnost, kar pomeni, da med posameznimi genetskimi linijami ni prišlo do rekombinacij virusa. Pri podrobni analizi filogenetskih drevesih posameznega virusnega segmenta smo opazili, da nekateri bolniki, glede na zemljepisni izvor okužbe, ne sodijo v isto genetsko linijo. Opaženo si razlagamo z dejstvom, da pri bolnikih za

zemljepisni izvor okužbe upoštevamo kraj stalnega prebivališča bolnika, saj dejanskega mesta okužbe ne poznamo. Zaključimo lahko, da smo z analizo virusnega genoma iz slovenskih bolnikov potrdili, da v Sloveniji kroži več genetskih linij virusa PUU in DOB, ki se združujejo v zemljepisno ločene monofiletske linije.

Nukleotidna zaporedja virusa PUU pomnožena neposredno iz akutnih vzorcev slovenskih bolnikov so si med seboj podobna v 93%, med tem, ko so si nukleotidna zaporedja virusa DOB pomnožena iz vzorcev slovenskih bolnikov podobna v 98%. Najbolj genetsko oddaljeno nukleotidno zaporedje virusa DOB smo pomnožili iz vzorca bolnika s smrtnim izidom bolezni, ki se je od preostalih virusnih zaporedij slovenskih bolnikov razlikovala v 6%. Ena od hipotez predpostavlja, da na Balkanu kroži bolj patogena različica virusa DOB (Klempa, 2004), saj je, kljub temu, da virus kroži po celotni osrednji Evropi, večino smrtnih izidov bolezni prav na Balkanu. Pri analizi tarčnega odseka segmenta S in M virusa DOB pomnoženega iz bolnikov smo dokazali 9 aminokislinskih zamenjav. Pri večini aminokislinskih zamenjav je prvotno aminokislino zamenjala druga, ki je bila glede polarnosti iste vrste. V segmentu S se je večina mutaciji pojavljala pri večini virusnih zaporedij iz vzorcev bolnikov, ne glede na potek bolezni. Pri analizi segmenta M virusa DOB smo večino mutaciji zasledili pri posameznih virusnih zaporedjih. Kar 3 posamezne aminokislinske zamenjave smo ugotovili v virusnem zaporedju pomnoženem iz vzorcev bolnika f286 s smrtnim izidom okužbe. Raziskovalci ugotavljajo, da je višjo virulentnost virusa HTN v sesajočih miškah povzročila le ena aminokislinska zamenjava v segmentu M, ki je najverjetneje izboljšala sposobnost membranske fuzije hantavirusa in s tem hitrejše razmnoževanje virusa v tarčnih celicah (Ebihara in sod., 2000). Dokazov, da je katera koli od navedenih mutacij v virusnem zaporedju pomnoženem iz vzorca bolnika f286 spremenila virulentnost virusa žal nimamo. Glede na to, da so to posamezne mutacije, ki se niso ponovile pri virusnih zaporedjih pomnoženih iz vzorcev ostalih bolnikov s smrtnim izidom bolezni, menimo, da smo pri bolniku f286 dokazali nov genotip virusa DOB.

Pri analizah nukleotidnih zaporedij virusov PUU pomnoženih iz akutnih vzorcev bolnikov smo na krajših tarčnih odsekih virusa ugotovili več polimorfizmov posameznega nukleotida, s čimer smo potrdili ugotovitve, da je virus PUU genetsko bolj raznolik od virusa DOB (Avsic-Zupanc in sod., 2007). Na aminokislinskem nivoju, smo pri bolnikih okuženih z virusom

PUU, na tarčnem odseku segmenta S, dokazali le 1 zamenjavo aminokislina, ki je bila prisotna pri bolnikih z blagim in težkim potekom bolezni. Kljub le 173 bp dolgemu odseku segmenta M virusa PUU, ki smo ga uspeli pomnožiti v akutnih vzorcih bolnikov, smo dokazali kar 16 različnih polimorfizmov posameznega nukleotida, kar kaže na to, da je odsek genoma na koncu beljakovine G_n močno raznolika regija. Tudi po prevajanju odseka v aminokislinsko zaporedje smo ugotovili eno aminokislinsko zamenjavo pri bolniku s težkim potekom bolezni, kar še dodatno potrjuje ugotovitev, da je tarčni odsek virusa močno raznolik.

Tako pri virusu DOB kot tudi PUU nismo povezali nobene genetske mutacije na tarčnih odsekih segmentov S in M, ne z višjim bremenom virusa v krvi bolnika ne s klinično različnim potekom bolezni. Kljub temu, mislimo, da ima pri bolnikih s HMRS glavno vlogo v poteku bolezni posameznikov imunski odziv, ki lahko zasuče potek bolezni v blago obliko ali tako s smrtnim izidom. Vseeno pa na vprašanje, ali je višje virusno breme pri bolnikih s težjim potekom bolezni povezano z neustreznim imunskim odgovorom bolnika, haplotipom HLA, ali le z dejstvom, da težji bolniki prej poiščejo zdravstveno oskrbo in zato v akutnih vzorcih posledično dokažemo tudi višje virusno breme žal nismo mogli odgovoriti. Odprto je ostalo tudi vprašanje, zakaj pri nekaterih bolnikih, kljub visokemu virusnemu bremenu, nismo uspeli pomnožiti virusa in zakaj pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, kljub začetnim oligonukleotidom, s katerimi brez težav pomnožimo virusni segment pri naravnih gostiteljih, nismo bili uspešni.

Vsa odprta vprašanja kažejo na zapleteno povezavo virusa in molekul imunskega odziva pri posameznikih, ki vodijo v različne izide hemoragičnih mrzlic. Proučevanje le teh še dodatno omejuje dejstvo, da ni na voljo nobenega primernega živalskega modela in da so redke klinične študije izvedene na genetsko raznolikih populacijah, kar še dodatno zamegli povezave. Pri kliničnih študijah hantavirusov, kot je tudi naša, je vedno problematično dobiti dovolj velike skupine ljudi, da bi s statističnimi analizami lahko dovolj trdno potrdili dobljene povezave. Poleg tega gre navadno za retrospektivne študije, kjer smo vedno omejeni s tipom in količino vzorca. Kljub temu pa več raziskav, ki proučujejo različne hipoteze na istem področju pripelje do večjih spoznanj.

5.4 SKLEPI

- Z našo raziskavo, v katero smo vključili 160 bolnikov s HMRS, ki so bili zdravljeni bolnišnično, smo potrdili izsledke iz literature, da hantavirus DOB povzroča težjo obliko HMRS, kot virus PUU.
- Virusno breme smo dokazali pri 69,4% bolnikov, okuženih z virusom DOB, in 77,3% bolnikov, okuženih z virusom PUU. Izmerjene koncentracije virusne RNA pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, so bile značilno višje kot pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.
- Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, in težkim potekom bolezni ali celo smrtnim izidom so bile izmerjene koncentracije virusne RNA značilno višje od izmerjenih koncentracij virusne RNA pri bolnikih z blagim potekom bolezni.
- V skupini bolnikov s HMRS smo določili 23 različnih skupin alelov HLA-B in 12 različnih skupin alelov HLA-DRB1. V primerjavi med zdravo slovensko populacijo in bolniki s HMRS nismo ugotovili nobene značilne povezave med virusno okužbo in skupino alelov HLA.
- V skupini bolnikov, ki so bili okuženi z virusom DOB, smo dokazali višjo frekvenco samo pri skupini alelov HLA-B*35, predvsem pri bolnikih s smrtnim izidom bolezni. Smrtni primeri so bili povezani z alelom HLA*B35:01, vendar razlike, zaradi majhne skupine, niso bile značilne.
- HLA-B*07 bi lahko imel zaščitno vlogo pred okužbo z virusom PUU in razvojem težkih oblik bolezni, saj je bi značilno manj prisoten v skupini bolnikov, okuženih z virusom PUU.
- Z našo študijo smo dokazali, da se peptidi virusov DOB in PUU predstavljajo z različnimi molekulami HLA, oziroma tudi pri predstavitvi z istimi molekulami HLA ne spodbudijo enakega imunskega odgovora.
- Nukleotida zaporedja virusov PUU pomnoženih neposredno iz vzorcev slovenskih bolnikov so si med seboj podobna v 93%, medtem, ko so si

nukleotidna zaporedja virusa DOB pomnožena iz vzorcev slovenskih bolnikov podobna v 98%.

- S študijo nismo mogli potrditi povezave med gentskimi različicami virusa in potekom bolezni oziroma višjim virusnim bremenom pri posameznih bolnikih, kljub temu da smo dokazali več aminokislinskih zamenjav v tarčnih odsekih virusnega genoma.
- Tako virus DOB kot tudi virus PUU krožita v Sloveniji v več genetskih različicah, ki pa so med seboj povezane glede na zemljepisni izvor in ne glede na potek bolezni pri ljudeh.

6 POVZETEK

Zaradi tesne ko-evolucije virusa z naravnim gostiteljem ni na voljo primernega živalskega modela, zato je patogeneza HMRS nepoznana (Bray, 2005). Kljub temu velja, da je potek bolezni v večji meri odvisen od imunskega odziva posameznika kot od virusnega tipa (Khaiboullina in St Jeor, 2002; Maes in sod., 2004; Markotic, 2003; Schonrich in sod., 2008). Z doktorsko disertacijo smo skušali opredeliti vpliv genetske raznolikosti v lokusu HLA in virusnega genoma na patogenezo HMRS in potek bolezni pri posamezniku. V ta namen smo preučili polimorfizem v lokusu HLA-B in HLA-DRB1 ter določili nukleotidno zaporedje virusov PUU in DOB pomnoženih neposredno iz akutnega vzorca bolnika.

V študijo smo vključili 160 bolnikov s HMRS, ki so se zdravili bolnišnično ter jih razdelili v skupine glede na klinične in laboratorijske parametre, s katerimi smo ocenjevali potek bolezni. Med bolniki, okuženimi z virusom DOB, smo dokazali 9,8% smrtnost, ki je bila najpogosteje posledica odpovedi delovanja srca, medtem ko pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, nismo dokazali nobenega smrtnega izida bolezni. S študijo smo potrdili izsledke, da v Sloveniji povzroča težjo obliko HMRS virus DOB, kljub temu pa je znotraj skupine bolnikov, okuženih z virusom DOB potek bolezni razlikuje od blage oblike do smrtnega izida. Pomembno vlogo pri tem naj bi imela tudi predstavitev virusnih peptidov skozi sistem HLA, ki lahko vzbudi primeren ali pretiran imunski odziv. Pri bolnikih s HMRS, v primerjavi z zdravo slovensko populacijo nismo dokazali nobene značilne razlike v frekvencah alelov HLA. Prepoznavnejše razlike smo ugotovili, ko smo razdelili bolnike na skupino, okuženo z virusom PUU, in skupino, okuženo z virusom DOB. V skupini bolnikov, okuženimi z virusom DOB, smo ugotovili razliko v frekvenci HLA-B*35, predvsem pri bolnikih s težkim potekom bolezni in takih s smrtnim izidom bolezni, zato menimo, da skupina alelov HLA-B*35 predstavlja tveganje za težji potek bolezni. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, smo ugotovili višjo frekvenco skupine alelov HLA-B*08 in HLA-B*56 pri bolnikih s težkim potekom bolezni. Dejavnik tveganja za razvoj težje oblike bolezni pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, bi lahko bila skupina alelov HLA-DRB1*13. Zaščitno vlogo, v slovenski populaciji, pred okužbo z virusom PUU bi lahko imeli aleli HLA-B*07 in HLA-DRB1*15. Zanimivo je, da smo ugotovili razliko v vlogah molekul HLA-B* in HLA-DRB1* pri bolnikih, okuženih z virusom PUU ali DOB v slovenski populaciji, kar pomeni, da se

predstavljajo različni hantavirusi v isti populaciji na različne načine. To potrjuje ugotovitev, da sta bolnika s smrtnim izidom okužbe z virusom DOB, imela alel HLA-B*35:01, hkrati pa je bil isti alel pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, najpogostejši v skupini bolnikov z blagim potekom bolezni.

Poleg dejavnikov humane genetike bi lahko vplivala na potek bolezni tudi koncentracija in nukleotidne značilnosti virusa, zato smo pri bolnikih s HMRS izmerili virusno breme in določili nukleotidne in aminokislinske značilnosti virusa. Virusno breme smo dokazali pri 69,4% bolnikov, okuženih z virusom DOB, in 77,3% bolnikov, okuženih z virusom PUU. Izmerjene koncentracije virusne RNA pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, so bile značilno višje kot pri bolnikih, okuženih z virusom PUU. Prav tako smo dokazali tudi, da pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, in težkim potekom bolezni so izmerjene koncentracije virusne RNA značilno višje od izmerjenih koncentracij virusne RNA pri bolnikih, z blagim potekom bolezni.

Nukleotidne in aminokislinske značilnosti virusov smo analizirali neposredno iz akutnega vzorca bolnikov z različnim potekom bolezni. Na takšen način smo se izognili postopkom, ki bi lahko povzročili dodatne mutacije v virusnem genomu, vendar pa smo zato uspeli pomnožiti virus pri manjšem odstotku bolnikov. Pomnožili smo 1000 bp dolg odsek na segmentu S in M virusa DOB pri 38% vzorcev bolnikov z akutnim HMRS, ter 700 bp dolg odsek na segmentu S pri 19% bolnikov, okuženih z virusom PUU. Pri analizi filogenetskih dreves posameznih segmentov virusov DOB in PUU smo ugotovili, da oba segmenta kažeta enako filogenetsko sorodnost, kar pomeni, da ni prišlo do rekombinacij virusa med posameznimi genetskimi linijami. Z genetsko analizo virusov DOB in PUU pomnoženih neposredno iz akutnih vzorcev bolnikov, smo potrdili, da kroži v Sloveniji več genetskih linij virusa PUU in DOB, ki se združujejo v zemljepisno ločene monofiletske linije. Na nukleotidnem nivoju so si virusi PUU pomnoženi iz slovenskih bolnikov med seboj podobni v 93%, medtem, ko so si nukleotidna zaporedja virusov DOB pomnoženih iz slovenskih bolnikov podobna v 98%. Kljub temu, da smo dokazali kar 9 aminokislinskih zamenjav v tarčnih odsekih virusa, pa nismo ugotovili nobene povezave med genetskimi različicami virusa in potekom bolezni pri bolniku oziroma višjem virusnim bremenom. Na podlagi rezultatov

študije menimo, da ima glavno vlogo v poteku bolezni pri bolnikih s HMRS posameznikov imunski odziv, ki zasuče potek bolezni zasuče v blago obliko ali tako s smrtnim izidom.

7 SUMMARY

Several studies have shown that in hemorrhagic fever with renal syndrome patients, the disease outcome is determined by a complex interaction between the virus and immunopathologic and human genetic factors. Major histocompatibility complex class I and class II genes regulate the balance between appropriate aggressive responses and invading pathogens while minimizing the destruction of host tissue.

In Slovenia, the severity of the disease caused by Puumala virus (PUU) is significantly lower than that of HFRS due to Dobrava virus (DOB). Therefore, HFRS patients with different disease outcome were included in our study and the determination of HLA haplotype and the virus sequence was made. The DOB virus is responsible for more severe cases of HFRS in Slovenia and among our group of patients the fatality rate was 9,8%. On the other hand, no one of the PUU virus infected patients included in our study died, but nevertheless some of them experienced severe course of the disease. We have determined 23 different HLA-B and 12 different HLA-DRB1 types in Slovenian HFRS patients. Comparison of HLA frequencies between healthy individuals and HFRS patients showed no strong association with the susceptibility for hantaviral infection. Significant associations were recognized when the patient group was separated according to the virus responsible for the infection. DOB virus infected patients have a significantly higher frequency of HLA-B*35 in contrast with the frequency of HLA-DRB1*13, where this phenotype was more frequent in PUU virus infected patients, especially in the severe form of the disease. We believe that HLA-DRB1*13 might be a risk factor for development of severe form of the disease after PUU virus infection in Slovenian population. On the other hand haplotypes HLA-B*07 and HLA-DRB1*15 could play a protective role in PUUV-caused HFRS in the Slovenian population. Interestingly, our study showed a diverse associations of HLA molecules with DOB virus and PUU virus induced HFRS, and therefore, we presume that different hantaviruses are presented differently through the same HLA molecules and that this might lead to either a more severe or a milder form of the disease.

Besides human genetic factors and immune response, also the virus itself could play a role in pathogenesis and the disease outcome. Viral load was demonstrated in 77,3% patients infected with PUU virus and 69,4% infected with DOB virus. Above that, higher viral load

levels were demonstrated in patients infected with DOB virus in comparison with patients infected with PUU virus. Also a significant correlation between high viral load level and the severity of the disease was shown for patients infected with DOB virus. No such correlation was found for patients infected with PUU virus. In addition to that virus sequence was determined directly in acute human samples. By direct sequencing we have successfully determined segments S and M in 38% patients infected with DOB virus and 19% of the patients infected with PUU virus. The phylogenetic analysis has shown that in Slovenia several genetic lineages of PUU virus and DOB virus are circulating. They form different monophyletic clusters based on their geographical origin. Slovenian PUU viruses isolated from patients are similar in 93% on nucleotide level. DOB virus isolates show even higher nucleotide identity (98%). Despite the fact that several single nucleotide polymorphisms sites were established in different virus lineages and that some of them even lead to the amino acid change, no correlation between severity of the disease and the virus genetic variant was found.

Based on the results from our study and the work of other researchers in the field of hantaviruses we believe that the main role in hantavirus pathogenesis is played by each individual immune response.

8 VIRI

- Alexeyev O.A., Morozov V.G., Efremov A.G., Settergren B. 1994. A case of haemorrhagic fever with renal syndrome complicated by spleen haemorrhage. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, 26, 4: 491-492.
- Antoniadis A., Stylianakis A., Papa A., Alexiou-Daniel S., Lampropoulos A., Nichol S.T., Peters C.J., Spiropoulou C.F. 1996. Direct genetic detection of Dobrava virus in Greek and Albanian patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Disease*, 174, 2: 407-410.
- Arai S., Bennett S.N., Sumibcay L., Cook J.A., Song J.W., Hope A., Parmenter C., Nerurkar V.R., Yates T.L., Yanagihara R. 2008a. Phylogenetically distinct hantaviruses in the masked shrew (*Sorex cinereus*) and dusky shrew (*Sorex monticolus*) in the United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78, 2: 348-351.
- Arai S., Ohdachi S.D., Asakawa M., Kang H.J., Mocz G., Arikawa J., Okabe N., Yanagihara R. 2008b. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105, 42: 16296-16301.
- Arai S., Song J.W., Sumibcay L., Bennett S.N., Nerurkar V.R., Parmenter C., Cook J.A., Yates T.L., Yanagihara R. 2007. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. *Emerging Infectious Disease*, 13, 9: 1420-1423.
- Avsic-Zupanc T., Nemirov K., Petrovec M., Trilar T., Poljak M., Vaheri A., Plyusnin A. 2000. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *Journal of General Virology*, 81: 1747-1755.
- Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Duh D., Plyusnina A., Lundkvist A., Plyusnin A. 2007. Puumala hantavirus in Slovenia: analyses of S and M segment sequences recovered from patients and rodents. *Virus Research*, 123, 2: 204-210.
- Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Furlan P., Kaps R., Elgh F., Lundkvist A. 1999. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia--a 10-year survey. *Clinical Infectious Diseases*, 28, 4: 860-865.
- Avsic-Zupanc T., Poljak M., Furlan P., Kaps R., Xiao S.Y., Leduc J.W. 1994. Isolation of a strain of a Hantaan virus from a fatal case of hemorrhagic fever with renal syndrome in Slovenia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51, 4: 393-400.
- Avsic-Zupanc T., Xiao S.Y., Stojanovic R., Gligic A., van der Groen G., LeDuc J.W. 1992. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *Journal of Medical Virology*, 38, 2: 132-137.
- Avšič-Županc T., Petrovec M. 2003. Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom; biologija, epidemiologija in laboratorijska diagnostika. *Medicinski razgledi*, 42: 147-155.
- Bernshtein A.D., Apekina N.S., Mikhailova T.V., Myasnikov Y.A., Khlyap L.A., Korotkov Y.S., Gavrilovskaya I.N. 1999. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Archives of Virology*, 144, 12: 2415-2428.
- Blackwell J.M., Jamieson S.E., Burgner D. 2009. HLA and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 2: 370-385.

- Botten J., Mirowsky K., Ye C., Gottlieb K., Saavedra M., Ponce L., Hjelle B. 2002. Shedding and intracage transmission of Sin Nombre hantavirus in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model. *Journal of Virology*, 76, 15: 7587-7594.
- Bowen M.D., Gelbmann W., Ksiazek T.G., Nichol S.T., Nowotny N. 1997. Puumala virus and two genetic variants of Tula virus are present in Austrian rodents. *Journal of Medical Virology*, 53, 2: 174-181.
- Bray M. 2005. Pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Current Opinons in Immunolgy*, 17, 4: 399-403.
- Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A., Hovi T., von Bonsdorff C.H., Vuorimies J., Manni T., Penttinen K., Oker-Blom N., Lahdevirta J. 1980. *Nephropathia epidemica*: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *Journal of Infectious Diseases*, 141, 2: 131-134.
- Brummer-Korvenkontio M., Vapalahti O., Henttonen H., Koskela P., Kuusisto P., Vaheri A. 1999. Epidemiological study of *nephropathia epidemica* in Finland 1989-96. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31, 5: 427-435.
- Calderon G., Pini N., Bolpe J., Levis S., Mills J., Segura E., Guthmann N., Cantoni G., Becker J., Fonollat A., Ripoll C., Bortman M., Benedetti R., Enria D. 1999. Hantavirus reservoir hosts associated with peridomestic habitats in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 6: 792-797.
- Candore G., Cigna D., Gervasi F., Colucci A.T., Modica M.A., Caruso C. 1994. In vitro cytokine production by HLA-B8,DR3 positive subjects. *Autoimmunity*, 18, 2: 121-132.
- Carey D.E., Reuben R., Panicker K.N., Shope R.E., Myers R.M. 1971. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian Journal of Medical Research*, 59, 11: 1758-1760.
- Casals J., Henderson B.E., Hoogstraal H., Johnson K.M., Shelokov A. 1970. A review of Soviet viral hemorrhagic fevers, 1969. *Journal of Infectious Diseases*, 122, 5: 437-453.
- Cebalo L., Dusek T., Kuzman I., Markotic A. 2003. Grading the severity of disease in patients with Puumala or Dobrava virus infections from 1995 to 2000 in Croatia. *Acta Medica Croatica*, 57, 5: 355-359.
- Cerar D., Avsic-Zupanc T., Jereb M., Strle F. 2007. Case report: severe neurological manifestation of Dobrava hantavirus infection. *Journal of Medical Virology*, 79, 12: 1841-1843.
- Chen J.P., Cosgriff T.M. 2000. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagulation Fibrinolysis*, 11, 5: 461-483.
- Chen L.B., Yang W.S. 1990. Abnormalities of T cell immunoregulation in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 161, 5: 1016-1019.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 1: 156-159.
- Chu Y.K., Jennings G.B., Schmaljohn C.S. 1995. A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. *Journal of Virology*, 69, 10: 6417-6423.
- Coffey L.L., Mertens E., Brehin A.C., Fernandez-Garcia M.D., Amara A., Despres P., Sakuntabhai A. 2009. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and Infection*, 11, 2: 143-156.

- Cosgriff T.M., Lee H.W., See A.F., Parrish D.B., Moon J.S., Kim D.J., Lewis R.M. 1991. Platelet dysfunction contributes to the haemostatic defect in haemorrhagic fever with renal syndrome. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 5: 660-663.
- Cosgriff T.M., Lewis R.M. 1991. Mechanisms of disease in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Kidney International*, 35, Suppl 35: S72-S79.
- Douron E., Moriniere B., Matheron S., Girard P.M., Gonzalez J.P., Hirsch F., McCormick J.B. 1984. HFRS after a wild rodent bite in the Haute-Savoie--and risk of exposure to Hantaan-like virus in a Paris laboratory. *Lancet*, 324: 676-677.
- Ebihara H., Yoshimatsu K., Ogino M., Araki K., Ami Y., Kariwa H., Takashima I., Li D., Arikawa J. 2000. Pathogenicity of Hantaan virus in newborn mice: genetic reassortant study demonstrating that a single amino acid change in glycoprotein G1 is related to virulence. *Journal of Virology*, 74, 19: 9245-9255.
- Eltari E., Nuti M., Hasko I., Gina A. 1987. Haemorrhagic fever with renal syndrome in a case in northern Albania. *Lancet*, 330: 1211-1211.
- Evander M., Eriksson I., Pettersson L., Juto P., Ahlm C., Olsson G.E., Bucht G., Allard A. 2007. Puumala hantavirus viremia diagnosed by real-time reverse transcriptase PCR using samples from patients with hemorrhagic fever and renal syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 8: 2491-2497.
- Ferrer C.P., Vial C.P., Ferres G.M., Godoy M.P., Culza V.A., Marco C.C., Castillo H.C., Umana C.M., Rothhammer E.F., Llop R.E. 2007. Genetic susceptibility to Andes Hantavirus: Association between severity of disease and HLA alleles in Chilean patients. *Revista Chilena de Infectologia*, 24, 5: 351-359.
- Ferres M., Vial P., Marco C., Yanez L., Godoy P., Castillo C., Hjelle B., Delgado I., Lee S.J., Mertz G.J. 2007. Prospective evaluation of household contacts of persons with hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile. *Journal of Infectious Diseases*, 195, 11: 1563-1571.
- Gajdusek D.C. 1962. Virus hemorrhagic fevers. Special reference to hemorrhagic fever with renal syndrome (epidemic hemorrhagic fever). *Journal of Pediatrics*, 60, 841-857.
- Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., Shipulin G.A. 2009. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses and Public Health*, 56, 6-7: 297-309.
- Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Myasnikov Yu A., Bernshtein A.D., Ryltseva E.V., Gorbachkova E.A., Chumakov M.P. 1983. Features of circulation of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus among small mammals in the European U.S.S.R. *Archives of Virology*, 75, 4: 313-316.
- Gavrilovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H., Mackow E.R. 1999. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *Journal of Virology*, 73, 5: 3951-3959.
- Gavrilovskaya I.N., Peresleni T., Geimonen E., Mackow E.R. 2002. Pathogenic hantaviruses selectively inhibit beta3 integrin directed endothelial cell migration. *Archives of Virology*, 147, 10: 1913-1931.
- Gavrilovskaya I.N., Shepley M., Shaw R., Ginsberg M.H., Mackow E.R. 1998. beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 12: 7074-7079.

- Gligic A., Stojanovic R., Obradovic M., Hlaca D., Dimkovic N., Diglisic G., Lukac V., Ler Z., Bogdanovic R., Antonijevic B. 1992. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: epidemiologic and epizootiologic features of a nationwide outbreak in 1989. *European Journal of Epidemiology*, 8, 6: 816-825.
- Golovljova I., Vasilenko V., Prukk T., Brus Sjolander K., Plyusnin A., Lundkvist A. 2000. Puumala and Dobrava hantaviruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome in Estonia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19, 12: 968-969.
- Gonzalez J.P., McCormick J.B., Baudon D., Gautun J.P., Meunier D.Y., Dourmon E., Georges A.J. 1984. Serological evidence for Hantaan-related virus in Africa. *Lancet*, 324: 1036-1037.
- Groeneveld P.H., Colson P., Kwappenberg K.M., Clement J. 1995. Increased production of nitric oxide in patients infected with the European variant of hantavirus. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 27, 5: 453-456.
- Hart C.A., Bennett M. 1999. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. *Microbes and Infection*, 1, 14: 1229-1237.
- Hashimoto S., McCombs C.C., Michalski J.P. 1989. Mechanism of a lymphocyte abnormality associated with HLA-B8/DR3 in clinically healthy individuals. *Clinical and Experimental Immunology*, 76, 3: 317-323.
- Heyman P., Vaheri A. 2008. Situation of hantavirus infections and haemorrhagic fever with renal syndrome in European countries as of December 2006. *Euro Surveillance*, 13, 28-28.
- Heyman P., Vaheri A., Lundkvist A., Avsic-Zupanc T. 2009. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7, 2: 205-217.
- Hill A.V. 1999. Genetics and genomics of infectious disease susceptibility. *British Medical Bulletin*, 55, 2: 401-413.
- Hooper J.W., Larsen T., Custer D.M., Schmaljohn C.S. 2001. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, 289, 1: 6-14.
- Horling J., Cheng Y., Plyusnin A., Persson K., Lehvaslaiho H., Vaheri A., Niklasson B., Lundkvist A. 1995a. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the M and S genome segments of a Swedish Puumala virus isolate. *Virus Research*, 39, 2-3: 321-330.
- Horling J., Lundkvist A., Persson K., Mullaart M., Dzagurova T., Dekonenko A., Tkachenko E., Niklasson B. 1995b. Detection and subsequent sequencing of Puumala virus from human specimens by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2: 277-282.
- Huang C., Jin B., Wang M., Li E., Sun C. 1994. Hemorrhagic fever with renal syndrome: relationship between pathogenesis and cellular immunity. *Journal of Infectious Diseases*, 169, 4: 868-870.
- Hughes J.M., Peters C.J., Cohen M.L., Mahy B.W. 1993. Hantavirus pulmonary syndrome: an emerging infectious disease. *Science*, 262, 5135: 850-851.
- Hutchinson K.L., Rollin P.E., Peters C.J. 1998. Pathogenesis of a North American hantavirus, Black Creek Canal virus, in experimentally infected *Sigmodon hispidus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 1: 58-65.

- Itescu S., Mathur-Wagh U., Skovron M.L., Brancato L.J., Marmor M., Zeleniuch-Jacquotte A., Winchester R. 1992. HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 5, 1: 37-45.
- Jaaskelainen K.M., Kaukinen P., Minskaya E.S., Plyusnina A., Vapalahti O., Elliott R.M., Weber F., Vaeheri A., Plyusnin A. 2007. Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. *Journal of Medical Virology*, 79, 10: 1527-1536.
- Jaaskelainen K.M., Plyusnina A., Lundkvist A., Vaeheri A., Plyusnin A. 2008. Tula hantavirus isolate with the full-length ORF for nonstructural protein NSs survives for more consequent passages in interferon-competent cells than the isolate having truncated NSs ORF. *Virology Journal*, 5: 3.
- Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L., Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 7181: 990-993.
- Jonsson C.B., Figueiredo L.T., Vapalahti O. 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 2: 412-441.
- Jonsson C.B., Hooper J., Mertz G. 2008. Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res*, 78, 1: 162-169.
- Jonsson C.B., Schmaljohn C.S. 2000 Replication of hantaviruses. V: Hantaviruses. Schmaljohn C.S., Nichol S.T. (eds.), New York, Springer: 15-29.
- Kallio-Kokko H., Vapalahti O., Hedman K., Brummer-Korvenkontio M., Vaeheri A. 1993. Puumala virus antibody and immunoglobulin G avidity assays based on a recombinant nucleocapsid antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 3: 677-680.
- Kallio E.R., Klingstrom J., Gustafsson E., Manni T., Vaeheri A., Henttonen H., Vapalahti O., Lundkvist A. 2006. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *Journal of General Virology*, 87, 2127-2134.
- Kallio E.R., Voutilainen L., Vapalahti O., Vaeheri A., Henttonen H., Koskela E., Mappes T. 2007. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology*, 88, 8: 1911-1916.
- Kang H.J., Arai S., Hope A.G., Song J.W., Cook J.A., Yanagihara R. 2009. Genetic diversity and phylogeography of Seewis virus in the Eurasian common shrew in Finland and Hungary. *Virology Journal*, 6, 208-208.
- Kaukinen P., Vaeheri A., Plyusnin A. 2005. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Archives of Virology*, 150, 9: 1693-1713.
- Khaiboullina S.F., St Jeor S.C. 2002. Hantavirus immunology. *Viral Immunology*, 15, 4: 609-625.
- Kilpatrick E.D., Terajima M., Koster F.T., Catalina M.D., Cruz J., Ennis F.A. 2004. Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome. *Journal of Immunology*, 172, 5: 3297-3304.
- Kim S., Kang E.T., Kim Y.G., Han J.S., Lee J.S., Kim Y.I., Hall W.C., Dalrymple J.M., Peters C.J. 1993. Localization of Hantaan viral envelope glycoproteins by monoclonal antibodies in renal tissues from patients with Korean hemorrhagic fever H. *American Journal of Clinical Pathology*, 100, 4: 398-403.
- Kindt J.T., Goldsby A.R., Osborne A.B., Kuby J. 2007 The Major Histocompatibility Complex. V: Kuby Immunology. New York. W. H. Freeman Company: 189-222.

- Klein J., Sato A. 2000a. The HLA system. First of two parts. *New England Journal of Medicine*, 343, 10: 702-709.
- Klein J., Sato A. 2000b. The HLA system. Second of two parts. *New England Journal of Medicine*, 343, 11: 782-786.
- Klein S.L., Calisher C.H. 2007. Emergence and persistence of hantaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 315, 217-252.
- Klempa B. 2004. Dobrava and Tula hantaviruses from Central Europe: molecular evolution and pathogenic relevance. Doctoral Dissertation, Berlin, Humboldt-Universität: 115.
- Klempa B. 2009. Hantaviruses and climate change. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 6: 518-523.
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Barriere P., Koivogui L., ter Meulen J., Kruger D.H. 2007. Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 3: 520-522.
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Kruger D.H. 2006. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 5: 838-840.
- Klempa B., Meisel H., Rath S., Bartel J., Ulrich R., Kruger D.H. 2003. Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula hantavirus circulates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 10: 4894-4897.
- Klempa B., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Yunicheva Y.V., Morozov V.G., Okulova N.M., Slyusareva G.P., Smirnov A., Kruger D.H. 2008. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 4: 617-625.
- Klingstrom J., Plyusnin A., Vaheri A., Lundkvist A. 2002. Wild-type Puumala hantavirus infection induces cytokines, C-reactive protein, creatinine, and nitric oxide in *cynomolgus macaques*. *Journal of Virology*, 76, 1: 444-449.
- Korva M., Duh D., Puterle A., Trilar T., Avsic-Zupanc T. 2009a. First molecular evidence of Tula hantavirus in *Microtus voles* in Slovenia. *Virus Research* 144: 318-322.
- Korva M., Duh D., Saksida A., Trilar T., Avsic-Zupanc T. 2009b. The hantaviral load in tissues of naturally infected rodents. *Microbes and Infection*, 11, 3: 344-351.
- Kruger D.H., Ulrich R., Lundkvist A.A. 2001. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes and Infection*, 3, 13: 1129-1144.
- Kuzman I., Puljiz I., Turcinov D., Markotic A., Turkovic B., Aleraj B., Andric Z., Petkovic D., Tutek V., Herendic B., Iskra M., Pandak N., Misetic Z., Peric L., Jelaska D., Majetic-Sekovanic M., Ledina D., Misic-Majerus L., Radonic R. 2003. The biggest epidemic of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Acta Medica Croatica*, 57, 5: 337-346.
- Lee H.W., Lee P.W., Baek L.J., Song C.K., Seong I.W. 1981. Intraspecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30, 5: 1106-1112.
- Lee H.W., Lee P.W., Johnson K.M. 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 137, 3: 298-308.
- Lee H.W., van der Groen G. 1989. Hemorrhagic fever with renal syndrome. Progression in *Medical Virology*, 36, 62-102.

- Lee P.W., Gibbs C.J., Jr., Gajdusek D.C., Hsiang C.M., Hsiung G.D. 1980. Identification of epidemic haemorrhagic fever with renal syndrome in China with Korean haemorrhagic fever. *Lancet*, 315: 1025-1026.
- Li X.D., Kukkonen S., Vapalahti O., Plyusnin A., Lankinen H., Vaheri A. 2004. Tula hantavirus infection of Vero E6 cells induces apoptosis involving caspase 8 activation. *Journal of General Virology*, 85: 3261-3268.
- Linderholm M., Ahlm C., Settergren B., Waage A., Tarnvik A. 1996. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 173, 1: 38-43.
- Linderholm M., Billstrom A., Settergren B., Tarnvik A. 1992. Pulmonary involvement in *nephropathia epidemica* as demonstrated by computed tomography. *Infection*, 20, 5: 263-266.
- Linderholm M., Elgh F. 2001. Clinical characteristics of hantavirus infections on the Eurasian continent. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 256, 135-151.
- Linderholm M., Sandstrom T., Rinnstrom O., Groth S., Blomberg A., Tarnvik A. 1997. Impaired pulmonary function in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, 25, 5: 1084-1089.
- Lundkvist A., Cheng Y., Sjolander K.B., Niklasson B., Vaheri A., Plyusnin A. 1997a. Cell culture adaptation of Puumala hantavirus changes the infectivity for its natural reservoir, *Clethrionomys glareolus*, and leads to accumulation of mutants with altered genomic RNA S segment. *Journal of Virology*, 71, 12: 9515-9523.
- Lundkvist A., Horling J., Niklasson B. 1993. The humoral response to Puumala virus infection (*nephropathia epidemica*) investigated by viral protein specific immunoassays. *Archives of Virology*, 130, 1-2: 121-130.
- Lundkvist A., Hukic M., Horling J., Gilljam M., Nichol S., Niklasson B. 1997b. Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. *Journal of Medical Virology*, 53, 1: 51-59.
- Lyubsky S., Gavrilovskaya I., Luft B., Mackow E. 1996. Histopathology of *Peromyscus leucopus* naturally infected with pathogenic NY-1 hantaviruses: pathologic markers of HPS viral infection in mice. *Laboratory Investigation*, 74, 3: 627-633.
- Mackow E.R., Gavrilovskaya I.N. 2001. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 256, 91-115.
- Mackow E.R., Gavrilovskaya I.N. 2009. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 102, 6: 1030-1041.
- Maes P., Clement J., Gavrilovskaya I., Van Ranst M. 2004. Hantaviruses: immunology, treatment, and prevention. *Viral Immunology*, 17, 4: 481-497.
- Makela S., Kokkonen L., Ala-Houhala I., Groundstroem K., Harmoinen A., Huhtala H., Hurme M., Paakkala A., Porsti I., Virtanen V., Vaheri A., Mustonen J. 2009. More than half of the patients with acute Puumala hantavirus infection have abnormal cardiac findings. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 41, 1: 57-62.
- Makela S., Mustonen J., Ala-Houhala I., Hurme M., Partanen J., Vapalahti O., Vaheri A., Pasternack A. 2002. Human leukocyte antigen-B8-DR3 is a more important risk factor for severe Puumala hantavirus infection than the tumor necrosis factor-alpha(-308) G/A polymorphism. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 6: 843-846.

- Manasia M., Olinic N., Zagreanu I., Serban A. 1977. Hemorrhagic fever with renal syndrome: report of 11 observations. *International Urology and Nephrology*, 9, 2: 177-184.
- Markotic A. 2003. Immunopathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Acta Medica Croatica*, 57, 5: 407-414.
- Markotic A., Gagro A., Dasic G., Kuzman I., Lukas D., Nichol S., Ksiazek T.G., Sabioncello A., Rode O., Rabatic S., Dekaris D. 2002. Immune parameters in hemorrhagic fever with renal syndrome during the incubation and acute disease: case report. *Croatian Medical Journal*, 43, 5: 587-590.
- Markotic A., Hensley L., Daddario K., Spik K., Anderson K., Schmaljohn C. 2007. Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells. *Collegium Antropologicum*, 31, 4: 1159-1167.
- Markotic A., Hensley L., Geisbert T., Spik K., Schmaljohn C. 2003. Hantaviruses induce cytopathic effects and apoptosis in continuous human embryonic kidney cells. *Journal of General Virology*, 84: 2197-2202.
- Martinez-Lemus L.A., Wu X., Wilson E., Hill M.A., Davis G.E., Davis M.J., Meininger G.A. 2003. Integrins as unique receptors for vascular control. *Journal of Vascular Research*, 40, 3: 211-233.
- Martinez V.P., Bellomo C., San Juan J., Pinna D., Forlenza R., Elder M., Padula P.J. 2005. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 12: 1848-1853.
- Mehra N.K., Kaur G. 2003. MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Review in Molecular Medicine*, 5, 7: 1-17.
- Mertz G.J., Hjelle B.L., Bryan R.T. 1997. Hantavirus infection. *Advances Internal Medicine*, 42, 369-421.
- Mustonen J., Brummer-Korvenkontio M., Hedman K., Pasternack A., Pietila K., Vaheri A. 1994. *Nephropathia epidemica* in Finland: a retrospective study of 126 cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 26, 1: 7-13.
- Mustonen J., Huttunen N.P., Partanen J., Baer M., Paakkala A., Vapalahti O., Uhari M. 2004. Human leukocyte antigens B8-DRB1*03 in pediatric patients with *nephropathia epidemica* caused by Puumala hantavirus. *Pediatric Infectious Diseases Journal*, 23, 10: 959-961.
- Mustonen J., Partanen J., Kanerva M., Pietila K., Vapalahti O., Pasternack A., Vaheri A. 1996. Genetic susceptibility to severe course of *nephropathia epidemica* caused by Puumala hantavirus. *Kidney International*, 49, 1: 217-221.
- Mustonen J., Partanen J., Kanerva M., Pietila K., Vapalahti O., Pasternack A., Vaheri A. 1998. Association of HLA B27 with benign clinical course of *nephropathia epidemica* caused by Puumala hantavirus. *Scandinavian Journal of Immunology*, 47, 3: 277-279.
- Nemirov K., Andersen H.K., Leirs H., Henttonen H., Vaheri A., Lundkvist A., Plyusnin A. 2004. Saaremaa hantavirus in Denmark. *Journal of Clinical Virology*, 30, 3: 254-257.
- Nemirov K., Lundkvist A., Vaheri A., Plyusnin A. 2003a. Adaptation of Puumala hantavirus to cell culture is associated with point mutations in the coding region of the L segment and in the noncoding regions of the S segment. *Journal of Virology*, 77, 16: 8793-8800.
- Nemirov K., Vapalahti O., Lundkvist A., Vasilenko V., Golovljova I., Plyusnina A., Niemimaa J., Laakkonen J., Henttonen H., Vaheri A., Plyusnin A. 1999. Isolation and

- characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *Journal of General Virology*, 80: 371-379.
- Nemirov K., Vapalahti O., Papa A., Plyusnina A., Lundkvist A., Antoniadis A., Vaheri A., Plyusnin A. 2003b. Genetic characterization of new Dobrava hantavirus isolate from Greece. *Journal of Medical Virology*, 69, 3: 408-416.
- Netski D., Thran B.H., St Jeor S.C. 1999. Sin Nombre virus pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*. *Journal of Virology*, 73, 1: 585-591.
- Nichol S.T., Spiropoulou C.F., Morzunov S., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Feldmann H., Sanchez A., Childs J., Zaki S., Peters C.J. 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 262, 5135: 914-917.
- Niklasson B., Kjellsson T. 1988. Detection of *nephropathia epidemica* (Puumala virus)-specific immunoglobulin M by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 8: 1519-1523.
- Nuutinen H., Vuoristo M., Farkkila M., Kahri A., Seppala K., Valtonen V., Joutsiniemi T., Miettinen T. 1992. Hemorrhagic gastropathy in epidemic nephropathy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 38, 4: 476-480.
- Padula P.J., Edelstein A., Miguel S.D., Lopez N.M., Rossi C.M., Rabinovich R.D. 1998. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology*, 241, 2: 323-330.
- Pal E., Strle F., Avsic-Zupanc T. 2005. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Pomurje region of Slovenia--an 18-year survey. *Wien Klin Wochenschr Journal*, 117, 11-12: 398-405.
- Papa A., Johnson A.M., Stockton P.C., Bowen M.D., Spiropoulou C.F., Alexiou-Daniel S., Ksiazek T.G., Nichol S.T., Antoniadis A. 1998. Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. *Journal of Medical Virology*, 55, 4: 321-327.
- Peebles R.S., Jr., Graham B.S. 2001. Viruses, dendritic cells and the lung. *Respiratory Research*, 2, 4: 245-249.
- Peters C.J., Simpson G.L., Levy H. 1999. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annual Reviews in Medicine*, 50, 531-545.
- Pettersson L., Klingstrom J., Hardestam J., Lundkvist A., Ahlm C., Evander M. 2008. Hantavirus RNA in saliva from patients with hemorrhagic Fever with renal syndrome. *Emerging Infectious Disease*, 14, 3: 406-411.
- Plyusnin A. 2002. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Archives of Virology*, 147, 4: 665-682.
- Plyusnin A., Cheng Y., Lehvaslaiho H., Vaheri A. 1996. Quasispecies in wild-type tula hantavirus populations. *Journal of Virology*, 70, 12: 9060-9063.
- Plyusnin A., Horling J., Kanerva M., Mustonen J., Cheng Y., Partanen J., Vapalahti O., Kukkonen S.K., Niemimaa J., Henttonen H., Niklasson B., Lundkvist A., Vaheri A. 1997. Puumala hantavirus genome in patients with *nephropathia epidemica*: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral sequences in local rodents. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 5: 1090-1096.
- Plyusnin A., Kruger D.H., Lundkvist A. 2001. Hantavirus infections in Europe. *Advances in Virus Research*, 57, 105-136.

- Plyusnin A., Morzunov S.P. 2001. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 256, 47-75.
- Plyusnin A., Nemirov K., Apekina N., Plyusnina A., Lundkvist A., Vaheri A. 1999. Dobrava hantavirus in Russia. *Lancet*, 353: 207-207.
- Plyusnin A., Vapalahti O., Lankinen H., Lehvaslaiho H., Apekina N., Myasnikov Y., Kallio-Kokko H., Henttonen H., Lundkvist A., Brummer-Korvenkontio M. 1994. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *Journal of Virology*, 68, 12: 7833-7839.
- Radosevic Z., Mohacek I. 1954. The problem of *nephropathia epidemica* Myhrman-Zetterholm in relation to acute interstitial nephritis. *Acta Medica Scandinavia*, 149, 3: 221-228.
- Raftery M.J., Kraus A.A., Ulrich R., Kruger D.H., Schonrich G. 2002. Hantavirus infection of dendritic cells. *Journal of Virology*, 76, 21: 10724-10733.
- Ramsden C., Holmes E.C., Charleston M.A. 2009. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Molecular Biology and Evolution*, 26, 1: 143-153.
- Ramsden C., Melo F.L., Figueiredo L.M., Holmes E.C., Zanotto P.M. 2008. High rates of molecular evolution in hantaviruses. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 7: 1488-1492.
- Rasmuson J., Andersson C., Norrman E., Haney M., Evander M., Ahlm C. 2011. Time to revise the paradigm of hantavirus syndromes? Hantavirus pulmonary syndrome caused by European hantavirus. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30, 5: 685-690.
- Raymond T., Gorbunova E., Gavrillovskaya I.N., Mackow E.R. 2005. Pathogenic hantaviruses bind plexin-semaphorin-integrin domains present at the apex of inactive, bent alphavbeta3 integrin conformers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102, 4: 1163-1168.
- Razzauti M., Plyusnina A., Henttonen H., Plyusnin A. 2008. Accumulation of point mutations and reassortment of genomic RNA segments are involved in the microevolution of Puumala hantavirus in a bank vole (*Myodes glareolus*) population. *Journal of General Virology*, 89: 1649-1660.
- Rollin P.E., Coudrier D., Sureau P. 1994. Hantavirus epidemic in Europe, 1993. *Lancet*, 343: 115-116.
- Saksida A. 2008. Pomen imunskih dejavnikov in virusnega bremena v patogenezi bunjavirusnih hemoragičnih mrzlic. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 128 str.
- Saksida A. 2011. Bunjavirusi. V: Medicinska virologija. Poljak M., Petrovec M.(ur.), Ljubljana, Medicinski razgledi: 169-181.
- Saksida A., Duh D., Korva M., Avsic-Zupanc T. 2008. Dobrava virus RNA load in patients who have hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 197, 5: 681-685.
- Saksida A., Wraber B., Avsic-Zupanc T. Serum levels of inflammatory and regulatory cytokines in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *BMC Infectious Diseases*, 11: 142, doi:10.1186/1471-2334-11-142: 8.
- Schmaljohn C., Hjelle B. 1997. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 2: 95-104.

- Schmaljohn C.S., Hasty S.E., Dalrymple J.M., LeDuc J.W., Lee H.W., von Bonsdorff C.H., Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A., Tsai T.F., Regnery H.L. 1985. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science*, 227, 4690: 1041-1044.
- Schmaljohn C.S., Jennings G.B., Hay J., Dalrymple J.M. 1986. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology*, 155, 2: 633-643.
- Schonrich G., Rang A., Lutteke N., Raftery M.J., Charbonnel N., Ulrich R.G. 2008. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunology Reviews*, 225, 163-189.
- Schultze D., Lundkvist A., Blauenstein U., Heyman P. 2002. Tula virus infection associated with fever and exanthema after a wild rodent bite. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21, 4: 304-306.
- Settergren B., Leschinskaya E., Zagidullin I., Fazlyeva R., Khunafina D., Niklasson B. 1991. Hemorrhagic fever with renal syndrome: comparison of clinical course in Sweden and in the Western Soviet Union. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 23, 5: 549-552.
- Sibold C., Meisel H., Lundkvist A., Schulz A., Cifire F., Ulrich R., Kozuch O., Labuda M., Kruger D.H. 1999. Short report: simultaneous occurrence of Dobrava, Puumala, and Tula Hantaviruses in Slovakia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 3: 409-411.
- Sironen T., Klingstrom J., Vaheri A., Andersson L.C., Lundkvist A., Plyusnin A. 2008. Pathology of Puumala hantavirus infection in macaques. *PLoS ONE*, 3, 8: e3035. doi: 10.1371/journal.pone.0003035: 6.
- Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. 2005. Phylogenetic evidence for the distinction of Saaremaa and Dobrava hantaviruses. *Virology Journal*, 2, 90.
- Song J.W., Gu S.H., Bennett S.N., Arai S., Puorger M., Hilbe M., Yanagihara R. 2007a. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virology Journal*, 4, 114.
- Song J.W., Kang H.J., Song K.J., Truong T.T., Bennett S.N., Arai S., Truong N.U. in Yanagihara R. 2007b. Newfound hantavirus in Chinese mole shrew, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 11: 1784-1787.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. doi:10.1093/molbev/msr121: 10.
- Taylor S.L., Frias-Staheli N., Garcia-Sastre A., Schmaljohn C.S. 2009a. Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin alpha proteins and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappa B. *Journal of Virology*, 83, 3: 1271-1279.
- Taylor S.L., Krempel R.L., Schmaljohn C.S. 2009b. Inhibition of TNF-alpha-induced activation of NF-kappaB by hantavirus nucleocapsid proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171, S86-S93.
- Temonen M., Mustonen J., Helin H., Pasternack A., Vaheri A., Holthofer H. 1996. Cytokines, adhesion molecules, and cellular infiltration in *nephropathia epidemica* kidneys: an immunohistochemical study. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 78, 1: 47-55.

- Terajima M., Hayasaka D., Maeda K., Ennis F.A. 2007. Immunopathogenesis of hantavirus pulmonary syndrome and hemorrhagic fever with renal syndrome: Do CD8+ T cells trigger capillary leakage in viral hemorrhagic fevers? *Immunology Letters*, 113, 2: 117-120.
- Terajima M., Hendershot J.D., 3rd, Kariwa H., Koster F.T., Hjelle B., Goade D., DeFronzo M.C., Ennis F.A. 1999. High levels of viremia in patients with the Hantavirus pulmonary syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 180, 6: 2030-2034.
- Thorsby E. 1997. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Human Immunology*, 53, 1: 1-11.
- Tuuminen T., Kekalainen E., Makela S., Ala-Houhala I., Ennis F.A., Hedman K., Mustonen J., Vaheri A., Arstila T.P. 2007. Human CD8+ T cell memory generation in Puumala hantavirus infection occurs after the acute phase and is associated with boosting of EBV-specific CD8+ memory T cells. *Journal of Immunology*, 179, 3: 1988-1995.
- Van Epps H.L., Terajima M., Mustonen J., Arstila T.P., Corey E.A., Vaheri A., Ennis F.A. 2002. Long-lived memory T lymphocyte responses after hantavirus infection. *Journal Experimental Medicine*, 196, 5: 579-588.
- Vapalahti O., Lundkvist A., Kukkonen S.K., Cheng Y., Gilljam M., Kanerva M., Manni T., Pejcoch M., Niemimaa J., Kaikusalo A., Henttonen H., Vaheri A., Plyusnin A. 1996. Isolation and characterization of Tula virus, a distinct serotype in the genus Hantavirus, family *Bunyaviridae*. *Journal of General Virology*, 77, 3063-3067.
- Vapalahti O., Lundkvist A., Vaheri A. 2001. Human immune response, host genetics, and severity of disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 256, 153-169.
- Vapalahti O., Mustonen J., Lundkvist A., Henttonen H., Plyusnin A., Vaheri A. 2003. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infectious Disease*, 3, 10: 653-661.
- Vasilenko V.A., Gavrilovskaia I.N., Apekina N.S., Rezapkin G.V., Tkachenko E.A. 1987. Detection of foci of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Estonian SSR. *Vopr Virusol Journal*, 32, 4: 464-467.
- Wang M.L., Lai J.H., Zhu Y., Zhang H.B., Li C., Wang J.P., Li Y.M., Yang A.G., Jin B.Q. 2009. Genetic susceptibility to haemorrhagic fever with renal syndrome caused by Hantaan virus in Chinese Han population. *International Journal of Immunogenetics*, 36, 4: 227-229.
- Wells R.M., Sosa Estani S., Yadon Z.E., Enria D., Padula P., Pini N., Mills J.N., Peters C.J., Segura E.L. 1997. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerging Infectious Disease*, 3, 2: 171-174.
- Xiao R., Yang S., Koster F., Ye C., Stidley C., Hjelle B. 2006. Sin Nombre viral RNA load in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 194, 10: 1403-1409.
- Xiao S.Y., Leduc J.W., Chu Y.K., Schmaljohn C.S. 1994. Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, family *Bunyaviridae*. *Virology*, 198, 1: 205-217.
- Xiong J.P., Stehle T., Goodman S.L., Arnaout M.A. 2004. A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 39: 40252-40254.
- Yashina L.N., Abramov S.A., Gutorov V.V., Dupal T.A., Krivopalov A.V., Panov V.V., Danchinova G.A., Vinogradov V.V., Luchnikova E.M., Hay J., Kang H.J., Yanagihara

- R. 2010. Seewis virus: phylogeography of a shrew-borne hantavirus in Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Disease*, 10, 6: 585-591.
- Zaki S.R., Greer P.W., Coffield L.M., Goldsmith C.S., Nolte K.B., Foucar K., Feddersen R.M., Zumwalt R.E., Miller G.L., Khan A.S.. 1995. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *American Journal of Pathology*, 146, 3: 552-579.
- Zeller H.G., Karabatsos N., Calisher C.H., Digoutte J.P., Cropp C.B., Murphy F.A., Shope R.E. 1989. Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. II. Evidence suggesting the placement of viruses in the family *Bunyaviridae*. *Archives of Virology*, 108, 3-4: 211-227.
- Zhang Y.Z., Xiao D.L., Wang Y., Wang H.X., Sun L., Tao X.X., Qu Y.G. 2004. The epidemic characteristics and preventive measures of hemorrhagic fever with syndromes in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 25, 6: 466-469.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Tatjani Avšič-Županc se zahvaljujem za topel sprejem v laboratorij, dnevne izzive in zanimivo temo doktorske disertacije. Zahvaljujem se ji za pomoč, pogovor, nasvete in vzpodbudo v trenutkih obupa.

Zahvaljujem se prof. dr. Blanki Vidan Jeras iz Centra za tipizacijo tkiv, ki je kljub polni zasedenosti sodelovala pri nastajanju doktorske disertacije. Hvala za konstruktivne ideje in kritike, tehten pregled članka in navdušenje nad dobljenimi rezultati. Najlepša hvala tudi Sabini Kunilo Jamnik za pomoč pri tehnični izvedbi doktorske disertacije.

Najlepša hvala sodelavcem v laboratoriju za diagnostiko zoonoz, tako »bivšim«, kot tudi »novim«. Hvala Mateji, Ani, Nataši, Katji, Urški in Luku za jutranje kave, globoke pogovore, tolažbo in smeh. Brez Vas mi ne bi uspelo!!! Hvala tudi dr. Darji Duh, ki mi je pomagala pri zasnovi raziskave in njenih prvih korakih. Najlepša hvala tudi Katarini Resman, ki se je laboratoriju pridružila čisto na koncu, a je s svojim optimizmom in zagnanostjo veliko doprinesla k uspešnemu zaključku.

Hvala mag. Emilu Palu, dr. med., prof. dr. Stanki Lotrič-Furlan, dr. med., prof. dr. Francu Strletu, dr. med., dr. Jerneju Pajku, dr. med., Anici Berginc Dolenšek, dr. med., Zmagu Novaku, dr. med., mag. Branku Šibancu, dr. med., prof. dr. Marku Noč, dr. med., Silviji Mörec Jakopič, dr. med., Rafaelu Černuti, dr. med., za pomoč pri zbiranju kliničnih podatkov o bolnikih ter za tvorno sodelovanje.

Hvala članom komisije, prof. dr. Darji Žgur Bertok, prof. dr. Tatjani Avšič Županc, doc.dr. Miroslavu Petrovcu za tehten pregled naloge, za vse popravke in nasvete, ki so izboljšali disertacijo ter potrpežljivost pri prebijanju skozi bolonjski sistem doktorskega študija.

Hvala asist. strok. svet. dr. Mateji Poljšak Prijatelj in Marku Kolencu za elektronske slike »mojih« viruskov.

Hvala Barbari Škrbina, ki si je vzela čas in z lektoriranjem izboljšala doktorsko disertacijo.

Prisrčna hvala Mojci Šlenc in Vesni Stavrev, ki sta vedno le en klic daleč. Hvala, za vso podporo v kritičnih trenutkih in hvala za veselje ob uspehih.

Najbolj pa se zahvaljujem vsem mojim, ki verjamete vame in v moje sanje, me podpirate ter mi omogočate, da sem to kar sem...

PRILOGE

PRILOGA A: Preglednica bolnikov, okuženih z virusom DOB, ki smo jih vključili v raziskavo

	ID BOLNIKA	POTEK BOLEZNI	HLA B	HLA DRB1	VIRUSNO BREME [kopij RNA/ml vzorca]	VIRUS	SEQ segm. S	SEQ segm. M
D1	58	blag	B*14 B*27	DRB1*03 DRB1*15	0,00E+00	DOB		
D2	60	blag	B*08 B*51	DRB1*03 DRB1*04	0,00E+00	DOB		
D3	63	blag	B*35 B*44	DRB1*01 DRB1*11	0,00E+00	DOB		
D4	74	blag	B*44 B*51	DRB1*04 DRB1*11	0,00E+00	DOB		
D5	89	blag	B*35 B*40	ND ND	0,00E+00	DOB		
D6	98	blag	B*35 B*40	DRB1*08 DRB1*11	0,00E+00	DOB		
D7	116	blag	ND ND	DRB1*01 DRB1*16	0,00E+00	DOB		
D8	192	blag	ND ND	DRB1*04 DRB1*13	0,00E+00	DOB		
D9	300	blag	B*35 B*49	DRB1*01 DRB1*01	0,00E+00	DOB		
D10	304	blag	B*44 B*51	DRB1*01 DRB1*13	0,00E+00	DOB		
D11	306	blag	B*07 B*13	DRB1*07 DRB1*15	0,00E+00	DOB		
D12	209	blag	B*13 B*51	DRB1*07 DRB1*08	1,06E+02	DOB		
D13	298	blag	B*15 B*35	DRB1*14 DRB1*15	1,90E+02	DOB		
D14	172	blag	B*38 B*47	DRB1*07 DRB1*11	5,96E+02	DOB		
D15	100	blag	ND ND	DRB1*08 DRB1*08	1,18E+03	DOB		
D16	77	blag	ND ND	DRB1*04 DRB1*13	1,71E+03	DOB		
D17	173	blag	B*08 B*13	DRB1*03 DRB1*07	3,63E+04	DOB		
D18	218	blag	B*08 B*51	DRB1*03 DRB1*07	5,72E+04	DOB		
D19	270	blag	B*18 B*35	DRB1*01 DRB1*15	7,89E+04	DOB		+
D20	210	blag	B*14 B*38	DRB1*03 DRB1*13	6,69E+05	DOB		
D21	170	blag	B*35 B*51	DRB1*01 DRB1*04	1,30E+06	DOB		
D22	200	blag	B*07 B*57	DRB1*07 DRB1*11	1,65E+07	DOB	+	
D23	132	blag	B*14 B*44	DRB1*01 DRB1*11	2,92E+07	DOB	+	+
D24	136	blag	B*08 B*08	DRB1*03 DRB1*14	3,20E+07	DOB	+	+
D25	73	srednje težak	B*44 B*50	DRB1*04 DRB1*04	0,00E+00	DOB		
D26	274	srednje težak	B*39 B*50	DRB1*13 DRB1*16	1,15E+04	DOB	+	
D27	297	srednje težak	B*27 B*44	DRB1*07 DRB1*12	1,27E+04	DOB	+	+
D28	273	srednje težak	B*18 B*27	DRB1*01 DRB1*12	6,06E+04	DOB	+	+
D29	239	srednje težak	B*07 B*39	DRB1*14 DRB1*15	1,31E+05	DOB	+	
D30	231	srednje težak	B*44 B*44	DRB1*04 DRB1*16	6,36E+05	DOB	+	+
D31	193	srednje težak	B*51 B*55	DRB1*13 DRB1*14	8,58E+05	DOB	+	+
D32	256	srednje težak	B*35 B*41	DRB1*01 DRB1*14	3,05E+06	DOB	+	+
D33	279	srednje težak	B*27 B*35	DRB1*01 DRB1*13	5,07E+07	DOB	+	+
D34	83	težak	B*15 B*27	DRB1*11 DRB1*16	0,00E+00	DOB		
D35	91	težak	B*35 B*51	DRB1*01 DRB1*04	0,00E+00	DOB		
D36	162	težak	B*44 B*57	DRB1*07 DRB1*11	0,00E+00	DOB		
D37	166	težak	B*27 B*39	DRB1*01 DRB1*12	0,00E+00	DOB		
D38	168	težak	B*35 B*35	DRB1*08 DRB1*14	0,00E+00	DOB		
D39	203	težak	B*07 B*38	DRB1*14 DRB1*15	0,00E+00	DOB		
D40	305	težak	B*18 B*51	DRB1*04 DRB1*04	0,00E+00	DOB		
D41	106	težak	B*27 B*35	DRB1*01 DRB1*11	1,40E+02	DOB		
D42	171	težak	B*14 B*27	DRB1*01 DRB1*01	2,07E+04	DOB		
D43	134	težak	B*07 B*35	DRB1*11 DRB1*15	2,95E+04	DOB		
D44	299	težak	B*07 B*44	DRB1*08 DRB1*08	3,45E+04	DOB	+	+
D45	160	težak	B*08 B*35	DRB1*03 DRB1*04	2,12E+05	DOB		
D46	185	težak	B*07 B*35	DRB1*01 DRB1*15	2,68E+05	DOB		
D47	232	težak	B*40 B*49	DRB1*07 DRB1*13	4,35E+05	DOB		
D48	122	težak	B*27 B*44	DRB1*07 DRB1*11	4,47E+05	DOB		
D49	261	težak	B*35 B*44	DRB1*07 DRB1*11	4,60E+05	DOB	+	
D50	204	težak	B*08 B*50	DRB1*03 DRB1*07	6,51E+05	DOB		
D51	207	težak	B*07 B*40	DRB1*01 DRB1*15	8,37E+05	DOB	+	+
D52	87	težak	B*27 B*35	DRB1*11 DRB1*13	1,05E+06	DOB		
D53	205	težak	B*18 B*55	DRB1*03 DRB1*04	1,74E+06	DOB		
D54	165	težak	B*07 B*44	DRB1*07 DRB1*07	2,14E+06	DOB		
D55	215	težak	B*08 B*35	DRB1*03 DRB1*14	4,04E+06	DOB	+	+
D56	276	težak	B*07 B*27	DRB1*01 DRB1*15	4,35E+06	DOB	+	+
D57	108	težak	B*18 B*44	DRB1*07 DRB1*16	5,04E+06	DOB		
D58	169	težak	B*08 B*15	DRB1*01 DRB1*03	8,45E+06	DOB		
D59	301	težak	B*38 B*44	DRB1*13 DRB1*13	9,59E+06	DOB	+	+
D60	127	težak	B*38 B*51	DRB1*04 DRB1*13	1,58E+07	DOB		
D61	206	težak	ND ND	DRB1*01 DRB1*15	2,13E+07	DOB		
D62	130	težak	B*07 B*44	DRB1*03 DRB1*11	3,05E+07	DOB	+	+
D63	135	težak	B*14 B*35	DRB1*01 DRB1*13	4,10E+07	DOB		+
D64	118	težak	B*27 B*51	DRB1*01 DRB1*16	1,93E+08	DOB		
D65	129	težak	B*07 B*44	DRB1*04 DRB1*13	4,22E+08	DOB	+	
D66	39	smrtni izid	B*35 B*57	DRB1*15 DRB1*11	0,00E+00	DOB		
D67	57	smrtni izid	B*15 B*18	DRB1*01 DRB1*14	0,00E+00	DOB		
D68	99	smrtni izid	B*35 B*35	DRB1*07 DRB1*07	0,00E+00	DOB		
D69	275	smrtni izid	B*07 B*27	DRB1*01 DRB1*11	1,59E+05	DOB	+	+
D70	230	smrtni izid	B*35 B*55	DRB1*11 DRB1*16	5,85E+06	DOB	+	+
D71	286	smrtni izid	B*13 B*13	DRB1*07 DRB1*07	7,04E+06	DOB	+	+
D72	268	smrtni izid	B*35 B*57	DRB1*01 DRB1*01	2,45E+07	DOB	+	+

*ND - tipizacija HLA ni uspela

PRILOGA B: Preglednica bolnikov, okuženih z virusom PUU, ki smo jih vključili v raziskavo

	ID BOLNIKA	POTEK BOLEZNI	HLA B	HLA DRB1	VIRUSNO BREME [kopij RNA/ml vzorca]	VIRUS	SEQ segm. S	SEQ segm. M
P1	211	blag	B*07 B*39	DRB1*13 DRB1*15	0,00E+00	PUU		
P2	223	blag	B*35 B*51	DRB1*11 DRB1*14	0,00E+00	PUU		
P3	226	blag	B*40 B*44	DRB1*03 DRB1*11	0,00E+00	PUU		
P4	227	blag	B*18 B*27	DRB1*15 DRB1*15	0,00E+00	PUU		
P5	229	blag	B*38 B*08	DRB1*03 DRB1*13	0,00E+00	PUU		
P6	244	blag	B*07 B*55	DRB1*14 DRB1*15	0,00E+00	PUU		
P7	257	blag	B*14 B*27	DRB1*01 DRB1*07	0,00E+00	PUU		
P8	291	blag	B*07 B*14	DRB1*04 DRB1*11	0,00E+00	PUU		
P9	303	blag	B*37 B*52	DRB1*01 DRB1*01	0,00E+00	PUU		
P10	236	blag	B*13 B*14	DRB1*07 DRB1*15	3,14E+02	PUU		
P11	260	blag	B*35 B*35	DRB1*01 DRB1*07	1,09E+03	PUU		
P12	197	blag	B*35 B*51	DRB1*01 DRB1*03	1,24E+04	PUU		
P13	272	blag	B*07 B*35	DRB1*15 DRB1*15	1,63E+04	PUU		
P14	240	blag	B*15 B*27	DRB1*01 DRB1*01	1,63E+04	PUU		
P15	234	blag	B*08 B*51	DRB1*01 DRB1*01	5,19E+04	PUU		
P16	247	blag	B*40 B*57	DRB1*04 DRB1*13	5,30E+04	PUU	+	
P17	289	blag	B*18 B*51	DRB1*15 DRB1*15	5,61E+04	PUU		
P18	199	blag	B*18 B*57	DRB1*04 DRB1*13	6,54E+04	PUU	+	
P19	147	blag	B*27 B*57	DRB1*16 DRB1*16	8,48E+04	PUU		
P20	265	blag	B*35 B*57	DRB1*07 DRB1*14	1,03E+05	PUU		
P21	241	blag	B*08 B*49	DRB1*01 DRB1*07	1,10E+05	PUU		
P22	248	blag	B*18 B*38	DRB1*01 DRB1*11	1,24E+05	PUU	+	
P23	225	blag	B*35 B*44	DRB1*13 DRB1*16	1,79E+05	PUU		
P24	221	blag	B*07 B*18	DRB1*07 DRB1*13	2,96E+05	PUU		
P25	217	blag	B*35 B*55	DRB1*01 DRB1*11	3,24E+05	PUU		
P26	271	blag	B*13 B*44	DRB1*07 DRB1*07	4,71E+05	PUU		
P27	238	blag	B*35 B*40	DRB1*13 DRB1*15	4,78E+05	PUU		
P28	302	blag	B*44 B*57	DRB1*01 DRB1*11	6,02E+05	PUU		
P29	163	blag	B*07 B*27	DRB1*11 DRB1*15	6,70E+05	PUU		
P30	250	blag	B*13 B*18	DRB1*07 DRB1*15	6,72E+05	PUU	+	
P31	262	blag	B*07 B*52	DRB1*11 DRB1*15	1,07E+06	PUU	+	
P32	243	blag	ND ND	DRB1*01 DRB1*08	1,21E+06	PUU		
P33	251	blag	B*44 B*44	DRB1*01 DRB1*13	1,88E+06	PUU		
P34	149	blag	B*07 B*27	DRB1*01 DRB1*01	2,66E+06	PUU		+
P35	164	blag	B*15 B*27	DRB1*11 DRB1*16	3,84E+06	PUU		
P36	255	blag	B*35 B*51	DRB1*13 DRB1*13	3,96E+06	PUU		
P37	253	blag	B*07 B*15	DRB1*04 DRB1*15	4,03E+06	PUU		
P38	246	blag	B*27 B*41	DRB1*03 DRB1*16	4,30E+06	PUU	+	
P39	259	blag	B*18 B*51	DRB1*01 DRB1*08	5,67E+06	PUU		
P40	245	blag	B*07 B*51	DRB1*01 DRB1*15	5,97E+06	PUU		
P41	285	blag	B*35 B*51	DRB1*04 DRB1*14	9,84E+06	PUU		
P42	252	blag	B*40 B*44	DRB1*13 DRB1*13	1,46E+07	PUU	+	
P43	228	srednje težak	B*35 B*51	DRB1*11 DRB1*16	0,00E+00	PUU		
P44	266	srednje težak	B*38 B*57	DRB1*07 DRB1*13	0,00E+00	PUU		
P45	287	srednje težak	B*18 B*51	DRB1*08 DRB1*11	0,00E+00	PUU		
P46	235	srednje težak	B*27 B*44	DRB1*04 DRB1*11	4,89E+03	PUU	+	
P47	284	srednje težak	B*13 B*40	DRB1*07 DRB1*15	1,04E+05	PUU		
P48	263	srednje težak	B*40 B*57	DRB1*07 DRB1*13	1,72E+05	PUU		+
P49	254	srednje težak	B*07 B*40	DRB1*01 DRB1*15	3,96E+05	PUU	+	
P50	277	srednje težak	B*07 B*18	DRB1*11 DRB1*15	2,20E+06	PUU		
P51	278	srednje težak	B*07 B*41	DRB1*07 DRB1*15	5,88E+06	PUU		
P52	111	težak	B*35 B*51	DRB1*11 DRB1*13	0,00E+00	PUU		
P53	128	težak	B*08 B*27	DRB1*03 DRB1*13	0,00E+00	PUU		
P54	145	težak	B*07 B*27	DRB1*01 DRB1*04	0,00E+00	PUU		
P55	189	težak	B*08 B*51	DRB1*03 DRB1*13	0,00E+00	PUU		
P56	233	težak	B*13 B*51	DRB1*04 DRB1*15	0,00E+00	PUU		
P57	281	težak	B*49 B*55	DRB1*11 DRB1*13	0,00E+00	PUU		
P58	282	težak	B*15 B*40	DRB1*04 DRB1*16	0,00E+00	PUU		
P59	288	težak	B*14 B*47	DRB1*03 DRB1*13	0,00E+00	PUU		
P60	155	težak	B*07 B*51	DRB1*07 DRB1*11	3,33E+02	PUU		
P61	222	težak	B*18 B*27	DRB1*11 DRB1*16	5,01E+02	PUU		
P62	269	težak	B*38 B*56	DRB1*12 DRB1*14	2,69E+03	PUU	+	
P63	264	težak	B*13 B*35	DRB1*10 DRB1*11	4,88E+03	PUU		
P64	196	težak	B*44 B*51	DRB1*01 DRB1*11	4,89E+03	PUU		
P65	103	težak	B*15 B*51	DRB1*13 DRB1*16	6,55E+03	PUU		+
P66	121	težak	B*13 B*35	DRB1*01 DRB1*07	8,40E+03	PUU		
P67	242	težak	B*08 B*18	DRB1*03 DRB1*11	9,04E+03	PUU		
P68	120	težak	B*18 B*35	DRB1*08 DRB1*13	1,03E+04	PUU		+
P69	191	težak	B*08 B*27	DRB1*03 DRB1*16	1,39E+04	PUU		
P70	123	težak	B*27 B*38	DRB1*01 DRB1*04	1,47E+04	PUU		
P71	296	težak	B*39 B*55	DRB1*13 DRB1*13	2,31E+04	PUU		
P72	119	težak	B*38 B*44	DRB1*03 DRB1*13	2,40E+04	PUU		
P73	137	težak	B*15 B*51	DRB1*13 DRB1*15	2,43E+04	PUU		+
P74	195	težak	B*13 B*56	DRB1*01 DRB1*07	4,02E+04	PUU		
P75	184	težak	B*08 B*18	DRB1*07 DRB1*11	4,52E+04	PUU		
P76	258	težak	B*27 B*38	DRB1*13 DRB1*15	8,28E+04	PUU		
P77	124	težak	B*15 B*15	DRB1*04 DRB1*13	9,28E+04	PUU		
P78	142	težak	B*08 B*13	DRB1*03 DRB1*07	1,08E+06	PUU	+	+
P79	292	težak	B*27 B*58	DRB1*01 DRB1*13	1,43E+06	PUU		
P80	267	težak	B*15 B*27	DRB1*04 DRB1*11	1,52E+06	PUU		
P81	110	težak	B*44 B*50	DRB1*04 DRB1*07	1,60E+06	PUU		
P82	177	težak	B*15 B*44	DRB1*07 DRB1*13	2,12E+06	PUU		
P83	283	težak	B*08 B*18	DRB1*04 DRB1*11	3,94E+06	PUU	+	
P84	294	težak	B*49 B*49	DRB1*01 DRB1*07	4,20E+06	PUU		
P85	295	težak	B*07 B*15	DRB1*04 DRB1*04	5,50E+06	PUU		
P86	293	težak	B*40 B*44	DRB1*10 DRB1*16	8,51E+06	PUU	+	+
P87	280	težak	B*38 B*56	DRB1*11 DRB1*13	3,69E+07	PUU		+
P88	290	težak	B*35 B*35	DRB1*11 DRB1*13	3,88E+07	PUU		

* ND - tipizacija HLA ni uspela

BOLNIKI	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE	
HVVNP55_DORV	T G A G G A A A A G C T A A A G A A A A A G	[9548]
GI959429_DORV_30a/AF-BER	[9548]
f230	[9548]
f268	[9548]
f275	[9548]
f286	[9548]
s129	[9548]
s130	[9548]
s207	[9548]
s215	[9548]
s261	[9548]
s276	[9548]
s299	[9548]
s301	[9548]
mo259	[9548]
mo231	[9548]
mo239	[9548]
mo256	[9548]
mo273	[9548]
mo274	[9548]
mo279	[9548]
mo297	[9548]
m132	[9548]
m136	[9548]
m200	[9548]

PRILOGA F: Poravnava aminokislinskih zaporedji tarčnega odseka na segmentu M virusa DOB

BOLNIKI	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE	
HNVDBMS_DOBV GUS904035 DOBV Slo/AF-BER	Y S S L S V F I G S Q D G P I I Y S P G L F P K L N Q S S C D K V A L P L I W E G Y I D L P G Y Y E T V H P C N V F C V L S G P P G A S C E A F S E G G I F N I T	(80)
f230		(80)
f268		(80)
f275		(80)
f286		(80)
s130		(80)
s135		(80)
s207		(80)
s215		(80)
s276		(80)
s299		(80)
s301		(80)
m132		(80)
m270		(80)
mo193		(80)
mo231		(80)
mo256		(80)
mo279		(80)
mo297		(80)
mo273		(80)
BOLNIKI	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE	
HNVDBMS_DOBV GUS904035 DOBV Slo/AF-BER	S P T C L V S K Q N R F R A A E Q Q V N F V C Q R V D Q D I I Y C N G Q K K T I L T K T L V I G Q C I Y S V T S L F S I M P G V A H S I A I E L C V P G F H G	(160)
f230		(160)
f268		(160)
f275		(160)
f286		(160)
s130		(160)
s135		(160)
s207		(160)
s215		(160)
s276		(160)
s299		(160)
s301		(160)
m132		(160)
m270		(160)
mo193		(160)
mo231		(160)
mo256		(160)
mo279		(160)
mo297		(160)
mo273		(160)
BOLNIKI	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE	
HNVDBMS_DOBV GUS904035 DOBV Slo/AF-BER	W A T A A L L T T F C F G W I L I P S I T L A V L V L K F F A A I L H N S S Q E N R F K I I L R K I K E E F E R T K G S M V C E V C K Y E C E T G K E L R A H	(240)
f230		(240)
f268		(240)
f275		(240)
f286		(240)
s130		(240)
s135		(240)
s207		(240)
s215		(240)
s276		(240)
s299		(240)
s301		(240)
m132		(240)
m270		(240)
mo193		(240)
mo231		(240)
mo256		(240)
mo279		(240)
mo297		(240)
mo273		(240)
BOLNIKI	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE	
HNVDBMS_DOBV GUS904035 DOBV Slo/AF-BER	N L S C P Q S Q C P Y C F T H C E P T E S A F Q A H Y K V C Q A T H R F R D D L K K T I T P Q S T S P G C Y R T I N L F R Y K S R C Y I F T V W V T L L I E S	(320)
f230		(320)
f268		(320)
f275		(320)
f286		(320)
s130		(320)
s135		(320)
s207		(320)
s215		(320)
s276		(320)
s299		(320)
s301		(320)
m132		(320)
m270		(320)
mo193		(320)
mo231		(320)
mo256		(320)
mo279		(320)
mo297		(320)
mo273		(320)
BOLNIKI	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE	
HNVDBMS_DOBV GUS904035 DOBV Slo/AF-BER	I M W A A S A S E N V L E P S W N D N A H G V G V V P M H T D L E L D F S L P S S S K Y T Y K R K L T S P L N Q E Q S V D L H I E I E	(387)
f230		(387)
f268		(387)
f275		(387)
f286		(387)
s130		(387)
s135		(387)
s207		(387)
s215		(387)
s276		(387)
s299		(387)
s301		(387)
m132		(387)
m270		(387)
mo193		(387)
mo231		(387)
mo256		(387)
mo279		(387)
mo297		(387)
mo273		(387)

PRILOGA H: Poravnava aminokislinskih zaporedij tarčnega odseka na segmentu S virusa PUU

Seznanost	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE	
A1314600 PUUV Balkan	P T D P T G I E P D D H L K E R S S L R Y G N V L D V N A I D I E F P S G Q T A D W Y T I G V Y V I G F T L P I I L K A L Y M L S T R G R Q T V K E N K G T R I R F K D D T S F F E D I N G I R R P K H L	[100]
m247		1300
m248		1300
m250		1300
m252		1300
m262		1300
m199		1300
m266		1300
m264		1300
m235		1300
1293		1300
1142		1300
1269		1300
1283		1300
BOLNVI		1300
A1314600 PUUV Balkan	Y V S M P T A Q S T M K A E E L T P G R F R T I V C G L F P T Q I Q V R N I M S P V M G V I G F S F F V K D W S E R V R E F M E K E C P F I K P E I K P G T P P Q E A E F L K R N K V Y F M G R Q D V L	[200]
m247		1200
m248		1200
m250		1200
m252		1200
m262		1200
m199		1200
m266		1200
m264		1200
m235		1200
1293		1200
1142		1200
1269		1200
1283		1200
BOLNVI		1200
A1314600 PUUV Balkan	D K N H V A D I D K L L D Y A A S G D P T S H D N I E S P N A P W V F A C A P D R C P P T C I Y V A G M A E L G A F F S I L Q D M R N T I M A S K T V G T A E E K L K K S S F Y Q S Y L R R T Q S M G	[300]
m247		1300
m248		1300
m250		1300
m252		1300
m262		1300
m199		1300
m266		1300
m264		1300
m235		1300
1293		1300
1142		1300
1269		1300
1283		1300
BOLNVI		1300
A1314600 PUUV Balkan	I Q L D Q R I I L L Y M L E W G K E M V D H F H L G D D M D P E L R G L A Q A L I D Q K V K E I	[348]
m247		1348
m248		1348
m250		1348
m252		1348
m262		1348
m199		1348
m266		1348
m264		1348
m235		1348
1293		1348
1142		1348
1269		1348
1283		1348

HLA-Associated Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Disease Progression in Slovenian Patients[∇]

Miša Korva,¹ Ana Saksida,¹ Sabina Kunilo,² Blanka Vidan Jeras,² and Tatjana Avšič-Županc^{1*}

*Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Zaloška 4, Ljubljana, Slovenia,¹
and Blood Transfusion Center of Slovenia, Tissue Typing Center, Šljajmerjeva 6, Ljubljana, Slovenia²*

Received 23 May 2011/Returned for modification 27 June 2011/Accepted 13 July 2011

Major histocompatibility complex (MHC) class I and class II genes regulate the balance between appropriate aggressive responses and invading pathogens while minimizing the destruction of host tissue. Several studies have shown that in hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) patients, the disease outcome is determined by a complex interaction between the virus and immunopathologic and human genetic factors. In Slovenia, the severity of the disease caused by Puumala virus (PUUV) is significantly lower than that of HFRS due to Dobrava virus (DOBV). We have determined 23 different HLA-B and 12 different HLA-DRB1 types in Slovenian HFRS patients. Comparison of HLA frequencies between healthy individuals and HFRS patients showed no strong association with the susceptibility for hantaviral infection. Significant associations were recognized when the patient group was separated according to the virus responsible for the infection. DOBV-infected patients have a significantly higher frequency of HLA-B*35 than PUUV-infected patients. For HLA class II genes, the biggest difference between the PUUV- and DOBV-infected groups of patients was in HLA-DRB1*13, where this phenotype was more frequent in PUUV-infected patients, especially in the severe form of the disease. HLA-B*07 could play a protective role in PUUV-caused HFRS in the Slovenian population. Our study shows diverse associations of HLA molecules with DOBV- and PUUV-induced HFRS, and therefore, we presume that different hantaviruses are presented differently through the same HLA molecules and that this might lead to either a more severe or a milder form of the disease. In line with this idea, we have noticed that HLA-B*35 might be a genetic risk factor for DOBV infection in the Slovenian population.

The genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae*, encompasses several pathogenic viruses which cause two systemic infectious diseases, hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Eurasia and hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) in the Americas. In Europe, hantavirus disease is an endemic zoonosis that affects tens of thousands of individuals per year (11). Puumala virus (PUUV), Dobrava virus (DOBV), Saaremaa virus (SAAV), Tula virus (TULV), and Seoul virus (SEOV) have been proven to circulate in Europe, but the disease is mainly caused by PUUV in northern and western Europe and by DOBV in the central Europe and Balkan region (11).

Slovenia is a country in central Europe touching the Alps and bordering the Mediterranean. It covers an area of 20,273 square kilometers and has a population of 2.06 million people. Despite being a small country, it was shown that four types of hantaviruses, but not SEOV, circulate in the country (1, 2, 17).

In Slovenia, HFRS is caused by PUUV and DOBV hantaviruses, but the clinical severity varies greatly. In all, PUUV is usually the cause of a milder form of disease and DOBV is mainly responsible for more severe cases of the disease, with up to a 10% mortality rate (3, 25). The disease is clinically characterized by a sudden onset of acute fever, headache, back and abdominal pain, myalgia, nausea, vomiting, and transient myopia. In more severe cases, acute renal insufficiency needs

to be treated with transient hemodialysis, and hemorrhagic manifestations due to capillary leak syndrome are observed (8, 20).

Hantavirus pathogenesis is likely to be a complex multifactorial process that includes contributions from immune responses, platelet dysfunction, and the deregulation of endothelial cell barrier functions (21). In humans, hantaviruses elicit a strong immune response which seems to be an essential part of virus-associated pathogenesis (27). A mixed pattern of Th1 and Th2 immune response patterns and high levels of proinflammatory cytokines and their insufficient suppression by regulatory cytokines lead to harmful effects of the immune response in HFRS-infected patients (29).

The root of the adaptive immune response in humans involves the human leukocyte antigen (HLA) system. The HLA genes involved in the immune response fall into two functionally different classes: class I genes are expressed in most somatic cells, but the level of expression varies depending on the tissue involved. Class II genes are expressed only on B cells, activated T cells, macrophages, dendritic cells, and thymic epithelial cells. The role of both HLA classes is the presentation of short, pathogen-derived peptides to T cells and the consequent initiation of the adaptive immune response (15, 16). Besides the fact that the class I molecules are essential to the acquired immune response, they are also important in innate immunity as ligands for the killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) on the surface of natural killer cells. In contrast to the case for many bacterial and parasitic infections, an effective host response against viruses that contravene early innate defenses relies heavily on HLA-restricted T-cell responses (5). A genetic predisposition toward severe HFRS

* Corresponding author. Mailing address: Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Zaloška 4, 1000 Ljubljana, Slovenia. Phone: 386 1 543 7450. Fax: 386 1 543 7401. E-mail: tatjana.avsic@mf.uni-lj.si.

[∇] Published ahead of print on 20 July 2011.

disease caused by PUUV infection was shown to be associated especially with the haplotype HLA-B*08 DRB1*03:01 (22, 24, 26). Individuals with the haplotype HLA-B*08 DRB1*03:01 are prone to higher antibody production and lower production of regulatory cytokines (6). The same HLA haplotype was linked to a more rapid progression from HIV infection to AIDS (13) and with failure of the response against hepatitis B vaccine (9). In contrast, the HLA B*27 molecule, a known marker for autoimmune diseases (15), was associated with a more benign clinical course of HFRS disease in patients with PUUV infection (24) and significantly improved survival in HIV-infected individuals (7). For hantavirus infections, an association between HLA molecules and the clinical course of the disease was also shown for Sin Nombre virus (SNV), where patients with B*35:01 or DRB1*14:02 were more likely to experience a severe course of the disease or even a fatal outcome (14). In patients infected with Andes virus (ANDV), HLA B*08 was again correlated with the severe course of the disease, but HLA DRB1*15 alleles were significantly more common in a group of patients with the mild course of the disease (10).

The immunogenetic relationships between severe forms of hantaviral disease in humans are complex, but several parallels between the same alleles and different viruses suggest further investigation. In this study, we have investigated a correlation between HLA type and disease progression in hospitalized patients with HFRS in Slovenia. This study represents the first determination of HLA molecules and analysis of their possible impact on the clinical course of the disease in patients infected with DOBV.

MATERIALS AND METHODS

Patients and control group. A total of 160 patients hospitalized in Slovenia with the diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome were included in the study. Of these, 72 patients were diagnosed with DOBV infection and 88 patients with PUUV infection. During the course of the disease, the clinical diagnosis was confirmed serologically by an indirect immunofluorescence assay and by enzyme-linked immunoassay IgM and IgG tests or with one-step quantitative reverse transcription (RT)-PCR assay, as described previously (3, 18, 28).

A control group consisted of 131 randomly chosen healthy unrelated individuals. All subjects were of Slovenian nationality.

Clinical data collection. For all patients included in the study, the clinical data were collected retrospectively. In addition, patients were categorized into three different groups based on the severity of the disease. The severity of the disease was graded on the basis of clinical and laboratory parameters used in the proposed Croatian scale for grading disease severity in patients with HFRS (19), which has previously been evaluated on a group of Slovenian HFRS patients (28).

The first group comprised the patients with a fatal outcome of the disease. The second group consisted of patients with severe disease, and the third group of patients had a mild disease progression. In more detail, patients with severe disease were classified as having increased serum creatinine and urea levels (maximum values of at least 4 times the normal value), the need for hemodialysis, and the presence of hemorrhagic manifestations. Since the study was retrospective, informed consent was not obtained from patients. The research protocol was approved by the National Medical Ethics Committee of the Republic of Slovenia.

HLA typing. Genomic DNA was extracted from whole-blood samples using a DNA minikit (Qiagen) or with a DNA blood kit on an EZ1 BioRobot (Qiagen), depending on the available sample volume.

Individuals with HFRS and the control group were typed for HLA-B and HLA-DRB1 with LABType SSO typing tests (LT SSO B Locus and LT SSO DRB1 by One Lambda, Canoga Park, CA) using Luminex technology on a flow cytometer-like instrument (Labscan 100, Luminex Corporation, Austin, TX). This product is a reverse sequence-specific-oligonucleotide DNA typing assay

that uses sequence-specific oligonucleotide probes and color-coded microspheres to identify the HLA allele group.

Statistical analysis. A computer program was developed for statistical analysis. The two-tailed Fischer's exact test was used for comparison of the frequencies of individual alleles between the control group and HFRS patients. Among HFRS patients, comparisons were made between those infected with PUUV and with DOBV and according to the disease progression. The level of significance was set at a P value of <0.05 .

RESULTS

In total, the study was performed on 88 HFRS patients hospitalized due to PUUV infection and 72 HFRS patient with DOBV infection. On the basis of their clinical and laboratory parameters during the hospitalization period, patients infected with PUUV were categorized into two groups: 51 patients were assigned to the mild group and 37 patients to the severe group. In addition, 72 patients hospitalized due to DOBV infection were sorted into three groups consisting of 7 patients with a fatal outcome, 31 patients in the severe group, and 29 patients in the mild group.

Comparison of HLA-B and HLA-DRB1 phenotype frequencies in a control group versus their frequencies in patients with HFRS due to either DOBV or PUUV infection. Altogether, we determined 23 different HLA-B and 12 different DRB1 phenotypes in Slovenian HFRS patients (Table 1). Additionally, we examined 131 healthy individuals who represent a control group in the study. The frequencies established in the control group correspond to HLA frequencies in the Slovenian general population (Table 1). From HLA class I loci, only allele group HLA-B*53 showed a significant difference ($P = 0.040$) between its frequency in HFRS patients and in the control group, but this HLA type is very low in frequency in Slovenian population and was not present at all among HFRS patients. Besides HLA class I molecules, a significantly lower frequency of DRB1*03 ($P = 0.049$) was also observed in the patient group than in the control group. The lower frequency of this type was also observed when the group of patients was divided according to the virus responsible for the infection. In the group of PUUV-infected patients, the frequency of HLA-DRB1*03 was lower than its frequency in the control group (12.5% versus 23.7%; $P = 0.053$). When comparing DOBV-infected patients and the control group, no significant differences in frequencies were observed for HLA class I or II. The only distinction was a greater frequency of HLA-B*35 among patient groups infected with DOBV (34.3% versus 23.7%).

When comparing allele group frequencies of HLA-B between patients infected with DOBV and PUUV, a statistical difference was observed in the frequencies of HLA-B*35 ($P = 0.027$). The frequency of HLA-B*35 was significantly higher among DOBV-infected patients than in PUUV-infected patients (34.3% versus 18.4%). A borderline significance ($P = 0.068$) was also noticed for HLA-DRB1*13, which was, in contrast, more common in the PUUV-infected group of patients (18.3% versus 31.8%).

Comparison of HLA typing in PUUV-infected HFRS patients with different disease progressions. The results for comparison of HLA typing in PUUV-infected HFRS patients with the different disease progressions are presented in Table 2. The potential effects of HLA-B and HLA-DRB1 on disease progression were evaluated in 88 PUUV-infected Slovenian

TABLE 1. Frequencies of HLA-B and HLA-DRB1 were determined for HFRS patients and the control group and compared among groups of patients and/or the control group^a

Allele	Frequency (%) among individuals in indicated group				<i>P</i> value (relative risk) ^b			
	Control (<i>n</i> = 131)	HFRS (<i>n</i> = 160)	DOBV (<i>n</i> = 72)	PUUV (<i>n</i> = 88)	HFRS/control	DOBV/control	PUUV/control	DOBV/PUUV
B*07	24.4	18.1	19.4	18.4	NS	NS	NS	NS
B*08	13.7	11.3	11.9	11.5	NS	NS	NS	NS
B*13	6.9	8.1	6.0	10.3	NS	NS	NS	NS
B*14	3.1	5.6	7.5	4.6	NS	NS	NS	NS
B*15	7.6	8.8	6.0	11.5	NS	NS	NS	NS
B*18	16.0	12.5	9.0	16.1	NS	NS	NS	NS
B*27	13.0	18.8	19.4	19.5	NS	NS	NS	NS
B*35	23.7	24.4	34.3	18.4	NS	NS	NS	0.027
B*37	3.1	0.6	0.0	1.2	NS	NS	NS	NS
B*38	8.4	8.1	7.5	9.2	NS	NS	NS	NS
B*39	3.1	3.1	4.5	2.3	NS	NS	NS	NS
B*40	9.9	8.1	6.0	10.3	NS	NS	NS	NS
B*41	1.5	1.9	1.5	2.3	NS	NS	NS	NS
B*44	17.6	17.5	23.9	13.8	NS	NS	NS	NS
B*47	0.0	1.3	1.5	1.2	NS	NS	NS	NS
B*49	4.6	3.1	3.0	3.5	NS	NS	NS	NS
B*50	3.1	2.5	4.5	1.2	NS	NS	NS	NS
B*51	13.0	17.5	16.4	19.5	NS	NS	NS	NS
B*52	2.3	1.3	0.0	2.3	NS	NS	NS	NS
B*53	3.1	0.0	0.0	0.0	0.040 (0.0)	NS	NS	NS
B*55	4.6	4.4	4.5	4.6	NS	NS	NS	NS
B*56	0.8	1.9	0.0	3.5	NS	NS	NS	NS
B*57	6.9	6.9	6.0	8.1	NS	NS	NS	NS
B*58	3.1	0.6	0.0	1.2	NS	NS	NS	NS
DRB1*01	28.2	29.4	33.8	26.1	NS	NS	NS	NS
DRB1*03	23.7	14.4	16.9	12.5	0.049 (0.737)	NS	0.053* (0.602)	NS
DRB1*04	16.0	17.5	18.3	17.1	NS	NS	NS	NS
DRB1*07	18.3	22.5	22.5	22.7	NS	NS	NS	NS
DRB1*08	3.1	5.0	5.6	4.6	NS	NS	NS	NS
DRB1*10	0.8	1.3	0.0	2.3	NS	NS	NS	NS
DRB1*11	26.0	25.6	23.9	27.3	NS	NS	NS	NS
DRB1*12	0.8	2.5	4.2	1.1	NS	NS	NS	NS
DRB1*13	20.6	25.6	18.3	31.8	NS	NS	0.080* (1.392)	0.068*
DRB1*14	8.4	8.8	12.7	5.7	NS	NS	NS	NS
DRB1*15	22.1	19.4	16.9	21.6	NS	NS	NS	NS
DRB1*16	16.0	10.6	9.9	11.4	NS	NS	NS	NS

^a The groups comprised a control group of healthy individuals and a group of HFRS patients which was additionally separated into a DOBV-infected group and a PUUV-infected group.

^b *P* values between indicated groups were determined using the two-tailed Fischer's exact test. NS, not significant; *, borderline significant (*P* < 0.1).

patients. The HLA-B*08 haplotype was more frequent among our PUUV-infected patients with the severe outcome (18.9% versus 6.0%; *P* = 0.090). Similarly, HLA-B*15 was more frequent in patients with the severe disease progression than in patients with the mild form of the disease (18.9% versus 6.0%; *P* = 0.090). Moreover, HLA-B*56 was noticed significantly more frequently in the severe group of patients than in the control group (8.1% versus 0.8%; *P* = 0.034). On the other hand, there was a significantly lower frequency of HLA-B*07 among patients with the severe form of the disease than in the mild group of patients (8.1% versus 26.0%; *P* = 0.049). Besides the alleles already pointed out, HLA-B*57 was also significantly different when comparing groups of patients with the mild and the severe form of the disease (14.0% versus 0.0%; *P* = 0.019). The frequency of allele group HLA-B*57 was, in contrast, two times higher in the group of patients with the mild disease progression than in the control group (14.0% versus 6.9%), but the difference was not significant. Our results show that the frequency of HLA-DRB1*03 was significantly lower in the group of patients with mild disease progression

than in the control group (7.8% versus 23.7%; *P* = 0.020). HLA-DRB1*15 is suggested to have a protective role, since its frequency was significantly lower in the severe group than in the mild group of patients (8.1% versus 31.4%; *P* = 0.009). On the other hand, allele group HLA-DRB1*13 could be associated with the severe progression of the disease, since the frequency of this allele group in the severe group was 43.2% versus 23.5% in the mild group of patients (severe versus mild; *P* = 0.065) and 20.6% in the control group (severe versus control; *P* = 0.010).

Comparison of HLA typing in DOBV-infected HFRS patients with different disease progressions. HFRS patients infected with DOBV were sorted into three groups according to disease progression, and the HLA-B and HLA-DRB1 frequencies were compared among groups of patients and the control group (Table 3). In contrast to the patient group infected with PUUV, no statistically significant differences were noted among DOBV-infected patients with different clinical progressions. However, we observed higher frequencies of HLA-B*35, HLA-B*57, HLA-DRB1*01, and HLA-DRB1*11, especially

TABLE 2. Frequencies of HLA-B and HLA-DRB1 were determined for PUUV-infected patients with different disease progressions and compared among groups

Allele	Frequency (%) among individuals in indicated group			<i>P</i> value (relative risk) ^a		
	Control (<i>n</i> = 131)	Outcome		Severe/mild	Mild/control	Severe/control
		Severe (<i>n</i> = 37)	Mild (<i>n</i> = 51)			
B*07	24.4	8.1	26.0	0.049 (0.392)	NS	0.038 (0.335)
B*08	13.7	18.9	6.0	0.090* (1.797)	NS	NS
B*13	6.9	13.5	8.0	NS	NS	NS
B*14	3.1	2.7	6.0	NS	NS	NS
B*15	7.6	18.9	6.0	0.090* (1.703)	NS	0.062* (2.073)
B*18	16.0	13.5	18.0	NS	NS	NS
B*27	13.0	21.6	18.0	NS	NS	NS
B*35	23.7	13.5	22.0	NS	NS	NS
B*37	3.1	0.0	2.0	NS	NS	NS
B*38	8.4	13.5	6.0	NS	NS	NS
B*39	3.1	2.7	2.0	NS	NS	NS
B*40	9.9	5.4	14.0	NS	NS	NS
B*41	1.5	0.0	4.0	NS	NS	NS
B*44	17.6	13.5	14.0	NS	NS	NS
B*47	0.0	2.7	0.0	NS	NS	NS
B*49	4.6	5.4	2.0	NS	NS	NS
B*50	3.1	2.7	0.0	NS	NS	NS
B*51	13.0	18.9	20.0	NS	NS	NS
B*52	2.3	0.0	4.0	NS	NS	NS
B*53	3.1	0.0	0.0	NS	NS	NS
B*55	4.6	5.4	4.0	NS	NS	NS
B*56	0.8	8.1	0.0	0.073* (2.471)	NS	0.034 (3.458)
B*57	6.9	0.0	14.0	0.019 (0.0)	NS	NS
B*58	3.1	2.7	0.0	NS	NS	NS
DRB1*01	28.2	18.9	31.4	NS	NS	NS
DRB1*03	23.7	18.9	7.8	NS	0.020 (0.359)	NS
DRB1*04	16.0	24.3	11.8	NS	NS	NS
DRB1*07	18.3	21.6	23.5	NS	NS	NS
DRB1*08	3.1	2.7	5.9	NS	NS	NS
DRB1*10	0.8	5.4	0.0	NS	NS	NS
DRB1*11	26.0	32.4	23.5	NS	NS	NS
DRB1*12	0.8	2.7	0.0	NS	NS	NS
DRB1*13	20.6	43.2	23.5	0.065* (1.633)	NS	0.010 (2.215)
DRB1*14	8.4	2.7	7.8	NS	NS	NS
DRB1*15	22.1	8.1	31.4	0.009 (0.320)	NS	0.060* (0.375)
DRB1*16	16.0	13.5	9.8	NS	NS	NS

^a *P* values between control group and/or groups with indicated outcomes were determined using the two-tailed Fischer's exact test. NS, not significant; *, borderline significant (*P* < 0.1).

among DOBV-infected patients with a fatal outcome of the disease. A greater frequency of HLA-B*35 was observed when comparing patients with a fatal outcome of the disease and the control group (57.1% versus 23.7%; *P* = 0.069). Also, the frequency of allele group HLA-B*57 was greater in the group of patients with a fatal outcome than in the mild group of patients (*P* = 0.090) or the severe group of patients (*P* = 0.081). In addition, HLA-B*27 was more frequent among patients with the severe disease progression, and the frequency was twice as high as in the control group (*P* = 0.096).

DISCUSSION

In HFRS patients, the disease outcome is determined by a complex interaction between the virus and immunopathologic and human genetic factors. In Slovenia, DOBV and PUUV coexist in a single region of endemicity, and the disease caused by PUUV is significantly less severe than that of HFRS due to DOBV (3). Beyond that, differences in disease severity among

the HFRS cases caused by DOBV have been noticed (3, 4). In our study reported here, we examined HLA-B and HLA-DRB1 molecules in Slovenian HFRS patients.

First, a comparison was made between healthy individuals from the Slovenian population and HFRS patients. No strong association was observed except for HLA-B*53 and HLA-DRB1*03, where decreased frequencies were present in the patient group. In any case, in our opinion, HLA-B and HLA-DRB1 are not significantly associated with the susceptibility of an individual to hantaviral infection. More significant associations were recognized when the patient group was separated according to the virus responsible for the infection. DOBV-infected patients have a significantly higher frequency of HLA-B*35 than PUUV-infected patients, especially those with a severe outcome of the disease. An association between HLA-B*08 DRB1*03 and a severe progression of HFRS caused by PUUV has previously been reported for the Finnish population (22, 23). In our study, HLA-B*08 was also associated with a severe disease progression in PUUV-infected patients, but

TABLE 3. Frequencies of HLA-B and HLA-DRB1 were determined for DOBV-infected patients with different disease progressions and compared among groups

Allele	Frequency (%) among individuals in indicated group				P value (relative risk) ^a					
	Control (n = 131)	Outcome			Fatal/severe	Fatal/mild	Severe/mild	Fatal/control	Severe/control	Mild/control
		Fatal (n = 7)	Severe (n = 31)	Mild (n = 29)						
B*07	24.4	14.3	29.0	10.3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*08	13.7		12.9	13.8	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*13	6.9	14.3		10.3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*14	3.1		6.5	10.3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*15	7.6	14.3	6.5	3.5	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*18	16.0	14.3	9.7	6.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*27	13.0	14.3	25.8	13.8	NS	NS	NS	NS	0.096* (1.906)	NS
B*35	23.7	57.1	32.3	31.0	NS	NS	NS	0.069* (3.924)	NS	NS
B*38	8.4		9.7	6.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*39	3.1		3.2	6.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*40	9.9		6.5	6.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*41	1.5			3.5	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*44	17.6		29.0	24.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*47	0.0			3.5	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*49	4.6		3.2	3.5	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*50	3.1		3.2	6.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*51	13.0		12.9	24.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*55	4.6	14.3	3.2	3.5	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*57	6.9	28.6	3.2	3.5	0.081* (4.667)	0.090* (4.340)	NS	0.098* (4.618)	NS	NS
DRB1*01	28.2	42.9	34.4	31.3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*03	23.7		18.8	18.8	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*04	16.0		18.8	21.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*07	18.3	28.6	21.9	21.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*08	3.1		3.1	9.4	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*11	26.0	42.9	25.0	18.8	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*12	0.8		3.1	6.3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*13	20.6		18.8	21.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*14	8.4	14.3	9.4	15.6	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*15	22.1	14.3	18.8	15.6	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DRB1*16	16.0	14.3	9.4	9.4	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^a P values between control group and/or groups with indicated outcomes were determined using the two-tailed Fischer's exact test. NS, not significant; *, borderline significant (P < 0.1).

the difference in allele group frequencies was only borderline significant. No such association was observed among DOBV-infected patients. The only association between the severity of the disease and HLA haplotype in DOBV-caused HFRS was seen in the group of patients with a fatal outcome, where a greater frequency of HLA-B*35 was noted. The same HLA type has already been reported in correlation with a severe form of HCPS induced by SNV (14) and an accelerated progression to AIDS (12). Additionally, a significantly greater frequency of allele group HLA-B*56 was observed in PUUV-infected patients, especially in those with the severe disease progression. This implies that selected alleles could be a risk factor for a more severe form of PUUV-caused HFRS. Significant associations between HLA type and the severe progression of PUUV-caused disease were established for HLA class II DRB1 alleles. The greatest difference between the PUUV- and the DOBV-infected groups of patients was in HLA-DRB1*13, which was more frequent in PUUV-infected patients, especially in those with the severe form of the disease. In addition, HLA-DRB1*03 was more frequent in the severe group of patients infected with PUUV than in the mild group, but the frequency was comparable to that in the control group. In the group of patients with the mild form of the disease, the

selected HLA type was significantly less frequent than in the control group. HLA-DRB1 alleles have already been connected to the severe disease progression for PUUV-infected patients in the Finnish population (HLA-DRB1*03) (22, 23) and also with a mild form of ANDV-caused HCPS in the Chilean population (HLA-DRB1*15) (10). Similar results were observed in the Chinese Han population, where HLA-DRB1*13 and HLA-DRB1*15 were detected in fewer individuals with Hantaan virus (HTNV)-induced HFRS than in the control population, but no significant correlation was established between susceptibility to HTNV and selected allele groups (31). In the Slovenian population, a mild form of PUUV-caused HFRS was associated with HLA-DRB1*15; therefore, we think that this type might have a protective role against a severe form of the disease but does not influence the susceptibility to infection. Unfortunately, no such observation was found in DOBV-infected patients, which implies that different hantaviruses are differently processed through HLA molecules. In addition, it has been previously reported that the allele group HLA-B*27 has a protective role in PUUV- and SNV-induced disease (14, 24), but no parallel could be confirmed among Slovenian patients, neither those infected with PUUV nor those infected with DOBV. A protective role of

HLA type in the Slovenian population against the severe form of PUUV-caused HFRS could be associated with HLA-B*07, which was statistically more frequent in HFRS patients with the mild disease progression.

Major histocompatibility complex (MHC) class I and class II genes regulate the balance between appropriate aggressive responses to invading pathogens and minimized destruction of host tissue (30). Different studies concerning genetic susceptibility and the disease progression of HFRS have shown diverse associations of HLA molecules and hantavirus infection (10, 14, 22, 23, 31). Based on that and the results from our study, which show diverse associations of HLA molecules for DOBV- and PUUV-induced HFRS, we presume that different hantaviruses are presented differently through the same HLA molecules and that that might lead to either the more severe or the mild form of the disease. In their study, Wang et al. hypothesized that HLA-B*08 DRB1*3 and B*46 DRB1*09 haplotypes, which are very frequent in the Caucasian and Chinese populations, respectively, are two genetic risk factors for HFRS in those populations (31). In line with that observation, we have noticed that HLA-B*35 might be a genetic risk factor for the same disease in the Slovenian population. HLA-B*35 is a common HLA type in our population, so it is possible that hantaviruses adapt to the most frequent allele groups in a selected population. Although genetic epidemiological studies of HLA are important, they still require complementation by other, mostly large-scale studies to confirm their results because, as in the case of most human-pathogen interactions, the hantavirus disease outcome cannot be exclusively explained by human genetic factors. Our study has confirmed some previous findings about HLA type influencing the hantavirus disease outcome and exposed some new possible associations. In order to confirm our observations, further studies are needed in the Slovenian population, as well as in other countries with hantavirus infections.

ACKNOWLEDGMENT

The authors state that no potential conflict of interest exists.

REFERENCES

1. Avsic-Zupanc, T., et al. 2000. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J. Gen. Virol.* **81**:1747–1755.
2. Avsic-Zupanc, T., et al. 2007. Puumala hantavirus in Slovenia: analyses of S and M segment sequences recovered from patients and rodents. *Virus Res.* **123**:204–210.
3. Avsic-Zupanc, T., et al. 1999. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia—a 10-year survey. *Clin. Infect. Dis.* **28**:860–865.
4. Avšič-Županc, T., and M. Petrovec. 2003. Hemoragična mrzlica z reanlnim sindromom; biologija, epidemiologija in laboratorijska diagnostika. *Medicinski razgledi* **42**:147–155.
5. Blackwell, J. M., S. E. Jamieson, and D. Burgner. 2009. HLA and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:370–385.
6. Candore, G., et al. 1994. In vitro cytokine production by HLA-B8,DR3 positive subjects. *Autoimmunity* **18**:121–132.
7. Chopera, D. R., et al. 2008. Transmission of HIV-1 CTL escape variants provides HLA-mismatched recipients with a survival advantage. *PLoS Pathog.* **4**:e1000033.
8. Cosgriff, T. M. 1991. Mechanisms of disease in hantavirus infection: pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Rev. Infect. Dis.* **13**:97–107.
9. Egea, E., et al. 1991. The cellular basis for lack of antibody response to hepatitis B vaccine in humans. *J. Exp. Med.* **173**:531–538.
10. Ferrer, C. P., et al. 2007. Genetic susceptibility to Andes hantavirus: association between severity of disease and HLA alleles in Chilean patients. *Rev. Chilena Infectol.* **24**:351–359. (In Spanish.)
11. Heyman, P., A. Vaheri, A. Lundkvist, and T. Avsic-Zupanc. 2009. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **7**:205–217.
12. Itescu, S., et al. 1992. HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **5**:37–45.
13. Just, J. J. 1995. Genetic predisposition to HIV-1 infection and acquired immune deficiency virus syndrome: a review of the literature examining associations with HLA [corrected]. *Hum. Immunol.* **44**:156–169.
14. Kilpatrick, E. D., et al. 2004. Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome. *J. Immunol.* **172**:3297–3304.
15. Klein, J., and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**:702–709.
16. Klein, J., and A. Sato. 2000. The HLA system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**:782–786.
17. Korva, M., D. Duh, A. Puterle, T. Trilar, and T. Avsic-Zupanc. 2009. First molecular evidence of Tula hantavirus in *Microtus voles* in Slovenia. *Virus Res.* **144**:318–322.
18. Korva, M., D. Duh, A. Saksida, T. Trilar, and T. Avsic-Zupanc. 2009. The hantaviral load in tissues of naturally infected rodents. *Microbes Infect.* **11**:344–351.
19. Kuzman, I., et al. 2003. The biggest epidemic of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Acta Med. Croatica* **57**:337–346. (In Croatian.)
20. Linderholm, M., and F. Elgh. 2001. Clinical characteristics of hantavirus infections on the Eurasian continent. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **256**:135–151.
21. Mackow, E. R., and I. N. Gavrillovskaia. 2009. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb. Haemost.* **102**:1030–1041.
22. Makela, S., et al. 2002. Human leukocyte antigen-B8-DR3 is a more important risk factor for severe Puumala hantavirus infection than the tumor necrosis factor-alpha(-308) G/A polymorphism. *J. Infect. Dis.* **186**:843–846.
23. Mustonen, J., et al. 2004. Human leukocyte antigens B8-DRB1*03 in pediatric patients with nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**:959–961.
24. Mustonen, J., et al. 1998. Association of HLA B27 with benign clinical course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Scand. J. Immunol.* **47**:277–279.
25. Pal, E., F. Strle, and T. Avsic-Zupanc. 2005. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Pomurje region of Slovenia—an 18-year survey. *Wien Klin. Wochenschr.* **117**:398–405.
26. Plyusnin, A., et al. 1997. Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral sequences in local rodents. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1090–1096.
27. Raftery, M. J., A. A. Kraus, R. Ulrich, D. H. Kruger, and G. Schonrich. 2002. Hantavirus infection of dendritic cells. *J. Virol.* **76**:10724–10733.
28. Saksida, A., D. Duh, M. Korva, and T. Avsic-Zupanc. 2008. Dobrava virus RNA load in patients who have hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Infect. Dis.* **197**:681–685.
29. Schonrich, G., et al. 2008. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunol. Rev.* **225**:163–189.
30. Trowsdale, J. 2011. The MHC, disease and selection. *Immunol. Lett.* **137**:1–8.
31. Wang, M. L., et al. 2009. Genetic susceptibility to hemorrhagic fever with renal syndrome caused by Hantaan virus in Chinese Han population. *Int. J. Immunogenet.* **36**:227–229.