

A nyugat-nílusi vírus kimutatása humán betegmintákból: nyomon követéses vizsgálatok a 2015. évi szezonális időszakban

Nagy Anna¹ ■ Nagy Orsolya dr.¹ ■ Bán Enikő dr.¹ ■ Molnár Eszter¹
Müller Zsófia dr.² ■ Orbán Márton dr.² ■ Kecskés Borbála dr.³
Harsányi Emese Henriett dr.³ ■ Kővágó Levente dr.³ ■ Jobbágy Lajos dr.⁴
Németh Zoltán dr.⁴ ■ Várnai Zsuzsanna dr.⁵ ■ Takács Mária dr.¹

¹Országos Epidemiológiai Központ, Virologiai Főosztály, Budapest

²Fejér Megyei Szent György Egyetemi Oktató Kórház, Infektológiai Osztály, Székesfehérvár
Szent Pantaleon Kórház, ³Infektológiai Osztály, ⁴Aneszteziológiai és Intenzív Betegellátó Osztály, Dunaújváros

⁵Egyesített Szent István és Szent László Kórház-Rendelőintézet, Infektológiai Osztály, Budapest

Bevezetés: A nyugat-nílusi vírus Magyarországon is elterjedt, éves rendszerességgel humán megbetegedéseket okozó, szúnyogok által terjesztett virális zoonosis. Az akut infekciók laboratóriumi differenciáldiagnosztikája szerológiai vizsgálatokon alapul, de a molekuláris módszerek alkalmazhatósága is egyre inkább előtérbe kerül.

Célkitűzés: Vizsgálatunk célja a 2015. évi akut fertőzöttek vér-, liquor- és vizeletmintáinak molekuláris vizsgálata volt, illetve a pozitív betegek nyomon követése annak megállapítása érdekében, hogy mennyi ideig detektálható a vírus.

Módszer: Az akut fertőzött betegek mintáit indirekt immunfluoreszcens, hemagglutináció-gátlási, majd kétféle PCR-módszerrel vizsgáltuk. A pozitív mintákból a vírustörzseket Sanger-szekvenálással azonosítottuk és vírusizolálást végeztünk.

Eredmények: Öt páciens esetén nyílt lehetőség a nyomon követést elvégezni, ennek során a betegek vizeletéből hosszú ideig (a tünetek megjelenésétől számítva akár hetekig) és összehasonlítva más mintatípusokkal, magasabb koncentrációban volt kimutatható a vírus.

Következtetések: Akut fertőzések fennállásakor a vizeletminták PCR-vizsgálata járványügyi és diagnosztikai szempontból is hasznos információt szolgáltat, ezért vizeletminták beküldésével javasoljuk kiegészíteni a szerológiai diagnosztikát.

Orv Hetil. 2017; 158(20): 791–796.

Kulcsszavak: nyugat-nílusi vírus, virális encephalitis, vírusgenom-kimutató, vizelet

Detection of West Nile virus in human samples: follow-up studies during the 2015 seasonal period

Introduction: West Nile virus, a mosquito-borne viral zoonosis is responsible for human infections in Hungary. Laboratory diagnosis is based on serological tests, however the application of molecular methods has been appreciated.

Aim: The aim of the study was to investigate blood, cerebrospinal-fluid and urine samples of acutely ill patients and to follow-up PCR positive cases to ascertain the length of virus excretion.

Method: Clinical specimens were examined by indirect-immunofluorescent, haemagglutination-inhibition, two PCR tests and Sanger-sequencing. Virus isolation in case of two patients was successful.

Results: A follow-up study could be carried out in case of 5 patients. Viral nucleic acid was detectable in urine even for several weeks after symptom onset and viral RNA was present at higher concentration compared with other samples.

Conclusions: PCR analysis of urine could provide useful epidemiological and diagnostic information. Therefore, it is recommended to collect urine samples in order to supplement the serological diagnosis.

Keywords: West Nile virus, viral encephalitis, viral genome detection, urine

Nagy A, Nagy O, Bán E, Molnár E, Müller Zs, Orbán M, Kecskés B, Harsányi EH, Kővágó L, Jobbágy L, Németh Z, Várnai Zs, Takács M. [Detection of West Nile virus in human samples: follow-up studies during the 2015 seasonal period]. *Orv Hetil.* 2017; 158(20): 791–796.

(Beérkezett: 2017. március 19.; elfogadva: 2017. április 13.)

Rövidítések

PCR = polimeráz láncreakció; West Nile virus = nyugat-nílusi vírus; WNF = (West Nile fever) nyugat-nílusi láz; WNND = (West Nile neuroinvasive disease) nyugat-nílusi neurológiai tünetegyüttes

A nyugat-nílusi vírus (West Nile virus) a *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségéhez tartozó arbovírus, azaz ízeltlábú vektorok által terjesztett virális zoonosis, amelyet először 1937-ben izoláltak egy lázas nő véréből, Uganda „West Nile” nevű tartományában [1]. Az elmúlt évtizedekben világszerte elterjedt, mára Európa számos országában endémiássá vált. Magyarországon szinte valamennyi megye érintett, azonban a laboratóriumilag igazolt fertőzések túlnyomó többsége a középső és keleti országrész térségére koncentrálódik.

A vírusnak kilenc feltételezett genetikai leszármazási vonala (úgynevezett *lineage*) ismert, amelyek közül az 1-es és 2-es lineage hozható bizonyíthatóan összefüggésbe humán infekciókkal [1]. Az elmúlt évek humán kutatásokkal kapcsolatos és az állatorvosi területen nyert adatai szerint Magyarországon elsősorban *lineage-2* nyugat-nílusi vírus cirkulációja figyelhető meg, így az emberi infekciók hátterében is a 2-es leszármazási vonalhoz tartozó vírustörzsek állhatnak [2–4]. Mivel azonban korábban – 2003-ban egy lúdfarmon kitört járvány során – már volt precedens *lineage-1* vírustörzs jelenlétének igazolására is, előfordulása és humán kóroki szerepe nem zárható ki egyértelműen [5, 6]. Az elmúlt években pedig egy feltételezett, új, 9. genetikai vonal megjelenését is leírták az országban, egyelőre csak *Uranotaenia unguiculata* szúnyogokban [7, 8]. A vírus transzmissziójában elsősorban szúnyogvektorok – különös tekintettel a *Culex* genus tagjai – vesznek részt, amely szúnyogok alapvetően ornitofil vektorok, azonban véletlenszerűen emlősöket is csíphetnek, ezzel átterjesztve a fertőzést például madarakról lóra, emberre [1]. Az ember úgynevezett fertőzőési zsákutca, a szúnyogcsípés általi emberről emberre történő terjedési út ez idáig nem ismert. Ritkább transzmissziós lehetőség a transzplacentáris, laktáció általi vagy transzfúzióhoz, esetleg szervdonációhoz köthető fertőződés [9, 10]. Az inkubációs idő átlagosan 2–14 nap között változik, azonban fontos megjegyezni, hogy a szúnyogcsípés pontos időpontja nehezen behatárolható. A betegség előfordulása, a vektorok életciklusából adódóan, szezonálisat mutat, az igazolt fertőzések hal-

mozottan jelennek meg az augusztustól októberig terjedő időszakban. Az esetek jelentős hányada szubklinikai, aspecifikus tünetekkel kísért [1]. A klinikailag manifesztálódó megbetegedések egy része enyhébb lefolyású, jellemző tünetek a láz, izületi és izomfájdalmak, maculopapularis és rosoliform exanthemák [1, 11]. Az enyhébb klinikai tünetekkel jellemezhető formát a szakirodalom nyugat-nílusi láz (West Nile fever – WNF) néven különíti el [1]. Az esetek egy kisebb százalékában alakul ki a súlyosabb kórlefeljárású és esetenként maradványtünetek kialakulásával kísért neurológiai tünetegyüttes (West Nile neuroinvasive disease – WNND), amely túlnyomórészt aszeptikus meningitis, encephalitis, ritkábban *poliomyelitis*zerű flaccid paralysis, Guillain–Barré-szindróma formájában zajlik, de kialakulhat tudatvesztés is, amely súlyosabb esetekben fatális kimenetelű [1, 9, 12]. A neurológiai kórforma kialakulásában rizikócsoportnak számít az idősebb, 65 év feletti korosztály, esetükben a prognózis is sokkal rosszabb. Humán használatra alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható vakcina még nem érhető el, illetve specifikus terápia sem áll rendelkezésre. Jelenlegi ismereteink szerint az egyetlen terápiás lehetőség a tüneti kezelés alkalmazása [10]. A laboratóriumi diagnosztika elsősorban szerológiai vizsgálatokon alapul, amely kapcsán fontos kiemelni, hogy hazánkban a nyugat-nílusi vírus mellett egy másik, humán megbetegedést okozó flavivírus, a kullancsencephalitis-vírus is endémiás, miközben az utóbbi időben a trópusi területekről importálható egyéb flavivírusok (Dengue, Zika, sárgaláz) irányába is megnőtt a vizsgálatkérések száma. Mindemellett a flavivírus-fertőzések szerológiai differenciáldiagnosztikáját jelentősen komplikálhatják a szerológiai keresztreakciók, amely a nemzetségre jellemző jelenség és valamennyi szerodiagnosztikai eljárásban tapasztalható. Ezért, részben a diagnosztika segítése végett – mintegy kiegészítő módszerként –, részben pedig járványügyi szempontból releváns információ nyérése céljából az Országos Epidemiológiai Központ Virális Zoonosisok Nemzeti Referencia Laboratóriuma 2014-től a molekuláris diagnosztikai eljárásokat is bevezette a nyugat-nílusi vírusfertőzések rutindiagnosztikájába. Szemben a korábban elterjedt vélekedéssel – miszerint a rövid ideig tartó viraemia miatt a PCR-alapú módszerek alkalmazhatósága megkérdőjelezhető –, az elmúlt három év tapasztalata azt mutatja, hogy a vírus jó eséllyel mutatható ki akut fertőzötték vizeletmintájából, több esetben pedig a vírusizolálás is sikeresen elvégezhető volt [1, 3,

13–17]. Mivel szakirodalmi adatok szerint vizeletmintában a vírus hosszabb ideig és magasabb koncentrációban ürül, célunk azon akut betegek megfigyelése és nyomon követése volt, akiknek vizeletében jelen volt a virális nukleinsav, annak érdekében, hogy meghatározzuk, mennyi ideig detektálható a nyugat-nílusi vírus vizeletmintáikból. Az akut fertőzések elbírálása a szerológiai és PCR-eredmények együttes figyelembevételével történik, valószínűsíthető vagy igazolható kategóriákba való besorolását pedig a jelenleg is hatályban lévő, Európai Parlament és Tanács által 2012-ben jóváhagyott esetdefiníciók határozzák meg [18].

A megerősített eset laboratóriumi kritériuma az alábbi négy feltétel legalább egyikének teljesülése:

- A nyugat-nílusi vírus izolálása vérből vagy gerincvelői folyadékból.
- A nyugat-nílusi vírus nukleinsavának kimutatása vérből vagy gerincvelői folyadékból.
- A nyugat-nílusi vírussal szembeni specifikus ellenanyagok (IgM) kimutatása gerincvelői folyadékból.
- A nyugat-nílusi vírusra specifikus IgM magas titere és a nyugat-nílusi vírusra specifikus IgG kimutatása és megerősítés neutralizációval.

A valószínűsíthető eset laboratóriumi feltétele:

- A nyugat-nílusi vírussal szembeni specifikus ellenanyagok kimutatása vérsavóban.

Módszer

A Virális Zoonosisok Nemzeti Referencia Laboratóriumába érkező vérsavó- és liquorminták vizsgálata elsősorban szerológiai módszerekkel történt: indirekt immunfluoreszcens vizsgálattal, majd az eredmények konfirmálása hemagglutináció-gátlási próbával. A kullancsencephalitis- és nyugat-nílusi vírus specifikus ellenanyag-vizsgálatokat párhuzamosan végeztük, tekintettel a szerológiai keresztreakciók lehetőségére. Az indirekt immunfluoreszcens vizsgálat során IgG és IgM típusú ellenanyagokat egyaránt vizsgáltunk, a hemagglutináció-gátlási próbában összellenanyagszintet mértünk, illetve mivel van lehetőség hemagglutináció-gátlással IgM-pozitivitás irányába is vizsgálni a mintákat, verifikáltuk az indirekt immunfluoreszcens módszerrel kapott IgM-eredményeket is.

A szerológiai vizsgálatok alapján valószínűsíthetően vagy igazoltan akut nyugat-nílusi vírusfertőzésben szenvedő páciensek vérsavó- és – amennyiben rendelkezésre állt – teljesvér-, liquor- és vizeletmintáinak PCR-vizsgálata reverz transzkripciót követő hidrolízis vagy más néven TaqMan-próbás real-time PCR-módszerrel történt, amely módszer a nyugat-nílusi vírus 1-es és 2-es genetikai leszármazási vonalának kimutatására egyaránt alkalmas [19]. A primerek és a hidrolízispróba a virális genom konzervatív 5'UTR capsid génnel átfedő régiójára specifikusak [19]. A real-time PCR-pozitív betegminták további vizsgálata nested PCR-módszerrel történt, a genom mérsékelten változó NS3 régiójára specifikus

primerekkel [20, 21]. A nested PCR-termékek felhasználásával meghatároztuk a vírus genetikai leszármazási vonalát Sanger-féle didezoximódszeren alapuló szekvenálás segítségével.

Eredmények

A Virális Zoonosisok Nemzeti Referencia Laboratóriuma a 2015. évi szezonális időszakban összesen 22 klinikailag diagnosztizált akut nyugat-nílusi vírusfertőzést támasztott alá, amelyek közül – igazodva az Európai Parlament és Tanács által jóváhagyott esetdefiníciókhoz – kilenc eset minősül igazolhatónak, 12 valószínűsíthetőnek, egy eset pedig valószínűsíthetően aktuális vagy közelmúltban lezajlott infekciónak. A neurológiai kórforma 18 páciensnél, a nyugat-nílusi lázra jellemző kiütéses és lázas tünetek megjelenése négy betegnél volt tapasztalható.

A betegek anamnézisében trópusi országokba történő utazásra vonatkozó adat nem szerepelt, ezért ezekről a területekről importálható flavivírusok irányába nem végeztünk vizsgálatot a szerológiai keresztreakciók kizárása érdekében. A PCR-módszerrel megvizsgált összesen 22, korábbi szerológiai vizsgálatokban is pozitívnak bizonyult személy közül kilenc beteg vizeletmintájából volt kimutatható a vírus. Ezzel szemben vérsavó- vagy teljesvér-pozitivitást csak három beteg esetén tapasztaltunk,

1. táblázat | A nyomon követésben részt vett páciensek anamnesztikus adatainak rövid összefoglalása

Névkód	Lakhely (lakcím szerint)	A beküldő orvos által leírt tünetek, anamnesztikus adatok
A2015	Mátyásdomb, Fejér megye	57 éves férfi, 2015. 09. 01-jén kezdődő tünetek: láz, tudatzavar. A beküldő diagnózis: <i>encephalitis</i> . A páciens két napig intenzív terápiás ellátásra és gépi lélegeztetésre szorult, bal fülére maradandó halláskárosodást szenvedett. A tünetek kezdete előtti időszakban a beteg vadászaton vett részt Szerbiában.
B2015	Rácalmás, Pest megye	51 éves nő, 2015. 08. 30-án kezdődő tünetek: láz, zavartság. A beküldő diagnózis: <i>encephalitis</i> . Alapbetegsége: myasthenia gravis.
C2015	Dunaújváros, Pest megye	66 éves férfi, 2015. 09. 15-én kezdődő tünetek: láz, zavartság, eszméletlenség. A beküldő diagnózis: <i>encephalitis</i> . A páciens két napig intenzív terápiás ellátásra és gépi lélegeztetésre szorult, később maradványtünetek nélkül gyógyult.
D2015	Budapest	60 éves férfi, 2015. 09. 25-én kezdődő tünetek: láz, fejfájás. A beküldő diagnózis: <i>encephalitisnek megfelelő tünetek</i> .
E2015	Dunaújváros, Pest megye	53 éves férfi, 2015. 08. 31-én kezdődő tünetek: láz, ataxia. A beküldő diagnózis: <i>cerebellitis, encephalitis</i> .

2. táblázat | A nyomon követésben részt vett páciensek vérsavó- és liquormintáiból elvégzett indirekt immunfluoreszcens vizsgálat eredményei. Az eltelt napok száma a betegség kezdeti időpontja és a mintavétel közt eltelt napok számát jelöli

Név kód/minta	Eltelt napok száma	Anti-WN IgG IIF	Anti-WN IgM IIF	Anti-KE IgG IIF	Anti-KE IgM IIF
A2015/vérsavó	9 nap	≥1:320 pozitív	≥1:10 pozitív	<1:10 negatív	<1:10 negatív
A2015/liquor	9 nap	Pozitív	Pozitív	Negatív	Negatív
B2015/vérsavó	24 nap	≥1:5120 pozitív	≥1:10 pozitív	1:1280 valószínűleg keresztreakció	<1:10 negatív
B2015/liquor	16 nap	Pozitív	Pozitív	Pozitív, valószínűleg keresztreakció	Negatív
C2015/vérsavó	9 nap	≥1:1280 pozitív	≥1:10 pozitív	1:40 valószínűleg keresztreakció	<1:10 negatív
C2015/liquor	9 nap	Pozitív	Pozitív	Pozitív, valószínűleg keresztreakció	Negatív
D2015/vérsavó	11 nap	≥1:1280 pozitív	≥1:10 pozitív	1:40 valószínűleg keresztreakció	<1:10 negatív
D2015/liquor	11 nap	Pozitív	Pozitív	Kétes, valószínűleg keresztreakció	Negatív
E2015/1. vérsavó	6 nap	<1:10 negatív	≥1:10 pozitív	<1:10 negatív	<1:10 negatív
E2015/liquor	6 nap	Negatív	A minta elfogyott	Negatív	A minta elfogyott
E2015/2. vérsavó	36 nap	≥1:5120 pozitív	≥1:10 pozitív	1:1280 valószínűleg keresztreakció	<1:10 negatív

anti-WN IgG/IgM = anti-nyugat-nílusi vírus IgG/IgM; anti-KE IgG/IgM = antikullancsencephalitis-vírus IgG/IgM; IIF = indirekt immunfluoreszcens vizsgálat

3. táblázat | A nyomon követésben részt vett páciensek vérsavómintáiból elvégzett hemagglutináció-gátlási próba eredményei. Az eltelt napok száma a betegség kezdeti időpontja és a mintavétel közt eltelt napok számát jelöli

Név kód/minta	Eltelt napok száma	Anti-WN GAM HAG	Anti-WN IgM HAG	Anti-KE GAM HAG	Anti-KE IgM HAG
A2015/vérsavó	9 nap	1:320 pozitív	Pozitív	Elfogyott a minta	Elfogyott a minta
B2015/vérsavó	24 nap	1:1280 pozitív	Pozitív	1:80 valószínűleg keresztreakció	Kétes, valószínűleg keresztreakció
C2015/vérsavó	9 nap	1:2560 pozitív	Pozitív	1:20 valószínűleg keresztreakció	Kétes, valószínűleg keresztreakció
D2015/vérsavó	11 nap	1:160	Pozitív	<1:10 negatív	Nem vizsgáltuk
E2015/1. vérsavó	6 nap	1:160	Pozitív	<1:10 negatív	Negatív
E2015/2. vérsavó	36 nap	1:1280	Pozitív	1:80 valószínűleg keresztreakció	Negatív

GAM HAG = IgG-, IgM-, IgA-összellenanyagszint meghatározására szolgáló hemagglutináció-gátlási próba

a vizsgált liquorok közül pedig csak egyetlen mintából mutattuk ki a vírust a detektálhatósági határon. A vérsavóra nézve PCR-pozitív páciensek mindegyikénél jelen volt a virális nukleinsav a vizeletmintában is, a vérsavóhoz viszonyítva magasabb koncentrációban. Az ismételt mintavételt és nyomon követést öt páciensnél volt lehetőség elvégezni. A szerológiai vizsgálatokban az IgG-vegtiter, összellenanyagszint, valamint IgM-vizsgálat egyértelműsítette, hogy mind az öt betegnél aktuális nyugat-nílusi vírusfertőzés állt fenn, ugyanakkor az IgG- és összellenanyagtiter-meghatározásban tapasztalható volt szerológiai keresztreakció is a kullancsencephalitis-vírus-specifikus ellenanyagok kimutatására irányuló tesztekben (1. és 2. táblázat). Mind az öt beteg neurológiai tüneteket mutatott, anamnézisüket az 1. táblázat foglalja össze. A páciensektől érkező vérsavó- és liquorminták szerológiai vizsgálatokor egyetlen, az E2015 kóddal jelölt beteg esetén volt megfigyelhető szerokonverzió, így az aktuális fertőzés fennállását a második vérminta eredményei konfirmálták. A szerológiai vizsgálatok eredményeit a 2. és 3. táblázat tartalmazzák. Az öt, szerológiai

alapon akut fertőzöttnek minősíthető páciensről az ismételt mintavételt a hosszabb ideig tartó hospitalizáció tette lehetővé. A PCR-módszerrel történő nyomon követést elsősorban vizeletminták bevonásával végeztük, emellett két betegnél második vérminta vizsgálatára is lehetőségünk nyílt.

A PCR-vizsgálatok eredményeit a 4. táblázat foglalja össze. Az A2015 jelű páciensnél a tünetek megjelenését követő kilencedik naptól a 23. napig folyamatos volt a vizeletminták bekérése, összesen nyolc alkalommal. A 23. napon a beteget emittálták, ezt követően két kontrollvizsgálat alakalmával, a 43. és 57. napon történt ismételt mintavétel. Az ekkor vett mindkét vizeletminta PCR-vizsgálata negatív eredményt adott (4. táblázat), ezért feltételezzük, hogy a viruria a 23. és 43. napok között ért véget. A kilencedik napon vett vérsavó- és liquormintából a vírus a detektálhatósági limiten volt csak kimutatható (4. táblázat). A B2015 kódú betegről a 24. napon vett vizeletmintában a detektálhatósági határon még jelen volt a virális RNS, a viruria feltételezhetően ekkor érhetett véget. Ezzel szemben az ugyanazon napon vett vér- és

4. táblázat | A nyomon követett páciensek különböző mintáinak real-time PCR-vizsgálata során kapott eredmények. Az eltelt napok száma a betegség kezdeti időpontja és a mintavétel közt eltelt napok számát jelöli

Névkód	Eltelt napok száma	Vérsavó	Teljes vér	Liquor	Vizelet
A2015	9 nap	<i>Ct > 40,00</i>	N. m.	<i>Ct > 40,00</i>	<i>Ct 29,85</i>
	21 nap	<i>negatív</i>	N. m.	N. m.	<i>Ct 31,16</i>
	23 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Ct 28,83</i>
	43 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Negatív</i>
	57 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Negatív</i>
B2015	16 nap	N. m.	N. m.	<i>Negatív</i>	N. m.
	24 nap	<i>Negatív</i>	<i>Negatív</i>	N. m.	<i>Ct > 40,00</i>
	37 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Negatív</i>
C2015	5 nap	<i>Ct 35,85</i>	<i>Ct 27,01</i>	<i>Negatív</i>	N. m.
	8 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Ct 24,03</i>
	27 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Ct 38,16</i>
	40 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Ct > 40,00</i>
D2015	11 nap	<i>Negatív</i>	<i>Negatív</i>	<i>Negatív</i>	N. m.
	13 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Ct 35,15</i>
	27 nap	N. m.	N. m.	N. m.	<i>Ct > 40,00</i>
E2015	6 nap	<i>Ct 34,11</i>	N. m.	<i>Negatív</i>	N. m.
	36 nap	<i>Ct > 40,00</i>	N. m.	N. m.	<i>Ct 38,10</i>

Ct = threshold-cycle vagy küszöbciklus, a real-time PCR azon ciklusszáma, amelynél a fluoreszcenciaintenzitás értéke először haladja meg a háttér-fluoreszcencia értékét. Minél kisebb a Ct-érték, annál több vírust tartalmaz a minta; N. m. = nem állt rendelkezésre minta

korábbi liquorminták negatív eredményt adtak (4. táblázat).

A C2015 jelű páciens esetén a betegség kezdetétől számított 40. napig végeztük a nyomon követést, amely összesen 14 vizeletminta vizsgálatát jelentette. Valamennyi mintából detektálható volt a nyugat-nílusi vírus. A 40. napon vett vizeletmintában azonban már csak a kimutathatósági határon volt jelen a vírus nukleinsava. További kontrollvizsgálat nem történt, ezért a 40. napon lezárult a nyomon követés. Feltételezhető, hogy egy következő vizeletminta vizsgálata már negatív eredményt adott volna, a viruria a 40. nap körül érhetett véget.

A C2015 kódú betegnél látható, hogy a későbbi időpontban vett vizeletminta erősebben pozitív, összehasonlítva a korábban levett vérmintával. Továbbá ennél a betegnél a vérsavó- és teljesvér-minta külön-külön is PCR-pozitívnak bizonyult, utóbbi mintatípusból a vérsavóhoz képest nagyobb koncentrációban volt kimutatható a vírus (4. táblázat).

A D2015 jelű betegnél a 27. nap körül ért véget a viruria, az E2015 névkódú beteg vizeletmintájából pedig még a 36. napon is kimutatható volt a vírus, az ugyanazon napon vett vérmintához képest magasabb koncentrációban (4. táblázat). A real-time PCR-eredmények megerősíté-

se nested PCR-vizsgálattal történt, a genom NS3 régiójára tervezett primerekkel. A nested PCR-termékek szolgáltak a szekvenálás alapjául. Mind az öt páciens mintájából 2-es genetikai leszármazási vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírustörzset mutattunk ki.

Megbeszélés

A 2015. év szezonális időszakában összesen 21 akut és egy közelmúltban átvészelt nyugat-nílusi vírus fertőzött páciens közül kilenc esetben volt kimutatható a vírus vizeletmintából. Öt személynél volt lehetőségünk nyomon követést végezni. A kapott eredmények alapján azt valószínűsítjük, hogy a vírus hosszabb ideig és magasabb koncentrációban mutatható ki vizeletből, összehasonlítva az általunk vizsgált egyéb mintatípusokkal. A legkisebb valószínűséggel liquormintákból, míg legnagyobb eséllyel vizeletmintából volt detektálható a vírus. A kapott eredmények korrelálnak laboratóriumunk 2014-ben kísérleti jelleggel végzett vizsgálati eredményeivel, illetve más, külföldi munkacsoportok által publikált megfigyelésekkel is [3, 13–16]. A nyomon követés során tapasztaltak szerint a vizelettel való vírusürítés elhúzódó lehet, azonban a vírusürítés hossza és a betegség lefolyása, súlyossága közti összefüggés nem egyértelmű. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy valamennyi nyomon követett páciens kórelőzményében szerepelt neurológiai tünetegyüttes.

Egy beteg esetén sikerült vérsavóból és teljes vérből is kimutatni a vírust, a teljesvér-mintából magasabb koncentrációban. A jelenség egyes kísérletek szerint magyarázható azzal, hogy a vírus a vörösvértestek felszínéhez asszociáltan lehet jelen [22]. Ezért a jövőben a molekuláris diagnosztikai eljárásokba a teljesvér-minták vizsgálatát is célszerű lenne bevonni [23]. Ugyanakkor ez a mintatípus nem áll rendelkezésre minden esetben, sokszor a natív vagy szérumseparátoros vérvételi csőbe levett mintákból utólag, a laboratóriumba érkezéskor már nem nyerhető ki a teljes vér vagy külön a vörösvértest-frakció.

Következtetések

Elsősorban a vizeletminták – és amennyiben rendelkezésre áll – a teljesvér-minták PCR-módszerrel történő vizsgálata a diagnosztika egy újszerű eszköze, amely lehetőséget teremt egyrészt a szerológiai keresztreakciók vagy koinfekciógyanú miatt nehezen véleményezhető esetek diagnosztizálására, másrészt pedig a hazánkban keringő és humán fertőzések hátterében álló vírustörzsek azonosítására. A laboratóriumi gyakorlatban a szerológia mellett mára már a napi rutin részévé vált eljárás a minta beérkezését követően gyorsan elvégezhető, ezenkívül a mintavétel nem invazív jellege is könnyíti a vizsgálatot.

A járványügyi szempontból releváns adatok szolgáltatása mellett tudományos kutatások alapjául is szolgálhat a vizeletből történő direkt víruskimutatás. Az például,

hogyan alakulhat-e perzisztens vírusfertőzés, és ha igen, milyen genetikai faktorok befolyásolják mind a vírus, mind pedig a gazdaszervezet részéről, és mindez milyen hosszú távú egészségügyi kockázatot jelenthet, a virológia egy jelenleg is nyitott kérdése. A jövőben tervezzük infektivitásvizsgálatok elvégzését is a PCR-pozitív mintákból, a genetikai vonal meghatározásán túlmenően pedig a vírusgenom új generációs teljesgenom-szekvenálását is, amely módszer által vizsgálható a vírus szöveti tropizmusa, valamint esetleges heterogén populációk (kvázispeciesek) együttes jelenléte is. Mindez lehetővé teszi azon genetikai faktorok, változások azonosítását, amelyek hatással lehetnek a szöveti affinitásra és egy esetleges perzisztens fertőzés kialakulására is.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása, illetve a kapcsolódó kutatómunka intézményen kívüli anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: N. A.: Klinikussal való kapcsolattartás, mintabekérés, molekuláris vizsgálatok, szekvenálás, vírusizolálás, a kézirat megszövegezése. N. O.: Szerológiai diagnosztika, vírusizolálás, táblázatok ellenőrzése. B. E.: Szerológiai diagnosztika. M. E.: Molekuláris diagnosztika. M. Zs., O. M., K. B., H. E. H., K. L., J. L., N. Z., V. Zs.: Minta- és adatbeküldés. T. M.: A kísérletek megtervezése, adatok elemzése, a kézirat végső szövegének kialakítása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Köszönetnyilvánítás

A szerológiai vizsgálatok szakszerű technikai kivitelezéséért köszönet illeti Rausch Henriett, Gáti Ferencné, Kaposi Tamásné és Vavrikné Nagy Andrea szakasszisztenseket.

Irodalom

- [1] Barzon, L., Pacenti, M., Ulbert, S., et al.: Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2015, 13, 327–342.
- [2] Kutasi, O., Bakonyi, T., Lecollinet, S., et al.: Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *J. Vet. Intern. Med.*, 2011, 25, 586–591.
- [3] Nagy, A., Bán, E., Nagy, O., et al.: Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Arch. Virol.*, 2016, 161, 1797–1806.
- [4] Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., et al.: Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2006, 7, 181–188.
- [5] Bakonyi, T., Hubálek, Z., Rudolf, I., et al.: Novel Flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11, 225–231.
- [6] Bakonyi, T., Ivanics, É., Erdélyi, K., et al.: Lineage 1 and lineage 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2006, 12, 618–623.
- [7] Pachler, K., Lebl, K., Berer, D., et al.: Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, 20, 2119–2122.
- [8] Kemenesi, G., Dallos, B., Oldal, M., et al.: Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia unguiculata* mosquito, Hungary. *Virus Dis.*, 2014, 25, 500–503.
- [9] Sambri, V., Capobianchi, M., Charrel, R., et al.: West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2013, 19, 699–704.
- [10] Sampathkumar, P.: West Nile virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnostic, and prevention. *Mayo Clin. Proc.*, 2013, 78, 1137–1144.
- [11] Szomor, K. N., Rigó, Z., Bán, E., et al.: Serologic evidence of West Nile virus infection in patients with exanthema in Hungary. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2011, 58, 157–167.
- [12] Hayes, E. B., Sejvar, J. J., Zaki, S. R., et al.: Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11, 1174–1179.
- [13] Papa, A., Testa, T., Papadopolou, E., et al.: Detection of West Nile virus 2 in the urine of acute human infection. *J. Med. Virol.*, 2014, 86, 2142–2145.
- [14] Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., et al.: Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J. Infect. Dis.*, 2013, 208, 1086–1092.
- [15] Murray, K., Walker, C., Herrington, E., et al.: Persistent infection with West Nile virus years after initial infection. *J. Infect. Dis.*, 2010, 201, 2–4.
- [16] Tonry, J. H., Brown, C. B., Cropp, C. B., et al.: West Nile virus detection in urine. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11, 1294–1296.
- [17] Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., et al.: Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, 52, 3411–3413.
- [18] European Commission Implementing Decision, Brussels, 8.8.2012 C(2012) 5538. <http://www.fhi.no/dokumenter/23c9ecb6a.pdf> [assessed November 10, 2015].
- [19] Linke, S., Ellerbrok, H., Niedrig, M., et al.: Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, 2007, 146, 355–358.
- [20] Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., et al.: Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, 17, 920–922.
- [21] Chaskopoulou, A., Dovas, C. I., Chaintoutis, S. C., et al.: Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Euro Surveill.*, 2011, 16(31), pii=19933. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19933>
- [22] Rios, M., Daniel, S., Chancey, C., et al.: West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, 45(2), 181–186.
- [23] Lustig, Y., Mannesse, B., Koren, R., et al.: Superiority of West Nile virus RNA detection in whole blood for diagnosis of acute infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2016, 54, 2294–2297.

(Takács Mária dr.,
Budapest, Albert Flórián út 2–6., 1097
e-mail: takmar@gmail.com