



## FUNKČNÍ VZOREK

---

**Metoda detekce hantaviru Brno loanvirus (BRNV)**

**Mgr. Andrea Fořtová, Ph.D.**  
**Mgr. Jan Havierník, Ph.D.**  
**prof. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.**  
**RNDr. Jiří Salát, Ph.D.**

7347  
2023

# **Funkční vzorek**

**VÚVeL 7347/2023**

## **Metoda detekce hantaviru Brno loavirus (BRNV)**

Mgr. Andrea Fořtová, Ph.D.  
Mgr. Jan Havierník, Ph.D.  
Prof. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.  
RNDr. Jiří Salát, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

2023

ISBN: 978-80-7672-047-3

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu NU21-05-00143  
Agentury zdravotnického výzkumu Ministerstva zdravotnictví České republiky.

## **OBSAH**

1. Úvod	4
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	5
3. Popis funkčního vzorku	5
3.1. Metodika detekce RNA BRNV pomocí real-time RT-PCR	5
3.2. Výsledky	6
3.2.1. Detekce BRNV v živočišné tkáni	6
3.2.2. Ověření specifity výsledku metody	7
3.2.3. Výsledky – shrnutí	7
4. Srovnání novosti postupu	7
5. Uplatnění funkčního vzorku	7
6. Ekonomické aspekty	7
7. Seznam použité literatury	8
8. Dedikace	8

## 1. Úvod

Hantaviry patří mezi zoonotické viry s velkým významem pro veřejné zdraví. Taxonomicky jsou tyto mikroorganismy řazeny do rodu *Orthohantavirus* (čeleď Hantaviridae, řád Bunyavirales) (Khun a kol., 2020). Hantaviry mohou v nejzávažnějších případech vyvolávat život ohrožující onemocnění: hemoragickou horečku s renálním syndromem nebo hantavirový plicní syndrom (Krüger a kol., 2001). Genetická informace těchto virů je tvořena třemi segmenty RNA s negativní polaritou. Malý genomový segment kóduje virový nukleokapsidový protein, střední segment obalové glykoproteiny a velký segment RNA polymerázu (Vaheiri a kol., 2013).

Hlavními přirozenými hostiteli hantavirů jsou hlodavci, mezi další významné hostitele těchto mikroorganismů patří hmyzožravci a netopýři (Avšič-Županc a kol., 2019). Přirození hostitelé jsou pravděpodobně hantaviry infikováni dlouhodobě. Do vnějšího prostředí jsou tyto viry vylučovány močí, výkaly nebo slinami. Nejčastějším způsobem přenosu infekce na člověka je vdechnutí vylučovaných virů, méně častou cestou infekce je kousnutí infikovaným zvířetem (Avšič-Županc a kol., 2019).

Netopýři jsou rezervoárovými hostiteli více než 130 druhů virů, přičemž 60 druhů má zoonotický potenciál (Luis a kol., 2013). V nedávné době jsme objevili v netopýrech z České republiky nový hantavirus (Straková a kol., 2017), v současnosti nesoucí označení Brno loanvirus (BRNV; *Loanvirus brunaense*). V rámci následného výzkumu byla zjištěna kompletní sekvence jeho genomu. Nově identifikovaný BRNV vykazuje fylogenetickou příbuznost s jinými hantaviry přenášenými netopýři a vysokou genetickou vzdálenost od jiných známých hantavirů. BRNV byl zachycen i v Německu, Rakousku a Polsku a zdá se, že se vyskytuje zejména v netopýru rezavém (*Nyctalus noctula*). Analýza distribuce virové RNA ukázala nejvyšší přítomnost viru v játrech, plicích a ledvinách (Dafalla a kol., 2023).

Netopýr rezavý je hmyzožravý netopýr rozšířený po celé Evropě, Asii a severní Africe. Tento druh patří mezi migrující netopýry, přičemž na velké vzdálenosti migrují zejména samice (Popa-Lisseanu a Voigt, 2009). Netopýři zimující ve střední Evropě pocházejí z populací s letní oblastí výskytu vzdálenou stovky kilometrů severně, což je potřeba zohledňovat při interpretaci získaných epidemiologických dat a při managementu ochrany těchto živočichů. Netopýři rezaví hibernují ve velkých skupinách se zástupci obou pohlaví na stejném stanovišti. Vzhledem k tomu, že během zimního spánku snášejí nízké teploty, využívají jako zimoviště díry ve stromech, skalní štěrby, ale i kostelní podkroví nebo dutiny v pláštích bytových domů. V městském prostředí jsou nejčastějším přezimujícím druhem netopýrů (Celuch a Kaňuch, 2005).

Skutečnost, že tento druh netopýra se běžně nachází v lidských sídlech, může představovat potenciální riziko přenosu tohoto hantaviru na člověka nebo na domácí či hospodářská zvířata. Proto bylo důležité vyvinout kvalitní detekční metodu pro zjišťování přítomnosti hantaviru BRNV pro

prevalenční studie v netopýrech žijících v blízkosti lidí a pro případnou identifikaci přenosu infekce BRNV na člověka nebo zvířata.

## 2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku bylo zavedení metody pro záchyt hantaviru BRNV v živočišné tkáni.

## 3. Popis funkčního vzorku

### 3.1. Metodika detekce RNA BRNV pomocí real-time RT-PCR

Pro specifickou detekci přítomnosti BRNV v živočišné tkáni byla vyvinuta metoda real-time RT-PCR (reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce). Jako materiál pro testování detekce BRNV byly použity 10 % homogenáty tkání (játra, ledviny, mozek, srdce, střevo, mozek, plíce, laváž) z 57 uhynulých netopýrů rezavých pocházejících z městské aglomerace. Při této metodě je z testovaného materiálu nejprve izolována virová RNA. Izolace RNA byla provedena z 0,14 ml 10 % tkáňového homogenátu pomocí izolačního kitu QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen). Vlastní jedнокroková real-time RT-PCR reakce byla provedena za použití Luna Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs). Pro detekci RNA BRNV byly použity následující oligonukleotidy a sonda.

oligonukleotidy: RdRp-fw: 5' -TGCTCACCATTCTGATGATGC -3',

RdRp-rv: 5' -ACATTGCTTTCCATATATCCCCATT -3'

sonda: RdRp-pr: 5'-TTGAGCCTGAAGATGATGGTTCTGCATGGT -3'.

Oligonukleotidy a sonda byly navrženy s využitím sekvence RNA dependentní RNA polymerázy BRNV. Vlastní real-time RT-PCR reakce a její analýza byla provedena na LightCycler 480 II v 96 jamkové desce (Roche). Při této reakci dochází nejprve k přepisu RNA na DNA a následně je monitorováno množství vznikajících kopií cílového genu vlastní PCR reakcí v reálném čase. Při této reakci dochází k exponenciální replikaci cílového úseku nukleové kyseliny a za pomoci fluorescenčně značené sondy je vyhodnocena přítomnost a relativní množství hledané virové RNA BRNV.

Real-time RT-PCR reakce probíhala v reakční směsi o výsledném objemu 20 µl složené z:

Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix	10 µl
Luna WarmStart® RT Enzyme Mix	1 µl
primery	1,6 µl
sonda fluorescenčně značená FAM	0,4 µl
voda	5 µl
izolovaná RNA	2 µl

Teplotní profil real-time RT-PCR reakce byl následující:

reverzní transkripce	10 min při 55°C
iniciační denaturace	1 min při 95°C
45 cyklů:	
denaturace	10 s při 95°C
syntéza DNA a detekce signálu	30 s při 60°C

### 3.2. Výsledky

#### 3.2.1. Detekce BRNV v živočišné tkáni

S použitím vyvinuté metody real-time RT-PCR se podařilo prokázat BRNV v pěti jedincích netopýra rezavého z celkového počtu 57 testovaných netopýrů. Tento výsledek poukazuje na poměrně vysokou prevalenci (8,8 %) tohoto hantaviru ve skupině testovaných netopýrů rezavých.

RNA BRNV byla prokázána ve všech testovaných orgánech (játra, ledviny, mozek, srdce, střevo, mozek, plíce, laváž). Nejvyšší relativní množství RNA BRNV bylo zachyceno v játrech, kde bylo při analýze dosaženo nejnižších hodnot Cp reakce (15,2). Detekce BRNV ve všech testovaných tkáních poukazuje na širokou distribuci viru v orgánech hostitele. Zároveň je možné konstatovat, že pomocí vyvinuté metody je možné detekovat RNA BRNV v různých tkáních.

Pro účely ověření detekce BRNV v lidském séru byl pozitivní vzorek homogenátu jaterní tkáně netopýra rezavého naředit desítkovou řadou v lidském séru a pro účely porovnání byl ředěn stejným způsobem v médiu DMEM. Vzniklá ředící řada tedy obsahovala původní homogenát naředit 1:10 až 1:1000 000. Následně byla z takto připravených vzorků izolována RNA a provedena detekce BRNV pomocí vyvinuté real-time RT-PCR. RNA BRNV se podařilo detekovat ve všech vzorcích ředících řad. V případě ředění pozitivního homogenátu v médiu bylo dosaženo následujících hodnot Cp reakcí: ředění 1:10 - Cp 15,84, ředění 1:1000000 Cp 37,19. Při ředění homogenátu obsahující RNA BRNV v lidském séru byly detekovány následující hodnoty: ředění 1:10 – Cp 22,25, ředění 1:1000000 – Cp 40 (hraniční hodnota detekce). Výsledné CP hodnoty reakcí všech vzorků z obou ředících jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. 1).

Tab. 1: Cp hodnoty reakcí detekce RNA BRNV v pozitivním homogenátu ředěném v médiu nebo séru.

Ředění	médium DMEM	lidské sérum
1 : 10	15,84	22,25
1 : 100	19,62	26,07
1 : 1000	23,81	29,88
1 : 10 000	28,96	33,65
1 : 100 000	33,18	37,11
1 : 1000 000	37,19	40

### 3.2.2. Ověření specifity výsledku metody

Specifita vyvinuté metody pro detekci RNA BRNV byla ověřena pomocí dříve popsané metody nested RT-PCR pro detekci hantavirů (Klempa et al., 2006). Reversní transkripce izolované RNA byla provedena pomocí Proto Script II First Strands cDNA Synthesis kit (New England Biolabs). Vzniklá cDNA byla použita pro detekci BRNV za použití následujících sad oligonukleotidů:

a) primární PCR: HAN-L-F1: 5'- ATGTAYGTBAGTGCWGATGC-3'

HAN-L-R1: 5'- AACCA DTCWGTGCCRTCATC-3'

b) pro nested PCR: HAN-L-F2: 5'-TGCWGATGCHACIAART GGTC-3'

HAN-L-R2: 5'-GCRTCRTCWGARTGRTGDGCAA-3'

PCR reakce je cílena na vysoce konzervovanou oblast velkého segmentu hantavirů a výsledkem reakce je PCR produkt o velikosti 412 bp. Tento produkt byl následně analyzován elektroforézou v 2 % agarózovém gelu a značen pomocí EliDNA PS Green (Elizabeth Pharmacon). Produkt izolovaný z gelu byl poté sekvencován pro finální potvrzení přítomnosti RNA BRNV v původním materiálu – tkáni netopýra rezavého. Pomocí uvedené nested PCR pro detekci hantavirů a následného sekvencování PCR produktu byla potvrzena přítomnost RNA BRNV u všech pěti netopýrů, kde se podařilo zachytit RNA BRNV pomocí vyvinuté metody real-time RT-PCR.

### 3.2.3. Výsledky - shrnutí

Vyvinutá metoda detekce hantaviru BRNV pomocí real-time RT-PCR je funkční. Specifické oligonukleotidy pro syntézu konkrétního úseku nukleové kyseliny BRNV a specifická fluorescenčně značená sonda, která se váže na nově syntetizovanou oblast DNA, zaručují jednoznačné určení přítomnosti RNA BRNV ve všech testovaných tkáních.

## 4. Srovnání novosti postupů

Test detekce hantaviru BRNV metodou real-time RT PCR není podle našich informací v současné době jinde používán.

## 5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek je na pracovišti autorů zaveden a je využíván k výzkumným účelům zejména k detekci BRNV v tkáních netopýrů. Další potenciální využití vyvinutého testu spočívá v uplatnění v humánní nebo veterinární medicíně pro případné odhalení přenosu BRNV na člověka nebo domácí či hospodářská zvířata.

## 6. Ekonomické aspekty

V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout.

## 7. Seznam použité literatury

- Avšič-Županc T., Saksida A., Korva M. 2019. Hantavirus infections. *Clinical microbiology and infection* 21S:e6-e16.
- Cel'uch M., Kaňuch P. 2005. Winter activity and roosts of the noctule (*Nyctalus noctula*) in an urban area (Central Slovakia). *Lynx (Praha)* 36:39–45.
- Dafalla M., Orłowska A., Keleş S.J., Straková P., Schlottau K., Jeske K., Hoffmann B., Wibbelt G., Smreczak M., Müller T., Freuling C.M., Wang X., Rola J., Drewes S., Fereidouni S., Heckel G., Ulrich R.G. 2023. Hantavirus Brno loanvirus is highly specific to the common noctule bat (*Nyctalus noctula*) and widespread in Central Europe. *Virus genes* 59:323-332.
- Khun J.H., Adkins S., Alioto D. a kol., 2020. 2020 taxonomic update for phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. *Archives of virology* 165:3023-3072.
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., Meulen J., Krüger D.H. 2006. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerging infectious diseases* 12:838-40.
- Krüger D.H., Ulrich R., Lundkvist A. 2001. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes and infection* 3:1129-1144.
- Luis A.D., Hayman D.T.S., O'Shea T.J., Cryan P.M., Gilbert A.T., Pulliam J.R.C., a kol. 2013. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of royal society B* 280:20122753.
- Popa-Lisseanu A. G., Voigt C. C. 2009. Bats on the move. *Journal of mammalogy* 90:1283–1289.
- Straková P., Dufkova L., Širmarová J., Salát J., Bartonička T., Klempa B., Pfaff F., Höper D., Hoffmann B., Ulrich R.G., Růžek D. 2017. Novel hantavirus identified in European bat species *Nyctalus noctula*. *Infection genetics and evolution* 48:127-130.
- Vaheri A., Strandin T., Hepojoki J., Sironen T., Henttonen H., Mäkelä S., Mustonen J. 2013. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature reviews microbiology* 11:539-550.

## 8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu NU21-05-00143 Agentury zdravotnického výzkumu Ministerstva zdravotnictví České republiky.



VUVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Hudcova 296/70

621 00 Brno

Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)