Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI XCI, knj. 30.

Rezaković, Džemal

2002

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/bd15ed37-b36d-4fde-9b5a-2482564851dc

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

ISSN 1512-8245



AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XCI

Odjeljenje medicinskih nauka

Knjiga 30

Centar za medicinska istraživanja

Knjiga 1

Redakcioni odbor

Jela Grujić-Vasić, Faruk Konjhodžić, Slobodan Loga

Urednik

Džemal Rezaković
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 2002

Hantavirus u Bosni i Hercegovini – mikrobiološki, epidemiološki i klinički aspekti

Mirsada Hukić[1)]

Saradnici u projektu

Mikrobiolozi: Ake Lundkvist[2)], Paul Heilman[3)], Nijaz Tihić[1)], Zineta Delibegović[1)], Mahmud Nurkić[1)], Aida Nurikić[1)]; *Internisti:* Džemal Rezaković[4)], Denijal Tulumović[5)], Enisa Mešić[5)], Hajrija Selesković[5)], Muradif Šarić[6)]; *Infektolozi:* Sana Šabović[7)], Ekrem Jusufović[7)], Lejla Čalkić[8)]; *Neurolog:* Osman Sinanović[9)]; *Okulisti:* Kemija Slanjankić[10)], Dževdet Sarajlić[10)], *Patolozi:* Elmir Čičkušić[11)], Zinaida Karasalihović[11)]; *Transfuziolog:* Slavica Mott-Divković[12)]; *Biohemičari:* Mirjana Uzejrbegović[13)], Lejla Begić[14)]; Senada Sarihodžić[15)]; *Epidemiolozi:* Zlatko Puvačić[16)], Fahrudin Čamdžić[6)], Sead Karakaš[17)], Amer Čustović[1)], *Biolog:* Muhamed Ćurić[18)].

1) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za mikrobiologiju
2) Švedska: Swedish institute for Infectious Disease Control, Stockholm
3) Belgija: Research Laboratory for vector-borne diseases, National reference centre for Hantavirus infections, Queen Astred military Hospital/MBTC, Brussels
4) Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine
5) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Interna klinika
6) Dom zdravlja Kladanj
7) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Klinika za zarazne bolesti
8) Kantonalna bolnica Zenica
9) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Neurološka klinika
10) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Klinika za očne bolesti
11) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za patologiju
12) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za transfuziologiju
13) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za biohemiju
14) Katedra za biohemiju Medicinskog fakulteta u Tuzli
15) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za radiologiju
16) Institut za epidemiologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu
17) Kantonalni zavod za javno zdravstvo Travnik
18) Dom zdravlja Travnik

Uvod

Hantavirus (HTV) je zaseban rod u porodici Bunyaviridae. Do danas je izolirano i okarakterisano 30 različitih HTV vrsta, od kojih samo 13 ima patogeno značenje za čovjeka[1]. Svaki hantavirus primarno je vezan za jednu vrstu divljih glodara, uzrokujući kod njih perzistentnu, asimptomatsku, doživotnu infekciju. Životinje luče virus mjesecima preko urina, stolice i salivom. Čovjek se zarazi inhalacijom virusa i preko kontaminirane hrane. Klinički najvažnije vrste su: Sin Nombre (SNV) u Americi, Hantaan (HTN) i Seoul (SEO) u Aziji, te Puumala (PUU) i Dobrava (DOB) u Evropi[2]. Hantavirusi su uzročnici akutne virusne bolesti koja se karakteriše pojavom opštih simptoma i znakova, kolapsom, šokom i hemoragičnom dijatezom. HTN, PUU i DOB imaju kao glavni ciljni organ bubrege, a SNV i SNV-srodni agensi oštećuju prije svega pluća. U zavisnosti od mjesta djelovanja HTV-infekcija se može manifestovati kao akutna renalna insuficijencija, ili akutni plućni edem. HTN-infekcije, a posebno DOB infekcije mogu biti uzrok teških, pa i fatalnih krvarenja. Ključni faktor u patognezi bolesti je kapilarna propustljivost, koja dovodi do intersticijalnog edema (bubrega, pluća), akumulacije tekućine (pleura, peritoneum), hemokoncentracije i eventualno do multiplog oštećenja organa. Mehanizmi koji dovode do oštećenja endotela i kapilarne propustljivosti su nejasni, a pretpostavlja se da su uslovljeni reakcijom raznih medijatora inflamacije (NO, citokini i hemokini), ili HTV-indukovanom apoptozom[1,2,3].

Bosna i Hercegovina je od 1952. god., kada je opisan prvi slučaj hemoragične groznice sa bubrežnim sindromom (HFRS), poznata kao endemsko područje za ovu bolest[4]. Pored brojnih sporadičnih slučajeva obolijevanja na ovom području opisano je više velikih epidemija HFRS i to: 1967. [5,6], 1989. [7] i 1995. [8] godine. Epidemija HFRS u tuzlanskoj regiji u 1995. godini je prva epidemija u kojoj su dokazana dva tipa HTV: PUU sa blagim kliničkim tokom i DOB sa teškom kliničkom slikom[9,10,11]. Kliničke analize, serološka ispitivanja i izolacija virusa, jasno su pokazali da na ovom području kruže najmanje dva (PUU i DOB), a prema nekima četiri različita hantavirusa (PUU, DOB, HTN i SEO)[12,13,14,15]

Problem

Područje Bosne i Hercegovine je ostalo neispitano u pogledu zastupljenosti različitih tipova hantavirusa, njihovih genetskih osobitosti, njihovih prirodnih rezervoara i geografske distribucije. Za HFRS vezane su i druge nepoznanice, kao što su: patogenetski mehanizmi nastanka bolesti, karakteristike kliničke slike u odnosu na uzročnike, funkcionalni i morfološki poremećaji na bubrezima i drugim organima nakon prebolovane HTV-infekcije.

Ciljevi ove studije

a. Istražiti prisustvo hantavirusa u različitim regijama Federacije BiH (Tuzlanski kanton; Zenički kanton i Srednjebosanski kanton);
b. Procijeniti zastupljenost glodara: Clethrionimus glareolus, Apodemus flavicolis, Apodemus sylvaticus, Microtus arvalis, Microtus agrestis, Sorex species i Mus species, u regionu;
c. Izvršiti detekciju i procjenu seroprevalence na hantaviruse u različitih vrsta glodara;
d. Procijeniti prisustvo i genetičku heterolognost hantavirusa kod Cl. glareolus. i A. flavicolis;
e. Napraviti kartu ispitivane regije sa: naseljima, klimatskim karakteristikama, karakteristikama tla, osobinama vegetacije, distribucijom ispitivanih glodara i distribucijom hantavirusa;
f. Ispitati kliničke karakteristike infekcija uzrokovanih sa PUU i DOB;
g. Ispitati funkcionalne i morfološke promjene na bubrezima u akutnoj fazi HFRS;
h. Prospektivno pratiti pojavu funkcionalnih i morfoloških poremećaja na bubrezima nakon prebolovane HFRS;
i. Ispitati neke od patogenetskih mehanizama nastanka oboljenja;
j. Istražiti prisustvo sekvela nakon preboljele HFRS.

Materijal i metode rada

Ispitivanje će biti sprovedeno u tri kantona Federacije BiH: Tuzlanskom kantonu, Zeničko-dobojskom kantonu i Srednjebosanskom kantonu, na već definisanim endemskim žarištima HFRS. Izvršiće se epidemiološko izviđanje regiona. U mapu će se unijeti geografske karakteristike područja: klima, nadmorska visina, sastav tla, rijeke i potoci, karakteristike vegetacije (polje, šuma, vrste šume itd) i urbana područja.

Ispitivanjem će se obuhvatiti

a. 300 divljih glodara vrsta: Clethrionimus glareolus, Apodemus flavicolis, Apodemus sylvaticus, Microtus arvalis, Microtusagrestis, Sorex species, Mus species.
b. Osobe koje obole sa znacima i simptomima hemoragične groznice u naredne 3 godine.
c. 100 osoba koje su prebolovale HFRS prije 5-7 godina, a u kojih je bolest potvrđena serološkim testovima i određena vrsta uzročnika.

U svakom od kantona odabrat će se po 5 mjesta hvatanja glodara (sa oko 75 lokacija), u različitim biotopima. Glodari će se hvatati zamkama (Tomahawk ili Sherman) postavljenim u linije. Zamke će se držati 3 dana na mjestu

ANU BiH АНУ БиХ

lova i pregledati 2x dnevno. Identifikacija životinja će se vršiti morfološkim pregledom i genetskim analizama. Clethrionimus glareolus, Apodemus flavicolis, Apodemus sylvaticus, Microtus arvalis, Microtus agrestis, Sorex species i Mus species će se uzeti u dalji postupak.

Postupak obrade životinja

Nakon duboke anestezije sa eterom, životinjama će se uzimati krv iz orbitalnog plexusa. Izdvojeni serum će se do daljnje obrade držati na -20°C. Serum životinja će se ispitati testovima indirektne imunoflorescencije i ELISA na prisustvo antitijela klasa IgM i IgG na viruse: Hantaan (HTN), Dobrava (DOB), Puumala (PUU) i Seoul (SEO).

Nakon žrtvovanja životinje ekstenzijom vratne kičme uzeće se organi: pluća i bubrezi. Uzorci tkiva će se do dalje obrade držati na -70°C. Iz bubrežnog tkiva seropozitivnih glodara izvršiće se ekstrakcija RNK, koja će poslužiti za izvođenje RT-PCR uz upotrebu genus specifičnih primera za segment M.

Nakon toga će se izvesti PCR sa species specifičnim primerima. Amplificirani fragmenti biće sekvencionirani na ABI 310 Genetic Analyser. Upotrebom PHYLIP ili PAUP softverskog programa izvršiće se analiza homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih fragmenata i utvrditi filogenetska povezanost.

Obrada oboljelih od HFRS i osoba koje su preboljele HFRS

Klinička i laboratorijska obrada oboljelih od HFRS i osoba koje su preboljele HFRS biće usmjerena na otkrivanje morfoloških i funkcionalnih oštećenja svih organa, kao i na razjašnjavanje nekih patogenetskih mehanizama nastanka bolesti. Obrada će biti provođena prema utvrđenim protokolima za prospektivno i retrospektivno istraživanje: protokol I (za akutnu fazu bolesti), protokol II (za rekonvalescentnu fazu bolesti) i protokol III (za osobe koje su preboljele HFRS prije 5-7 godina). Svi predviđeni parametri biće mjereni i izražavani u standardnim mjernim jedinicama. Dobijeni podaci biće statistički obrađeni i evaluirani.

Protokol I.

a. Svim oboljelim uzeće se detaljna anamneza i uraditi fizikalni pregled. Za vrijeme trajanja bolesti pratit će se 24 časovna diureza, krvni tlak i puls. Svim ispitanicima će se uraditi virusološke, imunološke, biohemijske, a prema mogućnostima i patohistološke i imonohistohemijske pretrage. Etiološka dijagnoza postaviće se ili izolacijom virusa iz krvi i urina ili serološkim testovima za dokazivanje specifičnih imunoglobulina za HTV. Detekcija virusa u krvi i urinu vršiće se već navedenom RT-PCR metodom. Metodama indirektne imunoflorescencije i ELISA određivaće

se titrovi specifičnih antitijela, klasa IgM i IgG, na Hantaviruse: HTN, DOB, PUU i SEO. Takođe će se odrediti ukupni imunoglobulini, komplement, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-a i IFN-γ. Radi eventualne dijalize uradiće se markeri virus hepatitisa B i virus hepatitisa C.

b. Biohemijske pretrage iz krvi i urina uključuju: SE, KKS, broj trombocita, retrakciju koaguluma, vrijeme krvarenja, protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, trombinsko vrijeme, nivo fibrinogena, fibrinolizu, pojedinačne faktore koagulacije, protein C i protein S, glikemiju, acidobazni status, osmolalnost krvi i urina, urea, kreatinin, mokraćnu kiselinu, ukupne proteine, albumine, globuline, kalijum, natrijum, kalcijum, magnezijum, fosfor, bilirubin, transaminaze, urin, kvantitativnu (biuret) i kvalitativnu proteinurija (elektroforeza proteina u urinu), urea i kreatinin u urinu, elektrolite u urinu.

c. Morfološka i imunohistohemijska ispitivanja bubrega će se uraditi u onih bolesnika sa lezijom renalne funkcije, ukoliko nema kontraindikacija. Za analizu morfoloških promjena koristiće se tkivni uzorci fiksirani u formalinu i ukalupljeni u parafin. Histološki rezovi će se bojiti: hematoksilin eozinom, PAS metodom, Masson trichrom bojenjem, impregnacijom sa srebrom i Van Gieson-Weighert metodom. Za prikazivanje imunih depozita IgA, IgG, IgM, Clq i C3c koristiće se metoda direktne imunofluorescencije na tkivu smrznutom tečnim azotom. Fenotipizacija limfocita u intersticijalnom infiltratu vršila bi se metodom trostepene imunoperoksidaze sa streptavidinom uz upotrebu primarnih antitijela CD3, CD4, CD8, CD20, te upotrebom granzima i perforina za vizualiziranje aktiviranih citotoksičnih T limfocita. Istom metodom, uz upotrebu monoklonalnih antitijela na G1 i G2 glikoproteine virusne ovojnice, dokazivalo bi se prisustvo virusa u citoplazmi tubularnih epitelnih ćelija. Ekspresija adhezivnih endotelnih molekula ICAM-1 i VCAM određivala bi se imunohistohemijski na smrznutim rezovima metodom trostepene iminoperoksidaze.

d. Praćenje morfoloških i funkcionalnih promjena na organima vršiće se metodama: ultrazvučni pregled bubrega, jetre, žučne kese i slezene (sa fotografijama), EEG, vizuelni i auditivni evocirani potencijali, EMNG, pregled očnog dna metodom trozrncalne lupe, ispitivanje centralne vidne oštrine, vidnog polja vizusa i kolornog vida, kompjuterizovana tomografija mozga, RTG pluća i spirometrija.

Protokol II.

Prospektivno praćenje funkcionalnih i morfoloških poremećaja na bubrezima nakon prebolovane HFRS vršiće se u toku 3 godine. U tom periodu uradiće se 6 kontrolnih pregleda, i to: nakon 30 dana, 3 mjeseca, 6 mjeseci, godinu dana, dvije godine, tri godine.

Kontrolni pregledi će se sastojati od pažljivo uzete anamneze, fizikalnog pregleda, izmjerene 24 časovne diureze, krvnog tlaka, pulsa i nalaza: SE, KKS, trombociti, glikemija, acidobazni status, osmolalnost krvi i urina, urea, kreatinin, mokraćna kiselina, ukupni proteini, albumini, globulini, kalijum, natrijum, kalcijum, magnezijum, fosfor, bilirubini, transaminaze, urin, kvantitativna (biuret) i kvalitativna proteinurija (elektroforeza proteina u urinu), urinokultura, urea i kreatinin u urinu, elektroliti u urinu, ultrazvučni pregled, glomerularna filtracija (EDTA) i efektivni protok plazme kroz bubreg (klirens I-hipurata), renin, aldosteron, određivanja titra antitijela za HTV. Ponovno morfološko ispitivanje bubrega uradiće se u bolesnika sa značajnom lezijom bubrežne funkcije, bez obzira na to koliko je vremena proteklo od akutne faze bolesti.

Protokol III.

Retrospektivna analiza bubrežne funkcije u osoba koje su prebolovale HFRS prije 5 godina baziraće se na: pažljivo uzetoj anamnezi, fizikalnom pregledu sa posebnim osvrtom na uropoetski sistem, izmjerenoj 24 časovnoj diurezi, krvnom tlaku, ultrazvučnom pregledu bubrega sa fotografijom; biohemijskim pretragama iz krvi i urina kao za kontrolni pregled, radiološkim pretragama u onim slučajevima gdje je to potrebno za razjašnjavanje patološkog stanja; glomerularnoj filtraciji (klirens EDTA) i efektivnom renalnom protoku plazme (klirens I-hipurata); morfološkom ispitivanju bubrega u slučajevima prisustva značajne lezije renalne funkcije (ne može se predvidjeti tačan broj takvih bolesnika, pretpostavljamo da ih neće biti više od 20-30); određivanjem titra antitijela za HTV.

Trajanje i dinamika istraživanja

Trajanje projekta je 36 mjeseci (od 01. 11. 2001. god. do 01. 11. 2004. god.).

U prvoj godini obradiće se sve osobe koje su prebolovale HFRS prije 5-7 godina po predviđenoj proceduri. Svi oboljeli u toj godini biće obuhvaćeni ispitivanjem. Uhvatiće se i obraditi 100 glodara. Izvršiće se analiza i evaluacija rezultata dobijenih u prvoj godini ispitivanja.

Svi oboljeli u drugoj godini biće obuhvaćeni ispitivanjem i vršiće se kontrolni pregledi oboljelih u prvoj godini. Uhvatiće se i obraditi 100 glodara. Izvršiće se analiza i evaluacija rezultata dobijenih u prvoj i drugoj godini ispitivanja.

Svi oboljeli u trećoj godini biće obuhvaćeni ispitivanjem i vršiće se kontrolni pregledi oboljelih u prvoj i drugoj godini. Uhvatiće se i obraditi 100 glodara. Izvršiće se analiza i evaluacija svih dobijenih rezultata.

Očekivani rezultati i njihov značaj

Predviđenim istraživanjima će se jasno identifikovati vrste HTV koje kruže na području tri kantona Federacije BiH: Tuzlanskom kantonu, Zeničko-dobojskom kantonu i Srednjebosanskom kantonu.

Definisat će se prirodni rezervoari pojedinih vrsta HTV i odrediti njihova geografska distribucija.

Utvrdit će se dominantni putevi prenošenja virusa, a time i postaviti nove mjere prevencije, koje će imati za cilj smanjenje rizika zaražavanja ljudi u endemskim područjima HFRS.

Utvrdit će se uloga imunoloških mehanizama u nastanku oštećenja bubrega.

Jasno će se definisati klinička slika DOB-infekcije i PUU-infekcije.

Očekuju se funkcionalni i morfološki poremećaji na bubrezima nakon prebolovane DOB-infekcije, a ne i nakon prebolovane PUU-infekcije.

Rezultati predviđenih istraživanja olakšaće prepoznavanje i dijagnostiku HFRS.

Utvrđivanje zona sa visokim rizikom od infekcije sa HTV ima veliki značaj u prevenciji infekcije, kao i vojnomedicinski značaj u planiranju vojnih vježbi i odbrane zemlje.

АНУ БиХ АНУ БиХ

Literatura

1. **Specter S., Hodinka L.R., Young A.S.:** *Clinical Virology Manual. 3rd. Ed. Washington, D.C.* ASM Press. 2000.
2. **Clement J., Hukić M., Colson P., Lundkvist A., Niklasson B., Van Ranst M.:** *Hantaviruses: Old and New.* Inf Dis Rev 1999; 1: 57-58.
3. **Suša S.:** *Hemoragična groznica s bubrežnim sindromom.* Savremena administracija, Beograd, 1997.
4. **Simić M., Mirić V.:** *Success of application of peritoneal dialysis in a case of renal insufficiency.* Vojnosant Pregl 1952; 9: 285-290.
5. **Đorđević B.:** *Haemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia (Yugoslavia).* Folia Medica Facultatis Medicinae, Universitatis Saraeviensis, Sarajevo 1968; 3: 9-22.
6. **Rezaković Dž., Vojvodić Z., Ibrahimbegović F.:** *Study of the haemostatic defect and corpuscular element rate in the peripheral blood.* Folia Medica Facultatis Medicinae Universitatis Saraeviensis, Sarajevo 1968; 3: (3): 69-83.

7. **Gligić A., Stojanović R., Obradović M., Hlaća D., Dimković N., Diglišić G., Lukać V., Ler Z., Bogdanović R., Antonijević B., Ropac D., Avsić-Zupanić T., Leduc J.W., Ksiazek T., Yanagihara R., Gajdusek D.C.:** *Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: epidemiologic and epizootiologic fetures of a nationalwide outbreak in 1989.* Eur. J. Epidemiol, 1992; 8: 816-825.
8. **Hukić M., Kurt A., Torstensson S., Ludkvist A., Wiger D., Niklasson B.:** *Outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome in north eastern Bosnia.* Lancet 1996; 347: 56-57.
9. **Lundkvist A., Hukić M., Hörling J., Gilljam M., Nichol S., Niklasson B.:** *Puumala and Dobrava virusses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: Evidence of higly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera.* J Med Virol 1997; 53: 51-59.
10. **Clement J., Hukić M., Lundkvist A., Niklasson B.:** *Concomitant outbreak of two different Hantaviruses (HTV) in Bosnia: Abstracts.* The fourth International Conference on HFRS and Hantaviruses, March 5-7, 1998, Atlanta, Georgia USA, 105.
11. **Hukić M., Nurkić M., Niklasson B., Lundkvist A., Šabović S., Čamdžić F., Mešić E., Tihić N.:** *Mogućnost i osobitost serološke dijagnostike hemoragične groznice sa renalnim sindromom (HFRS) - hantanvirusna infekcija u sjeveroistočnoj Bosni.* Acta Medica Saliniana 1996; 25: (l-2): 43-48.
12. **Mešić E., Hukić M., Šabović S., Trnačević S., Halilbašić A.** *Renal syndrome in haemorrhagic fever in north eastern Bosnia.* Abstracts. XXXIIIrd Congresses of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Associacion. Amsterdam 1996; 110.
13. **Hukić M., Nurkić M.:** *Some epidemiological characteristics of epidemic of hemorrhagic fever with renal syndrome in north eastern Bosnia in 1995.* Proceedings of the 2nd Congress of Slovenian Microbiologists with International Participation, Portorož 1998: 392.
14. **Hukić M., Šabić S., Mešić E., Nurkić M.:** *Korelacija seološkog tipa hantanvirusa i stepena oštećenja bubrežne funkcije.* Zbornik sažetaka prvog bosansko-hercegovačkog simpozija nefrologa sa međunarodnim učešćem. Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 1997: 14.
15. **Hukić M., Nurkić M.:** *Hantanvirus-infekcije, leptospiroze i tularemija, bolesti prirodnog žarišta među vojnicima u toku rata na području sjeveroistočne Bosne.* Zbornik sažetaka I kongres infektologa, epidemiologa i mikrobiologa BiH sa međunarodnim učešćem, Sarajevo 1997: 133.