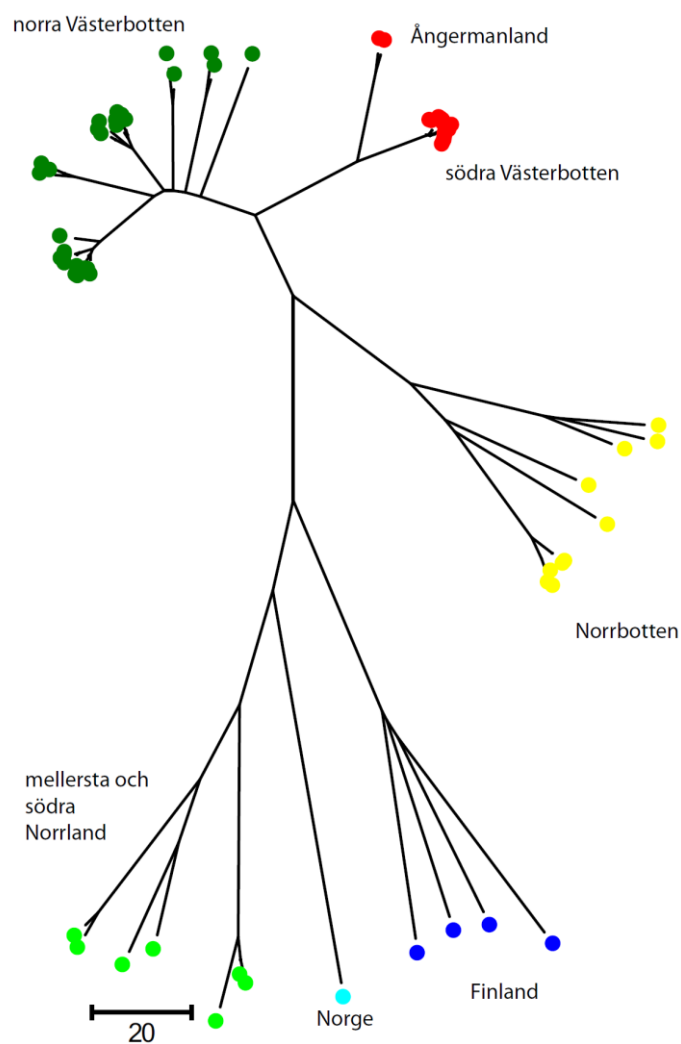


Projektrapport

UTVECKLING AV MOLEKYLÄRBIOLOGISK DETEKTION AV HANTAVIRUS



ABSTRACT

Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD) is a collaborative effort between four Swedish governmental institutes, National Food Administration, National Veterinary Institute, Swedish Institute for Communicable Disease Control and the Swedish Defence Research Agency. One of the main goals of this collaboration is harmonisation of methods and equipment between the participating authorities to increase the level of biopreparedness in Sweden.

Hantaviruses cause a large number of human diseases, making them a global public health threat. Approximately 150,000 to 200,000 patients with reported hantavirus disease need hospital treatment in Eurasia annually, and up to 5% of the patients die. Further, about 200 hantavirus cases are reported per year in America. Although the number of cases is much smaller in the Americas than in Europe and Asia, the average case mortality rate in America is very high, around 40%.

Puumala virus is the only known disease-causing hantavirus in Sweden. There is a national need to develop a quality assured molecular biological detection of Puumala virus, both for acute disease (diagnostic purposes) and for studies of the geographical distribution of this virus in Sweden.

In this project we have developed a Q-PCR based method for detection of Puumala virus intended for diagnostic use. This method can be an important complement to the current serological assays, and have the potential to detect infection before seroconversion.

Titel: Utveckling av molekylärbiologisk diagnostik av Hantavirus

Projektid: 2013

Projektgrupp: Projekt 17

Kontaktperson i FBD styrgrupp: Mats Forsman

Styrgrupp: Viveca Båverud, ordförande (SVA)
Ida Andersson (SMI)
Andreas Bråve (SMI)
Mona Byström (FOI)
Mats Forsman (FOI)
Rickard Knutsson (SVA)
Hans Lindmark (Livsmedelsverket)
Anneli Lundin Zumpe (Livsmedelsverket)

Finansiering: Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap

Layout:

Tryck:

INNEHÅLL

Abstract	2
Innehåll.....	4
Sammanfattning	6
1 Bakgrund.....	7
2 Syfte	8
2.1 Övergripande mål 2013	8
3 Material och metoder	9
3.1 QRT-PCR protokoll.....	9
3.2 Kit och reagenser	9
3.3 Positiva och negativa kontroller; serum och <i>in vitro</i> transkriberat RNA	9
4 Resultat.....	10
4.1 Delmål 1: TaqMan-protokoll för detektion av PUUV.	10
4.2 Delmål 2: Analysera om FBD:s valideringsprotokoll kan tillämpas för virusdiagnostik.	11
4.3 Delmål 3: Utvärdera ingående myndigheters olika extraktionsmetoder för optimal möjlighet till senare detektion av PUUV RNA.	12
4.4 Delmål 4: Genomföra en provningsjämförelse inom FBD med den metod vi sätter upp.....	12
5 Diskussion	13
6 Slutsatser	14
7 Förslag på fortsatt verksamhet	15
7.1 Framtida mål.....	15
7.2 Framtida utvecklingsmöjligheter	15
8 Bilagor.....	16
Bifogade bilagor:	
8.2 Valideringsprotokoll	
8.3 Provningsjämförelse	

9	Bilagor-Wiki.....	167
10	Referenser.....	18

SAMMANFATTNING

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter, Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Ett av forumets huvudmål är harmonisering av metoder och utrustning mellan de deltagande myndigheterna för att öka beredskapen i Sverige inför en eventuell B-händelse. Vid en avsiktlig eller naturlig spridning av riskklass 3 bakterier och relevanta virus är en fungerande krisberedskap, med avseende på medicinska motåtgärder och dekontaminationsförfaranden, beroende av snabba preliminära laboratorieresultat. Till skillnad från odlingsdiagnostik, som ofta ses som en gyllene standard, erbjuder molekylär diagnostik metoder som snabbare kan analysera en större mängd prover med frågeställning om riskklass 3 bakterier eller virus.

Hantavirus orsakar två allvarliga sjukdomar i människor, Hemorrhagisk feber med renalt syndrom (HFRS) och Hantavirus pulmonary syndrome (HPS), vilket gör hantavirusinfektioner till ett globalt hot mot folkhälsan. Cirka 150 000 till 200 000 hantavirusinfekterade patienter behöver årligen sjukhusvård i Europa/Asien. I Amerika rapporteras cirka 200 fall av HPS per år, med en mycket hög dödlighet (cirka 40%).

I Sverige orsakar Puumalavirus (PUUV) HFRS, i Sverige kallas denna sjukdom ofta sorkfeber eftersom PUUV:s naturliga värd är sork och för att människor smittas efter kontakt med sorkexkret som innehåller PUUV.

Det finns ett nationellt behov att utveckla en kvalitetssäkrad molekylärbiologisk detektion av PUUV, framförallt för att underlätta diagnostik men även för att bättre kunna kartlägga virusets geografiska utbredning, t.ex. genom påvisning av virus i skogssork och/eller i biobanksmaterial.

I detta projekt har vi utvecklat ett qRT-PCR system för detektion av PUUV. Primers och prob designades utifrån ett relativt sett välkonserverat område i S-segmentet. Test av systemet på akuta prover visade på en sensitivitet på 80% och en specificitet på 100%. Systemet testas under säsongen 2013/2014 parallellt med serologi på SMI, Norrlands Universitetssjukhus och Sunderbyns sjukhus för att utvärdera om det kan användas som komplement till dagens serologiska tester.

1 BAKGRUND

Hantavirus (familj *Bunyaviridae*) kan orsaka svår sjukdom i människa, ibland med hög dödlighet (1). Generellt orsakar de humanpatogena hantavirus som finns i Europa och Asien Hemorrhagisk feber med renalt syndrom (HFRS) medan hantavirus som förekommer i Amerika orsakar Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS). I Sverige orsakar Puumala virus (PUUV) HFRS (2). I Sverige går HFRS oftast under benämningen sorkfeber eller *nephropathia epidemica* (NE) (3).

Till skillnad från övriga medlemmar i familjen *Bunyaviridae* sprids inte hantavirus till människa via insekter, utan via inandning av virus som har utsöndrats av den naturliga värden (reservoaren), vilken för HFRS- och HPS-orsakande hantavirus är olika arter av gnagare. PUUV sprids till människa av skogssork. Antalet HFRS-patienter varierar kraftigt från år till år i Sverige, liksom i resten av världen. I Sverige rapporterades år 2007 över 2000 diagnostiserade fall av sorkfeber. Dödligheten i Sverige är under 1% vilket är lägre än HFRS orsakat av Dobrava virus (DOBV, finns i centrala Europa) och Hantaan virus (HTNV, finns i Asien). DOBV och HTNV har en dödlighet på 5-10%. Dödligheten i HPS är hög, cirka 40%.

Idag påvisas hantavirusinfektion genom serologi (4). En kvalitetssäkrad myndighetsövergripande molekylärbiologisk metod för detektion av PUUV saknas. Ett behov av detta finns dock, i första hand för påvisning av PUUV vid frågeställning om akut sjukdom, men även för att underlätta kartläggning av virusets geografiska utbredning i Sverige.

Förutom kvalitetssäkrade metoder för påvisning av i Sverige förekommande PUUV finns även ett behov av kvalitetssäkrade metoder för generell detektion av hantavirus som inte cirkulerar i Sverige. Detta behövs primärt för den nationella beredskapen (hemvändande resenärer och militärer under/efter utlandstjänstgöring), men också för att snabbt kunna detektera eventuellt nya typer av hantavirus i Sverige.

2 SYFTE

Övergripande mål: Det övergripande målet med FBD är att skapa och förbättra förutsättningarna för att mer effektivt använda landets samlade kapacitet och kompetens för diagnostik av biologiska riskklass 3 agens, och att genom samordning kunna utföra kvalitetssäkrad diagnostik med god kapacitet och uthållighet i händelse av storskalig spridning av allvarlig smitta.

Det övergripande målet med projekt 17 är att utveckla molekylärbiologisk diagnostik för detektion av PUUV som cirkulerar i Sverige.

Effektmål: Att bidra till att den nationella laboratoriekapaciteten för diagnostik av hantavirus har höjts.

2.1 PROJEKTMÅL 2013

Delmål 1: Vidareutvecklat det TaqMan-protokoll för detektion av PUUV baserad på S-segmentet som togs fram inom FBD år 2012 så att det kan användas för diagnostik av PUUV-infektion över hela Sverige.

Delmål 2: Analyserat om FBD:s valideringsprotokoll kan tillämpas för virusdiagnostik.

Delmål 3: Utvärderat ingående myndigheters olika extraktionsmetoder för optimal möjlighet till detektion av PUUV RNA.

Delmål 4: Genomförande av en provningsjämförelse inom FBD med den utvecklade metoden.

3 MATERIAL OCH METODER

3.1 QRT-PCR PROTOKOLL

Ett system för detektion av PUUV designades under år 2012. Detta system är baserat på tillgängliga sekvenser från PUUV i Sverige och primers och prob binder till en relativt sett välkonserverad region i S-segmentet.

Primers och prob köptes från Applied Biosystems (Life Technologies).

3.2 KIT OCH REAGENSER

FOI: Vid FOI användes QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, produktnummer 52906) för RNA-extraktion och Q-Script One-Step Fast qRT-PCR Kit (Quanta Biosciences, produktnummer WVR 733-1909) för qRT-PCR.

SVA: Vid SVA användes för RNA-extraktion Bullet Stool kit* (Diasorin, referens nummer 1.32.104) och för qRT-PCR AgPath-ID OneStep RT-PCR Kit (Applied Biosystems produktnummer 4387391).

*modifieras enligt tillverkarens anvisningar för användning på SVA.

SMI: Vid SMI användes QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, produktnummer 52906) för RNA-extraktion och TaqMan Fast Virus 1-step mastermix (LifeTechnologies, produktnummer 4444432) för qRT-PCR.

3.3 POSITIVA OCH NEGATIVA KONTROLLER; SERUM OCH *IN VITRO* TRANSKRIBERAT RNA

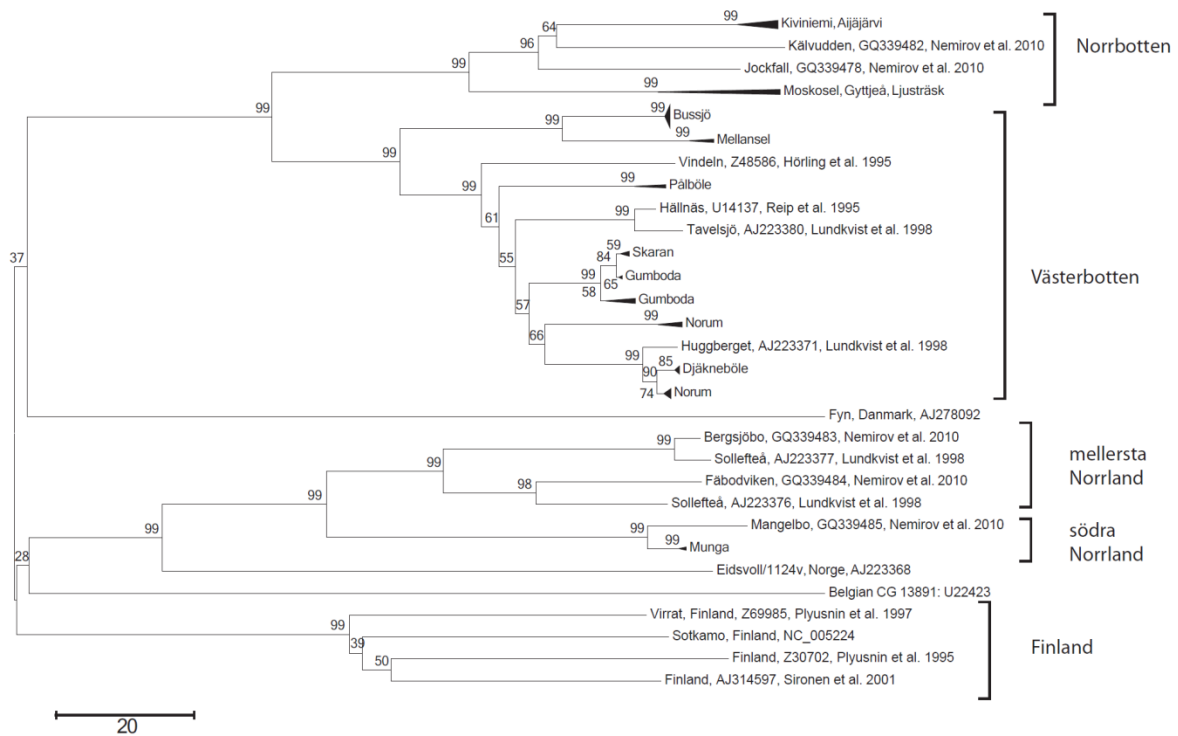
En bioinformatisk analys indikerade att den metod vi designat inte ska korsreagera med humant DNA/RNA. För att konfirmera detta kontrollerades det uppsatta qRT-PCR systemet för eventuell korsreaktivitet mot humant DNA/RNA, genom att testa humant serum från friska blodgivare (negativ kontroll). Som positiv kontroll användes serum från PUUV-infekterade patienter vars serum var positiva i serologi (det vill säga har påvisbara anti-PUUV antikroppar) för akut PUUV-infektion.

In vitro transkriberat RNA (från GeneScript) användes för att utvärdera metodens detektionsnivå samt som positiv kontroll för metoden.

4 RESULTAT

4.1 DELMÅL 1: TAQMAN-PROTOKOLL FÖR DETEKTION AV PUUV.

Vi utgick från det protokoll som utvecklades under år 2012. Analyser som gjordes då visade tydligt att PUUV har en stor genetisk variation inom Sverige (Figur 1).



Figur 1. Fylogenetisk analys av svenska PUUV S-segment.

Dock kunde vi med hjälp av bioinformatik hitta en konserverad region i PUUV:s S-segment för design av primers och prob. Initiala tester med denna qRT-PCR-baserade metod under 2012 indikerade att det skulle kunna användas för detektion av PUUV i patientprover, och det beslöts därför att fortsätta med detta protokoll under 2013. Detta gav oss möjlighet att studera protokollet mer i detalj och fr.a. att testa dess möjlighet som ett tänkbart komplement, eller till och med som alternativ till, de serologiska metoder som PUUV-diagnostik idag är beroende av (4).

Först kunde vi se att av 55 testade serum från friska blodgivare var alla negativa i qRT-PCR med det protokoll vi tagit fram. Detta indikerar att risken för att få falskt positivt svar på prov från oinfekterade individer är låg. Utöver PUUV kan i Europa DOBV och SEOV orsaka HFRS, dessa virus kan som väntat (på grund av stor genetisk skillnad jämfört med PUUV) inte detekteras med detta qRT-PCR-baserade system. Samma sak gäller HTNV, och även för andra virus än hantavirus (Chikungunya virus, West Nile virus, tick-borne encephalitis virus, Rift valley fever virus och Dengue virus). Sammantaget visade dessa tester att det protokoll vi tagit fram inte gav falskt positivt svar i prov från oinfekterade patienter och att det heller inte korsreagerade med andra testade virus.

Vi gick sedan vidare med patientprover från PUUV-infekterade individer. Av initialt testade serumprover från patienter med akut PUUV-infektion kunde PUUV RNA detekteras i 13 av 17 prover (76%). Validering av vårt protokoll, med nya prover, visade på en sensitivitet på 80% och en specificitet på 100%. Här bör noteras att viremin i HFRS-patienter är snabbt övergående, det vill säga det är inte säkert att alla prov från HFRS-patienter innehåller PUUV-RNA, det är därför ev. omöjligt att uppnå 100% sensitivitet. Detektionsnivån, som bestämdes mot *in vitro* transkriberat RNA, var 60 RNA-kopior. Sammanfattningsvis så uppfyller det utvecklade protokollet de på förhand uppställda kraven.

4.2 DELMÅL 2: ANALYSERA OM FBD:S VALIDERINGS PROTOKOLL KAN TILLÄMPAS FÖR VIRUSDIAGNOSTIK.

I ett separat FBD-projekt (Fortsatt kvalitetssäkring av provanalys inom FBD; 2012 (Projekt 9), 2013 (Projekt 18)) utvecklades under 2012 och 2013 ett valideringsprotokoll tänkt att användas vid utveckling av qRT-PCR för detektion av bakterie-DNA. Vår bedömning är att även om delar av protokollet kan komma till användning även för validering av metoder ämnade för virusdetektion, så kräver validering av metoder för detektion av virus, fr.a. RNA-virus, specifika valideringsprotokoll. Detta beror dels på allmänna skillnader mellan bakterier och virus, men även på unika egenskaper hos det virus man vill validera en metod för.

Vi tror att det är svårt att ta fram ett generellt valideringsprotokoll för virusdiagnostik. Med all sannolikhet krävs olika valideringsprotokoll för olika virus, åtminstone för olika virusfamiljer.

Vi valde istället att använda oss av det valideringsprotokoll som för närvarande används för virus-PCR på SVA (se bilaga 1).

Sammanfattning av resultaten från validering SVA:

Sensitivitet: LOD = 60 kopior *in vitro* transkriberat RNA

Precision: stark positiv 0,22 %, medel 1,03 %, svagt positiv 1,5 %

Reproducerbarhet: stark positiv 2,4 %, medel 0,9 %, svagt positiv 2,3 %

Diagnostisk förmåga:

	PUUV- infektion (ak-positiva)	Friska blodgivare	Summa
qRT-PCR positiv	16	0	16
qRT PCR negativ	4	55	59
Summa	20	55	75

Sensitivitet = 80 %

Specificitet = 100 %

Positivt prediktivt värde = 100 %

Falskt positiva = 0

Negativt prediktivt värde = 73 %

4.3 DELMÅL 3: UTVÄRDERA INGÅENDE MYNDIGHETERS OLIKA EXTRAKTIONSMETODER FÖR OPTIMAL MÖJLIGHET TILL SENARE DETEKTION AV PUUV RNA.

Vi utvärderade de extraktionsmetoder som FOI, SMI, och SVA använder sig av. 6 st serumprover samt två kontroller, en positiv och en negativ, allikvoterades och sedan extraherades och analyserades de med qRT-PCR enligt respektive laboratoriums standardförfarande. Resultaten blev tillräckligt bra för att gå vidare med metoden på alla ingående myndigheter.

4.4 DELMÅL 4: GENOMFÖRA EN PROVNINGSJÄMFÖRELSE INOM FBD MED DEN METOD VI SÄTTER UPP

Vi genomförde en provningsjämförelse på FOI, SMI och SVA. Nitton för projektgruppen okända prover distribuerades och analyserades med uppsatt qRT-PCR-metod på de olika laboratorierna. Resultaten sammanställdes och jämfördes (se bilaga 2).

5 DISKUSSION

Att utveckla molekylärbiologisk diagnostik mot hantavirus är viktigt eftersom det har en stor potential att underlätta vid diagnostik. Men, det är också förknippat med svårigheter: det finns en stor variation i det virala genomet och ganska få PUUV-sekvenser från Sverige finns tillgängliga. Detta försvårar vid design av primers och prob.

Vi har med hjälp av befintliga sekvenser från PUUV:s S-segment identifierat en relativt sett välkonserverad region, och utifrån detta designat primers och prob. Det framtagna protokollet testades för att fastställa känslighet etc. Sammantaget visade dessa tester att specificiteten är 100% och att sensitiviteten är 80%. Värt att nämna är att dessa tester gjordes på prover som förvarats i frys i upp till 3 år, det är möjligt att sensitiviteten för icke tidigare frysta prover är högre.

Oss veterligen är detta första gången som ett protokoll framtaget för att detektera PUUV i ett helt land (i detta fall testat på prover från patienter spridda över hela Sverige) har visat en så hög sensitivitet. Vi har därför gått vidare och testar nu, parallellt med vanlig serologi, detta protokoll under vintern 2013/2014 på nyinkomna patientprover på SMI. Vår förhoppning är att även kunna inkludera de två andra laboratorier (Norrlands universitetssjukhus och Sunderby sjukhus) som utför PUUV-diagnostik i Sverige i denna studie under 2013/2014. Detta för att efter årets HFRS-säsong kunna utvärdera vår metod i jämförelse med klassisk serologi (4). Vår förhoppning är att få en god täckning och vi tror också att sensitiviteten på ”färska” prover kan vara högre än vad den är på de frysta prover som hittills testats inom ramen för denna studie. En jämförelse mellan den qRT-PCR metod som vi tagit fram inom detta projekt och den klassiska serologi som idag används för diagnostik av PUUV-infektion är fr.a. viktig för att kunna upptäcka eventuella luckor, d.v.s. geografiska områden i Sverige där HFRS finns (och där PUUV-infektion kan detekteras med serologiska tester) men där vår qRT-PCR metod idag inte kan användas för detektion av dessa PUUV-infektioner. Detta skulle indikera att i detta område cirkulerar PUUV med en annan genetisk sekvens än vad PUUV har i övriga landet. Om så är fallet föreslår vi att prover från dessa områden sekvenseras för vidareutveckling av systemet.

Förhoppningsvis kan, inom kort, detta protokoll för detektion av PUUV som vi tagit fram inom FBD komma att användas inom diagnostiken av misstänkt HFRS i Sverige. Att det redan kan användas som ett komplement till serologi är uppenbart: detta protokoll har använts på en patient med ovanlig serologisk profil där det var svårt att slå fast om patienten hade en akut PUUV-infektion eller hade genomgått en tidigare PUUV-infektion. När akutprov från denna patient kördes med vårt protokoll blev det positivt, d.v.s. vi kunde påvisa en pågående PUUV-infektion i patienten och därmed fastslå en akut HFRS.

6 SLUTSATSER

Molekylärbiologisk detektion av hantavirus behövs för en förbättrad och förenklad diagnostik av HFRS i Sverige, och av potentiella infektioner med andra hantavirus, t.ex. hos turister. Idag är sorkfeberdiagnostik helt beroende av serologi (4) och kan bara utföras på tre laboratorier i Sverige. Vid ett större utbrott av sorkfeber i Sverige, som senast år 2007, innebär det att arbetsinsatsen blir väldigt hög på dessa laboratorier, och att det eventuellt tar längre tid än önskvärt att ställa diagnos.

Serologi kan dock aldrig helt ersättas av qRT-PCR vid misstanke om hantavirusinfektion eftersom:

1. Man aldrig kan vara säker på att en patient är viremisk: med stor sannolikhet kommer prov tagna sent efter akut insjuknande ofta vara negativa i qRT-PCR, men dessa är då vanligtvis positiva i serologi.
2. HFRS-patienter smittade utanför Sverige kan vara smittade med ett annat hantavirus än PUUV (t.ex. DOBV) eller med en variant av PUUV som ev. inte kan detekteras med denna metod.
3. Cirkulation av nya hantavirus i Sverige inte kan uteslutas, t.ex. har SEOV nyligen upptäckts i tamrättor i Sverige (5). Patienter infekterade med andra hantavirus än PUUV i Sverige kommer inte kunna diagnostiseras med denna metod.

Även om serologi fortsättningsvis kvarstår som en viktig metod för diagnostik av misstänkt HFRS, så hoppas och tror vi att det protokoll vi tagit fram inom FBD kommer att användas inom rutindiagnostik vid misstanke om HFRS orsakad av PUUV i Sverige. Det används redan nu som komplement till serologi inom klinisk diagnostik på SMI, och en qRT-PCR för detektion av PUUV lokalt i och omkring Umeå används på Norrlands universitetssjukhus som komplement sedan tidigare (6). Vi ser en klar möjlighet att använda den metod vi nu tagit för initial screening av patientprov: vid positivt resultat kan man fastslå en pågående PUUV-infektion, och vid negativt prov kan serologi användas för att utesluta eller diagnostisera HFRS.

7 FÖRSLAG PÅ FORTSATT VERKSAMHET

7.1 FRAMTIDA MÅL

Den studie som pågår vintern 2013/2014 på SMI, Norrlands universitetssjukhus och på Sunderbyns sjukhus, kan förhoppningsvis svara på om qRT-PCR är ett tillförlitligt alternativ och/eller komplement till den serologi som idag används för att detektera en akut PUUV-infektion.

Det ultimata målet med denna studie är att det protokoll vi tagit fram kommer att användas inom HFRS-diagnostik i Sverige, att det sprids till flera laboratorier, och att det kommer att vara till nytta för dessa laboratorier och för HFRS-patienter.

7.2 FRAMTIDA UTVECKLINGSMÖJLIGHETER

Att vi lyckats få fram ett protokoll för detektion av PUUV, i akutprov vid misstanke om sorkfeber, från hela det utbredningsområde som PUUV har i Sverige visar för första gången att det kan vara möjligt att använda qRT-PCR för rutindiagnostik av hantavirus. Detta väcker hopp om att kunna designa qRT-PCR baserade metoder för detektion även av andra hantavirus, vilket skulle underlätta diagnostiken av HFRS och HPS globalt. En utveckling i denna riktning är önskvärd eftersom qRT-PCR kräver mindre avancerade laboratorier än vad serologiska metoder gör. D.v.s. för diagnostiska laboratorier där serologi idag inte är väl etablerat skulle en möjlighet till qRT-PCR baserad diagnostik kunna möjliggöra och/eller underlätta HFRS/HPS-diagnostik.

8 BILAGOR

8.1 VALIDERING AV NY REALTIDS-PCR

8.2 PROVNINGSJÄMFÖRELSE

9 BILAGOR – WIKI

Kompletterande dokument S1 och S2 finns på FBD:s interna Wiki, under projekt 17 2013 ”Utveckling av molekylärbiologisk detektion av Hantavirus”.

S1. MOLEKYLÄRBIOLOGISK DETEKTION AV HANTAVIRUS

Litteraturstudie och genomgång av befintliga molekylärbiologiska metoder för detektion av hantavirus.

S2. METODBESKRIVNING AV UTVECKLAT PCR PROTOKOLL INKLUDERANDE PRIMERSEKVENSER

10 REFERENSER

1. Vaehri A, Strandin T, Hepojoki J, Sironen T, Henttonen H, Mäkelä S, Mustonen J. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat Rev Microbiol.* 11:539-50. 2013.
2. Mustonen J, Mäkelä S, Outinen T, Laine O, Jylhävä J, Arstila PT, Hurme M, Vaehri A. The pathogenesis of nephropathia epidemica: New knowledge and unanswered questions. *Antiviral Res.* 100:589-604. 2013.
3. <http://www.smi.se/sjukdomar/sorkfeber/>
4. [http://www.referensmetodik.smi.se/w/Sorkfeber_\(Puumalavirus\)](http://www.referensmetodik.smi.se/w/Sorkfeber_(Puumalavirus))
5. Lundkvist Å, Verner-Carlsson J, Plyusnina A, Forslund L, Feinstein R, Plyusnin A. Pet rat harbouring Seoul hantavirus in Sweden, June 2013. *Euro Surveill.* 18: pii20521. 2013.
6. Evander M, Eriksson I, Pettersson L, Juto P, Ahlm C, Olsson GE, Bucht G, Allard A. Puumala hantavirus viremia diagnosed by real-time reverse transcriptase PCR using samples from patients with hemorrhagic fever and renal syndrome. *J Clin Microbiol.* 45:2491-7. 2007.