

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



Emina Durmiši

**GENETSKA RAZNOLIKOST VIRUSA KLOPNEGA
MENINGOENCEFALITISA V SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



Emina Durmiši

**GENETIC HETEROGENEITY OF THE
TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN SLOVENIA**

DOCTORAL THESIS

Ljubljana, 2013

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



Avtor: Emina Durmiši, univ. dipl. mikr.

Naslov: Genetska raznolikost virusa klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji

Imenovanje mentorja na seji senata dne: 09.12.2010

Komisija za oceno in zagovor imenovana na seji senata dne: 08.10.2012

Datum zagovora: 11.04.2013

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

Predsednik komisije: akad. prof. dr. Franc Strle, dr. med

Član: prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Član: prof. dr. Gregor Majdič, dr. vet. med.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Tatjani Avšič-Županc se iskreno zahvaljujem za vso izkazano skrb, podporo in spodbudo, za vse konstruktivne ideje, nasvete in kritike pri nastajanju doktorske naloge. Tudi ko sem bila prepričana, da ni več možno nadaljevati, ste mi pokazali da obstaja pot, ki me bo pripeljala do cilja.

Zahvaljujem se članom komisije, akad. prof. dr. Francu Strletu, prof. dr. Miroslavu Petrovcu in prof. dr. Gregoru Majdiču, za kritično branje moje doktorske naloge in za vse konstruktivne predloge.

Najlepše se zahvaljujem Jasni Prebil za ves čas, ki ga je posvetila lektoriranju naloge, in za vse nasvete! Hvala Jasna!

Najlepša hvala Katji Strašek Smrdel, Nataši Knap, Ani Saksida, Mateji Jelovšek, Miši Korva, Urški Glinšek Biškup, Darji Duh, Luki Fajsu in Katarini Resman za prijetne trenutke, ki sem jih doživela v laboratoriju. Hvala dr. Tomiju Trilarju iz Prirodoslovnega muzeja Slovenije ter Nataši, Ani in Miši za prijetne terene, ko smo skupaj lovili klope in glodavce! Za prve laboratorijske korake se najlepše zahvaljujem Nataši Knap in Darji Duh! Pokazali sta mi, kako se pravilno dela, in vsadili vame obsesivnega čistilca delovnih površin. Hvala Katji za potrpežljivo poslušanje, zanimanje in svetovanje!

Zahvaljujem se vsem sodelavcem na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo! Zahvaljujem se vsem dežurnim, ki so me tolikokrat počakali, kot tudi čistilkam in varnostnikom! Najlepša hvala moji soimenjakinji, čistilki Emini, ki je vedno v poznih urah našla prijazno besedo spodbude.

Zahvaljujem se mojim zlatim prijateljicam Jani Petković, Jasni Prebil, Tijani Kofler, Tatjani Šeლება Hohmann, Ani Zovko, Maji Zovko, Petri Čertanc, Daliborki Dušanić, Maji Marušić., Bojani Starčević in Katarini Šketa za vse nepozabne trenutke, žure, tortice, kavice...! Hvala Jani, Jasni, Ani, Maji in Bojani za gostoljubnost, ki je ne bom nikoli pozabila, pa ne samo zato, ker me še vedno boli hrbet ;)

Hvala vsem MOJIM, ki jih imam RADA: mami Regini, tati Ekremu, bratu Mateju in dragemu Mihaelu, ker mi stojijo od strani, vedno me brezpogojno spodbujajo in verjamejo vame. Hvala vam, ker ste mi omogočili, da sem postala to, kar sem! Zaradi vas živim to čudovito življenje!!!

POVZETEK

Virus klopnega meningoencefalitisa (KMEV) se v naravi ohranja s kroženjem med naravnimi gostitelji kot so mali sesalci in divjad, ter klopi, ki so prenašalci virusa. Pri človeku, ki je naključni gostitelj, lahko KMEV povzroči okužbo osrednjega živčevja z resnimi posledicami, kar ima pomemben vpliv na javno zdravstvo v endemičnih področjih. KMEV je flavivirus, ki ima, podobno kot ostali virusi RNA, pogoste mutacije in zaradi tega potencial za hitro evolucijo. Ker ni znano, ali se v Sloveniji pojavljajo genetske različice KMEV in katere so, je bil cilj naše raziskave ugotoviti, ali obstaja raznolikost evropskega podtipa KMEV v Sloveniji. Doktorska disertacija predstavlja prvo raziskavo, ki proučuje nukleotidna zaporedja virusa KME pridobljena neposredno iz rezervoarjev, prenašalcev in končnih gostiteljev virusa KME na enem zemljepisnem področju.

Doktorsko nalogo smo razdelili na tri dele. Virusno RNA smo izolirali neposredno iz vzorcev klopov, majhnih glodavcev in vzorcev bolnikov s KME brez posrednega gojenja v celičnih kulturah ali laboratorijskih živalih. Molekularnim izolatom smo določili nukleotidno zaporedje, ki nosi zapis za beljakovino NS5 in E. Zapis za beljakovino NS5 smo izbrali, ker je beljakovina NS5 največja nestrukturna beljakovina flavivirusov. Njen zapis je najbolj ohranjen in stabilen del virusnega genoma. Ima osrednjo vlogo pri podvajanju virusne RNA. Vsebuje virusno od RNA odvisno RNA polimerazo in ima metiltransferazno aktivnost, kar je pomembno pri stabilizaciji in prevajanju molekule RNA. Sodeluje pri zaviranju imunskega odziva in je pomemben virulenčni dejavnik virusa. Zapis za beljakovino E smo izbrali, ker je beljakovina E osnovna ovojnična beljakovina virusa in je zato tudi osnovna tarča nevtralizirajočih protiteles. Odgovorna je za ključne funkcije vstopa virusa v celice, kot sta vezava na receptor in fuzija z membrano ter za indukcijo nevtralizirajočih protiteles. Zapis zanjo je dovolj dolg in kljub raznolikosti dovolj dobro ohranjen za filogenetske analize. Poleg tega je v genski bazi podatkov na voljo veliko informacij o številnih zapisih za beljakovino E, ki imajo zemljepisno različen izvor.

V prvem delu raziskave smo na osmih zemljepisnih področjih Slovenije, ki se delno razlikujejo v svojstvenih ekoloških pogojih, v eno-mesečnih presledkih v letih od 2005 do

2008 nabirali klope z metodo zastave. V raziskavo smo vključili 9209 klopov, ki smo jih uredili v 1192 skupin. RNA virusa KME smo dokazali v sedemindvajsetih skupinah klopov. Pomnožili smo 1075 bp dolg tarčni odsek beljakovine NS5 pri devetih od sedemindvajset pozitivnih vzorcev klopov in 931 bp dolg tarčni odsek beljakovine E pri osmih pozitivnih vzorcih klopov. Nukleotidne zapise smo uporabili v nadaljnjih filogenetskih analizah.

V drugi del raziskave smo vključili glodavce, ki imajo pomembno vlogo pri enzootskem kroženju virusa KME. V raziskavo smo vključili 842 glodavcev, ki so bili ujeti z živalovkami na različnih področjih Slovenije od leta 1992 do leta 2010. RNA virusa KME smo dokazali pri sedemnajstih glodavcih. Pomnožili smo 536 bp dolg tarčni odsek beljakovine NS5 pri osmih od sedemnajst pozitivnih vzorcev glodavcev in 1203 bp dolg tarčni odsek beljakovine E pri osmih vzorcih glodavcev. Nukleotidne zapise smo uporabili v nadaljnjih filogenetskih analizah.

V tretji del raziskave smo vključili 121 vzorcev bolnikov, obolelih s KME. Za nadaljnje raziskave smo izbrali 22 vzorcev, ki so zadovoljili pogojem, da so vsebovali zadostno količino materiala, da je bil rezultat RT-PCR v realnem času pozitiven, in da je bila čim večja zemljepisna razpršenost izolatov glede na naslov bivanja bolnika. Pomnožili smo 1003 bp dolg tarčni odsek beljakovine NS5 pri devetnajstih od dvaindvajset izbranih vzorcev bolnikov in 757 bp dolg tarčni odsek beljakovine E pri dvaindvajsetih vzorcih bolnikov. Nukleotidne zapise smo uporabili v nadaljnjih filogenetskih analizah.

Z analizo dela genoma virusa KME smo neposredno iz klopov, glodavcev in bolnikov potrdili, da v Sloveniji kroži več genetskih različic virusa KME. Dokazali smo, da je genetska raznolikost virusa KME v Sloveniji zemljepisno razporejena, saj se genetske različice združujejo v zemljepisno ločene monofiletske linije. Opazili smo razmeroma visoko genetsko raznolikost virusa KME in določili sedem filogenetskih skupin. Dokazali smo, da je združevanje v filogenetske skupine neodvisno od gostitelja, iz katerega smo pridobili zapis za tarčna zaporedja beljakovin NS5 in E virusa KME, in da med prenašalci

oziroma gostitelji na enem zemljepisnem področju prevladuje enaka genetska različica virusa KME. Pri vzorcih, pridobljenih iz klopov in glodavcev, smo dokazali povezavo med filogenetskim in zemljepisnom združevanjem. Pri zapisih, pridobljenih iz bolnikov s KME, smo pridobili bolj heterogene rezultate, saj pri njih za zemljepisni izvor okužbe upoštevamo kraj stalnega bivališča, ker je dejansko mesto okužbe težko ugotoviti. Pri analizi filogenetskih dreves posameznih tarčnih odsekov za beljakovini NS5 in E smo ugotovili, da kažeta oba odseka enako filogenetsko sorodnost. Rezultati so nakazali možnost rekombinacijskega dogodka v genomu virusa KME, ki smo ga pridobili iz vzorca bolnika. Z raziskavo smo potrdili izsledke iz literature, da sta zapisa za beljakovini NS5 in E v primerjavi s celotnim genomom dobra označevalca za robustne filogenetske analize. Naša raziskava je prva, ki proučuje nukleotidna zaporedja virusa KME, pridobljena neposredno iz vzorcev prenašalca, gostitelja in končnega gostitelja na enem zemljepisnem področju.

Izsledke raziskav, ki so del doktorske naloge, smo objavili v revijah, ki jih citira Science Citation Index (SCI):

- Knap N., Durmiši E., Saksida A., Korva M., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2009. Influence of Climatic Factors on Dynamics of Questing *Ixodes ricinus* Ticks in Slovenia. *Veterinary Parasitology*, 164: 275-281 (IF = 2,278).
- Durmiši E., Knap N., Saksida A., Trilar T., Duh D., Avšič-Županc T. 2011. Prevalence and Molecular Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Slovenia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11: 659-664 (IF = 2,607).
- Fajs L., Durmiši E., Knap N., Strle F., Avšič-Županc T. 2012. Phylogeographic Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus from Patients, Rodents and Ticks in Slovenia. *PLOS ONE* 2012; 7: e48420 (IF = 4,092).

SUMMARY

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is maintained in nature by natural convection between hosts that include small mammals and deer, and ticks - the carriers of the virus. In humans, the dead-end hosts of TBEV, it can cause infection of the central nervous system with serious consequences which has a significant impact on public health. TBEV is the flavivirus which, like other RNA viruses, has a high frequency of mutations and therefore the potential for rapid evolution. It is not known whether there is heterogeneity of TBEV in Slovenia. The aim of our study was to determine the genetic diversity of TBE virus variants present in TBE endemic regions of Slovenia from tick, rodent and human samples. To the best of our knowledge this is the first study that employed direct determination of nucleotide sequences and simultaneous analysis of TBEV sequences from three TBEV hosts in one geographical area.

In the experimental part of the thesis, viral RNA was isolated directly from samples of ticks and rodents and clinical samples of patients with TBE without indirect cultivation in cell cultures or laboratory animals. We directly sequenced two viral protein genes: NS5 and E. NS5 protein is the largest non-structural flaviviral protein whose gene sequence is preserved and the most stable part of the viral genome. It plays a central role in the duplication of viral RNA and contains the viral RNA dependent RNA polymerase and the methyl transferase activity, which is important in stabilization and translation of RNA molecules. It participates in the inhibition of immune response and is an important virulence factor. E protein was selected because it is basic envelope protein of the virus and is therefore a primary target of neutralizing antibodies. It is responsible for key functions of viral entry into cells such as receptor binding, membrane fusion and the induction of neutralizing antibodies. E protein gene sequence is long and, despite the heterogeneity, well conserved for phylogenetic analysis. In addition, in the genetic data base much information is available for E protein gene sequences from multiple geographical origins.

Doctoral thesis was divided into three parts. The first part of the study was focused on eight geographical areas of Slovenia, which partly differ in ecological conditions. In these areas we have collected ticks monthly from 2005 to 2008 by flagging. The study included 9,209 ticks

arranged in 1192 groups. The viral RNA was detected in 27 groups. We amplified 1075 bp long segment of the NS5 protein gene directly from 9 tick samples and 931 bp long segment of the E protein gene from 8 tick samples. Nucleotide records obtained were used for further phylogenetic analysis.

In the second part of the study we have included rodents, who play an important role in enzootic circulation of TBEV. Rodents were collected in collaboration with the Natural History Museum of Slovenia on different locations from 1992 to 2010 using live traps. The study included 842 small rodents and viral RNA was detected in 17 of them. We amplified 536 bp long segment of the NS5 protein gene directly from 8 rodent samples and 1203 bp long segment of the E protein gene directly from 8 rodent samples. Nucleotide records obtained were used for further phylogenetic analysis.

In the third part of the study we have included 121 clinical samples of patients with TBE. Among 121 samples 22 were selected that met the conditions that they included sufficient quantity of material, so that the samples were positive on real time RT-PCR, and that the isolates originates from maximum geographical spread according to their residential address. We detected viral RNA in 22 samples. We amplified 1003 bp long segment of the NS5 protein gene directly from 19 patient samples and 757 bp long segment of the E protein gene directly from 22 patient samples. Nucleotide records obtained were used for further phylogenetic analysis.

The analysis of NS5 and E protein gene sequences amplified from ticks, rodents and patients with TBE revealed high genetic variability of TBEV and geographical clustering of TBEV in Slovenia. Seven phylogenetic clades were determined both on the E and NS5 protein gene sequence analyses. Our results show that similar TBEV variants are present in all three hosts. Correlation analysis of phylogenetic and geographical clustering showed that ticks and rodents from the same or nearby isolation sites shared a high level of sequence identity, whereas ticks and rodents from different locations showed greater sequence divergence. From records obtained from patients with TBE, we acquired more heterogeneous data because we have

considered the place of residence to be the geographical origin of infection, since the actual site of infection was unknown. Our study confirmed the findings from the literature: the NS5 and E protein gene sequences compared to a whole genome are good markers for robust phylogenetic analysis. According to the available information, our study gives the first evidence of possible recombination event between different TBEV variants from patients. Our study is the first that examines nucleotide sequences of TBE virus obtained directly from the vector, the host and the dead end host on one geographical area.

Research results, which are part of the doctoral thesis, were published in journals, quoted by Science Citation Index (SCI):

- Knap N., Durmiši E., Saksida A., Korva M., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2009. Influence of Climatic Factors on Dynamics of Questing *Ixodes ricinus* Ticks in Slovenia. *Veterinary Parasitology*, 164: 275-281 (IF = 2,278).
- Durmiši E., Knap N., Saksida A., Trilar T., Duh D., Avšič-Županc T. 2011. Prevalence and Molecular Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Slovenia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11: 659-664 (IF = 2,607).
- Fajs L., Durmiši E., Knap N., Strle F., Avšič-Županc T. 2012. Phylogeographic Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus from Patients, Rodents and Ticks in Slovenia. *PLOS ONE* 2012; 7: e48420 (IF = 4,092).

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	I
KAZALO VSEBINE	VII
KAZALO TABEL	XIII
KAZALO SLIK	XV
SEZNAM OKRAJŠAV	XVIII
1 UVOD	1
1.1 VIRUS KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA	1
1.1.1 Zgradba virusa.....	1
1.1.2 Organizacija genoma.....	2
1.1.3 Virusne beljakovine.....	3
1.1.3.1 Strukturne beljakovine	4
1.1.3.2 Nestrukturne beljakovine	7
1.1.4 Pomnoževanje virusa.....	8
1.1.5 Patogeneza virusne okužbe	9
1.1.6 Občutljivost in stabilnost virusa.....	11
1.2 TAKSONOMIJA IN EVOLUCIJA VIRUSA KME	12
1.2.1 Podtipi virusa KME.....	15
1.3 KROŽENJE VIRUSA V NARAVI	16
1.3.1 Klopi.....	17
1.3.1.1 Ixodes ricinus	19
1.3.1.2 Življenjski krog in ekologija	19
1.3.2 Glodavci	21

1.3.2.1	Kroženje virusa KME med malimi sesalci.....	22
1.3.2.2	Rumenogrla miš	23
1.3.2.3	Gozdna voluharica.....	24
1.3.3	Človek	25
1.4	EPIDEMIOLOGIJA OKUŽBE Z VIRUSOM KME.....	25
1.4.1	Naravna žarišča	25
1.4.2	Razširjenost KME v svetu.....	26
1.4.3	Razširjenost KME v Sloveniji.....	28
1.5	KLINIČNA SLIKA, ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽBE.....	30
1.5.1	Klinična slika.....	30
1.5.2	Zdravljenje in preprečevanje bolezni	31
1.6	DIAGNOSTIKA	32
1.6.1	Neposredno dokazovanje virusa.....	33
1.6.2	Posredno dokazovanje virusa	34
2	NAMEN DELA (CILJI, HIPOTEZE)	35
3	MATERIALI IN METODE	36
3.1	MATERIALI	36
3.1.1	Klopi.....	36
3.1.1.1	Izbor lokacij.....	36
3.1.1.2	Metoda zastave	37
3.1.1.3	Razkuževanje in identifikacija klopov	37
3.1.2	Glodavci	38
3.1.2.1	Lov z živalovkami.....	38
3.1.2.2	Meritve in žrtvovanje glodavcev	38

3.1.3	Vzorci bolnikov	39
3.1.3.1	Izbira vzorcev	39
3.2	METODE	40
3.2.1	Osamitev celokupne RNA.....	40
3.2.1.1	Osamitev celokupne RNA iz klopov.....	40
3.2.1.2	Osamitev celokupne RNA iz organov glodavcev	41
3.2.1.3	Osamitev celokupne RNA iz vzorcev bolnikov	43
3.2.1.3.1	Osamitev celokupne RNA z reagentom TRIzol®LS	43
3.2.1.3.2	Avtomatska osamitev virusne RNA v delovni postaji EZ1 Advanced XL	43
3.2.2	Preverjanje uspešnosti osamitve klopne RNA	44
3.2.3	Preverjanje prisotnosti RNA virusa KME z RT-PCR v realnem času	45
3.2.3.1	Interna kontrola za RT-PCR v realnem času.....	46
3.2.3.2	RT-PCR v realnem času.....	46
3.2.4	Pomnoževanje dela genoma virusa KME neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov	47
3.2.4.1	Pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine NS5 virusa KME	48
3.2.4.1.1	Izbira začetnih oligonukleotidov	48
3.2.4.1.2	RT-PCR krajšega dela genoma za zapis beljakovine NS5.....	49
3.2.4.1.3	Pomnoževanje krajšega dela genoma za zapis beljakovine NS5 z vgnezenim PCR	49
3.2.4.1.4	RT-PCR daljšega dela genoma za zapis beljakovine NS5	50
3.2.4.2	Pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine E virusa KME	51
3.2.4.2.1	Izbira začetnih oligonukleotidov	51
3.2.4.2.2	Pomnoževanje tarčnega dela genoma za zapis beljakovine E virusa KME	52
3.2.4.2.3	Pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine E z vgnezenim PCR	53

3.2.5	Elektroforeza pridelkov RT-PCR in vgnezenega PCR v agaroznem gelu	54
3.2.6	Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR.....	55
3.2.6.1	Čiščenje pridelkov PCR	55
3.2.6.2	Določanje koncentracij očiščenih pridelkov PCR.....	57
3.2.6.3	Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR	57
3.2.7	Analiza nukleotidnih zaporedij	58
4	REZULTATI.....	60
4.1	DOKAZ GENOMA VIRUSA KME Z RT-PCR V REALNEM ČASU V VZORCIH KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV	60
4.1.1	Klopi.....	60
4.1.2	Glodavci	64
4.1.3	Vzorci bolnikov	66
4.2	NUKLEOTIDNE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE NS5 VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME.....	68
4.2.1	Pomnoževanje krajšega tarčnega odseka beljakovine NS5.....	68
4.2.1.1	Analiza nukleotidnih zaporedij	69
4.2.1.2	Analiza aminokislinskih zaporedij	70
4.2.2	Pomnoževanje daljšega tarčnega odseka beljakovine NS5.....	71
4.2.2.1	Vzorci klopov	72
4.2.2.1.1	Analiza nukleotidnih zaporedij	72
4.2.2.1.2	Analiza aminokislinskih zaporedij	74
4.2.2.2	Vzorci glodavcev.....	75
4.2.2.2.1	Analiza nukleotidnih zaporedij	75
4.2.2.2.2	Analiza aminokislinskih zaporedij	77
4.2.2.3	Vzorci bolnikov, obolelih s KME	78

4.2.2.3.1	Analiza nukleotidnih zaporedij	78
4.2.2.3.2	Analiza aminokislinskih zaporedij	80
4.3	NUKLEOTIDNE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE E VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME.....	82
4.3.1	Pomnoževanje tarčnega odseka beljakovine E.....	82
4.3.1.1	Vzorci klopov	84
4.3.1.1.1	Analiza nukleotidnih zaporedij	84
4.3.1.1.2	Analiza aminokislinskih zaporedij	86
4.3.1.2	Vzorci glodavcev.....	87
4.3.1.2.1	Analiza nukleotidnih zaporedij	87
4.3.1.2.2	Analiza aminokislinskih zaporedij	87
4.3.1.3	Vzorci bolnikov s KME	89
4.3.1.3.1	Analiza nukleotidnih zaporedij	89
4.3.1.3.2	Analiza aminokislinskih zaporedij	91
4.4	CELOKUPNA ANALIZA.....	93
4.4.1	Filogenetska analiza tarčnega odseka beljakovine NS5.....	93
4.4.2	Filogenetska analiza tarčnega odseka beljakovine E	98
4.4.3	Povezava filogenetske analize in zemljepisnega porekla vzorca	104
5	RAZPRAVA	105
5.1	DOKAZ VIRUSA KME V VZORCIH KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME	105
5.2	NUKLEOTIDNE IN AMINOKISLINSKE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE NS5 VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME	107

5.3	NUKLEOTIDNE IN AMINOKISLINSKE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE E VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME	110
5.4	CELOKUPNA ANALIZA.....	115
6	ZAKLJUČKI.....	120
7	LITERATURA.....	122
8	PRILOGE	136
9.	OBJAVLJENI ČLANKI, KI ZAJEMAJO IZSLEDKE RAZISKAV PREDSTAVLJENIH V DOKTORSKI NALOGI	144

KAZALO TABEL

Tabela 1-1 Klopno prenosljivi flavivirusi	15
Tabela 3-1 Podatki o izbranih lokacijah	37
Tabela 3-2 Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za preverjanje uspešnosti osamitve klopne RNA.	44
Tabela 3-3 Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov in lovka za RT-PCR v realnem času	45
Tabela 3-4 Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za določevanje nukleotidnih zaporedij za del genoma za zapis beljakovine NS5.....	48
Tabela 3-5 Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za določevanje nukleotidnih zaporedij za del genoma za zapis beljakovine E.	51
Tabela 4-1 Število klopov <i>I. ricinus</i> po posameznih stadijih na različnih lokacijah v letih od 2005 do 2008.	60
Tabela 4-2 Število skupin klopov in pozitivnih skupin klopov, zbranih na različnih lokacijah v Sloveniji.....	61
Tabela 4-3 Vzorci klopov, pri katerih smo dokazali RNA virusa KME.	63
Tabela 4-4 Vzorci glodavcev, pri katerih smo dokazali RNA virusa KME.....	65
Tabela 4-5: Rezultati RT-PCR v realnem času – dokaz virusne RNA v vzorcih bolnikov	66
Tabela 4-6 Vzorci bolnikov, pri katerih smo dokazali RNA virusa KME.....	67
Tabela 4-7 Klopi, glodavci in bolniki, okuženi z virusom KME, pri katerih smo pomnožili krajši tarčni odsek beljakovine NS5 virusa KME.	69
Tabela 4-8 Klopi, glodavci in bolniki, okuženi z virusom KME, pri katerih smo pomnožili daljši tarčni odsek beljakovine NS5 virusa KME.....	71
Tabela 4-9 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih iz klopov.....	74
Tabela 4-10 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih iz glodavcev.....	77

Tabela 4-11 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih iz vzorcev bolnikov.	81
Tabela 4-12 klopi, glodavci in bolniki, okuženi z virusom KME, pri katerih smo pomnožili tarčni odsek beljakovine E virusa KME.	83
Tabela 4-13 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine E virusa KME, pridobljenih iz vzorcev klopotov.	86
Tabela 4-14 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine E virusa KME, pridobljenih iz glodavcev.	88
Tabela 4-15 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine E virusa KME, pridobljenih iz vzorcev bolnikov.	92
Tabela 4-16 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih iz vzorcev klopotov, glodavcev in vzorcev bolnikov v primerjavi z referenčnim sevom Neudoerfl (TEU27495).	96
Tabela 4-17 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine E virusa KME, pridoljenih iz vzorcev klopotov, glodavcev in vzorcev bolnikov v primerjavi z referenčnim sevom Neudoerfl (TEU27495).	102

KAZALO SLIK

Slika 1-1 Zgradba flavivirusnega delca.	2
Slika 1-2 Organizacija in ekspresija genoma virusa KME.	3
Slika 1-3 Topologija membrane strukturnih beljakovin flavivirusov.	4
Slika 1-4 Shematska predstavitev zunanjega in transmembranskega dela beljakovine E, od zgoraj (a) in od strani (b).	6
Slika 1-5 Življenjski cikel virusa KME.	9
Slika 1-6 Filogenetska analiza na podlagi celotnega nukleotidnega zaporedja za poliprotein.	13
Slika 1-7 Filogenetska analiza klopno prenosljivih flavivirusov na podlagi homologije aminokislin beljakovine NS3.	14
Slika 1-8 Koženje virusa KME v naravi med prenašalci in gostitelji; pot okužbe.	17
Slika 1-9 Razvojne stopnje klopa <i>I. ricinus</i> . a-nimfa, b-odrasel samec, c-odrasla samica, d-samica, napita s krvjo gostitelja.	21
Slika 1-10 Razširjenost rumenogrla miši (<i>Apodemus flavicollis</i>) v Sloveniji.	23
Slika 1-11 Razširjenost gozdne voluharice (<i>Myodes glareolus</i>) v Sloveniji.	24
Slika 1-12 Razširjenost KME in njegovih prenašalcev. Z rdečo prekinjeno črto je označena meja, ki obkroža endemično področje.	28
Slika 1-13 Povprečna letna incidenca KME po regijah v Sloveniji od leta 2000 do 2009.	29
Slika 1-14 Diagnostika KME pri dvofaznem poteku bolezni. Kratice: IV – izolacija virusa, PCR – verižna reakcija s polimerazo.	33
Slika 4-1 Grafični prikaz rezultatov RT-PCR v realnem času preiskovanih skupin klopov od leta 2005 do leta 2008.	62
Slika 4-2 Grafični prikaz rezultatov RT-PCR v realnem času preiskovanih glodavcev od leta 1992 do leta 2010 po statističnih regijah Slovenije.	64
Slika 4-3 Grafični prikaz rezultatov RT-PCR v realnem času preiskovanih vzorcev bolnikov od leta 2000 do leta 2011.	66

Slika 4-4 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (1075 bp) beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klosov. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klosov..	73
Slika 4-5 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (536 bp) beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev glodavcev. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev glodavcev..	76
Slika 4-6 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (1003 bp) beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov..	79
Slika 4-7 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (931 bp) beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klosov. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klosov.	85
Slika 4-8 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (757 bp) beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov..	90
Slika 4-9 Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME (936 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klosov, glodavcev in vzorcev bolnikov.....	93
Slika 4-10 Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klosov, glodavcev in vzorcev bolnikov.....	94
Slika 4-11 Filogenetsko drevo tarčnega daljšega odseka beljakovine NS5 (936 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klosov, glodavcev in vzorcev bolnikov.	97

Slika 4-12 Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka beljakovine E virusa KME (757 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov.....	99
Slika 4-13 Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov.....	100
Slika 4-14 Filogenetsko drevo tarčnega odseka beljakovine E (757 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov.	103

SEZNAM OKRAJŠAV

bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimsko imunski test (angl. enzyme linked immunosorbent assay)
IC	interna kontrola
IFA	imunoflorescenčna metoda (angl. immunofluorescence assay)
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
KME	klopi meningoencefalitis
KMEV	virus klopnega meningoencefalitisa
KME - Fe	daljnovzhodni podtip virusa klopnega meningoencefalitisa
KME - Sib	sibirski podtip virusa klopnega meningoencefalitisa
KME – Eu	evropski podtip virusa klopnega meningoencefalitisa
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (angl. Polymerase Chain reaction with Reverse Transriptase)

1 UVOD

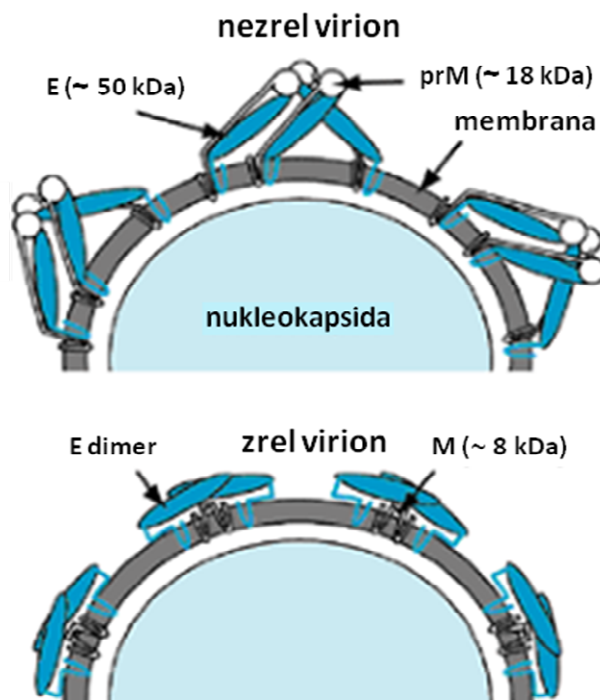
1.1 VIRUS KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA

Virus klopnega meningoencefalitisa (virus KME, KMEV) je predstavnik v rodu *Flavivirus* in ga uvrščamo v družino *Flaviviridae* (Heinz in sod., 2000). Pri človeku povzroča okužbo osrednjega živčevja, ki ima lahko resne posledice.

1.1.1 Zgradba virusa

Virusni delci so okrogle oblike, premera od 40 do 60 nm. Ikozaedrično nukleokapsido, ki v premeru meri približno 30 nm, sestavlja več kopij ene same virusne beljakovine C (angl. capsid) in genomska RNA. Nukleokapsido obdaja membrana. Razlikujemo zrel in nezrel virusni delec. Zreli virusni delci imajo ovojnico sestavljeno iz beljakovine E (angl. envelope) in beljakovine M (angl. membrane). Znotrajcelični, nezreli virusni delci, vsebujejo namesto beljakovine M prekurzor prM (angl. precursor M), ki se proteolitično cepi pri izstopu viriona iz celice (Heinz in sod., 2000). PrM deluje kot šaperon, ki usmerja pravilno zvijanje beljakovine E. Ovojnična beljakovina E ustvarja dimere v obliki palic, ki so usmerjene vzporedno na membrano, in tako prekriva površino virusnega delca (slika 1-1).

Virusni delec je zgrajen iz 6% ribonukleinskih kislin (RNA), 66% beljakovin, 17 % lipidov, ki izvirajo iz celičnih membran gostitelja, in 9% ogljikovih hidratov (Schlesinger in Schlesinger, 1991; Heinz in sod., 2000).



Slika 1-1 Zgradba flavivirusnega delca (Lindenbach in sod., 2007).

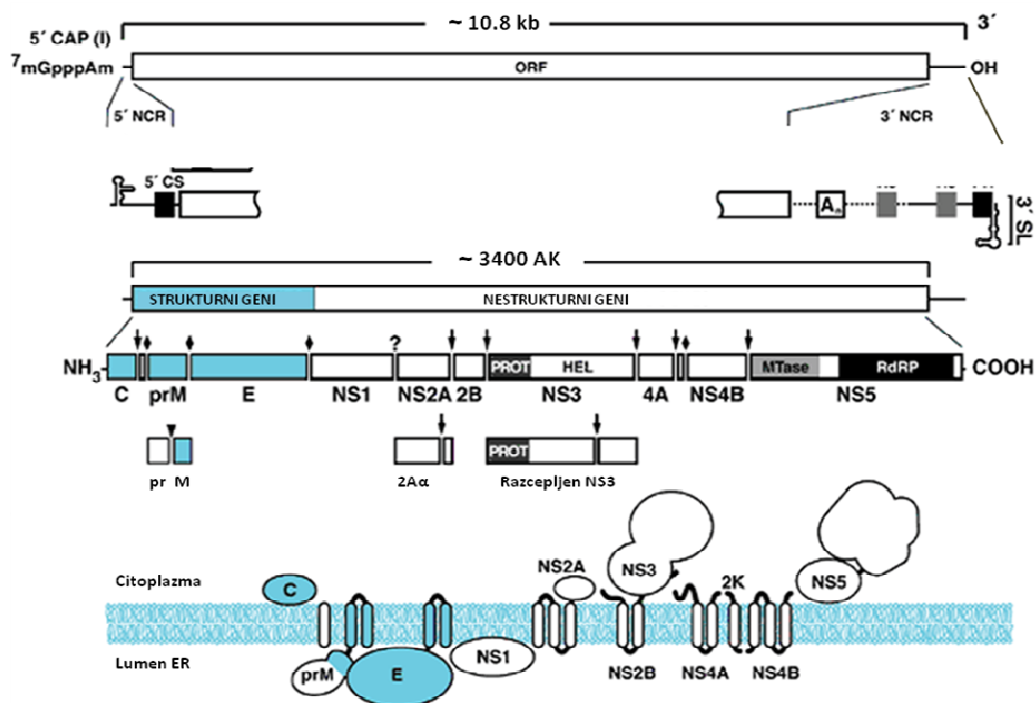
1.1.2 Organizacija genoma

Genom virusa je enojnovijačna pozitivno polarna RNA, dolga približno 11 000 nukleotidov. Genomska RNA je kužna in je edina virusna mRNA, prisotna v okuženih celicah (Heinz in sod., 2000). Sestavljena je iz dveh kratkih nekodirajočih zaporedij na 5'- in 3'-koncu in enega odprtega bralnega okvirja (angl. open reading frame, ORF), ki je dolg več kot 10 000 nukleotidov. Po prevajanju in procesiranju virusnega genoma nastane 10 različnih beljakovin. Tri strukturne (C, prM in E) in sedem nestrukturnih (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (slika 1-2) (Heinz, 2003; Fischl in sod., 2008). 5'-kratko nekodirajoče zaporedje je dolgo približno 130 nukleotidov in vsebuje kapo tipa I (m⁷GpppAmp), ki ji sledita ohranjena dinukleotida AG. Dolžina 3'-kratkega nekodirajočega zaporedja lahko variira od 450 do 800 nukleotidov in lahko vsebuje notranji poli-A rep (Heinz in sod., 2000; Gritsun in sod., 2003). RNA nekodirajoči zaporedji ustvarjata sekundarne strukture, ki sodelujejo kot cis-regulatorni elementi pri podvajanju genoma, prevajanju in sestavljanju virusnega delca (Gritsun in sod.,

2003). Genom virusa ima tri različne vloge: (1) kot sporočilna RNA (mRNA) za translacijo virusnih beljakovin, (2) kot matrica (angl. template) za pomnoževanje RNA in (3) kot genetski material, shranjen v novih virusnih delcih. Shema organizacije genoma virusa KME je prikazana na sliki 1-2 (Lindenbach in sod., 2007).

1.1.3 Virusne beljakovine

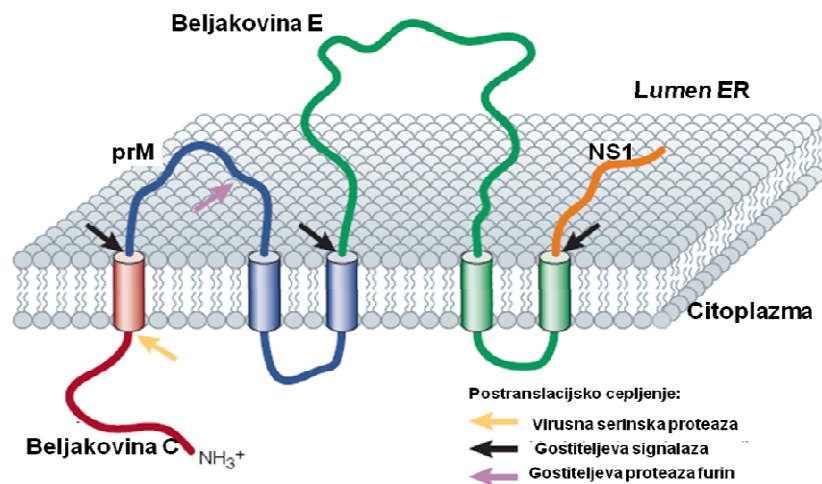
Genom virusa se prevede v eno samo polipeptidno molekulo (~3400 aminokislin). Primarni produkt prevajanja se nato kotranslacijsko in posttranslacijsko cepi na specifičnih mestih z gostiteljskimi in virusnimi proteazami. Tako nastanejo tri strukturne in sedem nestrukturnih beljakovin, ki sodelujejo pri razmnoževanju virusa (slika 1-3) (Gritsun in sod., 2003; Mandl, 2005). Signalne peptidaze gostitelja cepijo poliprotein na stikih C/prM, prM/E, E/NS1 in 2K/NS4B. Serinska proteaza virusa cepi poliprotein na stikih NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K in NS4B/NS5. Ni znano, kateri encim je odgovoren za cepljenje stika med NS1-2A. Pričakovana topologija flavivirusnega poliproteina je prikazana na sliki (1-2) (Lindenbach in sod., 2007).



Slika 1-2 Organizacija in ekspresija genoma virusa KME (Lindenbach in sod., 2007).

1.1.3.1 Strukturne beljakovine

Pri prevajanju poliproteina se strukturne beljakovine vsidrajo v endoplazmatski retikulum gostitelja (ER) z različnimi signalnimi zaporedji in transmembranskimi domenami (Slika 1-2). Beljakovina C vsebuje hidrofolbno signalno zaporedje na koncu C, ki translocira beljakovino prM v lumen ER. Beljakovina prM vsebuje dve transmembranski domeni, ki vsebujeta zaporedja za ustavljanje prenosa in signalno zaporedje. Kot rezultat tega je tudi beljakovina E, translocirana v lumen ER. V lumnu ER beljakovini prM in E sestavljata stabilne heterodimere (slika 1-3) (Lorenz in sod., 2002; Mukhopadhyay in sod., 2005).



Slika 1-3 Topologija membrane strukturnih beljakovin flavivirusov (Mukhopadhyay in sod., 2005).

Beljakovina C (~120 aminokislin, 11 kDa) je majhna, močno bazična beljakovina, ki tvori strukturno komponento nukleokapside (Lindenbach in sod., 2007). Osnovni gradnik kapside je dimer beljakovine C. Vsak monomer je sestavljen iz štirih različnih α -vijačnic ($\alpha 1$ do $\alpha 4$), ki so povezane s kratkimi zankami (Patkar in sod., 2007). Vijačnici $\alpha 2$ in $\alpha 4$ enega monomera sta antiparalelni vijačnicama $\alpha 2$ in $\alpha 4$ drugega monomera. Vse štiri vijačnice so del centralne hidrofolbne domene, odgovorne za medsebojno delovanje znotraj dimera. Domnevajo, da se $\alpha 4$ -vijačnica, ki ima visoko vsebnost pozitivno nabith aminokislin, nespecifično veže z virusno RNA. Na vsakem koncu dimera sta dve hidrofolbni $\alpha 2$ -vijačnici, ki vzpostavljata interakcijo z membrano, ki obdaja nukleokapsido, in sta znotraj žleba, ki ga obdaja $\alpha 1$ -vijačnica (Mandl, 2005; Patkar in sod., 2007). Hidrofolbni C konec prekursorja beljakovine vsidra beljakovino C

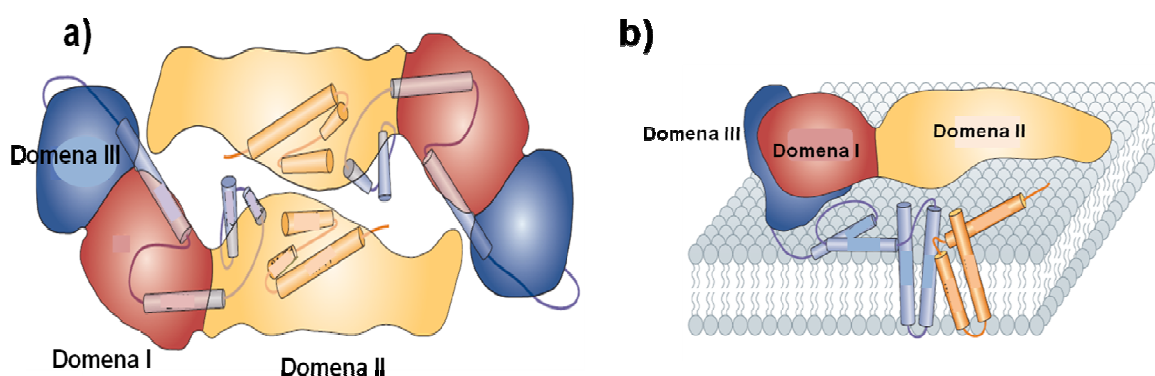
na citoplazemsko stran membrane ER in je interno signalno zaporedje, ki omogoči translokacijo beljakovine prM v lumen ER. Signalno zaporedje se pri zrelem virusnem delcu odcepi s pomočjo virusne proteaze NS2B-NS3.

Pri pomnoževanju virusa nastanejo popolni virusni delci in manjša količina sub-virusnih neinfektivnih delcev. Zaradi določenih izbrisov ali sprememb v aminokislinskem zaporedju beljakovine C lahko pri sestavljanju virusnih delcev pride do povečanega deleža neinfektivnih sub-virusnih delcev (Kofler in sod., 2002). Beljakovini prM in E lahko nedvisno od beljakovine C sestavijo sub-virusni delec, ki ne vsebuje nukleokapside (Heinz in sod., 2000).

Beljakovina prM (~165 aminokislin, 26 kDa) je glikoziliran prekurzor strukturne beljakovine M (~75 aminokislin, 8 kDa). Pri nezrelih virusni delcih ustvarja beljakovina prM heterodimerne komplekse z beljakovino E in jo s tem ščiti, saj prepreči njeno fuzijo z membrano trans-Golgijevega omrežja, kar bi se zgodilo v nasprotnem primeru zaradi nizkega pH. Beljakovina prM deluje kot šaperon za pravilno sestavljanje in zvijanje beljakovine E (Lorenz in sod., 2002). Tik preden se nezreli virusni delci sprostijo iz celice, gostiteljeva furin proteaza cepi beljakovino prM na N-terminalni (topen „pr“ odsek) in C-terminalni (strukturna beljakovina M, ki je zasidrana v membrani) odsek (Stadler in sod., 1997).

Beljakovina E (~496 aminokislin, 52 kDa) je osnovna ovojnična beljakovina, ki prekriva skoraj celotno zunanjo površino zrelega virusnega delca, in je zato tudi osnovna tarča nevtralizirajočih protiteles. Odgovorna je za ključne funkcije vstopa virusa v celice, kot so vezava na receptor in fuzija z membrano, ter za indukcijo nevtralizirajočih protiteles (Rey in sod., 1995). Domnevajo, da se lahko pritrdi na več različnih receptorjev gostiteljskih celic tako vretenčarjev kot tudi različnih členonožcev (klopi in komarji) (Kroschewski in sod., 2003; Mandl, 2005). Beljakovina E je podolgovata molekula, ki je pred fuzijo v obliki dimera, monomera sta usmerjena nasprotno ena na drugega (glava prvega gleda rep drugega). Na površini virusa ustvarja beljakovine E edinstven, tako imenovan vzorec ribje kosti (engl. herringbone pattern). Pri nizkem pH dimerne oblika beljakovine E disociira v monomere in se potem ireverzibilno spremeni v trimerno obliko, ki je bolj stabilna (Stiasny in sod., 2001). Izpostavljen zunanji del monomera beljakovine E je sestavljen iz treh različnih domen: centralna β -sendvič domena (domena I), podaljšana dimerizacijska domena (domena II) in

domena z značilno, imunoglobulinom podobno obliko (domena III) (slika 1-4). Povezave med domenami so fleksibilne, kar je zelo pomembno pri spremembi iz nezrelega v zrel virusni delec kot tudi pri procesu fuzije z membrano (Zhangin sod., 2004). C konec beljakovine je vsidran v membrano ER. Novejše raziskave kažejo, da ima tudi transmembranska regija beljakovine E pomembno vlogo pri sestavljanju virusnega delca in pri kasnejših fazah membranske fuzije, ker omogoča nujno potrebne znotraj- in medmolekulske stike pri trimerih beljakovine E (Fritz in sod., 2011).



Slika 1-4 Shematska predstavitev zunanjega in transmembranskega dela beljakovine E, od zgoraj (a) in od strani (b) (Mukhopadhyay in sod., 2005).

Zapis za beljakovino E je dovolj dolg in kljub raznolikosti dovolj dobro ohranjen za filogenetske analize (Gubler in sod., 2007). Poleg tega je v genski bazi podatkov na voljo veliko informacij o številnih zapisih za beljakovino E, ki imajo zemljepisno različen izvor. Opredelili so številne mutacije v domeni III, ki lahko spremenijo nevrovirulenco in nevroinvazivnost virusa KME, virusa Louping-ill (LIV) in virusa Langat (LGTV) (Campbell in Pletnev, 2000; Holzman in sod., 1990, 1997; Jiang in sod., 1993; Mandl in sod., 2000). Že ena aminokislinska zamenjava v domenah I, II ali III v zapisu za beljakovino E je lahko povezana z atenuacijo nevrovirulence ali nevroinvazivnosti pri laboratorijskih miškah (McMinn 1997, Holzman in sod., 1990). Dosedanje raziskave pri flavivirusih, kot so virus Zahodnega Nila, virus Denga in virus encefalitisa St. Louis kažejo na to, da je le nekaj sprememb v aminokislinskem zaporedju beljakovine E dovolj za spremembo v virulenci virusa (Pletnev in sod., 1993; Vorndam in sod., 1993; Botha in sod., 2008).

1.1.3.2 Nestrukturne beljakovine

Beljakovina NS1 (351 aminokislin, 46 kDa) je močno ohranjen glikoprotein, ki se med sintezo premesti v ER. Signalna peptidaza gostitelja jo odcepi od beljakovine E. Znotraj okuženih celic deluje kot kofaktor pri podvajanju virusne RNA. Beljakovina NS1 ustvarja homodimere. V heksamerni obliki (trije homodimeri) se izloča v serum bolnikov. Beljakovine NS1 v heksamerni obliki prevzamejo hepatociti in jih posredujejo do poznih endosomov kjer se kopičijo (Mackenzie in sod., 1996; Alcon-LePoder in sod., 2005; Lindenbach in sod., 2007).

Beljakovina NS2A (229 aminokislin, 22 kDa) je relativno majhna hidrofobna beljakovina. Domnevajo, da ima vlogo pri vezavi matrične RNA na membrano ER v kompleks za podvajanje (Mackenzie in sod., 1996).

Beljakovina NS2B (130 aminokislin, 14 kDa) je majhna, membransko vezana beljakovina. Ustvarja stabilen kompleks z beljakovino NS3 in deluje kot kofaktor za serin proteazno delovanje beljakovine NS3.

Beljakovina NS3 (621 aminokislin, 70 kDa) je velika citoplazemska beljakovina, ki se povezuje z membrano s pomočjo beljakovine NS2B. Ima vsaj trojno vlogo pri pomnoževanju virusa: helikazno, RNA trifosfatazno in, v kompleksu z beljakovino NS2B, serin proteazno aktivnost (Lindenbach in Rice, 2003). NS2B-3 proteaza posreduje večino cepitev v nestrukturni regiji virusnega poliproteina kot tudi cepitev, ki osvobodi beljakovino C od transmembranskega signalnega zaporedja. Pri helikazni aktivnosti izkorišča energijo hidrolize nukleozid trifosfatov (NTPs) za odvijanje novonastale RNA od matrice in pri odvijanju sekundarnih struktur, ki so signal za začetek podvajanja. Z RNA trifosfatazno aktivnostjo je vključena v modifikacijo 5' konca genoma (Lindenbach in Rice, 2003).

Beljakovini NS4A (149 aminokislin, 16 kDa) in NS4B (252 aminokislin, 27 kDa) sta majhni hidrofobni beljakovini. Njihova vloga je vsidranje poliproteina, ki nastane pri prevajanju genoma virusa, v znotrajcelične membrane. To omogoča pravilno delovanje polimeraznega kompleksa in pravilno cepitev poliproteina (Mackenzie in sod., 1996; Lindenbach in Rice, 2003).

Beljakovina NS5 (902 aminokislin, 103 kDa) je največja nestrukturna beljakovina flavivirusov. Njen zapis je najbolj ohranjen in stabilen del virusnega genoma. Ima osrednjo vlogo pri podvajanju virusne RNA. Vsebuje virusno od RNA odvisno RNA polimerazo in ima

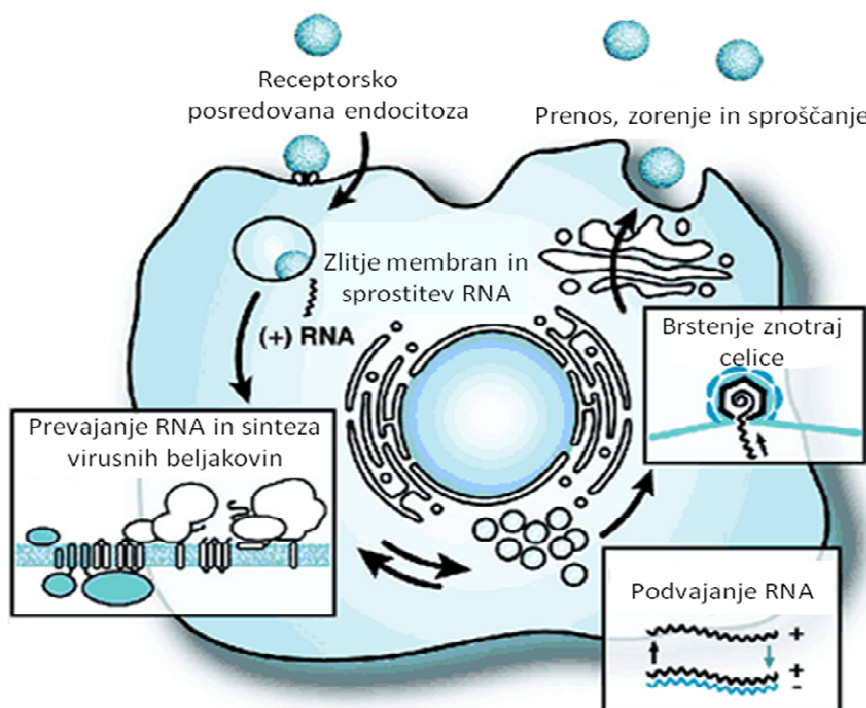
metiltransferazno aktivnost, kar je pomembno pri stabilizaciji in prevajanju molekule RNA. Sodeluje pri zaviranju imunskega odziva in je pomemben virulenčni dejavnik (Best in sod., 2005; Mansfield in sod., 2009).

1.1.4 Pomnoževanje virusa

Genom virusov s pozitivno polarno enojnovijačno RNA služi hkrati za prenos informacije, vgrajene v RNA iz ene generacije virusov v drugo, kot tudi za tvorbo proteinov v procesu prevajanja.

Prvi korak pomnoževanja virusa KME je vezava virusa na površino gostiteljske celice. Do povezave pride med virusno ovojnično beljakovino E in, kot predvidevajo, med celičnim glikozaminoglikan heparan sulfatom, ki je obilno predstavljen na membranah različnih celic vretenčarjev in klopov (Kroschewski in sod., 2003). Virus vstopi v celice gostitelja z receptorsko posredovano endocitozo. Najprej se nahaja v prelizosomalnem endocitotskem mešičku gostiteljske celice. Nizek pH povzroči konformacijske spremembe in prerazporeditev ovojnične beljakovine E, kar privede do zlitja virusne membrane z membrano endocitotskega mešička. Nukleokapsida preide v citoplazmo gostitelja, kjer se sprostí genomska RNA. Začne se prevajanje RNA za sintezo virusnih beljakovin, temu sledi podvajanje genoma virusa. Podvajanje genoma virusa je kombinacija dveh procesov: genomska RNA se pomnoži v negativno polarno kopijo RNA, ki potem deluje kot matrica, na podlagi katere od RNA odvisna RNA polimeraza (replikaza RNA) katalizira prepis pozitivno polarne RNA, ki je komplementaren genomski RNA. Beljakovini prM in E se po prevajanju preneseta v lumen ER. Več kopij beljakovine C in ena kopija genomske RNA na citoplazemski strani membrane ER sestavljajo nukleokapsido. Nukleokapsida brsti v ER in pridobi lipidno ovojnico. Nastanejo neinfektivni, nezreli virusni delci, ki imajo na svoji površini beljakovini prM in E in se brez težav prenašajo po sekretorni poti gostitelja. Poleg tega v ER nastanejo tudi sub-virusni delci (SVD), ki jim manjka nukleokapsida. Sub-virusni delci tudi po zorenju ostanejo neinfektivni (Kofler in sod., 2002). Zorenje virusa nastopi, ko proteaza gostitelja cepi prM v cisternah trans-Golgijevega omrežja in tako povzroči prerazporeditev beljakovine E, ki ustvarja fuzijsko kompetentne homodimere. Zreli, infektivni virusi, ki na svoji površini

izražajo beljakovini M in E, se z eksocitozo sprostijo iz celice (slika 1-5) (Ludwig in Iacono-Connors, 1993; Heinz, 2003; Mandl, 2005; Lindenbach in sod., 2007).



Slika 1-5 Življenjski cikel virusa KME (Lindenbach in sod., 2007).

1.1.5 Patogeneza virusne okužbe

Večina okužb z virusom KME se zgodi zaradi ugriza klopa, čeprav lahko pride do okužb tudi z uživanjem okuženega nepasteriziranega mleka (Dumpis in sod. 1999). Virus se najprej pomnožuje na mestu vboda klopa, dokazali so ga v Langerhansovih celicah kože. Od tam se preko lokalnih limfnih vozlov in limfatičnega sistema sprošča v krvni obtok. Širjenje virusa po krvi omogoči okužbo različnih organov, predvsem retikulo-endotelijski sistem (vranica, jetra in kostni mozeg). Virus se v teh organih pomnožuje in sprošča nazaj v krvni obtok, kar omogoča nekaj dnevno trajanje viremije (Haglund in Günther, 2003; Lindenbach in sod., 2007; Ružek in sod., 2010). V času viremije pride do vstopa virusa v možgane, kjer okuži osrednji živčni sistem (McMinn, 1997). Za prehod krvno-možganske pregrade je potrebno

visoko virusno breme (Chambers in Diamond, 2003). Pomnoževanje virusa povzroča vnetje, lizo in celično disfunkcijo. Natančen mehanizem prehoda virusa preko krvno-možganske pregrade še ni znan. Predlagajo štiri načine prenosa: (1) nevronska pot po okužbi perifernih živcev, (2) okužba visoko občutljivih vohalnih nevronov, (3) vstop virusa v endotelijske celice možganskih kapilar, temu sledi transcitoza in virus se sprostí v možganski parenhim, in (4) virus difundira med endotelijskimi celicami kapilar in tako preide porozno krvno-možgansko pregrado (Dorrbecker in sod., 2010; Ružek in sod., 2010).

Nevropatogeneza KME vključuje dve ločeni lastnosti: nevroinvazivnost in nevrovirulenco (Mandl, 2005). Sposobnost virusa, da se razmnožuje v perifernih tkivih, povzroča viremijo in vstopi v osrednji živčni sistem, imenujemo nevroinvazivnost. Nevrovirulenca je sposobnost virusa, da povzroči citopatsko okužbo osrednjega živčevja in razvoj encefalitisa (McMinn, 1997).

Patološke spremembe v osrednjem živčnem sistemu so razširjene in vključujejo predvsem sivo snov in leptomeninge, pri čemer so še posebej prizadeti podaljšana hrbtenjača, jedra možganskih živcev, možgansko deblo, mali možgani in hrbtenjača. Glavne tarčne celice so nevroni. Opazna je njihova degeneracija, nekroza in neurofagija (Haglund in Günther, 2003; Ružek in sod., 2010). Poškodovani so zaradi citotoksičnosti virusa in indukcije imunopatogenega odgovora (Mandl, 2005). Pri razvoju encefalitisa so dokazali pomen citotoksičnih limfocitov T. Predvidevajo, da je KME posledica kompleksnih dejavnikov propadanja živčnih celic in imunopatologije (Haglund in Günther, 2003; Dorrbecker in sod., 2010; Ružek in sod., 2009, 2010).

Za razliko od človeka je pri živalih, ki so se po naravni poti okužile z virusom KME, gostiteljski imunski odziv sposoben preprečiti razvoj bolezni. Na tem področju so potrebne nadaljnje raziskave (Mansfield in sod., 2009).

1.1.6 Občutljivost in stabilnost virusa

Virusi KME se zaradi lipidne ovojnice enostavno (hitro) inaktivirajo z organskimi topili in detergenti. Ovojnica ščiti genom virusa pred celičnimi nukleazami in ob delovanju reagentov ribonukleaze razgradijo golo nukleokapsido (Monath in Heniz, 1996).

Flavivirusi so optimalno obstojni pri pH 8,4 do 8,8. Virus KME se razlikuje od ostalih flavivirusov, ker ohrani vsaj delno infektivnost v pH področju od pH 1,42 do 9,19. Pri kislem pH se beljakovina E konformacijsko spremeni in čeprav so virusi manj infektivni, virioni ostanejo kužni v kislem mleku in prebavnih sokovih, zaradi česa je možna pot okužbe skozi prebavni trakt (slika 1-6) (Gritsun in sod., 2003; Stiasny in sod., 2007). Občutljivost na kisline, žolč, lipaze in proteaze v prebavnem traktu navadno preprečuje okužbo po oralni poti, vendar je virus KME na to delno odporen, kar še poveča možnost okužbe s pitjem kontaminiranega mleka (Monath in Tsai, 1997).

Pri temperaturi nad 50 °C se virusi hitro inaktivirajo, že po 10-ih minutah se izgubi 50 % infektivnosti. Popolno inaktivacijo virusa, suspendiranega v krvi ali drugi proteinski raztopini, dosežemo pri 56 °C za 30 minut. Virus je zelo obstojen pri ultra nizkih temperaturah (pod – 70 °C). V laboratoriju so lahko vir okužbe aerosoli, saj so virusi pri sobni temperaturi obstojni vsaj 6 ur, kar predstavlja potencialno nevarnost za okužbo prek dihalnih poti (Gritsun in sod., 2003).

Viruse inaktivira UV svetloba, obsevanje z žarki γ , nizek pH, visoka temperatura, ionski in neionski detergenti, tripsin, formaldehid, β -propiolakton, etilenamin in večina dezinficijensov, ki vsebujejo formaldehid, glutaraldehid, vodikov peroksid, alkohol, klor, jod in fenol (Monath in Heinz, 1996; Heinz in sod., 2000).

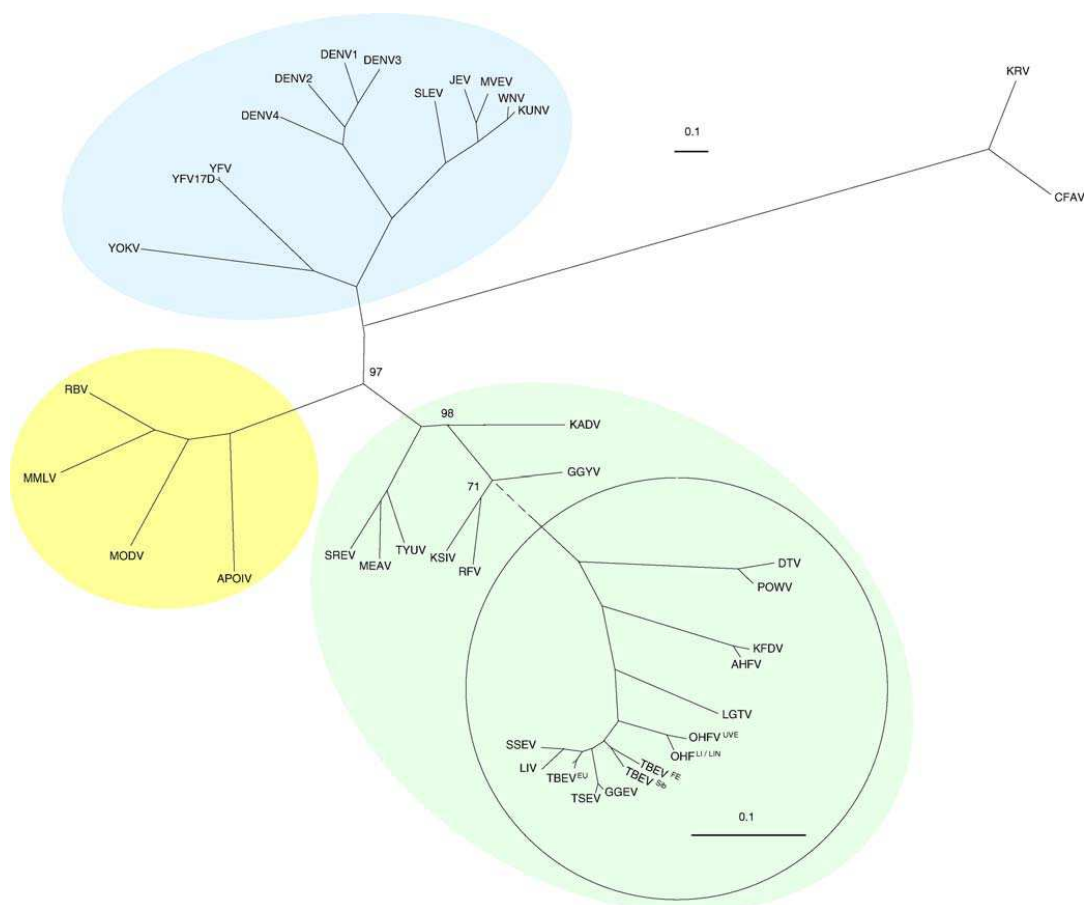
1.2 TAKSONOMIJA IN EVOLUCIJA VIRUSA KME

Družino *Flaviviridae* delimo na rodove *Flavivirus*, *Pestivirus* in *Hepacivirus* (Heinz in sod., 2000). Družina je poimenovana po latinski besedi *flavus*, ki v prevodu pomeni rumen, saj je bil prvi izoliran virus, ki spada v to družino, virus rumene mrzlice (Monath in Tsai, 1997).

Na podlagi antigenskih determinant beljakovine E so lahko s serološkimi testi (test navzkrižne reaktivnosti in nevtralizacijski test) razdelili flaviviruse v osem serokompleksov (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Antigensko razvrstitev so podprli tudi s filogenetskimi raziskavami. Virusi iz rodu *Flavivirus* se od ostalih članov družine *Flaviviridae* razlikujejo po svojih antigenskih, ekoloških in epidemioloških lastnostih. Rod sestavlja 73 virusov (50 vrst in 23 podtipov) (Gould in sod., 2003). Ustvarjajo monofiletsko linijo, ki je trenutno razdeljena v tri skupine: klopno prenosljivi virusi, virusi, ki se prenašajo s komarji, in skupina brez znanega prenašalca (slika 1-7) (Grard in sod., 2007). Prilagoditev virusa na specifičnega gostitelja vretenčarja in specifičnega prenašalca nevretenčarja vpliva na njegovo evolucijo, širjenje, epidemiologijo in patogenezo (Grard in sod., 2007).

Skupina virusov, ki se prenašajo s komarji, se je razvijala nepovezano, na večjih zemljepisnih razdaljah in dosegla večjo raznolikost (Gould in sod., 2003).

Razvoj klopno prenosljivih virusov je glede na molekularno epidemiološke študije potekal počasneje in povezano zadnjih 2500 let. Verjetno so se po pojavu v Afriki postopoma razpršili v severno Azijo, in nato proti zahodu čez gozdove Azije v Evropo. Počasen razvoj je verjetno posledica počasnega pomnoževanja virusa in podaljšanega življenjskega cikla klopov, ki traja od dve do pet let, pri čemer se klop trikrat hrani. Klopno prenosljive flaviviruse naprej delimo v tiste, katerih gostitelji so sesalci, in tiste, katerih gostitelji so morske ptice. Skupini si delita istega prednika znotraj rodu *Flavivirus* (Thiel in sod., 2005). Klopi, ki se lahko hranijo in okužijo tako sesalce kot morske ptice, predstavljajo evlucijski most med temi linijami (Grard in sod., 2007).

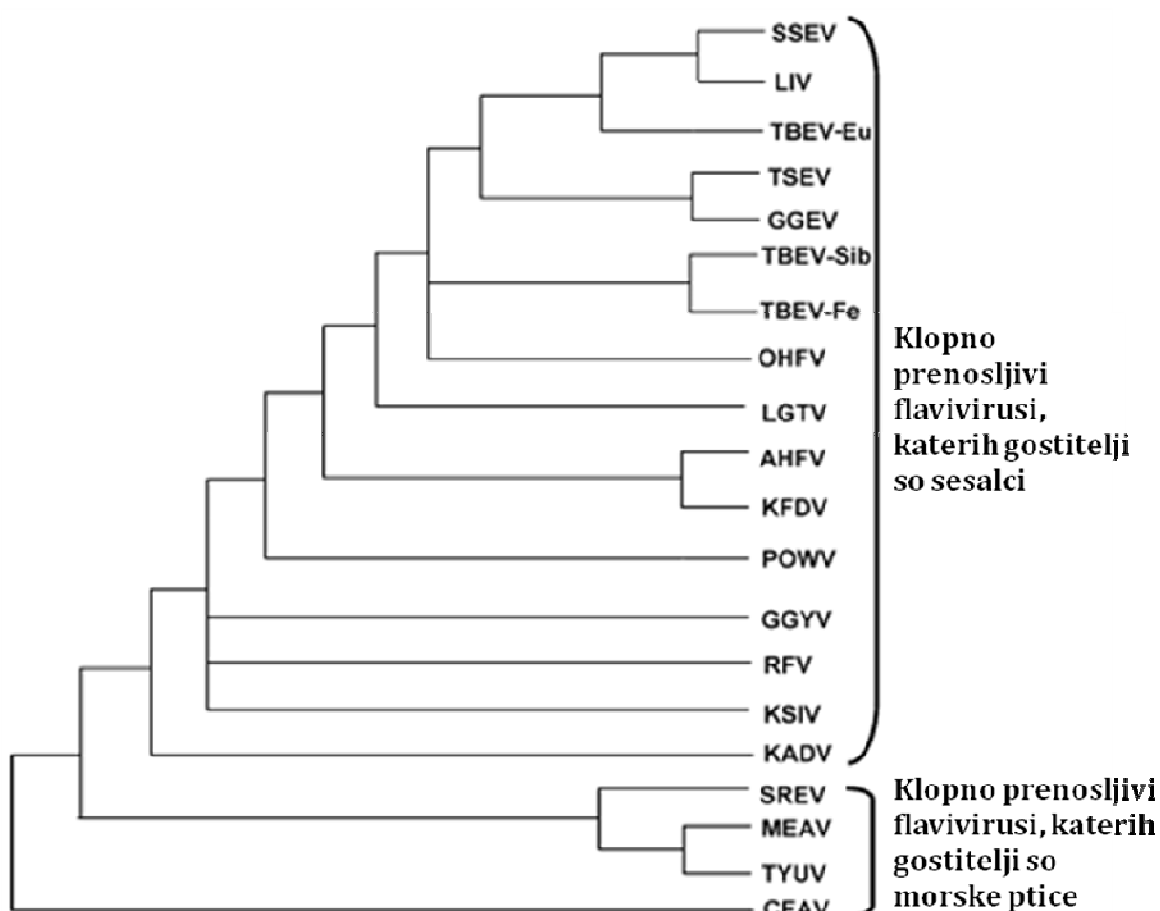


Slika 1-6 Filogenetska analiza na podlagi celotnega nukleotidnega zaporedja za poliprotein. S svetlo zeleno barvo je pobarvana skupina klopno prenosljivih virusov, z modro barvo je pobarvana skupina virusov, ki se prenašajo s komarji, in z rumeno barvo je pobarvana skupina brez poznane prenašalca (Grard in sod., 2007).

Klopno prenosljivi virusi, katerih gostitelji so morske ptice, so se razširili z neodvisnimi selitvami ptic in tako genetska evolucija teh virusov odraža prilagoditev na različne ekološke niše (Grard in sod., 2007). Klopno prenosljivi virusi, katerih gostitelji so sesalci, verjetno izvirajo iz centralne Azije. Po dostopnih podatkih se je njihova filogenetska ločitev začela po umiku zadnje ledene dobe, ki je omogočila nastanek današnje flore in favne ter sklopitev klopov z njihovimi gostitelji (gozdnimi glodavci) v gozdnih habitatih. Zemljepisno širjenje po severni polobli se je začelo v regijah tajg daljnje vzhodne Rusije in se je nadeljevalo čez Evropo vse do britanskih otokov (Dobler, 2010).

V skupino klopno prenosljivih flavivirusov, ki tvori tudi svoj serokompleks, spadajo virus Powassan (POWV), virus Louping ill (LIV), virus Langat (LGTV), virus hemoragične mrzlice

Omsk (OHFV), virus bolezni gozda Kyasanur (KFDV), virus Alkhamra (ALKV), virus Karshi (KSIV), virus Gutgets Gully (GGTV), virus Royal Farm (RFV) in virus klopne meningoencefalitisa (virus KME, angl. Tick-borne encephalitis virus, TBEV) (Gritsun in sod., 2003). Virusu KME so genetsko najbolj sorodni virus Louping ill in virus turškega in španskega encefalitisa (slika 1-8). V tabeli 1-1 so po abecednem redu prikazani klopno prenosljivi flavivirusi, ki so jim gostitelji sesalci (Dobler, 2010).



Slika 1-7 Filogenetska analiza klopno prenosljivih flavivirusov na podlagi homologije aminokislin beljakovine NS3. Dolžina vodoravnih linij ni sorazmerna z genetsko razdaljo. Kratice virusov za klopno prenosljive flaviviruse, ki so jim gostitelji sesalci, so podrobno razložene v tabeli 1. Kratice virusov za klopno prenosljive flaviviruse, ki so jim gostitelji morske ptice, so: SREV – virus grebena Saumarez, MEAV – virus Meaban, TYUV – virus Tyuleniy, CFAV – virus posrednika zlitja celic (Grard in sod., 2007).

Tabela 1-1 Klopno prenosljivi flavivirusi (Dobler, 2010).

Virus	Oznaka	Prenašalec	Zemljepisna razširjenost	Bolezen pri ljudeh
<i>virus Gutgets Gully</i>	GGTV	<i>Ixodes uriae</i>	Avstralija	ni znana
<i>virus Karshi</i>	KSIV	argasidni klopi	Uzbekistan, Kazahstan	ni znana
<i>virus bolezni gozda Kyasanur</i>	KFDV	<i>Haemaphysalis spinigera</i>	Indija	hemoragična mrzlica, encefalitis
<i>virus Alkhumra</i>	ALKV	ixodidni klopi (?)	Arabski polotok	hemoragična mrzlica, encefalitis
<i>virus Langat</i>	LGTV	ixodidni klopi	Jugovzhodna Azija, Sibirija	mrzlica, encefalitis
<i>virus Louping-ill</i>	LIV	ixodidni klopi		
britanski podtip	LIV-Brit	<i>Ixodes ricinus</i>	Britanski otoki, Norveška	encefalitis
irski podtip	LIV-Ir	<i>Ixodes ricinus</i>	Britanski otoki	encefalitis
španski podtip	LIV-Span	ixodidni klopi	Iberski polotok	ni znana
turški podtip	LIV-Turk	ixodidni klopi	Turčija	ni znana
<i>virus hemoragične mrzlice Omsk</i>	OHFV	<i>Dermacentor spp.</i>	Zahodna Sibirija	hemoragična mrzlica
<i>virus Powassan</i>	POWV	<i>Ixodes cookie</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Severna Amerika, daljnovzhodna Sibirija	encefalitis
<i>virus Royal Farm</i>	RFV	argasidni klopi	Afganistan	ni znana
<i>virus klopnega meningoencefalitisa</i>	KMEV	ixodidni klopi		
evropski podtip	KMEV-Eu	<i>Ixodes ricinus</i>	Evropa	encefalitis
daljnovzhodni podtip	KMEV-FE	<i>Ixodes persulcatus</i>	Rusija, Japonska, Kitajska	encefalitis
sibirski podtip	KMEV-Sib	<i>Ixodes persulcatus</i>	Finska, evropski del Rusije, Sibirija	encefalitis

1.2.1 Podtipi virusa KME

Poznamo tri podtipa virusa KME:

- daljnovzhodni podtip (virus KME - FE), predhodno poznan kot virus ruskega pomladno poletnega encefalitisa (RSSE). Prototipni sev virusa KME – FE je virus Sofjin, ki je

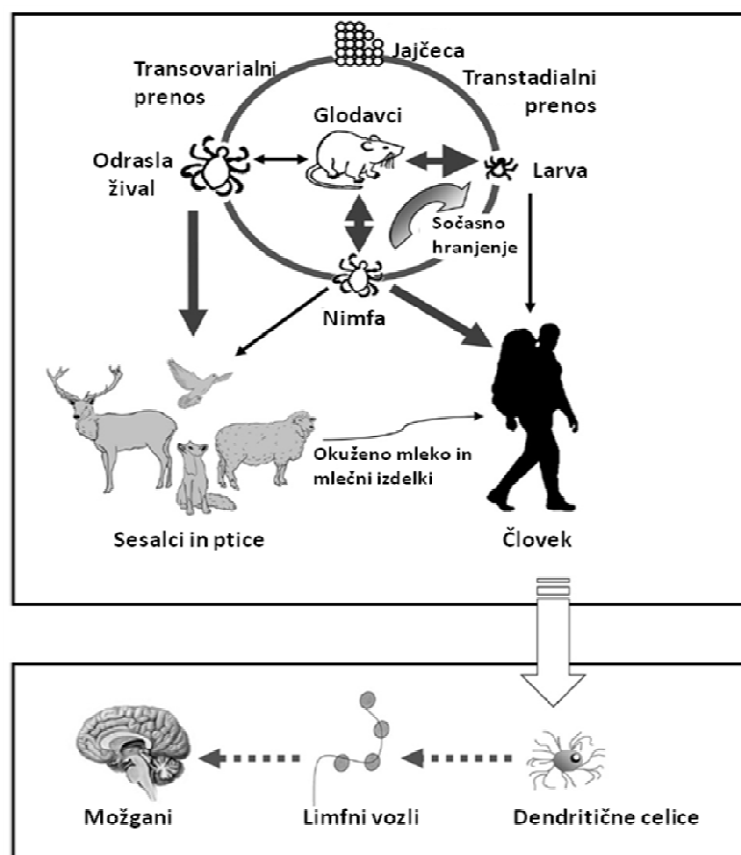
razširjen v vzhodni Evropi, Rusiji in na Japonskem. Večinoma ga prenaša klop vrste *Ixodes persulcatus*. Pri ljudeh povzroča okužbo osrednjega živčevja, najpogosteje encefalitis z 20 - 40 % smrtnostjo.

- sibirski podtip (virus KME - Sib), predhodno znan kot zahodno sibirski virus. Prototipni sev virusa KME – Sib je virus Vasilchenko, ki je razširjen v sibirskem pasu Rusije in se nekoliko prekriva z področjem podtipa KME-Eu na zahodu in KME-FE na vzhodu. Večinoma ga prenaša klop vrste *Ixodes persulcatus*. Pri ljudeh povzroča okužbo osrednjega živčevja, najpogosteje encefalitis s 6 - 8 % smrtnostjo.
- evropski podtip (virus KME - Eu), predhodno znan kot virus centralno evropskega encefalitisa (CEE). Prototipni sev virusa KME – Eu je virus Neudoerfl, ki je razširjen v osrednji Evropi in na Balkanu. Večinoma ga prenaša klop vrste *Ixodes ricinus*. Pri ljudeh povzroča okužbo osrednjega živčevja, najpogosteje encefalitis z 1 - 2 % smrtnostjo (Gritsun in sod., 2003a).

Na Baltiku so odkrili prekrivanje vseh treh podtipov virusa KME (Golovljova in sod., 2004). Novejše študije so pokazale, da sta daljnovzhodni in sibirski podtip medsebojno bolj filogenetsko povezana, kot evropski podtip, kar pomeni, da sta se ločila kasneje (Grard in sod., 2007). Do razhajanja sibirskega in daljnovzhodnega podtipa naj bi prišlo pred 1700 - 2100 leti (Hayasaka in sod., 2001). V študiji Grard in sodelavci predlagajo edinstveno taksonomsko vrsto - virus klopnega encefalitisa s štirimi virusi: zahodni virus KME, vzhodni virus KME (vključuje daljnovzhodni in sibirski podtip), virus turškega ovčjega encefalitisa (vključuje virus grškega kozjega encefalitisa) in Louping ill (vključuje španski, britanski in irski podtip) (Grard in sod., 2007).

1.3 KROŽENJE VIRUSA V NARAVI

Virus KME v naravi kroži med prenašalci (klopi), njihovimi gostitelji (mali gozdni sesalci) in naključnimi gostitelji (človek) (Grešikova in Calisher, 1989). Gostitelji virusa KME so lahko tudi divjad in domače živali. Čeprav ne razvijejo dovolj visoke viremije, ki bi omogočila nadaljni prenos virusa, te živali omogočajo razmnoževanje klopov in na ta način posredno pripomorejo k ohranjanju virusa v naravi (Avšič-Županc in Petrovec, 1997).



Slika 1-8 Koženje virusa KME v naravi med prenašalci in gostitelji; pot okužbe (Ružek in sod., 2010).

1.3.1 Klopi

Klopi in pršice so najmanjši pajkovci. Pri njih sta glavoprsje in zadek združena v celoto, nečlenast meh. Klopi so značilni ektoparaziti živali in tudi človeka (Logar, 1999). Znani so kot prenašalci različnih mikroorganizmov, ki povzročajo bolezni pri ljudeh. Obstajata dve glavni družini klopov: *Ixodidae* ali trdi, ščitasti klopi (694 vrst) in *Argasidae* ali mehki, usnjati klopi (177 vrst). Tretjo družino *Nuttalliellidae* predstavlja samo ena vrsta v južni Afriki (Sonenshine, 1991). Mehki klopi so večinoma v toplejših podnebjih. Običajno so aktivni ponoči, ko parazitirajo različne divje in domače živali in včasih tudi človeka. Trdi klopi so bolj zemljepisno razširjeni kot mehki klopi in jih lahko najdemo tudi v subarktičnih področjih (Gustafson, 1994).

Populacije klopov služijo kot prenašalci in naravni rezervoarji, virusu pa nudijo tudi način prezimitve (Ludwig in Iacono-Connors, 1993).

Glavni prenašalec evropskega podtipa virusa KME je klop *Ixodes ricinus*, medtem ko je klop *I. persulcatus* glavni prenašalec daljnovzhodnega in sibirskega podtipa virusa v Aziji in severovzhodni Evropi (Grešikova in Calisher, 1989; Lindquist in Vapalahti, 2008). Zemljepisna razširjenost podtipov se ujema z razširjenostjo prenašalcev. Na severu Finske so le v enem primeru dokazali evropski podtip virusa KME v klopu vrste *I. persulcatus* (Jääskeläinen in sod., 2011). Kot prenašalci lahko služijo tudi druge vrste klopov, kot so: *I. arboricola*, *I. hexagonus*, *I. nipponensis*, *I. ovatus*, *Haemaphysalis punctata*, *H. concinna*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus* (Gustafson, 1994; Nuttall in Labuda, 1994; Süss, 2003; Kim in sod., 2008;).

Ko se klop enkrat okuži, ohrani virus vse življenje (Kunz, 1992). Virus se v klopu razmnožuje v različnih organih, tudi žlezah slinavkah, in se prenaša s slino ob vbodu klopa (Avšič-Županc in Petrovec, 1997). Virus KME se v klopih prenaša vertikalno. Vertikalni prenos vključuje spolni (iz okuženega samca na samico), transovarialni (iz samice na jajčeca) in transstadialni (iz ličinke na nimfo, iz nje na odraslo žival) prenos (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Za dolgotrajni obstoj pa je zaradi izgub virusa pri prehodih v nove stadije (le 1% jajčec okužene samice prejme virus; le 10% odraslih klopov, ki se razvijejo iz okuženih ličink, in 30% iz okuženih nimf, je okuženih) nujno potreben še horizontalni prenos, ki vključuje stik med klopi in sesalci (Monath in Heniz, 1996; Perez-Eid in sod., 1992). Klop se hrani na viremičnem gostitelju in hkrati s krvjo zaužije virus. Da bi bil prenos mogoč, je potrebna visoka viremija gostitelja, kar se zgodi pri malih sesalcih. Človek in veliki sesalci ne razvijejo tako visoke viremije, ki bi omogočala prenos virusa na klopa, zato so le-ti končni gostitelji (Nuttall in Labuda, 1994). Obstaja še takoimenovan neviremičen prenos, ki se zgodi ob sočasnem hranjenju larv in nimf na neviremičnem ali lahko tudi na imunem gostitelju. Virus se zaradi neposredne bližine (do 1 cm) prenese iz okuženega na neokuženega klopa (Labuda in sod. 1996; Randolph in sod., 1996). Iz slovstva je znano, da je prekuženost klopov *I. ricinus* v Evropi od 0-5 % (Oehme in sod., 2002; Danielova in sod., 2002; Süss in sod., 2003; Golovljova in sod., 2004; Casati in sod., 2006; Melik in sod., 2007; Carpi in sod., 2009; Jääskeläinen in sod., 2010; Durmiši in sod., 2011).

1.3.1.1 *Ixodes ricinus*

Trdi ali ščitasti klopi družine *Ixodidae* imajo največ predstavnikov in so medicinsko najpomembnejši klopi v Evropi.

Klop *Ixodes ricinus* je prenašalec številnih medicinsko pomembnih mikroorganizmov: borelij, babezij, erlihij in virusa KME (Dumpis in sod., 1999). Razširjen je po vsej Evropi, od Irske, Velike Britanije, skandinavskih držav, preko srednje Evrope do Sredozemskega morja. Na tako velikem področju prevladujejo zelo različni naravni pogoji, kar kaže na veliko prilagodljivost in trdoživost klopov. Čeprav je njegov osnovni življenjski prostor gozd, ga najdemo tudi na travnikih (Sonenshine, 1993).

1.3.1.2 Življenjski krog in ekologija

Vse razvojne stopnje klopa *I. ricinus* prezimijo v zgornji plasti zemlje ali pod odpadlim listjem. Aktivni postanejo, ko se temperatura zemlje dvigne na 5 do 7 °C. Vsaka razvojna stopnja išče gostitelja, se pritrdi in se na njem hrani nekaj dni. Ko se klopi nasitijo, se spustijo in padejo z gostitelja, nato poiščejo mesto za počitek, kjer v miru prebavijo svoj obrok in se levijo v naslednjo razvojno stopnjo. Preobrazba iz ene razvojne stopnje v drugo ponavadi traja eno leto, življenjski krog klopa je torej dopolnjen v treh letih (Sonenshine, 1993). Klopi so relativno občutljivi na sušo in se običajno nahajajo v travi in grmičevju. *I. ricinus* se najraje zadržuje v gozdovih, kjer je visoka relativna vlažnost in ni suhih mest.

Ličinka, nimfa in odrasel klop so aktivne razvojne stopnje klopov, ki se hranijo s krvjo gostitelja (Sonenshine, 1993). Ko aktivno išče gostitelja, se klop hitro odzove na različne dražljaje, kot so CO₂, NH₃, telesno temperaturo, vibracije v zraku in ostale dražljaje, ki kažejo na prisotnost gostitelja. Prav zaradi tega jih lahko zbiramo z metodo zastave, na katero se takoj pritrdijo, saj v začetku ne razlikujejo zastave od živega gostitelja (Sonenshine, 2005). Višina, na katero klop spleza, je odvisna od razvojne stopnje. V večini primerov ličinke splezajo na nizko rastlinje blizu tal, kjer je najbolj verjetno, da bodo srečale majhne sesalce, ptice, ki se hranijo na zemlji, in ostale gostitelje. Odrasli klopi splezajo na višje rastline, kjer je večja verjetnost, da bodo naleteli na večje živali, kot so jeleni, različni mesojedci in ljudje. Klopi

lahko čakajo na spodnji strani lista tudi več ur, vse dokler se ne začnejo izsuševati. Takrat se spustijo na tla, ki so hladnejša in vlažnejša. Tam pridobijo vodo z neposredno absorpcijo atmosferske vlage. Nato splezajo nazaj na rastlino in nadaljujejo čakanje (Sonenshine, 2005).

Ko klop najde gostitelja, najprej nekaj ur pleza preden se začne hraniti. Pritrjanje se začne, ko klop vbode rilček v kožo. Najprej se zarijejo njegove helicere, ki razširijo ranico za hipostom. Zobci na hipostomu so obrnjeni nazaj, kar trdno pritrdi klopa v kožo (Logar, 1999). Temu sledi tvorba lepila, ki prepoji rano in se razširi na kožo v področje okoli ust. Lepilo je material iz beljakovin, ki ga izločajo žleze slinavke. Hitro strjanje lepila pritrdi klopa na vbodno mesto. Izločanje lepila traja 2 do 3 dni. Dokler se lepilo popolnoma ne strdi, se pritrjeni klopi lažje izpulijo iz kože. Po tem dolgotrajnem pritranju sledi sesanje krvi. Žleze slinavke izločajo različne snovi, kot so antikoagulant, antihistaminiki, lokalni anestetiki, toksini in encimi, ki olajšajo sesanje krvi. Zaradi lokalnih anestetikov žrtev ne čuti, ko klop vbode rilček v kožo.

Po pritrditvi morajo klopi najprej ustvariti novo kutikulo, da pripravijo dovolj prostora za veliko količino krvi, ki jo bodo izsesali. Zaradi tega klop ostane razmeroma dolgo pritrjen (2 do 3 dni, samice pa vse do 13 dni). Po končanem hranjenju se masa klopa poveča pri ličinkah in nimfah približno 10- do 20-krat, za odrasle samice pa lahko tudi od 100- do 120-krat (Sonenshine, 2005).

Parjenje se večinoma odvija na gostitelju, običajno pred začetkom sesanja krvi, čeprav se *I. ricinus* lahko pari tudi na rastlinah. Po parjenju in hranjenju na gostitelju se samica spusti in pade na tla. Tam poišče primerno razpoko ali odpadlo listje v gozdu in prebavi svoj obrok. Potem na varnem kraju izleže jajčeca, od 400 do več kot 20 000 (Sonenshine, 1991). Jajčeca so ovalne oblike in komaj vidna s prostim očesom. Izleganje jajčec lahko traja več tednov, nakar izčrpana samica pogine. Inkubacijski čas jajčec traja od par tednov do nekaj mesecev glede na temperaturo. Po izvalitvi iz jajčec so ličinke velike od 0,5 do 1,0 mm. Sledi iskanje prvega gostitelja in njihov prvi obrok krvi, temu sledi levitev v razvojno stopnjo nimfe. Temu sledi drugi obrok krvi in dozorevanje v odraslega klopa. Odrasla samica je velika 3 do 4 mm, samec 2,5 mm. Samec lahko oplodi več samic in potem pogine (Gustafson, 1994).



Slika 1-9 Razvojne stopnje klopa *I. ricinus*. a-nimfa, b-odrasel samec, c-odrasla samica, d-samica, napita s krvjo gostitelja (Foto: Trilar, 2002).

1.3.2 Glodavci

Mali sesalci, predvsem žužkojedi in glodavci, so pomembni gostitelji virusa KME, saj živijo v podobnem življenjskem okolju kot klopi, ki so naravni rezervoar in glavni prenašalci virusa. Glavna hrana glodavcev sta žir in želod, ki sta plodova bukve in hrasta. Plodovi ne rastejo in zorijo vsako leto enako obilno, zato je od tega odvisna gostota populacije glodavcev, ki se v letu obilnega zorenja plodov zelo poveča (Pucek in sod., 1993). V času zorenja plodov pride v bližino dreves veliko divjadi, ki so gostitelji odraslih klopov. Ko so na istem področju v velikem številu prisotni različni gostitelji in klopi v vseh svojih razvojnih stadijih, je kroženje virusa v naravi najhitrejša (Randolph, 1999). Žužkojedi (rovke, krti, ježi) imajo v nasprotju z glodavci stabilnejšo populacijo, saj njihovo preživetje ni tako močno odvisno od časa zorenja drevesnih plodov, ker se večinoma prehranjujejo s hrano živalskega izvora (Pucek in sod., 1993).

Glavni gostitelji virusa so gozdna voluharica (*Myodes glareolus*), rumenogrla gozdna miš (*Apodemus flavicollis*), navadna gozdna miš (*Apodemus sylvaticus*), poljska miš (*Microtus arvalis*), veverica (*Sciurus vulgaris*) in jež (*Erinaceus europaeus*) (Avšič-Županc in Petrovec, 1997). Na Češkem, ki prav tako kot Slovenija spada med endemska področja virusa KME, so pokazali, da sta rumenogrla miš in gozdna voluharica najpomembnejša gostitelja virusa KME (Zeman in Januška, 1999). Na zahodu Slovaške so odkrili protitelesa proti virusu KME pri 15

% rumenogrljih gozdnih miši in gozdnih voluharic, ki tam predstavljajo 75 % populacije glodavcev (Kozuch in sod., 1990). S študijo v Koreji so z molekularnimi metodami dokazali evropski podtip virusa KME pri 20 % prostoživečih glodavcev (Kim in sod., 2008). Glavni gostitelji virusa KME v Sloveniji sta gozdna voluharica (*Myodes glareolus*) in rumenogrla miš (*Apodemus flavicollis*) (Avšič-Županc in Petrovec, 1997; Knap in sod., 2012). Knap in sodelavci so ugotovili specifična protitelesa proti virusu KME pri 5,9 % glodavcev, ujetih v Sloveniji v obdobju od leta 1990 do leta 2009. Dokazali so, da je v Sloveniji incidenca bolezni povezana s prevalenco virusa KME pri lokalnih glodavcih (Knap in sod., 2012).

1.3.2.1 Kroženje virusa KME med malimi sesalci

Prenos virusa med glodavci lahko poteka vertikalno ali horizontalno. Vertikalen prenos je prenos virusa med materjo in potomci ter se lahko zgodi prenatalno ali ponatalno. Pred rojstvom se zarodki okužijo transplacentalno, po rojstvu pa s sesanjem okuženega materinega mleka. Horizontalni prenos poteka med živalmi v naravi med parjenjem (Bakhvalova in sod., 2009).

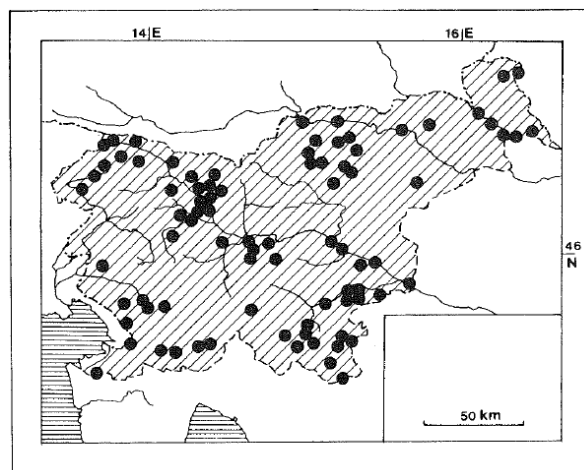
Pri glodavcih traja viremija le nekaj dni, a je dovolj visoka, da se klopi ob hranjenju lahko okužijo (Heigl in Zeipel, 1966). Okužba gostiteljev poteka po do sedaj znanih podatkih brez simptomov. Po okužbi z virusom razvije gostitelj specifična protitelesa proti virusu KME. Za vzdrževanje virusa v naravnih žariščih je zato potrebno, da je vselej zagotovljeno zadostno število mladih, za okužbo dovzetnih živali. Stare, serološko pozitivne (imune) živali namreč kot rezervoar za virus niso primerne. Mali sesalci so zato zaradi kratkega generacijskega časa in visoke reproduktivnosti primeren naravni gostitelj virusa (Solomon in Mallewa, 2001). Mali sesalci, ki so že razvili protitelesni odziv proti virusu KME in niso več viremični, tudi omogočajo prenos virusa med okuženim in neokuženim klopom, ki se sočasno hrani en ob drugem (Labuda in sod., 1997). Tak prenos virusa je izredno hiter in učinkovit. Na mestu vboda klopa virus najprej vstopi v Langerhansove celice malega sesalca in potuje v bezgavke. Tam se prenese v nove limfocite, ki potujejo na mesto vboda drugega neokuženega klopa kot odziv na antigene v slini klopa (Labuda in sod., 1996).

1.3.2.2 Rumenogrla miš

Rumenogrla miš (lat. *Apodemus flavicollis*) je razširjena po vsej Evropi vse do Skandinavije na severu, Urala na vzhodu in severozahoda Pirinejskega polotoka. V Sloveniji je splošno razširjena od nižin do nadmorske višine 1500 m; najdemo jo povsod razen v priobalnem pasu (slika 1-10).

Rep je navadno daljši od telesa, ima velike oči, dolge uhlje in stopala. Snežnobel trebuh je ostro omejen od intenzivno rjavega hrbta. Pri mladih živalih prevladujejo sivkasti toni, tudi na trebuhu. Prek grla se ji pogosto vleče značilen sklenjen rumen trak.

Živi v suhih in toplih, mešanih ali listnatih gozdovih, kjer je neredko najpogostejši mali sesalec. Lahko jo najdemo tudi v iglastih gozdovih in na odprtih področjih. Zlasti jeseni zaide tudi v stavbe. Drži se gozdnih tal, vendar tudi dobro pleza in si včasih zgradi gnezdo v drevju (ali v ptičji gnezdilnici). Žival je zelo hitra in aktivna predvsem ponoči. Prehranjuje se s semeni in plodovi, vendar v prehrani potrebuje tudi živalsko komponento. Razmnožuje se od marca do oktobra. Rumenogrla miši v naravi živijo največ 18 mesecev. Plenijo jih ujede, sove ter majhne in srednje zveri (Kryštufek, 1991).



Slika 1-10 Razširjenost rumenogrla miši (*Apodemus flavicollis*) v Sloveniji (Kryštufek, 1991).

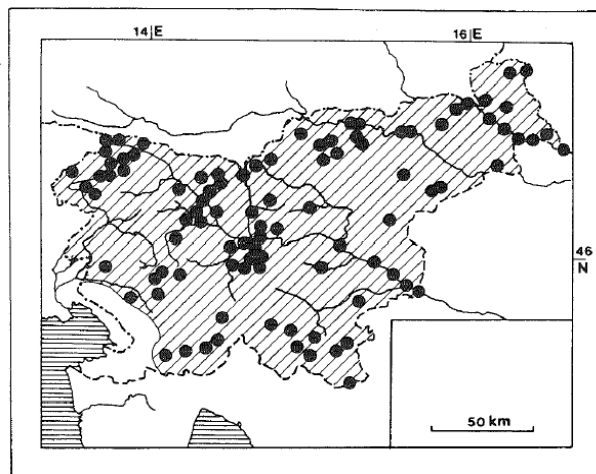
1.3.2.3 Gozdna voluharica

Gozdna voluharica (lat. *Myodes glareolus*) je razširjena od Pirinejev in Anglije do Bajkalskega jezera v Rusiji. V Evropi seže na jugu vse do Apeninov in severne Grčije, na severu pa do polarnega kroga. Razširjena je po vsej Sloveniji, od nižin do nadmorske višine 2000 m (slika 1-11).

To so manjše voluharice z razmeroma dolgim repom. Smrček je nekoliko bolj zašiljen kot pri ostalih voluharicah in ima večje uhlje. Hrbet je intenzivno rdečerrjave barve, trebuh je siv z rumenimi ali oker odtenki. Rep je dvobarven, zgoraj temno rjav, spodaj svetel. Na koncu repa je čop daljših dlak.

Najdemo jo v listnatih, mešanih in iglastih gozdovih, barjanskih grmiščih, gostem rastlinju ob vodah in v živih mejah. Izjemoma gre tudi v ruševje in kamenišča. Najpogosteje jo najdemo v vlažnih nižinskih gozdovih in ob velikih vodnih tokovih subpanonskega sveta.

Živijo predvsem na in v gozdnih tleh, čeprav tudi dobro pleza. Aktivne so cel dan, ponoči še bolj kot podnevi. Voluharice so rastlinojede in najraje uživajo mehke plodove in semena. Poleg tega jedo še glive, mahove, zelene dele rastlin in nevretenčarje. Razmnožuje se od aprila do oktobra. Mladiči so ob rojstvu slepi in goli, sesajo 18 dni in s 3-4 tedni dosežejo spolno zrelost. Življenjska doba je največ 18 mesecev. Plenijo jih vse zveri, ujede in sove (Kryštufek, 1991).



Slika 1-11 Razširjenost gozdne voluharice (*Myodes glareolus*) v Sloveniji (Kryštufek, 1991).

1.3.3 Človek

Na človeka lahko prenesejo virus vse razvojne oblike klopa. Ogroženi so predvsem ljudje, ki živijo, delajo ali se zadržujejo v naravnih žariščih virusa KME, gozdni delavci, taborniki in vojaki (Monath in Heinz, 1996).

Pokazali so, da je prevalenca virusa KME v klopih, odstranjenih s človeka, značilno višja kot pri nenahranjenih, prosto živečih klopih vrste *I. ricinus* na istem področju, kar je verjetno povezano z različnimi pomnoževalnimi strategijami virusa v klopih in sesalskih celicah (Süss in sod., 2006). Za razliko od glodavcev, človek ne razvije dovolj visoke viremije, da bi okužil klope, in klopi se običajno na človeku ne hranijo v velikem številu ali tako tesno drug ob drugem, da bi lahko prišlo do prenosa virusa ob sočasnem hranjenju (Labuda in sod., 1993). Zaradi tega je človek opredeljen kot končni gostitelj. Strokovnjaki za evolucijo virusov ta fenomen razlagajo s kratkotrajno interakcijo med virusom KME in človekom, ter pomnoževanjem v še ne prilagojenem gostitelju (Dobler, 2010).

Človek se z virusom KME lahko okuži tudi posredno z uživanjem nepasteriziranih mlečnih izdelkov, saj domače živali (krave, koze, ovce) med viremijo izločajo virus KME v mleko (Süss, 2003; Cisak, 2010).

1.4 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽBE Z VIRUSOM KME

1.4.1 Naravna žarišča

Virus KME najdemo le na omejenih področjih, imenovanih žarišča, ki so lahko velika od nekaj kvadratnih metrov do nekaj kvadratnih kilometrov (Süss, 2003; Zeman, 1997). Po teoriji, ki jo je razvil Evgenij Pavlovsky, je naravno žarišče zemljepisno področje, kjer je evolucija vodila do posebnih odnosov med virusom, prenašalcem in gostiteljem. Pri določenih botaničnih, zooloških, podnebnih in geo-ekoloških pogojih naravnega žarišča lahko virus KME kroži med okuženimi malimi sesalci in klopami. Ekološke okoliščine, v katerih se ohranja naravno kroženje virusa KME, so kompleksne in krhke (Randolph in Rogers, 2000; Süss, 2003).

Nastanek in obstoj naravnih žarišč je odvisen od več dejavnikov: podnebnih razmer, gostote in stabilnosti populacije klopov in gostiteljev, dovzetnosti gostiteljev, trajanja virerije v gostiteljih, deleža imunih gostiteljev, lastnosti biotopa (Avšič-Županc in Petrovec, 1997; Gustafson, 1994; Heinz, 2007). Naravno žarišče je aktivno, kjer so velike in stabilne populacije klopov, malih sesalcev in žužkojedov, ki imajo sinhrono sezonsko aktivnost. Kot latentno žarišče imenujemo področje kjer ugotovimo prisotnost virusa KME v gostiteljih, bolezen pa se pri prebivalstvu ne izraža (Randolph in sod., 1999; Randolph in sod 2000).

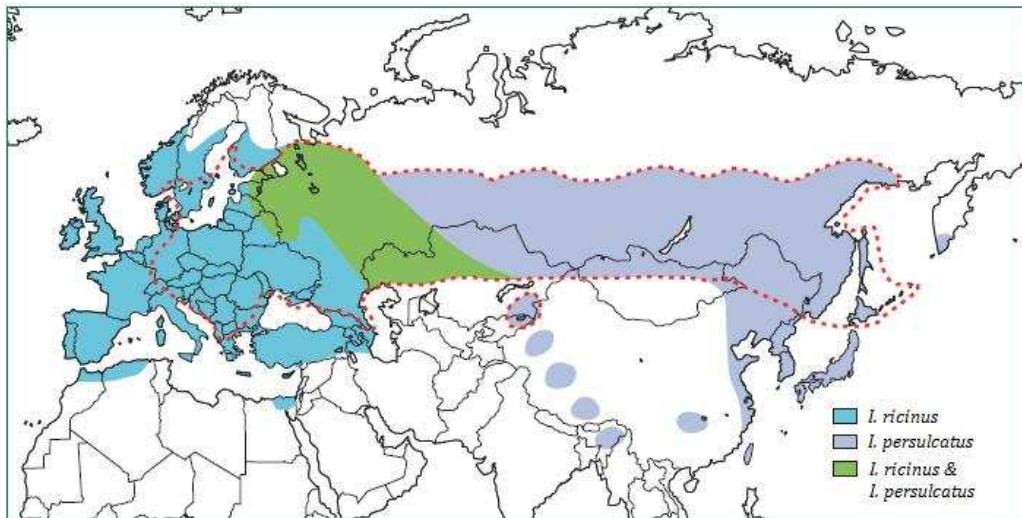
1.4.2 Razširjenost KME v svetu

Klopni meningoencefalitis (KME) je najpomembnejša flavivirusna okužba osrednjega živčevja v Evropi in Rusiji (Donoso Mantke in sod., 2008). Virus KME je endemičen na področju, ki sega od severa Kitajske in Japonske preko Rusije v Evropo (Mansfield in sod., 2009). Zemljepisna razširjenost podtipov virusa sovpada z razširjenostjo glavnih prenašalcev, klopov vrste *I. ricinus*, ki prenašajo evropski podtip virusa KME, in klopov vrste *I. persulcatus*, ki prenašajo sibirski in daljnjevzhodni podtip virusa KME (Golovljova in sod., 2008; Lindquist in Vapalahti, 2008; Petri in sod., 2010). Na omejenih področjih srednje, vzhodne in severne Evrope najdemo evropski podtip virusa KME. V Rusiji, na severu Kitajske in na Japonskem najdemo daljnjevzhodni podtip virusa KME. Sibirski podtip virusa KME najdemo na endemičnih področjih sibirskega dela Rusije in na severu Finske. Vse tri podtipe virusa najdemo v Baltskih državah (Slika 1-13) (Jääskeläinen in sod., 2006; Golovljova in sod., 2008; Lindquist in Vapalahti, 2008; Kovalev in sod., 2009; Kovalev in sod., 2010; Jääskeläinen in sod., 2010).

Na svetu je vsako leto prijavljenih 10 000 do 12 000 primerov KME, od tega okrog 3000 v Evropi (Süss, 2003; Donoso Mantke in sod., 2008). V obdobju od leta 2001 do leta 2008 je bilo zabeleženo 56 617 primerov KME (povprečje je 7077 na leto), od tega 43 451 primerov v Rusiji (povprečje je 4306 na leto) in 22 166 primerov v ostalih državah Evrope (povprečje 2771 na leto) (Arnež in Avšič-Županc, 2009). Države z največjo incidenco so Latvija (30 primerov na 100 000 prebivalcev na leto), Rusija (20,5) Estonija (16,5), Slovenija (14) in Litva (11,2) (Kaiser, 2008). Bolnikov s KME zaenkrat ni v Veliki Britaniji, na Irskem,

Islandiji, Belgiji, Nizozemskem, Španiji in na Portugalskem (Donoso Mantke in sod., 2008; Süss, 2011). Število prijavljenih obolenj se v posameznih državah iz leta v leto spreminja, kar je posledica sprememb podnebnih razmer, gostote populacije malih sesalcev in gostote populacije okuženih klopov. Bolezen je potrebno obvezno prijaviti v 16 državah: v 13 državah Evropske unije (Avstrija, Češka, Estonija, Finska, Nemčija, Grčija, Madžarska, Latvija, Litva, Poljska, Slovaška, Slovenija, Švedska) ter na Norveškem, v Švici in Rusiji (Süss, 2008; Mansfield in sod., 2009). Primerjava obdobja od 1976 do 1989 in od 1990 do 2007 kaže, da se je delež obolelih na področju držav Evrope, razen v Avstriji, povečal za okoli 300 % (Süss, 2008; Mansfield in sod., 2009; Arnež in Avšič-Županc, 2009). Število prijavljenih primerov KME z leti narašča in endemična področja se razširjajo (Süss, 2003).

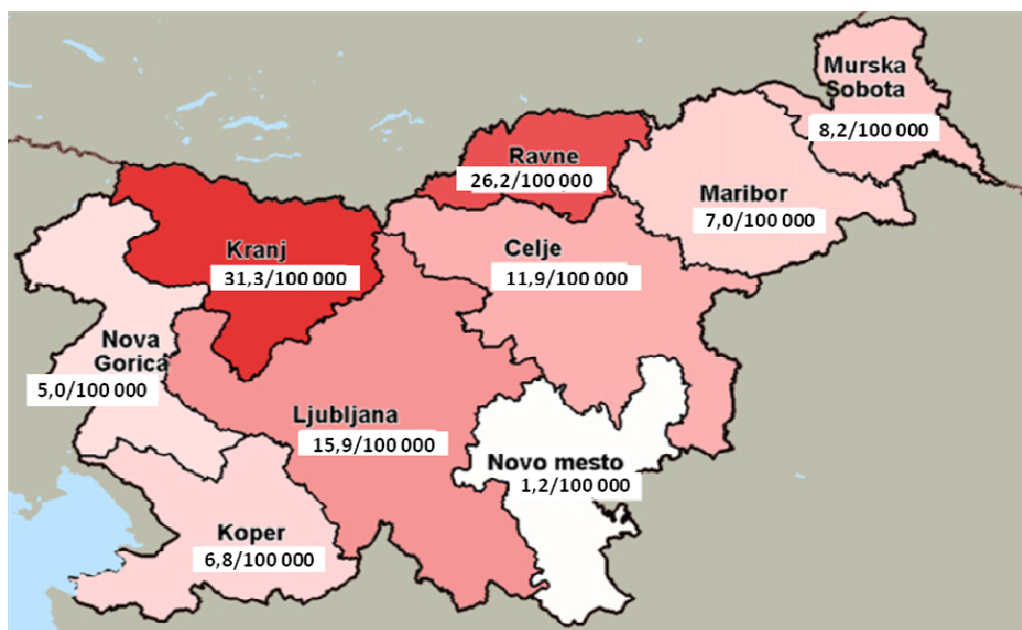
Povečano število obolelih s KME pripisujejo podnebnim spremembam, ki vplivajo na življenjski cikel klopov in njihovo širjenje v bolj severna področja kot tudi področja z višjo nadmorsko višino. Zviševanje povprečne temperature in povečanje količine padavin vodita do povečanja vlažnosti, kar izboljša življenjske pogoje za klope in glodavce (Süss, 2008). Poleg podnebnih sprememb prispevajo k povišanju incidence obolelih tudi socialni, politični, ekološki, ekonomski in demografski dejavniki (Süss, 2008). Spremembe, kot so povečanje števila nezaposlenih, povečanje prostega časa pri ljudeh z višjim ekonomskim standardom in upokožitev ljudi z višjim standardom, ki so bolj zdravi in zato tudi bolj aktivni, privedejo, da se ljudje vse več časa zadržujejo v naravi (sprehodi, planinarenje, ribolov, nabiranje gob) in so tako bolj dovzetni za ugriz klopa. Ponekod se je zaradi zmanjšanja obdelovanja zemlje in prepovedi uporabe nevarnih pesticidov povečala možnost za bivanje glodavcev (gostiteljem klopov). Potovanja so postala zelo priljubljena in predhodno zelo nedostopna mesta so postala dostopna, s čimer je narasla možnost okužbe ljudi, ki potujejo na endemična področja (Šumilo in sod., 2008a; Süss, 2008; Šumilo in sod 2008b; Mansfield in sod., 2009).



Slika 1-12 Razširjenost KME in njegovih prenašalcev. Z rdečo prekinjeno črto je označena meja, ki obkroža endemično področje (Lindquist in Vapalahti, 2008).

1.4.3 Razširjenost KME v Sloveniji

Slovenija je že od leta 1953 znana kot del velikega srednjeevropskega endemskega področja KME. Obvezno prijavljanje bolezni je bilo uvedeno leta 1977 (Kraigher in sod., 1996; Vesnjak-Zmijanec in sod., 1995). Tudi v Sloveniji je pojavljanje klopnega meningoencefalitisa vezano na naravna žarišča, ki imajo različno intenziteto: izredno aktivna (področje Mozirja in Kranja, kjer je možnost okužbe in obolevanja velika), nizko aktivna (področje Škofje Loke in Ilirske Bistrice) in celo latentna žarišča (kjer okužba in obolenje nista verjetni) (Avšič-Županc in sod., 1995). Endemsko področje se v Sloveniji razteza čez severni del Slovenije od Jesenic do Šentilja, nadaljuje se v Celjski kotlini, Savinjski dolini na Gorenjsko, potem do Ljubljanske kotline in naprej vse do Cerknice in Postojne ter Kočevja (Kraigher in sod., 2010; Avšič Županc in sod., 2009). Regije z najvišjo stopnjo obolevanja zaradi KME sta Gorenjska in Koroška (slika 1-14) (Grgič-Vitek in Klavs, 2011). Glede na velikost ima država ne le številne različne habitate, temveč tudi značilno različne podnebne pogoje na relativno majhni površini (Knap in sod., 2009). V Sloveniji zabeležimo letno okoli 200 - 300 primerov bolezni (Jereb in sod., 2002).



Slika 1-13 Povprečna letna incidenca KME po regijah v Sloveniji od leta 2000 do 2009 (Grgič-Vitek in Klavs, 2011).

Tveganju okužbe so izpostavljeni ljudje vseh starostnih skupin. Struktura zbolelih po spolu ostaja iz leta v leto skoraj nespremenjena. Delež zbolelih moških je nekoliko večji kot delež žensk (Kraigher in sod., 2010). V Evropi je bilo 5,1 - 12,9 % vseh poročenih primerov klopnega meningoencefalitisa pri otrocih, mlajših od 15 let (Arnež in Avšič-Županc, 2009). V Sloveniji je precepljenost otrok izjemno nizka (okoli 4 %) in je incidenca 40-krat večja kot v Avstriji, kjer je uvedeno cepljenje otrok (Zenz in sod., 2005; Arnež in Avšič-Županc, 2009). KME je v Sloveniji najpogostejši vzrok akutnega encefalitisa pri otrocih, mlajših od 15 let in je najpogostejše dokazana vročinska bolezen, ki se pojavi v šestih tednih po vbodu klopa (Čižman in Jazbec, 1993; Arnež in sod., 2003). Največje tveganje za okužbo je pri ljudeh, ki se začasno ali trajno zadržujejo na endemičnih področjih. Med take skupine ljudi spadajo predvsem delavci v kmetijstvu, gozdnem gospodarstvu, lesnih podjetjih, lesno-predelovalni industriji in gradbeništvu. Veliko število obolelih je tudi med ljudmi, ki hodijo v gozd zaradi rekreacije, nabiranja gozdnih sadežev in gob (Kraigher in sod., 2010).

1.5 KLINIČNA SLIKA, ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽBE

1.5.1 Klinična slika

KME je virusno obolenje osrednjega živčnega sistema. Večina okužb (70 - 95 %) z virusom KME poteka asimptomatsko (brez bolezenskih simptomov in znakov) (Venturi in sod., 2009). Pri vsaj dveh tretjinah bolnikov, ki kažejo prizadetost osrednjega živčevja, je potek bolezni dvofazen (Avšič-Županc in sod., 2009).

Prva, viremična faza bolezni nastopi običajno 7-14 dni po okužbi in traja do enega tedna. Zanja so značilni nespecifični, gripi podobni simptomi (vročina, glavobol, slabo počutje, utrujenost in bolečina v žrelu) in sovpada s prisotnostjo virusa v krvi (Lotrič-Furlan in sod., 2002; Gritsun in sod., 2003). Prvi fazi bolezni sledi asimptomatski interval, ki traja od 2 do 10 dni. Pri 20 do 30 % obolelih bolezen napreduje v drugo, fazo bolezni, kjer pride do nevroloških zapletov, in ta sovpada z vdorom virusa v osrednje živčevje (Dumpis in sod., 1999; Donoso Mantke in sod., 2008). Okužba osrednjega živčevja se lahko kaže kot vnetje možganskih ovojnic (meningitis), možganskega tkiva (encefalitis), hrbtenjače (mielitis), korenin živcev (radikulitis) ali kot kombinacija vseh štirih (Mansfield in sod., 2009). Praviloma to fazo spremlja močan glavobol, slabost, bruhanje, otrdelost vratu in vročina (Avšič-Županc in sod., 2009). Dolgotrajne ali celo trajne nevrološke posledice kot so glavobol, motnje v zaznavanju, koncentraciji, spominu, sluhu, koordinaciji, ravnotežju in delne paralize ali depresija, se pojavijo pri 10 do 58 % bolnikov (Bogovič in sod., 2010; Haglund in Gunther, 2003; Avšič-Županc in sod., 2009). Smrtnost zaradi KME, ki ga povzroča evropski podtip virusa KME je 1 do 2 % (Mandl, 2005).

Pri otrocih je praviloma potek bolezni blažji kot pri odraslih. Pri 2 % zbolelih otrok so zaznali dolgoročne nevrološke motnje, pri 26 % dolgotrajne koncentracijske in gibalne motnje in pri 60 % abnormalne encefalogrami (Arnež in Avšič-Županc, 2009). Resnost bolezni narašča s starostjo in je najvišja pri ljudeh, starejših od 60 let (Logar in sod., 2000; Jereb in sod., 2002; Logar in sod., 2006).

Tudi potek bolezni po zaužitju okuženega mleka je dvofazen, podoben omenjenemu poteku po vbodu klopa (Gritsun in sod., 2003). Razlika od okužbe z vbodom klopa je, da se pojavlja

epidemično, zbolevalo celotne družine, ne prihaja do težjih nevroloških zapletov in bolniki v veliki večini popolnoma okrevajo (Gritsun in sod., 2003).

Smrtnost zaradi KME, ki ga povzroča daljnovzhodni podtip virusa KME je 20 do 40 %, popolno okrevanje nastopi le pri 25 % bolnikov. Smrtnost zaradi KME, ki ga povzroča sibirski podtip virusa je 2 do 3 % in le pri 2 % poteka simptomatsko (Gritsun, 2003; Arnež in Avšič-Županc, 2009).

1.5.2 Zdravljenje in preprečevanje bolezni

Trenutno ni specifičnega zdravila za zdravljenje KME. Zdravljenje bolnikov s KME je simptomatsko in podporno ter je odvisno od izraženih simptomov pri posameznem bolniku. Bolnike je potrebno nadzirati. Če pride do ohromitve dihalnih mišic, je potrebna intubacija in umetno predihavanje (Telford in Foppa, 2000; Dumpis in sod., 1999). Bolezen lahko preprečimo z zmanjšanjem možnosti vboda klopa na področjih, kjer je virus KME prisoten. Preprosti preventivni ukrepi so nošenje primernih oblačil (dolgi rokavi in dolge hlače, gladkih tkanin in svetlih barv, zataknjene v nogavice), uporaba repelentov, tuširanje in pregledovanje telesa takoj po obisku gozda in čim hitrejša odstranitev pritrjenega klopa z uporabo pincete (Grgič-Vitek in Klavs, 2011). Pomembo je, da pred zaužitjem mleko toplotno obdelamo (Cisak in sod., 2010; Ružek in sod., 2010).

Najučinkovitejši način zaščite pred boleznijo je cepljenje. V Sloveniji je že od leta 1986 uvedeno obvezno cepljenje za vse, ki so poklicno izpostavljeni tveganju za okužbo in od leta 1990 za dijake in študente, ki so pri praktičnih vajah izpostavljeni nevarnosti okužbe. Od leta 1991 cepivo priporočajo vsem, tudi otrokom, starejšim od enega leta, ki živijo ali potujejo v endemična področja (Grgič-Vitek in Klavs, 2011).

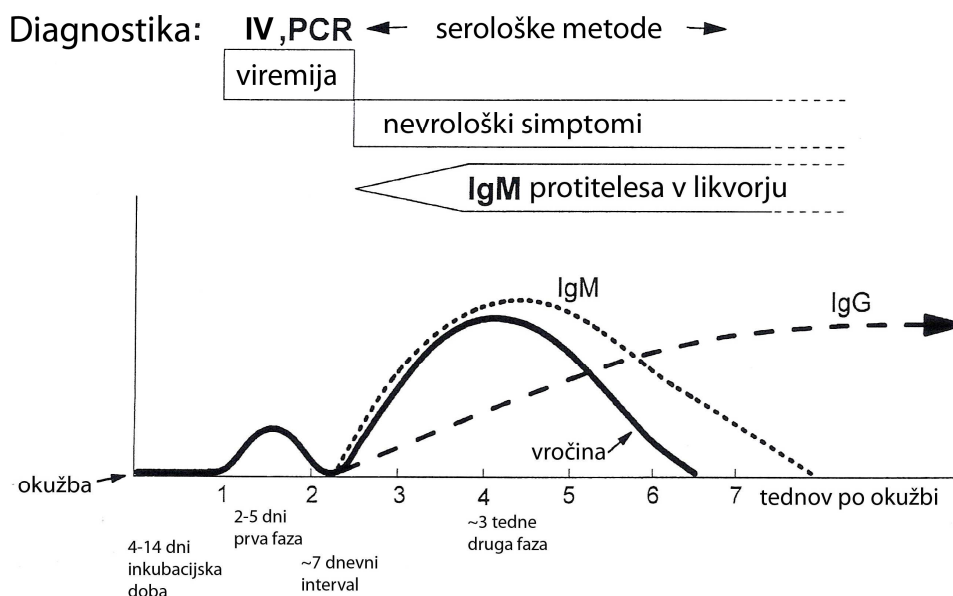
Za popolno cepljenje so potrebni trije odmerki cepiva. 1 do 3 mesece po prvem odmerku sledi cepljenje z drugim odmerkom, 9 do 12 mesecev po tem sledi cepljenje s tretjim odmerkom. Da dosežemo ustrezno zaščito še preden postanejo klopi aktivni, je najboljši čas za začetek cepljenja v zimskih mesecih. Prvo revakcinacijo se opravi z enim odmerkom cepiva tri leta po tretjem odmerku, naslednje revakcinacije pa na pet let. Pri osebah, starejših od 50 let se priporoča obnavljanje zaščite z revakcinacijo na tri leta. Kljub povečanemu številu cepljenih v

zadnjih letih, je delež cepljenih proti KME v Sloveniji nizek, okoli 12,4 % prebivalcev (Grgič-Vitek in Klavs, 2011).

V Evropi sta v uporabi dve cepivi, ki vsebujeta očiščen antigen virusa KME, pripravljen na celični kulturi piščančjih fibroblastov, ki je inaktiviran s formalinom (Gustafson, 1994). Obe cepivi sta narejeni s sevi virusov KME, ki sodijo v evropski potip virusa KME, in obe zaradi navzkrižne reaktivnosti zaščitita proti vsem trem podtipom virusa KME (Holzmann in sod., 1992). Cepivo FSME-Immun® (Baxter GmbH, Dunaj, Avstrija) je narejeno na podlagi avstrijskega seva virusa KME Neudorfl, cepivo Encepur (Chiron Behring) pa je narejeno na podlagi nemškega seva virusa KME Karlsruhe.

1.6 DIAGNOSTIKA

Pri diagnostiki KME je pomembno vedeti, ali je bolnik obiskal kraj, ki je endemičen, in ali se spominja vboda klopa pred pojavom simptomov oziroma ali je užival nepasterizirano mleko ali mlečne izdelke. Pomemben podatek je tudi, če je bil bolnik cepljen proti KME ali proti kateri drugi bolezni, ki jo povzročajo flavivirusi (virus japonskega encefalitisa, virus rumene mrzlice) in kdaj (Holzmann, 2003). Pri laboratorijski diagnozi uporabljamo vzorce, odvzete antemortem (serum in likvor) in postmortem (tkivo) (Holzmann, 2003). Za pravilno diagnozo pri vrednotenju rezultatov je potrebno in je bistveno sodelovanje zdravnikov ter laboratorijskega osebja (Arnež in Avšič-Županc, 2009). Da bi rezultate lahko primerjali med različnimi državami, je potrebno vpeljati standardizirane serološke in molekularne teste v vse evropske države (Donoso Mantke in sod., 2008).



Slika 1-14 Diagnostika KME pri dvofaznem poteku bolezni. Kratice: IV – izolacija virusa, PCR – verižna reakcija s polimerazo (Holzmann, 2003).

1.6.1 Neposredno dokazovanje virusa

Za neposredno dokazovanje virusa KME se najpogosteje uporablja dokazovanje virusne RNA v vzorcih bolnikov z verižno reakcijo s polimerazo z reverzno transkripcijo (RT-PCR, angl. reverse transcription polymerase chain reaction). Z RT-PCR lahko dokažemo okužbo z virusom KME pred pojavom specifičnih protiteles (slika 1-14), to je v prvi fazi bolezni, v drugi fazi pa le izjemoma pri redkih bolnikih, ki v začetnem obdobju druge faze KME še nimajo specifičnih protiteles. RT-PCR je primeren tudi za dokazovanje virusa KME v tkivih oseb, ki umrejo kmalu po začetku KME (Holzmann, 2003; Saksida in sod., 2005; Donoso Mantke in sod., 2008; Arnež in Avšič-Županc, 2009). Z RT-PCR lahko dokažemo virus brez predhodne osamitve tudi pri prenašalcih in gostiteljih (Avšič-Županc in Poljak, 1993).

Za neposredno dokazovanje virusa lahko uporabimo tudi metodo osamitve virusa iz kužnin bolnika. Ta metoda ni primerna za hitro diagnostiko okužbe, saj je časovno zamudna, tehnično zahtevna in razmeroma nevarna. Virus lahko osamimo iz vzorcev krvi, likvorja, redkeje urina in blata (Avšič-Županc in Poljak 1993; Holzmann, 2003).

1.6.2 Posredno dokazovanje virusa

V rutinski diagnostiki najpogosteje uporabljamo encimsko imunsko metodo (ELISA, angl. enzyme linked immunosorbent assay) in imunofluorescenčno metodo (IFA, angl. immunofluorescence assay). Testa temeljita na dokazovanju specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumu ali likvorju bolnika (Holzmann, 2003). Protitelesa se praviloma pojavijo hkrati z nevrološkiimi simptomi (slika 1-15). Protitelesa razreda IgM lahko zaznamo v serumu do šestega dne po nastopu nevroloških simptomov in jih lahko s testi dokažemo do nekaj mesecev po akutni okužbi. Protitelesa razreda IgG dosežejo najvišjo vrednost okrog šestega tedna po okužbi in jih lahko v serumu dokažemo vse življenje. Zaradi tega preprečujejo ponovno okužbo (Mansfield in sod., 2009). V serumu cepljenih oseb lahko tudi do deset mesecev po cepljenju zaznamo specifična protitelesa razreda IgM (Holzmann, 2003).

Dokaz samo protiteles razreda IgM ni zadosten za diagnozo, potrebno je dokazati tudi protitelesa razreda IgG. Če so prisotna le IgM protitelesa testiranje ponovimo čez 1-2 tedna (Holzmann, 2003). Če v serumu bolnika dokažemo samo specifična protitelesa razreda IgG, so ta lahko rezultat brezsimptomске okužbe, imunskega odziva po uspešnem cepljenju ali navzkrižno reaktivnih protiteles. Nastanek navzkrižno reaktivnih protiteles izzovejo ostali flavivirusi in cepiva proti njim, saj je virus KME z njimi antigensko soroden (Holzmann, 2003). Da bi potrdili pozitiven rezultat testa ELISA, je včasih potrebno narediti nevtralizacijski test, ki je najbolj tipsko specifičen serološki test (Holzmann, 2003).

Težave pri diagnozi se pojavljajo pri osebah, ki so zbolele kljub popolnem ali delnem cepljenju. Pri teh bolnikih se imunski odziv pojavi z zamikom in je potrebno za dokaz specifičnih protiteles razreda IgM odvzeti serumski vzorec 10 dni po pojavu simptomov. Pri teh primerih potrdimo diagnozo z dokazom intratekalne tvorbe specifičnih protiteles (Holzmann, 2003; Arnež in Avšič-Županc, 2009).

2 NAMEN DELA (CILJI, HIPOTEZE)

Slovenija je endemsko področje za KME, ki ga povzroča evropski podtip virusa klopnega meningoencefalitisa. Virus se v naravi ohranja s kroženjem med naravnimi gostitelji, kot so mali sesalci in divjad ter klopi, ki so prenašalci virusa. Virus KME je flavivirus, ki ima, podobno kot ostali RNA virusi, visoko pogostost mutacij in zaradi tega potencial za hitro evolucijo (Lundkvist in sod., 2001). Majhno število nukleotidnih in/ali aminokislinskih sprememb ima lahko velik vpliv na razlike v virulenci virusa. Ni znano, ali se v Sloveniji pojavljajo genetske različice KMEV in če se, katere so.

Namen doktorske naloge je ugotoviti, ali obstaja genetska raznolikost virusa KME v Sloveniji.

V ta namen smo postavili naslednje hipoteze:

- V Sloveniji obstajajo genetske različice virusa KME.
- Genetska variabilnost virusa KME je v Sloveniji zemljepisno razporejena.
- Med prenašalci oziroma gostitelji prevladuje enaka genetska različica virusa KME, ki je omejena na posamezna ekološka področja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Raziskava je bila sestavljena iz treh delov. V prvem delu smo proučevali klope, v drugem glodavce in v tretjem bolnike, obbolele s KME.

3.1.1 Klopi

Klope smo nabirali na osmih določenih lokacijah. V času aktivnosti klopov smo v eno-mesečnih presledkih z metodo zastave nabirali klope na nizkem rastlinju in grmičevju. Klope smo nabirali od aprila do novembra leta 2005, od februarja do decembra leta 2006, od januarja do decembra leta 2007 in od januarja do oktobra leta 2008.

3.1.1.1 Izbor lokacij

Lokacije smo določili glede na stopnjo endemičnosti naravnega žarišča KME v preteklosti in danes. Natančne podatke o primerih KME smo pridobili z Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije in v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, ki rutinsko testira vzorce bolnikov za KME. Izbrali smo osem lokacij (Tabela 3-1). Lokacije Sodražica, Rakovnik, Mozirje in Kamniška Bistrica so na področju z velikim številom obolelih s KME. Lokaciji Štefanja gora in Osolnik sta na področju z velikim številom obolelih s KME in sta bili izbrani zaradi višje nadmorske višine. Lokaciji Črni Kal in Murska Šuma sta bili izbrani, ker je na teh področjih zelo malo bolnikov s KME.

Tabela 3-1 Podatki o izbranih lokacijah

Lokacija	Zemljepisna širina	Zemljepisna dolžina	Nadmorska višina	Razlog izbire
Črni Kal	13°51'	45°32'	144 m	V preteklosti nizka prevalenca- nizka danes
Sodražica	14°45'	45°45'	533 m	V preteklosti nizka prevalenca- visoka danes
Murska Šuma	16°30'	46°29'	154 m	V preteklosti nizka prevalenca- nizka danes
Rakovnik	14°22'	46°08'	326 m	Srednja prevalenca v preteklosti- srednja danes
Mozirje	14°57'	46°19'	377 m	V preteklosti visoka prevalenca- visoka danes
Kamniška Bistrica	14°35'	46°19'	592 m	V preteklosti visoka prevalenca- visoka danes
Štefanja gora	14°28'	46°17'	678 m	Enako kot Kamniška bistrica – višja nadmorska višina
Osolnik	14°20'	46°08'	672 m	Enako kot Rakovnik – višja nadmorska višina

3.1.1.2 Metoda zastave

Metoda zastave je najpogostejše uporabljena metoda za nabiranje klopov z vegetacije (Sonenshine, 1993). Zastavo smo naredili tako, da smo na leseno palico pritrdili belo bombažno tkanino velikosti 1 m². Klopi so se pritrdili na zastavo, ko smo jo vlekli po rastlinju in grmičevju. Zbiranje smo izvajali na gozdnih robovih in v notranjosti gozda na področju vsaj 100 m². Po približno vsakih 2,5 metra vlečenja zastave smo jo obrnili in preverili prisotnost klopov. S sesalno napravo, ki smo jo izdelali sami, smo pobrali klope z zastave. Klope smo do obdelave hranili pri 4 °C v posodicah, v katere smo dodali vlažen list ali navlažen kos staničevine, ki je ščitil klope pred hitro izsušitvijo. Tako hranjeni lahko klopi preživijo od dva do tri tedne.

3.1.1.3 Razkuževanje in identifikacija klopov

Klopi imajo značilen eksoskelet iz hitina. Na površini klopov se nahaja mnogo netarčnih organizmov in umazanij. Zato je potrebno klope pred osamitvijo celokupne RNA ustrezno obdelati (Sparagano in sod., 1999). Klope, ki so bili shranjeni pri 4 °C, smo najprej prenesli za pet minut v 70 % etanol in po potrebi z njih odstranili umazanijo. Nato smo jih spirali v sterilni destilirani vodi dve do tri minute. Pred nadaljnjo obdelavo smo vzorce klopov

identificirali glede na vrsto klopa, razvojno stopnjo in spol. Klope smo ločili v smiselne skupine: odrasle smo ločili po spolu in v skupine po 5, nimfe v skupine po 10, larve v skupine po 30. Vzorce smo do nadaljnje obdelave shranili pri – 20 °C.

3.1.2 Glodavci

Glodavce smo lovili v sodelovanju s Prirodoslovnim muzejem Slovenije. Vzorčenje glodavcev utečeno poteka že od leta 1990. Terensko delo je potekalo večkrat na leto, takrat ko je pričakovana najvišja gostota populacije malih glodavcev (pozno spomladi in zgodaj jeseni).

3.1.2.1 Lov z živolovkami

Lovili smo male gozdne glodavce z živolovkami tipa Sherman ali Elliot. Živolovke smo napolnili z vato in vabo. Vata nudi ujetim živalim zavetje in tako zviša odstotek preživetja. Za vabo smo uporabili mešanico ovsenih kosmičev in konzerviranih sardel, ki s svojim značilnim vonjem prekrijejo vonj pasti. Pasti smo postavljali v poznih večernih urah, saj so živali aktivne predvsem v nočnem času. Vsako noč smo namestili 150 pasti neposredno ob luknjah v zemlji ali ob podrtih drevesih, da bi jih čim bolj približali naravnemu gibanju malih glodavcev. Zgodaj zjutraj smo pasti pobrali in ujete živali takoj prenesli v laboratorij.

3.1.2.2 Meritve in žrtvovanje glodavcev

Glodavce, ki smo jih čez noč ujeli v naravi, smo v laboratoriju previdno v skladu z zaščitnimi ukrepi (zaščitne halje, maske in rokavice) obdelali. Ujetim živalim smo določili spol in vrsto, nato smo jih izmerili (velikost, dolžino repa, stopala in uhlja), potem smo jih stehali in odstranili morebitne zajedavce. Živali smo potem žrtvovali in jim sterilno odvzeli kri in organe (srce, pljuča, jetra, ledvice, vranica, sečni mehur). S pomočjo steklenih cevok smo odvzeli tudi vzorec možganov. Zaradi načina odvzema ne moremo

vedeti, kateri del možganov smo preiskovali. Kri smo nato centrifugirali in ločili serum, ki smo ga shranili pri – 20 °C. Ostale zbrane materiale smo shranili pri – 80 °C.

3.1.3 Vzorci bolnikov

V raziskavo smo vključili vzorce krvi, tkiv in serumov bolnikov s KME, ki so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko zoonoz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v obdobju od leta 2000 do leta 2011.

3.1.3.1 Izbira vzorcev

Izbrali smo vzorce bolnikov, kjer smo imeli na voljo vsaj tri vzorce krvi. Izbrali smo tiste, pri katerih v prvem vzorcu po seroloških preiskavah ni bilo prisotnih protiteles proti virusu KME. Drugi vzorec je bil odvzet teden dni po prvem vzorcu in smo v njem po seroloških preiskavah potrdili prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM proti virusu KME. Tretji vzorec, ki je bil odvzet tretji teden po začetku bolezni, je vseboval nižji titer specifičnih protiteles razreda IgM in povišan titer specifičnih protiteles razreda IgG proti virusu KME. Za raziskavo smo od teh treh vzorcev istega bolnika uporabili prvi vzorec, ki je bil odvzet v viremični fazi KME.

3.2 METODE

3.2.1 Osamitev celokupne RNA

Celokupno RNA smo osamili po izboljšani metodi Chomczynskega in Sacchija, ki jo pri uporabi reagenta TRIzol® in TRIzol®LS priporoča proizvajalec reagenta Invitrogen Life Technologies™ (Carlsbad, Kalifornija, ZDA) (Chomczynski in Sacchi, 1987). Metoda temelji na fenol-kloroform-alkoholni osamitvi celokupne RNA iz vzorca. TRIzol Reagent (raztopina gvanidin izotiocianata, fenola in ostalih komponent) ščiti izolirano RNA pred RNAzami, ohranja integriteto RNA, kljub temu, da med homogenizacijo razgradi celice in celične komponente. Izolirana RNA ne vsebuje beljakovin in DNA. Delo smo izvajali v biološki komori za varno delo II. stopnje.

3.2.1.1 Osamitev celokupne RNA iz klopotov

Vzorke klopotov, ki so bili shranjenih pri -20 °C, smo najprej pripravili za homogenizacijo. Odrasle klopoti smo pred homogenizacijo prenesli na objektno steklenico, ki smo jo predhodno obrisali z absolutnim etanolom. S sterilnim skalpelom smo jih prerežali na polovico. Eno polovico smo shranili v sterilno posodico in jih tako pripravljene shranili za potrebe nadaljnjih raziskav. Polovice petih odraslih klopotov smo združili, razrezali s skalpelom in še dodatno mehansko homogenizirali z aparatom Tissue Lyser (Retsch Qiagen) v 300 µl filtriranega fosfatnega pufra (PBS, angl. Phosphate Buffer Saline). Vzorce nimf in larv smo tudi mehansko homogenizirali z aparatom Tissue Lyser (Retsch Qiagen) v 300 µl filtriranega fosfatnega pufra.

V vseh primerih smo 100 µl homogenata uporabili za osamitev RNA, preostalih 200 µl smo shranili za nadaljnje raziskave.

Opis postopka

- 100 µl homogenata smo prenesli v sterilno plastično 1,5-mililitrsko epruveto (Eppendorf, Nemčija) in mu dodali 300 µl reagenta TRIzol®. Mešanico vzorca in

TRIzola smo dobro premešali ter inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. S tem smo lizirali celice, nukleoproteinski kompleksi pa so razpadli.

- Po inkubaciji smo mešanici dodali 60 μ l kloroforma (CHCl_3) (Merck, Nemčija), sunkovito pretresli in premešali na vibracijskem mešalniku. Inkubirali smo 10 minut pri sobni temperaturi (po petih minutah inkubacije smo ga še enkrat sunkovito pretresli in premešali na vibracijskem mešalniku).
- Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 15 000 obratih/minuto.
- Po centrifugiranju smo v epruvetki dobili tri plasti: spodnja fenol - kloroformna plast z raztopljeno DNA in preostalimi nečistočami, srednjo plast, v kateri so beljakovine in lipidi, ter zgornjo vodno plast z raztopljeno RNA. Vodno plast smo previdno prenesli v novo 1,5-mililitrsko epruveto.
- Vodni fazi smo dodali 150 μ l izopropanola (Merck, Nemčija), ohlajenega na -20 °C in dobro premešali, centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 15.000 obratih/minuto.
- Po centrifugiranju RNA precipitira na dnu in stenah epruvete. Odstranili smo supernatant, dodali 300 μ l 75 % etanola, ohlajenega na -20 °C. Vsebinsko epruvete smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali sedem minut pri 4 °C in 12 000 obratih/minuto.
- Previdno smo odstranili supernatant in RNA sušili v odprtih epruvetah v komori ob toku zraka približno 25 minut.
- Osušeno RNA smo raztopili v 30 – 35 μ l vode brez RNAz (avtoklavirana, deionizirana, ultrafiltrirana, destilirana voda brez RNAz).
- Raztopljeno RNA smo shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.1.2 Osamitev celokupne RNA iz organov glodavcev

Za osamitev celokupne RNA glodavcev smo uporabili vzorce vranice, ledvic in možganov. Vranice glodavcev, ki so bile shranjene pri – 80 °C, smo najprej pripravili za homogenizacijo. Na objektno stekelce, ki smo ga predhodno obrisali z absolutnim etanolom, smo s sterilnimi pincetami postavili vranico. S sterilnim skalpelom smo odrezali košček tkiva (~ 25 mg) in ga postavili v sterilno 2-mililitrsko epruveto (Eppendorf,

Nemčija). Preostanek organa smo shranili pri -80 °C za potrebe nadaljnjih raziskav. Na enak način smo pripravili homogenate iz ledvic glodavcev.

Vzorci možganov, ki so bili v steklenih cevkah shranjeni pri -80 °C, smo za homogenizacijo pripravili tako, da smo steklene cevke položili na objektno stekelce, ki smo ga predhodno obrisali z absolutnim etanolom. Cevko smo objeli s staničevino in previdno odlomili košček, v katerem je približno 25 mg tkiva. Stekleno cevko, v kateri se nahaja vzorec možganov, smo prestavili v sterilno 2-mililitrsko epruveto. Ostale cevke smo shranili pri -80 °C za potrebe nadaljnjih raziskav.

Koščku tkiva (vranica, ledvica ali možgani) v sterilni 2-mililitrski epruveti smo dodali 200 µl filtriranega fosfatnega pufra in ga mehansko homogenizirali z aparatom Tissue – Lyser II (Qiagen, Hilden, Nemčija). V vseh primerih smo 200 µl homogenata uporabili za osamitev celokupne RNA.

Opis postopka

- V epruveto z 200 µl homogenata smo dodali 600 µl TRIzola. Mešanico smo dobro premešali in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi.
- Po inkubaciji smo mešanici dodali 120 µl kloroforma, sunkovito pretresli in premešali na vibracijskem mešalniku. Inkubirali smo 10 minut pri sobni temperaturi.
- Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 15 000 obratih/minuto.
- Po centrifugiranju smo vodno fazo previdno prenesli v novo 1,5-mililitrsko epruveto in dodali 300 µl izopropanola, ohlajenega na -20 °C, dobro premešali, centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 15 000 obratih/minuto.
- Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, RNA smo sprali s 600 µl 75 % etanola, ohlajenega na -20 °C. Vsebino epruvete smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali sedem minut pri 4 °C in 12 000 obratih/minuto.
- Previdno smo odstranili supernatant in RNA sušili v odprtih epruvetah v komori ob toku zraka približno 25 minut.
- Osušeno RNA smo raztopili v 30 – 35 µl vode brez RNAz
- Raztopljeno RNA smo shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.1.3 Osamitev celokupne RNA iz vzorcev bolnikov

3.2.1.3.1 Osamitev celokupne RNA z reagentom TRIzol[®]LS

Z reagentom TRIzol[®]LS, ki je reagent za izolacijo celokupne RNA iz tekočih vzorcev, smo izolirali celokupno RNA iz kliničnih vzorcev krvi in serumov. Za izolacijo smo uporabili 200 µl seruma ali polne krvi, ki smo jo prenesli v sterilno plastično 1,5-mililitrsko epruveto. Uporabljali smo enak postopek, kot je opisan pri osamitvi celokupne RNA iz organov glodavcev (3.2.1.2), le da smo namesto TRIzol[®] reagenta uporabili TRIzol[®]LS reagent.

3.2.1.3.2 Avtomatska osamitev virusne RNA v delovni postaji EZ1 Advanced XL

Iz kliničnih vzorcev serumov smo za osamitev virusne RNA uporabili avtomatsko osamitev s komercialnim kompletom reagentov EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Hilden, Nemčija). Osamitev smo izvedli po navodilih proizvajalca. Postopek izolacije je sestavljen iz štirih korakov: proteoliza seruma ali plazme s proteinazo K in inaktivacija RNaz, vezava nukleinskih kislin na silika površino magnetnih delcev, spiranje vezanih nukleinskih kislin z dvema spiralnima pufroma in etanolom ter elucija očiščenih nukleinskih kislin z elucijskim pufrom.

Za osamitev, ki poteka pri sobni temperaturi v delovni postaji EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hilden, Nemčija), smo uporabili 200 µl seruma. RNA smo eluirali v 50 µl elucijskega pufra. Do nadaljnje uporabe smo vzorce shranili pri -20 °C.

Zaradi omejene količine izhodiščnega vzorca in zaradi malih elucijskih volumnov osamljene RNA nismo merili koncentracije le-te.

3.2.2 Preverjanje uspešnosti osamitve klopne RNA

Uspešnost osamitve celokupne RNA smo preverili z verižno reakcijo s polimerazo z reverzno transkripcijo (RT-PCR) samo pri vzorcih RNA osamljene iz klopov, saj pri teh vzorcih celokupna osamljena RNA ni bila vidna s prostim očesom v nobenem koraku osamitve RNA. Uporabili smo reagente iz komercialnega kompleta Access RT-PCR System (Promega, Madison, WI, ZDA) in začetna oligonukleotida F-16sIxodes in R-16sIxodes, ki v genomu klopa *I. ricinus* nalegata na gen za 16S rRNA (Schwaiger in Cassinotti, 2003) (Tabela 3-2).

Tabela 3-2 Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za preverjanje uspešnosti osamitve klopne RNA.

	nukleotidno zaporedje 5'→3'	mesto naleganja ^a
F-16sIxodes	AAA AAA ATA CTC TAG GGA TAA CAG CGT AA	254-282
R-16sIxodes	ACC AAA AAA GAA TCC TAA TCC AAC A	327-351

^a nukleotidno zaporedje za 16S ribosomsko RNA klopa *Ixodes ricinus* (Z97882).

Reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl je vsebovala AMV/Tfl 5x reakcijski pufer, MgSO₄, mešanico dNTP-jev, dva oligonukleotidna začetnika (F-16sIxodes in R-16sIxodes), AMV reverzno transkriptazo, Tfl polimerazo DNA, ddH₂O in RNA, osamljeno iz klopov.

Pomnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu Primus 96 plus (MWG Biotech Inc. North Carolina, ZDA).

Temperaturni cikli so si sledili: eno uro pri temperaturi 42 °C je potekal reverzni prepis RNA v komplementarno DNA (cDNA). Dve minuti pri temperaturi 94 °C je potekala inaktivacija reverzne transkriptaze in ločevanje nastale dvovijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 35 ciklov reakcije:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 40 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 45 sekund pri 68 °C
- na koncu še ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Z elektroforezo v agaroznem gelu smo preverili navzočnost pomnoženega pridelka, ali je bila osamitev klopne RNA uspešna (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

3.2.3 Preverjanje prisotnosti RNA virusa KME z RT-PCR v realnem času

Z metodo RT-PCR v realnem času smo iz velikega števila vzorcev osamljene celokupne RNA prepoznali vzorce, ki vsebujejo RNA virusa KME. Uporabili smo reagente iz komercialnega kompleta SuperScriptTM III Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Life TechnologiesTM, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) in začetna oligonukleotida F-TBE1 in R-TBE1, ki nalegata na 3' nekodirajočo regijo genoma virusa KME in pomožujeta 67 baznih parov dolg odsek (Schwaiger in Cassinotti, 2003) (Tabela 3-3).

Za dokaz virusne RNA smo uporabili zelo občutljiv detekcijski sistem, pri katerem je spodnja meja detekcije pet kopij na reakcijo. Pridelek reakcije PCR zaznamo po fluorescenčnem signalu specifične TaqMan lovke TBE-Probe-WT. Lovka TBE-Probe-WT je na 5' koncu označena s fluorescentnim barvilom FAM (6-karboksi-fluorescein), na 3' koncu pa ima dušilec TAMRA (6-karboksitetrametilrodamin) (Tabela 3-3).

Tabela 3-3 Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov in lovka za RT-PCR v realnem času

	nukleotidno zaporedje 5'→3'	mesto naleganja
F-TBE 1	GGG CGG TTC TTG TTC TCC	11054 - 11071 ^b
R-TBE 1	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT	11099 - 11121 ^b
TBE-Probe-WT	TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA	11073 - 11095 ^b
YFP3	ATC GTT CGT TGA GCG ATT AGC AG	IC ^c

^b nukleotidno zaporedje virusa KME sev Neudoerfl (U27495);

^c lovka za zaznavanje pomnoževanja interne kontrole (IC).

3.2.3.1 Interna kontrola za RT-PCR v realnem času

Interno kontrolo (IC, angl. internal control) smo uvedli, da bi potrdili, da v RT-PCR reakciji v realnem času ni prišlo do zaviranja reakcije. Pomaga nam odkriti lažno negativne rezultate. Pripravili smo jo iz izdelanega sintetičnega RNA prepisa, ki je sestavljen iz tarčnega zaporedja divjega tipa virusa KME, v katerega smo vstavili alternativno vezavno mesto za lovko interne kontrole, pri čemer smo prekinili vezavno mesto za virusno specifično lovko (Drosten et al., 2006). Uporabili smo reagente iz komercialnega kompleta pCR 2.1-TOPO TA cloning reagent set (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Pridelek PCR, pomnožen z izbranimi začetnimi oligonukleotidi, smo vstavili v plazmidni vektor pCR 2.1-TOPO TA in klonirali v *E. coli*. Iz bakterijske kulture smo osamili plazmidno DNA, ki je vsebovala vstavljen pridelek PCR. S specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na plazmidno DNA in vsebujejo promotorsko mesto za T7 polimerazo, smo pomnožili vstavljen pridelek PCR. V naslednjem koraku smo uporabili T7 polimerazo, ki je prepisala vstavljen produkt PCR iz DNA v RNA. Sledilo je čiščenje prepisov RNA in spektrofotometrično merjenje njihove koncentracije. Pripravili smo ustrezno redčino interne kontrole, ki ne bo zavirala pomnoževanje morebitno prisotne RNA virusa KME. Za detekcijo interne kontrole smo izbrali specifično lovko YFP3, ki je na 5' koncu označena s barvilom JOE, na 3' koncu pa ima dušilec TAMRA (Tabela 3-3). Interno kontrolo in lovko za interno kontrolo smo dodali v vsako reakcijsko mešanico za preverjanje prisotnosti RNA virusa KME z RT-PCR v realnem času.

3.2.3.2 RT-PCR v realnem času

Reakcija je potekala v aparaturi Rotor Gene (Corbett Research, Sidney, Avstralija). Specifične lasnosti začetnih oligonukleotidov in sond TaqMan omogočajo sočasno pomnoževanje in detekcijo divjega tipa virusa in interne kontrole. Reakcijska mešanica, s končnim volumnom 25 µl je vsebovala 2-krat koncentrirano reakcijsko mešanico, ki vsebuje ustrezen puferski sistem, MgSO₄, dNTP-je in stabilizatorje, dva oligonukleotidna začetnika (F-TBE1 in R-TBE1), lovki TBE-WT in YFP3, interno kontrolo, encim SSIII

RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, Life Technologies™, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ddH₂O in RNA, osamljeno iz klopov, glodavcev ali vzorcev bolnikov.

Temperaturni cikli so potekali po naslednjem vrstnem redu: najprej je potekal reverzni prepis RNA v cDNA, in sicer 30 minut pri 42 °C. Sledila je inaktivacija reverzne transkriptaze SS III in aktivacija Platinum Taq polimeraze: 4 minute pri 95 °C in 40 ciklov reakcije:

- denaturacija: 15 sekund pri 95 °C
- prileganje začetnih oligonukleotidov in sond, podaljševanje tarčnega odseka: 1 minuta pri 60 °C.

Po končani reakciji smo analizo rezultatov opravili na računalniku. Kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linijo fluorescenčnega praga (Ct) in jih primerjali z rezultatom pozitivne kontrole.

3.2.4 Pomnoževanje dela genoma virusa KME neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov

Vzorci celokupne RNA, ki so bili pozitivni pri preverjanju prisotnosti RNA virusa KME z RT-PCR v realnem času, smo uporabili za pomnoževanje dveh delov genoma virusa KME, ki nosita zapis za beljakovini NS5 in E. Da bi pridobili pridelke PCR, primerne za sekveniranje, smo izvedli enostopenjski RT-PCR in vgnezdni PCR.

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

- Access RT-PCR System (Promega Corporation, Madison, ZDA)
- 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)

Za optimizacijo metode vgnezdna PCR smo uporabili komercialne komplete reagentov:

- Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)

- ABgene® PCR Master Mix (ABgene®, Epsom, Velika Britanija)
- KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen®, EMD Chemicals, Inc., Madison, WI, ZDA).

3.2.4.1 Pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine NS5 virusa KME

3.2.4.1.1 Izbira začetnih oligonukleotidov

Za pomnoževanje krajšega dela genoma za zapis beljakovine NS5 smo uporabili že objavljene začetne oligonukleotide FSM1, FSM2, FSM3 in FSM4 (Puchhammer-Stöckl in sod., 1995) (Tabela 3-4). S parom zunanjih začetnih oligonukleotidov FSM1 in FSM2 smo pomnoževali 357 baznih parov dolg tarčni odsek. FSM3 in FSM4 oligonukleotida se pripenjata znotraj tarčnega dela FSM1 in FSM2 začetnih oligonukleotidov in pomnožujeta 252 baznih parov dolg odsek DNA.

Za pomnoževanje daljšega dela genoma za zapis beljakovine NS5 smo uporabili že objavljena začetna oligonukleotida TBE-7547 in TBE-c8732, ki pomožujeta 1165 baznih parov dolg odsek DNA (Kupča in sod., 2010) (Tabela 3-4).

Tabela 3-4 Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za določevanje nukleotidnih zaporedij za del genoma za zapis beljakovine NS5.

	nukleotidno zaporedje 5'→3'	mesto naleganja ^d
FSM1	GAG GCT GAA CAA CTG CAC GA	7687 - 7706
FSM2	GAA CAC GTC CAT TCC TGA TCT	8024 - 8044
FSM3	ACG GAA CGT GAC AAG GCT AG	7748 – 7768
FSM4	GCT TGT TAC CAT CTT TGG AG	7980 - 7999
TBE-7547	CTG ACA CGT TGT GGA CGA TG	7547 - 7567
TBE-c8732	AAC ACT CTC TGC TGT CCG AAA G	8732 - 8754

^d nukleotidno zaporedje virusa KME sev Neudoerfl (U27495).

3.2.4.1.2 RT-PCR krajšega dela genoma za zapis beljakovine NS5

Za pomnoževanje krajšega dela genoma za zapis beljakovine NS5 smo uporabili komercialen komplet reagentov Access RT-PCR System (Promega Corporation, Madison, ZDA) in začetna oligonukleotida FSM1 in FSM2. Pomnoževanje je potekalo v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl je vsebovala 10 µl 5-krat koncentriranega reakcijskega pufra, 4 µl 25 mM MgSO₄, 4 µl 10 mM dNTP mešanice, 1 µl začetnega oligonukleotida FSM1 (50 pmol/µl), 1 µl začetnega oligonukleotida FSM2 (50 pmol/µl), 1 µl encima AMV reverzne transkriptaze (5 enot/µl), 1 µl encima Tfl DNA polimeraze (5 enot/µl), 23 µl sterilne deionizirane vode in 5 µl vzorca RNA.

Temperaturni cikli so si sledili: eno uro pri temperaturi 42 °C je potekal reverzni prepis RNA v cDNA. Dve minuti pri temperaturi 94 °C je potekala inaktivacija reverzne transkriptaze in ločevanje nastale dvovijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 35 ciklov reakcije:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 40 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 45 sekund pri 68 °C
- na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Pridelke PCR smo shranili pri 4 °C za nadaljnjo uporabo.

3.2.4.1.3 Pomnoževanje krajšega dela genoma za zapis beljakovine NS5 z vgnezenim PCR

Pridelke RT-PCR reakcije smo nato pomnoževali z metodo vgnezenega PCR z notranjima začetnima oligonukleotidoma FSM3 in FSM4. Za to smo uporabili komercialni komplet reagentov ABgene® PCR Master Mix (ABgene®, Epsom, Velika Britanija). Pomnoževanje je potekalo v aparaturi Primus 96 plus (MWB Biotech Inc., North Carolina, ZDA). Reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl je vsebovala 45 µl 1,1-krat koncentriranega PCR Master Mix-a, 1 µl začetnega oligonukleotida FSM3 (50 pmol/µl), 1

μ l začetnega oligonukleotida FSM4 (50 pmol/ μ l), 1 μ l sterilne deionizirane vode in 2 μ l pridelka PCR, pridobljenega s FSM1, FSM2 parom začetnih oligonukleotidov.

Temperaturni cikli so si sledili: ena minuta denaturacije pri 94 °C. Sledilo je 35 ciklov reakcije:

- denaturacija DNA: 20 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 56 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 72 °C
- na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C.

3.2.4.1.4 RT-PCR daljšega dela genoma za zapis beljakovine NS5

Za pomnoževanje daljšega tarčnega dela genoma za zapis beljakovine NS5 smo uporabili komercialni komplet reagentov SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) in začetna oligonukleotida TBE-7547 in TBE-c8732. Pomnoževanje je potekalo v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 μ l je vsebovala 25 μ l 2-krat koncentriranega reakcijskega pufra, 1 μ l začetnega oligonukleotida TBE-7547 (20 pmol/ μ l), 1 μ l začetnega oligonukleotida TBE-c8732 (20 pmol/ μ l), 2 μ l encimske mešanice SSIII RT/Platinum® Taq Mix, 16 μ l sterilne deionizirane vode in 5 μ l vzorca RNA.

Temperaturni cikli so si sledili: 45 minut pri temperaturi 50 °C je potekal reverzni prepis RNA v cDNA. Pet minut pri temperaturi 94 °C je potekala inaktivacija reverzne transkriptaze in ločevanje nastale dvovijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 40 ciklov reakcije:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 55 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 60 sekund pri 68 °C
- končno podaljševanje: 10 minut pri 68 °C
- na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Pridelke PCR smo shranili pri 4 °C za nadaljnjo uporabo.

3.2.4.2 Pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine E virusa KME

3.2.4.2.1 Izbira začetnih oligonukleotidov

Za pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine E smo na osnovi poravnave nukleotidnih zaporedij beljakovine E iz genske podatkovne baze na spletu oblikovali in uporabili dva začetna oligonukleotida (ENV 3F in ENV 3R), ki pomnožujeta 1309 baznih parov dolg tarčni odsek genoma virusa KME (Tabela 3-5). Na podlagi delnega nukleotidnega zaporedja seva virusa KME Ljubljana 1 (AF091012), ki so ga izolirali v Sloveniji leta 1993 (Avšič-Županc in sod., 1995), smo izbrali ohranjene odseke in oblikovali dodatne notranje začetne oligonukleotide: ENV 3.1F, ENV 3.1R, ENV 4.1 F in ENV 4R (Tabela 3-5). Te smo uporabili za vgneždeni PCR in sekveniranje.

Za pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine E smo uporabili tudi že objavljena začetna oligonukleotida TBE-1082 in TBE-c2022, ki pomožujeta 941 baznih parov dolg odsek DNA (Kupča in sod., 2010) (Tabela 3-5).

Tabela 3-5 Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za določevanje nukleotidnih zaporedij za del genoma za zapis beljakovine E.

	nukleotidno zaporedje 5'→3'	mesto naleganja
ENV 3F	TGA GGG GAA GCC TTC AAT	105-122 ^e
ENV 3R	TCA TGT TCA GGC CCA ACC A	1396-1414 ^e
ENV 3.1F	AAG TCG AAC CAC ACA CG	425-441 ^e
ENV 3.1R	ACA TAG TCT CCC GTG TG	436-452 ^e
ENV 4.1F	GTG TTA CTG AAG GCT CT	787-803 ^e
ENV 4R	GGC TTG ACG CCA TTT ACC A	908-925 ^e
TBE -1082	GGA AGC CTT CAA TGG ATG TG	1082-1102 ^f
TBE-c2022	CGT TCA CAT CTG GAG ATC CAT G	2022-2044 ^f

^e nukleotidno zaporedje beljakovine E virusa KME – sev Ljubljana 1 (AF091012);

^f nukleotidno zaporedje virusa KME sev Neudoerfl (U27495).

3.2.4.2.2 Pomnoževanje tarčnega dela genoma za zapis beljakovine E virusa KME

Za pomnoževanje tarčnega dela genoma za zapis beljakovine E smo uporabljali tri 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) in Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Pomnoževanje je potekalo v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Edina razlika pri uporabi komercialnega kompleta reagentov SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) in komercialnega kompleta reagentov SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) je v mešanici encimov. Pri obeh je reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl vsebovala 2-krat koncentriran reakcijski pufer, 1 µl začetnega oligonukleotida ENV 3F (50 pmol/µl), 1 µl začetnega oligonukleotida ENV 3R (50 pmol/µl), 2 µl encimske mešanice (pri prvem kompletu reagentov smo uporabili SSIII RT/Platinum® Taq Mix, pri drugem kompletu reagentov smo uporabili SSIII RT/Platinum® Taq High Fidelity), 16 µl sterilne deionizirane vode in 5 µl vzorca RNA.

Temperaturni cikli so si sledili: 30 minut pri temperaturi 50 °C je potekal reverzni prepis RNA v cDNA. Dve minuti pri temperaturi 94 °C je potekala inaktivacija reverzne transkriptaze in ločevanje nastale dvovijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 45 ciklov reakcije:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 60 sekund pri 56 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuta in 30 sekund pri 68 °C
- končno podaljševanje: 5 minut pri 68 °C
- na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Pridelke PCR smo shranili pri 4 °C za nadaljnjo uporabo.

Po enakem protokolu smo pripravili tudi pridelke PCR z uporabo TBE-1082 in TBE-c2022 kot začetna oligonukleotida.

Pri uporabi komercialnega kompleta reagentov Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) je reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 μ l vsebovala 10 μ l 5-krat Qiagen OneStep RT-PCR pufra, 2 μ l mešanice dNTP, 10 μ l 5-krat Q-raztopine, 0,6 μ l začetnega oligonukleotida ENV 3F (50 pmol/ μ l), 0,6 μ l začetnega oligonukleotida ENV 3R (50 pmol/ μ l), 2 μ l encimske mešanice Qiagen OneStep RT-PCR, 14,8 μ l sterilne deionizirane vode in 10 μ l vzorca RNA.

Temperaturni cikli so si sledili: 30 minut pri temperaturi 50 °C je potekal reverzni prepis RNA v cDNA. Petnajst minut pri temperaturi 95 °C je potekala inaktivacija reverzne transkriptaze in ločevanje nastale dvovijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 45 ciklov reakcije:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 60 sekund pri 56 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C
- končno podaljševanje: 10 minut pri 72 °C
- na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Pridelke PCR smo shranili pri 4 °C za nadaljnjo uporabo.

3.2.4.2.3 Pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine E z vgnezdenim PCR

Za pomnoževanje tarčnega dela genoma za zapis beljakovine E z vgnezdenim PCR smo uporabili komercialna kompleta reagentov Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) in KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen®, EMD Chemicals, Inc., ZDA). Pridelke PCR smo pomnoževali z notranjima začetnima oligonukleotidoma ENV 3.1F in ENV 3R. Pomnoževanje je potekalo v aparaturi Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Pri uporabi komercialnega kompleta reagentov Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) je reakcijska mešanica s končnim volumnom 52

μ l vsebovala 45 μ l 1,1-krat koncentriranega reakcijskega pufra (PCR SuperMix), 1 μ l obeh začetnih oligonukleotidov in 5 μ l pridelka RT-PCR.

Temperaturni cikli so si sledili: dve minuti denaturacije pri 94 °C. Sledilo je 40 ciklov reakcije:

- denaturacija DNA: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 55 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuta in 10 sekund pri 68 °C
- končno podaljševanje: 5 minut pri 68 °C
- na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C za nadaljnjo uporabo.

Pri uporabi komercialnega kompleta reagentov KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen®, EMD Chemicals, Inc., ZDA) je reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 μ l vsebovala 25 μ l 2-krat Xtreme pufra, 0,5 μ l dveh začetnih oligonukleotidov, 10 μ l 2mM dNTP mešanice, 1 μ l encima KOD Xtreme Hot Start DNA Polimeraze (1enota/ μ l), 8 μ l sterilne deionizirane vode in 5 μ l pridelka RT-PCR.

Temperaturni cikli so si sledili: dve minuti denaturacije pri 94 °C. Sledilo je 40 ciklov reakcije:

- denaturacija DNA: 10 sekund pri 98 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 55 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 60 sekund pri 68 °C
- na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C za nadaljnjo uporabo.

3.2.5 Elektroforeza pridelkov RT-PCR in vgnezenega PCR v agaroznem gelu

Pridelke PCR smo dokazovali z vodoravno elektroforezo v 2 % agaroznem gelu (agaroza NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA). Agarozni gel smo pripravili v 50 ml 1-krat koncentriranega TAE pufra (Tris acetat EDTA pufer, vsebuje Tris bazo, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH je 8,3) in ga do vrelišča segrevali v mikrovalovni pečici.

Raztopljen gel smo ohladili (na približno 60 °C) in barvali s 5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml, Promega, Madison, ZDA). Potem smo ga nalili v plastični nosilec in počakali, da se strdi. Strjeni gel smo na nosilcu postavili v elektroforezno kad, ki smo jo napolnili z 1-krat koncentriranim TAE pufrom, tako da je bil celotni gel prekrit s pufrom, ki omogoča tok elektronov z anode na katodo.

Velikosti pridelkov PCR smo primerjali z molekularnimi označevalci lestvice DNA 100 bp in 1 kb (1 µg/µl, Gibco BRL, Life Technologies, New York, ZDA), ki smo jih nanegli v prvo vdolbinico, odvisno od tega, kako velike pridelke PCR smo pričakovali. Pri dokazovanju pridelkov PCR krajšega dela genoma za zapis beljakovine NS5 in pridelkov vgnezdene reakcije PCR smo uporabljali označevalec lestvice DNA 100 bp, pri dokazovanju pridelkov PCR daljšega dela genoma za zapis beljakovine NS5 in za pridelke reakcij PCR tarčnega dela genoma za zapis beljakovine E smo uporabljali označevalec lestvice DNA 1 kb. V ostale vdolbinice gela smo nanegli 10 µl pridelka PCR in 2 µl nosilne raztopine Loading Dye Solution (0,35 % brom-fenol modrilo) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija). Elektroforeza je potekala približno 30 - 40 minut pri napetosti 80 V pri sobni temperaturi. Agarozni gel smo pregledali na ultravijoličnem presvetljevalniku in slikali s pomočjo aparature Gel Documentation Systems (Bio-Rad, Life Science Group, Berkeley, California, ZDA).

3.2.6 Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR

3.2.6.1 Čiščenje pridelkov PCR

Pridelke PCR smo čistili z uporabo komercialnega kompleta reagentov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA). Čiščenje temelji na vezavi DNA na delce silicijevega dioksida v membrani posebne kolone in spiranju s pufri.

Pri elektroforezi nekaterih pridelkov PCR na agaroznem gelu smo opazili nespecifične pridelke reakcije PCR. Te pridelke PCR smo zato v celoti nanegli na 1,2 % agarozni gel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Po

elektroforezi, ki je potekala 60 minut pri 80 V smo iz agaroznega gela pod UV lučjo izrezali želen pridelek PCR in se s tem znebili nespecifičnih pridelkov.

Opis postopka

Kos agaroznega gela z želenim pridelkom PCR smo spravili v 1,5 ml epruveto in ga stehali. V epruveto smo dodali tolikšno količino pufra MBS (angl. Membrane Binding Solution), ki je ustrezala teži izrezanega gela, in raztopili pri 60 °C. Pri pridelkih PCR, pri katerih nismo imeli nespecifičnih pridelkov, smo direktno v epruveto s pridelkom PCR dodali 40 µl pufra MBS.

- pridelke PCR, raztopljene v pufru MBS smo prenesli v tubico z membrano in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi.
- Centrifugirali smo 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. S tem postopkom se je DNA, ki smo jo pomnožili s PCR, vezala na membrano.
- Sledilo je spiranje nečistoč. Na membrano smo dodali 700 µl pufra MWS (angl. Membrane Wash Solution) ter ponovno centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto.
- Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni epruvetki, smo zavrgli.
- Na membrano smo dodali 500 µl pufra MWS ter centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih/minuto.
- Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni tubici, smo zavrgli.
- Sledilo je enominutno centrifugiranje pri 14 000 obratih/minuto, z odprtim notranjim pokrovom centrifuge. To je omogočilo odstranjevanje alkoholnih hlapov med centrifugiranjem.
- Membrano smo prenesli v označeno, čisto 1,5 ml epruveto.
- DNA smo eluirali v 50 µl segrete sterilne vode in inkubirali eno minuto pri sobni temperaturi. Sledilo je dvominutno centrifugiranje pri 14 000 obratih/minuto.

Očiščene pridelke PCR smo shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.6.2 Določanje koncentracij očiščenih pridelkov PCR

Koncentracije očiščenih pridelkov PCR smo ocenili tako, da smo v vdolbinice 1,6 % agaroznega gela (UltraPure™ Agarose, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) nanесли 3 μ l očiščene DNA, raztopljene v 7 μ l sterilne deionizirane vode, in 2 μ l brom-fenol modrila. Elektroforeza je potekala 10 minut pri 90 V. Po končani elektroforezi smo glede na barvno intenzivnost fragmenta "semi-kvantitativno" ocenili koncentracijo DNA z oceno od 1(intenzivni fragmenti) do 5 (šibki fragmenti) in temu primerno določili količino pridelka, ki smo ga uporabili za sekvenčno reakcijo. Pri oceni 1 je bila količina pridelka v sekvenčni reakciji 1 μ l, pri oceni 5 pa 5 μ l.

3.2.6.3 Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR

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 ali terminacijski metodi določevanja nukleotidnega zaporedja. Pri vsaki sekvenčni reakciji smo uporabili en začetni oligonukleotid. Uporabili smo reakcijsko mešanico, v kateri so fluorescenčno označeni dideoksi terminatorji, mešanica neoznačenih dNTP-jev in polimeraza FS (različica polimeraze Taq). Reakcijska mešanica je vsebovala 1 - 5 μ l DNA (glede na kvantitativno oceno iz agaroznega gela), 1,3 μ l začetnega oligonukleotida (50 pmol/ μ l), 4 μ l mastermix reakcijske mešanice, 2 μ l reakcijskega pufra in deionizirano vodo do skupnega volumna 20 μ l. Sekvenčna reakcija je potekala v aparaturi Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA) ali v aparaturi Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Reakcija je potekala v 25 ali 35 ciklih, glede na količino pridelka PCR:

- denaturacija DNA: 20 sekund pri 96 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 10 sekund pri 50 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 3 minute pri 60 °C
- na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Po končani reakciji smo pridelke sekvenčne reakcije shranili pri 4 °C.

Pred avtomatskim sekveniranjem smo pridelke sekvenčne reakcije očistili s komercialnim kompletom reagentov BigDye XTerminator® Purification Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Čiščenje temelji na vezavi neporabljenih terminatorjev na silika delce v raztopini.

Opis postopka

- Vzorec sekvenčne reakcije smo prenesli v mikrotitrsko ploščico.
- Mikrotitrsko ploščico smo tesno zalepili s folijo in centrifugirali 1 minuto pri 1000 obratih/minuto.
- Dodali smo 90 µl raztopine SAMTM in 20 µl reagenta Xterminator.
- Mikrotitrsko ploščico smo prekrili s PCR-folijo in stresli 30 minut pri 2000 obratov/minuto.
- Mikrotitrsko ploščico smo centrifugirali 2 minuti pri 1000 obratov/ minuto. S tem silika delce posedemo na dno mikrotitrskе ploščice.
- Mikrotitrsko ploščico shranimo pri 4 °C.

Očiščenim pridelkom sekvenčne reakcije smo določili nukleotidno zaporedje z avtomatskim genskim analizatorjem ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Uporabili smo programski paket BDx Standard Sequencing Reaction (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

3.2.7 Analiza nukleotidnih zaporedij

Računalniško obdelavo zaporedij smo izvedli s programskim paketom CLC Main Workbench, verzija 6,1 (CLC bio, Aarhus, Danska). Najprej smo sestavili nukleotidna zaporedja vseh verig DNA iz enega vzorca, ki smo jih dobili s sekvenčno reakcijo. Izrezali smo neberljiv začetek, konec in zaporedje začetnih oligonukleotidov ter preverili kvaliteto

sekvenčne analize posameznih baz nukleotidnega zaporedja. Poravnano in sestavljeno zaporedje smo preverili vzdolž verige zaradi morebitnih neujemanj.

Nukleotidna zaporedja (orientacijo in podobnost) smo primerjali z zaporedji v genski banki preko medmrežnega orodja BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA). Nukleotidna zaporedja virusa iz posameznega vzorca klopa, glodavca ali bolnika smo poravnali, analizirali smo mesta mutacij, nukleotidno zaporedje pa prevedli v aminokislinsko zaporedje v programu MEGA 5,05. (Tamura in sod., 2011).

Model nukleotidne zamenjave smo izbrali po Akaike informacijskem kriteriju v jModelTest 0,1,1 (Posada, 2008). Uporabili smo GTR+G+I (angl. Generalised time-reversible + Gamma + Proportion Invariant) model nukleotidne zamenjave. Z MrBayes 3,2 in Tracer v,1,5 smo izvedli Bayesove filogenetske analize (Huelsenbeck in Ronquist, 2001; Drummond in Rambaut, 2007). Uporabili smo naslednje nastavitve:

```
begin mrbayes;
```

```
set autoclose=yes nowarn=yes autooverwrite=no;
```

```
lset nst=6 rates=gamma;
```

```
mcmc nruns =3 ngen=10000000 samplefreq=1000 printfreq=1000 diagnfreq=10000;
```

```
sump burnin=10000;
```

```
sumt burnin=10000;
```

```
end;
```

Uporabili smo tri neodvisne MCMC (Monte Carlo Markov Chain) izračune, ki jih sestavlja 10 000 000 generacij. Z uporabljenimi nastavitvami smo zagotovili zadostno učinkovito velikost vzorca (ESS, angl. Effective sample sizes) (vsaj 200). Filogenetska drevesa z največjo verodostojnostjo smo upodobili s programom FigTree 1,3,1 (Drummond in Rambaut, 2007).

Na zemljevidu Slovenije smo prikazali povezavo med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami.

4 REZULTATI

4.1 DOKAZ GENOMA VIRUSA KME Z RT-PCR V REALNEM ČASU V VZORCIH KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV

4.1.1 Klopi

V štiriletnem obdobju smo nabrali 9209 klopov. Od tega je bilo 989 samcev, 902 samice in 7318 nimf. Število klopov po posameznih stadijih na različnih lokacijah v letih od 2005 do 2008 prikazuje tabela 4-1.

Tabela 4-1 Število klopov *I. ricinus* po posameznih stadijih na različnih lokacijah v letih od 2005 do 2008.

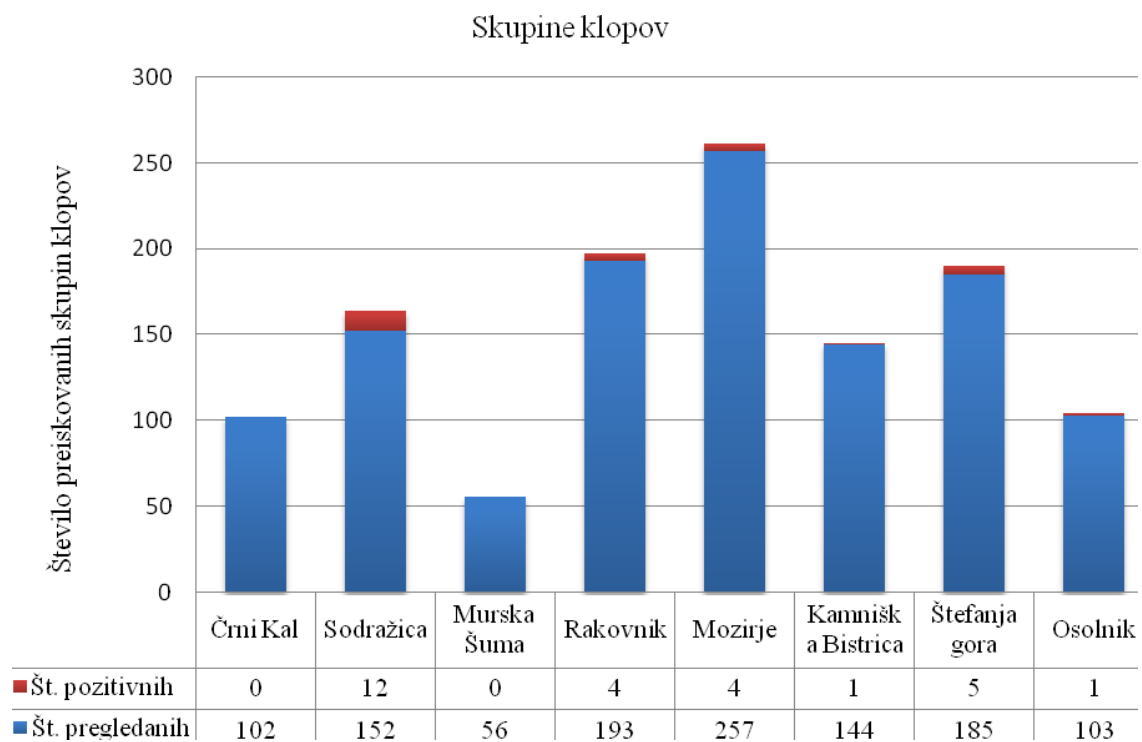
Lokacija	Črni Kal	Sodražica	Murska Šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška Bistrica	Štefanja gora	Osolnik	Skupaj
2005									
M	7	17	6	42	39	27	33	17	188
F	2	11	16	33	29	19	25	10	145
Ny	124	125	14	152	216	203	256	94	1184
št. klopov	133	153	36	227	284	249	314	121	1517
2006									
M	13	39	45	78	57	80	63	56	431
F	9	22	103	66	51	82	52	44	429
Ny	398	232	6	314	391	337	486	244	2408
št. klopov	420	293	154	458	499	499	601	344	3268
2007									
M	19	39	14	41	39	9	31	8	200
F	15	29	25	40	28	24	34	12	207
Ny	286	294	6	255	349	110	269	123	1692
št. klopov	320	362	45	336	416	143	334	143	2099
2008									
M	9	60		31	35	18	5	12	170
F	11	38		15	27	5	21	4	121
Ny	230	178		392	827	113	156	138	2034
št. klopov	250	276		438	889	136	201	154	2325
Skupaj									
št. klopov	1123	1084	235	1459	2088	1027	1450	762	9209

Legenda: M - samci; F - samice; Ny - nimfe.

Klope smo razvrstili v 1192 skupin in iz teh osamili celokupno RNA. Z metodo RT-PCR smo preverili uspešnost osamitve celokupne klopne RNA. Nato smo preverili prisotnost RNA virusa KME z metodo RT-PCR v realnem času. Virusno RNA smo dokazali v 27 od 1192 skupin (tabela 4-2)

Tabela 4-2 Število skupin klopov in pozitivnih skupin klopov, zbranih na različnih lokacijah v Sloveniji.

Lokacija	Črni Kal	Sodražica	Murska Šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška Bistrica	Štefanja gora	Osolnik	Skupaj
2005									
število skupin	17	23	13	37	41	38	42	19	230
število poz. skupin	0	3	0	0	0	0	5	0	8
2006									
število skupin	49	38	33	63	68	69	75	47	442
število poz. skupin	0	4	0	4	4	1	0	1	14
2007									
število skupin	36	43	10	43	50	18	41	17	258
število poz. skupin	0	5	0	0	0	0	0	0	5
2008									
število skupin		48		50	98	19	27	20	262
število poz. skupin		0		0	0	0	0	0	0
Skupaj št. skupin	102	152	56	193	257	144	185	103	1192
Skupaj št. poz. skupin	0	12	0	4	4	1	5	1	27



Slika 4-1 Grafični prikaz rezultatov RT-PCR v realnem času preiskovanih skupin klopov od leta 2005 do leta 2008. Celotni stolpec predstavlja število pregledanih vzorcev, rdeča barva posameznega stolpca predstavlja število pozitivnih vzorcev.

Za nadaljnje raziskave smo uporabili vzorce, pri katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali RNA virusa KME (tabela 4-3).

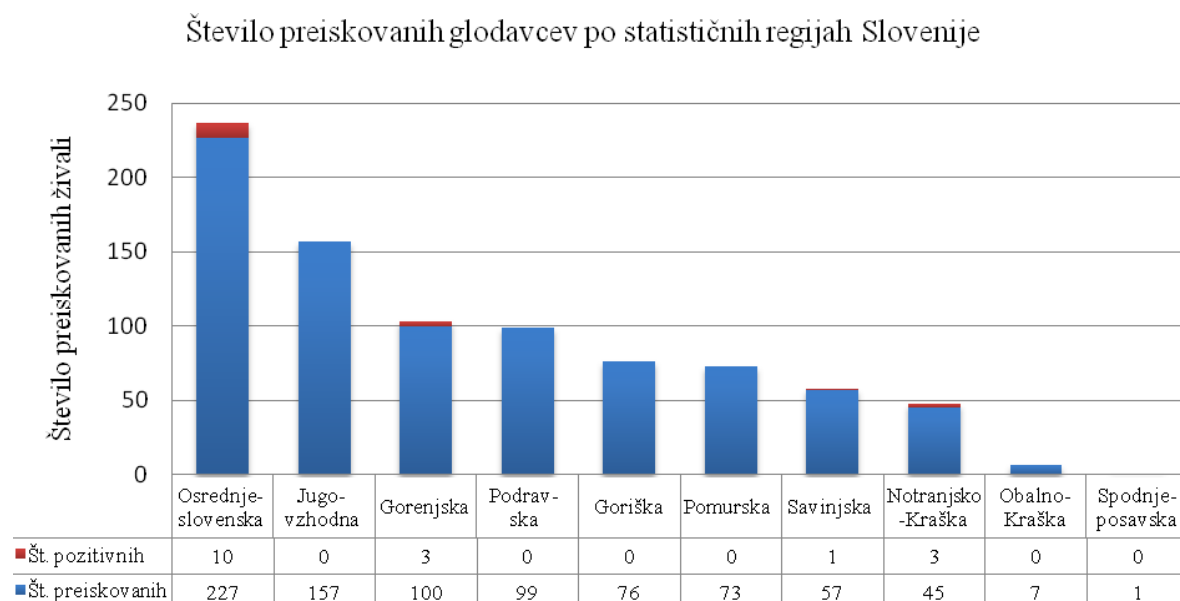
Tabela 4-3 Vzorci klopov, pri katerih smo dokazali RNA virusa KME.

Leto vzorčenja	Oznaka vzorca	Lokacija	Vrsta	Število, stadij
2005	T1	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T2	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	5 ♂
	T3	Štefanja gora	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T4	Štefanja gora	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T5	Štefanja gora	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T6	Štefanja gora	<i>I. ricinus</i>	5 ♀
	T7	Štefanja gora	<i>I. ricinus</i>	5 ♂
	T8	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	8 nimf
2006	T9	Rakovnik	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T10	Kamnik	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T11	Rakovnik	<i>I. ricinus</i>	5 ♂
	T12	Osolnik	<i>I. ricinus</i>	5 ♀
	T13	Rakovnik	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T14	Rakovnik	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T15	Mozirje	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T16	Mozirje	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T17	Mozirje	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T18	Mozirje	<i>I. ricinus</i>	10 nimf
	T19	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	5 ♂
	T20	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	4 ♂
	T21	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	3 ♀
	T22	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	3 ♀
2007	T23	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	5 ♀
	T24	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	5 ♀
	T25	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	5 ♂
	T26	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	5 ♂
	T27	Sodražica	<i>I. ricinus</i>	5 ♂

Legenda: ♂ - samci; ♀ - samice; nimf – nimfe.

4.1.2 Glodavci

V Laboratoriju za diagnostiko zoonoz, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo so v obdobju od leta 1990 do leta 2010 ujeli 2556 malih sesalcev na različnih zemljepisnih področjih Slovenije. V nalogo smo vključili vzorce, ki so jih nabrali od leta 1992 do leta 2010. Celokupno RNA smo izolirali iz vranic, ledvic ali možganov 842 glodavcev. Glodavce so ujeli v 10 statističnih regijah Republike Slovenije. Po številu preiskovanih glodavcev sledijo osrednjeslovenska regija z 227 glodavci, jugovzhodna regija s 157 glodavci, gorenjska regija s 100 glodavci, podravska regija z 99 glodavci, goriška regija s 76 glodavci, pomurska regija s 73 glodavci, savinjska regija s 57 glodavci, notranjsko-kraška regija s 45 glodavci, obalno-kraška regija s sedem glodavci in spodnjeposavska regija z enim preiskovanim glodavcem (Slika 4-2).



Slika 4-2 Grafični prikaz rezultatov RT-PCR v realnem času preiskovanih glodavcev od leta 1992 do leta 2010 po statističnih regijah Slovenije. Celotni stolpec predstavlja število pregledanih vzorcev, rdeča barva posameznega stolpca predstavlja število pozitivnih vzorcev.

Za nadaljnje raziskave smo uporabili vzorce pri katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali RNA virusa KME. Virusno RNA smo dokazali pri 17 glodavcih od tega pri 8-ih

vrste *Myodes glareolus*, pri 6-ih vrste *Apodemus flavicollis* in pri 3-eh vrste *Apodemus sylvaticus* (Tabela 4-4).

Tabela 4-4 Vzorci glodavcev, pri katerih smo dokazali RNA virusa KME.

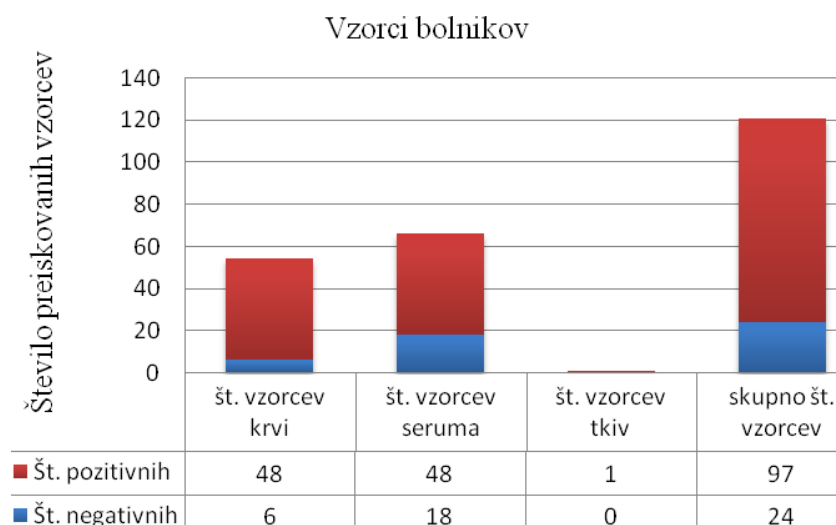
Leto vzorčenja	Oznaka vzorca	Vzorec	Vrsta	Lokacija	Organ
2006	R43	TT 13/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	Cerknica	možgani
	R44	TT 25/06	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Cerknica	možgani
	R45	TT 38/06	<i>Myodes glareolus</i>	Cerknica	možgani
	R29	TT 55/06	<i>Myodes glareolus</i>	Rakovnik	ledvica
2007	R30	TT 03/07	<i>Myodes glareolus</i>	Rakovnik	vranica
	R41	TT 27/07	<i>Myodes glareolus</i>	Tenetiše	možgani
	R33	TT 48/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	Tenetiše	ledvica
	R31	TT 75/07	<i>Myodes glareolus</i>	Rakovnik	vranica
	R32	TT 90/07	<i>Myodes glareolus</i>	Rakovnik	vranica
	R42	TT 103/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	Vransko	možgani
2008	R34	TT 43/08	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Tenetiše	vranica
	R35	TT 57/08	<i>Myodes glareolus</i>	Rakovnik	vranica
	R36	TT 61/08	<i>Apodemus flavicollis</i>	Rakovnik	vranica
	R37	TT 68/08	<i>Myodes glareolus</i>	Rakovnik	vranica
	R38	TT 69/08	<i>Apodemus flavicollis</i>	Rakovnik	vranica
	R39	TT 79/08	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Rakovnik	vranica
	R40	TT 81/08	<i>Apodemus flavicollis</i>	Rakovnik	vranica

4.1.3 Vzorci bolnikov

V raziskavo smo vključili klinične vzorce 78 bolnikov s KME, ki so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko zoonoz in laboratorij WHO, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v obdobju od leta 2000 do leta 2011. Pregledali smo 120 vzorcev telesnih tekočin bolnikov in en vzorec možganskega tkiva pokojnega bolnika. Vzorce smo izbrali na podlagi rezultatov seroloških testov, in sicer vzorce iz prve faze okužbe z virusom, kjer še niso bila prisotna protitelesa proti virusu KME. Virusno RNA smo dokazali z metodo RT-PCR v realnem času (Tabela 4-5).

Tabela 4-5: Rezultati RT-PCR v realnem času – dokaz virusne RNA v vzorcih bolnikov

RT-PCR v realnem času	neg.	poz.	% poz.	skupaj
št. vzorcev krvi	6	48	88,9	54
št. vzorcev seruma	18	48	72,7	66
št. vzorcev tkiv	0	1	100,0	1
skupno št. vzorcev	24	97	80,2	121



Slika 4-3 Grafični prikaz rezultatov RT-PCR v realnem času preiskovanih vzorcev bolnikov od leta 2000 do leta 2011. Celotni stolpec predstavlja število pregledanih vzorcev, rdeča barva posameznega stolpca predstavlja število pozitivnih vzorcev.

Za nadaljnje raziskave smo med 121 preiskovanimi vzorci izbrali 22 vzorcev od 22 bolnikov po sledečih merilih (tabela 4-6):

- pozitiven rezultat RT-PCR v realnem času;
- čim večja zemljepisna razpršenost izolatov. Glede na naslov bivanja bolnika smo izbrali vzorce iz 6 statističnih regij Republike Slovenije;
- zadostna količina materiala (krvi ali seruma).

Tabela 4-6 Vzorci bolnikov, pri katerih smo dokazali RNA virusa KME.

Leto vzorčenja	Oznaka vzorca	Vzorec	Kraj bivanja bolnika	Statistična regija
2000	H47	kri	Škofja Loka	Gorenjska
2002	H48	serum	Kamnik	Osrednjeslovenska
2003	H49	kri	Ribnica	Jugovzhodna
2000	H50	kri	Kamnik	Osrednjeslovenska
2003	H51	kri	Črnomelj	Jugovzhodna
/	H52	možgani	Nazarje	Savinjska
2005	H53	kri	Vrhnika	Osrednjeslovenska
2006	H54	kri	Tržič	Gorenjska
2007	H55	kri	Cerkno	Goriška
2007	H56	kri	Ljubljana	Osrednjeslovenska
2009	H57	serum	Tržič	Gorenjska
2010	H58	serum	Tržič	Gorenjska
2009	H59	serum	Kranj	Gorenjska
2010	H60	serum	Poljane	Gorenjska
2009	H61	serum	Polhov Gradec	Osrednjeslovenska
2009	H62	serum	Pivka	Notranjsko-Kraška
2009	H63	kri	Velenje	Savinjska
2010	H64	serum	Stara Cerkev	Jugovzhodna
2009	H65	serum	Vrhnika	Osrednjeslovenska
2009	H66	serum	Škofja Loka	Gorenjska
2010	H67	serum	Ribnica	Jugovzhodna
2009	H68	kri	Sodražica	Jugovzhodna

4.2 NUKLEOTIDNE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE NS5 VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME

Pri vzorcih klopov, glodavcev in bolnikov s KME smo za analizo genoma virusa KME virusno RNA pomnoževali neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov. Tako smo se želeli izogniti nastanku morebitnih mutacij, ki se pojavijo ob razmnoževanju virusa na celičnih kulturah, v poskusnih živalih ali pri kloniranju.

4.2.1 Pomnoževanje krajšega tarčnega odseka beljakovine NS5

Z začetnima oligonukleotidoma FSM1 in FSM2 smo z metodo RT-PCR pomnoževali 318 bp dolg odsek zapisa za beljakovino NS5 neposredno iz vzorcev celokupne izolirane RNA klopov, glodavcev in bolnikov s KME. Pridelke reakcije RT-PCR smo nato pomnoževali z metodo vgnezdenega PCR z notranjima začetnima oligonukleotidoma FSM3 in FSM4. Pravilnost poteka reakcije smo spremljali s pozitivno in negativno kontrolo. Kot pozitiven rezultat smo opredelili vzorce, pri katerih smo dobili pridelke dolžine 252 bp. Uspešno smo pomnožili RNA virusa KME pri 17 od 27 vzorcev klopov, 14 od 17 vzorcev glodavcev in 22 od 22 vzorcev bolnikov s KME (Tabela 4-7).

Tabela 4-7 Klopi, glodavci in bolniki, okuženi z virusom KME, pri katerih smo pomnožili krajši tarčni odsek beljakovine NS5 virusa KME.

Klopi		Glodavci		Bolniki	
Oznaka vzorca	kratko NS5 zaporedje	Oznaka vzorca	kratko NS5 zaporedje	Oznaka vzorca	kratko NS5 zaporedje
T1	+	R43	+	H47	+
T2	+	R44	+	H48	+
T3	+	R45	+	H49	+
T4	+	R29	+	H50	+
T5	+	R30	+	H51	+
T6	+	R41	+	H52	+
T7	+	R33	+	H53	+
T8	+	R31	+	H54	+
T9	+	R32	+	H55	+
T10	+	R42	+	H56	+
T11	+	R34	+	H57	+
T12	+	R35	-	H58	+
T13	-	R36	+	H59	+
T14	-	R37	+	H60	+
T15	+	R38	-	H61	+
T16	-	R39	-	H62	+
T17	+	R40	+	H63	+
T18	-			H64	+
T19	+			H65	+
T20	-			H66	+
T21	-			H67	+
T22	+			H68	+
T23	+				
T24	-				
T25	-				
T26	-				
T27	-				

4.2.1.1 Analiza nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov s KME, so se med seboj razlikovala v 0 – 2 % oziroma so bila podobna v 98 – 100 %. Nukleotidna zaporedja virusa KME, pomnožena neposredno iz klopov, ki smo jih nabrali na določeni lokaciji, se med seboj niso razlikovala, so bila identična. Zato smo pri

risanju filogenetskega drevesa uporabili po enega predstavnika iz vsake lokacije. Med lokacijami se je nukleotidno zaporedje, pomnoženo iz vzorcev klopov, razlikovalo. Največja nukleotidna razlika je znašala 2 % oziroma je bila podobnost med zaporedji 98 %. Nukleotidna zaporedja krajšega tarčnega odseka beljakovine NS5, pomnožena neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov s KME, in nukleotidno zaporedje seva Ljubljana I smo primerjali med seboj (Priloga A). Na 195 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 29 polimorfnih mest, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 14 % variabilnih mest.

4.2.1.2 Analiza aminokislinskih zaporedij

Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 64 aminokislin (Priloga B). Celotna beljakovina NS5 je sestavljena iz 902 aminokislin, kar pomeni, da smo s tem analizirali 7 % beljakovine NS5 virusa KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokislinske. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 - 0,06 % oziroma so bila podobna v 99,9 – 100 %. Ugotovili smo le eno aminokislinsko zamenjavo pri glodavcu R34, kjer je prišlo do zamenjave bazične aminokislinske arginin z nevtralno aminokislino serin (R61S).

4.2.2 Pomnoževanje daljšega tarčnega odseka beljakovine NS5

Neposredno iz vzorcev celokupne izolirane RNA klopov, glodavcev in bolnikov smo z metodo RT-PCR z začetnima oligonukleotidoma TBE-7547 in TBE-c8732 pomnoževali 1165 bp dolg odsek zapisa za beljakovino NS5. Uspešno smo pomnožili RNA virusa KME pri 9 od 27 vzorcev klopov, 8 od 17 vzorcev glodavcev in 19 od 22 vzorcev bolnikov s KME (Tabela 4-8).

Tabela 4-8 Klopi, glodavci in bolniki, okuženi z virusom KME, pri katerih smo pomnožili daljši tarčni odsek beljakovine NS5 virusa KME.

Klopi		Glodavci		Bolniki	
Oznaka vzorca	NS5 zaporedje	Oznaka vzorca	NS5 zaporedje	Oznaka vzorca	NS5 zaporedje
T1	-	R43	-	H47	-
T2	-	R44	-	H48	+
T3	+	R45	-	H49	+
T4	-	R29	-	H50	-
T5	-	R30	+	H51	+
T6	-	R41	+	H52	+
T7	-	R33	-	H53	+
T8	+	R31	+	H54	-
T9	+	R32	-	H55	+
T10	+	R42	+	H56	+
T11	-	R34	+	H57	+
T12	+	R35	+	H58	+
T13	-	R36	-	H59	+
T14	-	R37	+	H60	+
T15	+	R38	-	H61	+
T16	-	R39	+	H62	+
T17	-	R40	-	H63	+
T18	+			H64	+
T19	-			H65	+
T20	-			H66	+
T21	-			H67	+
T22	-			H68	+
T23	+				
T24	-				
T25	-				
T26	-				
T27	+				

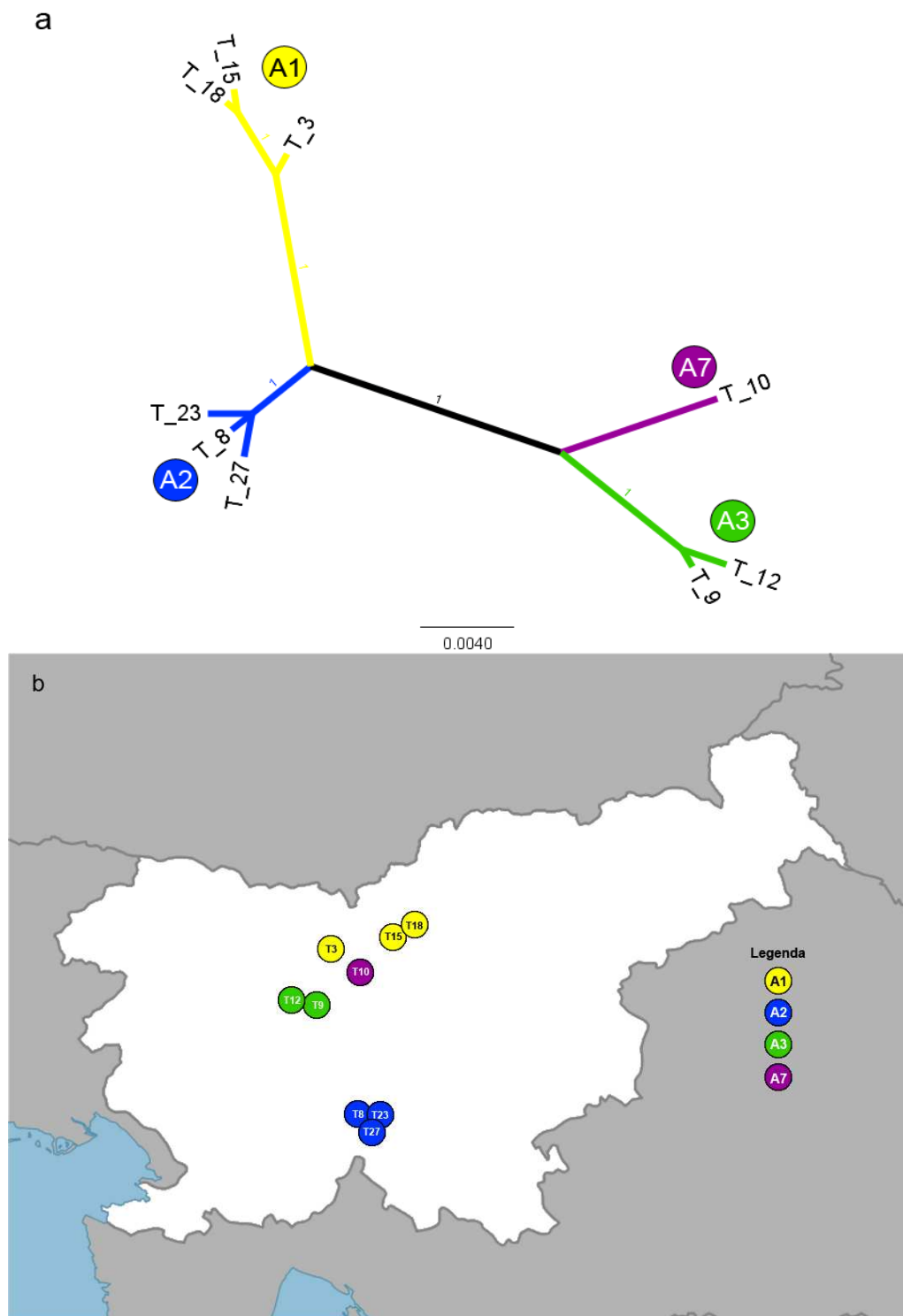
4.2.2.1 Vzorci klopov

4.2.2.1.1 Analiza nukleotidnih zaporedij

Iz poravnav nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo z metodo Bayesian Inference (BI) (Slika 4-4a). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev klopov, so se med seboj razlikovala v 0 - 1,7 % oziroma so bila podobna v 98,3 – 100 %. Nukleotidna zaporedja, pomnožena iz klopov, ki smo jih nabrali na določeni lokaciji v različnih letih, so bila med seboj identična. Tako so nukleotidna zaporedja virusa, ki smo jih pomnožili iz klopov, nabranih na Sodražici (T8, T23 in T27), identična med seboj kot tudi tista, ki smo jih pomnožili iz klopov z Mozirja (T15 in T18).

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev klopov, smo primerjali med seboj. Na 1075 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 42 mutacij, kar pomeni da je na tem odseku v virusnem genomu 4 % variabilnih mest (Priloga C).

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med razlikami v zaporedjih in zemljepisnim poreklom vzorca, iz katerega je osamljena virusna RNA, smo na zemljevidu Slovenije označili mesto odvzema vzorca z barvo, ki ustreza filogenetski skupini, označeni na filogenetskem drevesu. Na podlagi filogenetskega drevesa in zemljevida smo ugotovili, da se vzorci združujejo v skupine glede na njihov zemljepisni izvor (Slika 4-4). Nukleotidna razlika med skupinami A1 in A2 je znašala 1,2 % oziroma je bila podobnost med zaporedjima 98,8 %. Nukleotidna razlika med skupinami A2 in A3 je znašala 2,1 %, med skupinami A3 in A7 1,5 %, med skupinami A7 in A1 2,4 %, kar je bila največja razlika ne glede na to, da so zaporedja po zemljepisnem poreklu vzorcev bila najmanj oddaljena.



Slika 4-4 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (1075 bp) beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov. Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov. Legenda prikazuje barvo izolatov iz različnih filogenetskih skupin. Oznaka T predstavlja vzorec klopov. Številka zraven oznake T pomeni številko izolata.

4.2.2.1.2 Analiza aminokislinskih zaporedij

Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 358 aminokislin. S tem smo analizirali 40 % zaporedja beljakovine NS5 virusa KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokislinske. Od 42 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME pri klopih, jih je bilo 39 tih mutacij. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 - 0,2 % oziroma so bila podobna v 99,8 – 100 %. Ugotovili smo, da se aminokislinska zaporedja razlikujejo na 3 mestih, in sicer na mestu 61 sta bili hidrofilni, polarni, pozitivno nabiti aminokislini arginin ali lizin (R61K), na mestu 138 sta bili hidrofobni, nepolarni aminokislini valin ali izolevcin (V138I) in na mestu 333 sta bili hidrofobni, polarni, pozitivno nabiti aminokislini arginin ali histidin, ki imata aromatsko stransko verigo (R333H) (Tabela 4-9).

Tabela 4-9 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih iz klopov.

Zaporedje	Razlike v aminokislinah		
	61	138	333
T 3	R	V	R
T 8	K	.	H
T 9	K	I	.
T 10	K	I	.
T 12	K	I	.
T 15	.	.	.
T 18	-	.	-
T 23	K	.	H
T 27	K	.	H

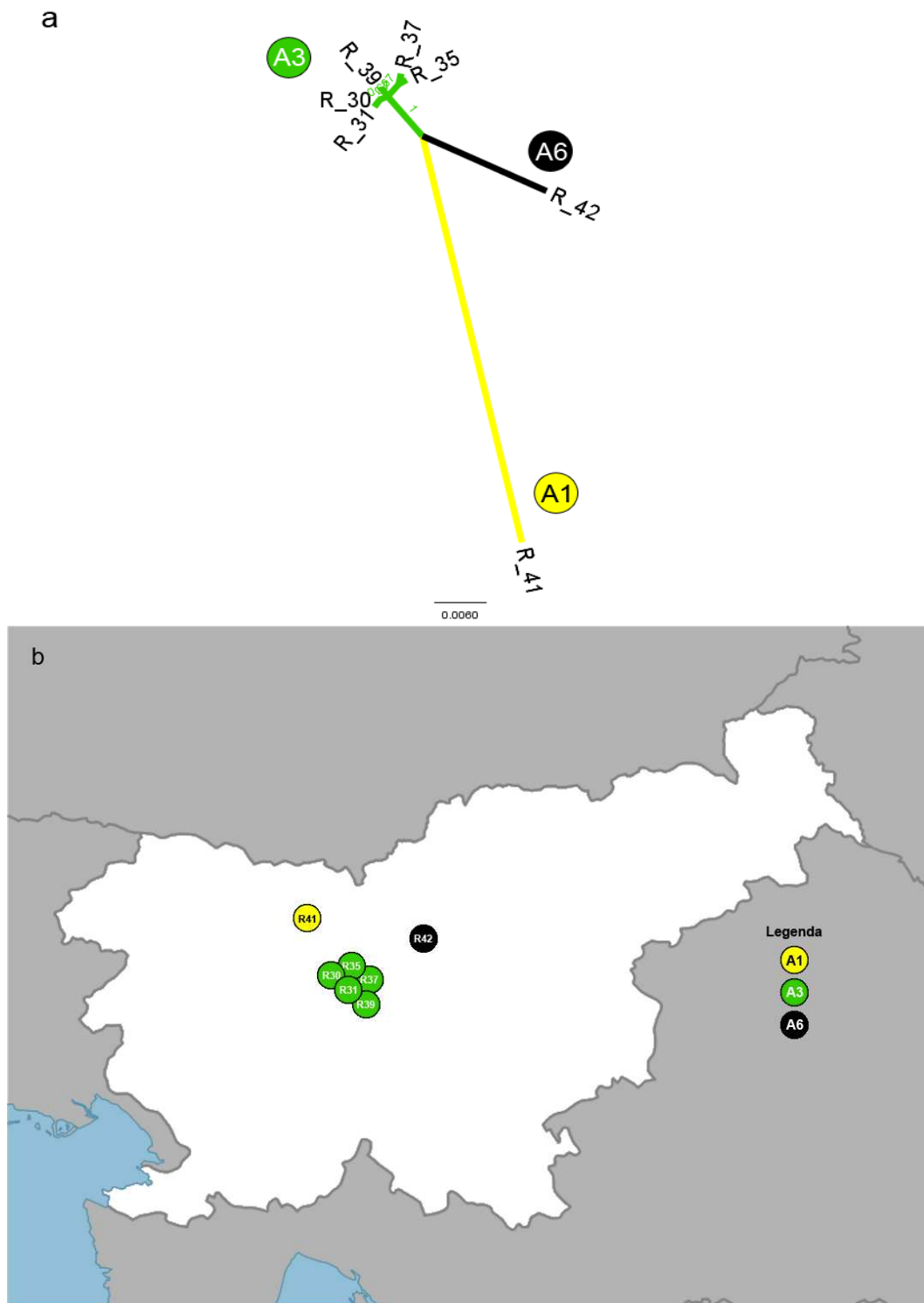
4.2.2.2 Vzorci glodavcev

4.2.2.2.1 Analiza nukleotidnih zaporedij

Iz poravnav nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo z metodo BI (Slika 4-5a). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME pomnožena neposredno iz vzorcev glodavcev, so se med seboj razlikovala v 0 – 2 % oziroma so bila podobna v 98 – 100 %. Nukleotidna zaporedja virusa KME, pomnožena iz glodavcev, ki smo jih ujeli na lokaciji Rakovnik v različnih letih, so bila med seboj identična (R30, R31, R35 in R37). Pri nukleotidnem zaporedju, pridobljenem iz glodavca, ujetega na lokaciji Rakovnik R39, je prišlo do zamenjave nukleotida na mestu 69, namesto timina v citozin. Nukleotidna razlika med zaporedji z lokacije Rakovnik je znašala 0,2 % oziroma je bila podobnost med zaporedjima 99,8 %.

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev glodavcev, smo primerjali med seboj. Na 536 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 34 mutacij, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 6 % variabilnih mest (Priloga D).

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med razlikami v zaporedjih in zemljepisnim poreklom vzorca, iz katerega je osamljena virusna RNA, smo na zemljevidu Slovenije označili mesto odvzema vzorca z barvo, ki ustreza filogenetski skupini, označeni na filogenetskem drevesu. Na podlagi filogenetskega drevesa in zemljevida smo ugotovili, da se vzorci združujejo v skupine glede na njihov zemljepisni izvor (Slika 4-5). Nukleotidna razlika med skupinama A1 in A6 je znašala 5 %, med skupinama A6 in A3 je znašala 2,4 % in med skupinama A3 in A1 je znašala 4,9 %.



Slika 4-5 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (536 bp) beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev glodavcev. Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev glodavcev. Legenda prikazuje barvo izolatov iz različnih filogenetskih skupin. Oznaka R predstavlja vzorec glodavca. Številka zraven oznake R pomeni številko izolata.

4.2.2.2.2 Analiza aminokislinskih zaporedij

Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 178 aminokislin. S tem smo analizirali 20 % zaporedja beljakovine NS5 virusa KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokislinske. Od 34 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih neposredno iz vzorcev glodavcev, je bilo 24 tih mutacij. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 - 1,7 % oziroma so bila podobna v 98,3 – 100 %. Ugotovili smo, da se aminokislinska zaporedja razlikujejo na desetih mestih (Tabela 4-10). Prevedena aminokislinska zaporedja beljakovine NS5 virusa KME, pomnožena iz vzorcev glodavcev na lokaciji Rakovnik, so bila identična. Med vzorci, ki so bili pridobljeni iz glodavcev z lokacije Rakovnik in glodavca z lokacije Tenetiše R41, smo ugotovili deset aminokislinskih zamenjav, in sicer: zamenjavo aminokislinske izolevcin v aminokislino valin (I5V, I89V), aminokislinske lizin v aminokislino arginin (K12R), aminokislinske arginin v aminokislino glicin (R14G, R18G), aminokislinske treonin v aminokislino alanin (T32A), aminokislinske tirozin v aminokislino cistein (Y34C), aminokislinske metionin v aminokislino valin (M71V) in aminokislinske asparagin v aminokislino serin (N146S, N148S). Pri vzorcu R42, ki smo ga pomnožili iz glodavca z lokacije Vransko, smo ugotovili zamenjavo aminokislinske izolevcin v aminokislino valin (I89V).

Tabela 4-10 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih iz glodavcev.

Zaporedje	Razlike v aminokislinah									
	5	12	14	18	32	34	71	89	146	148
R 30	I	K	R	R	T	Y	M	I	N	N
R 31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R 35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R 37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R 39	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R 41	V	R	G	G	A	C	V	V	S	S
R 42	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.

4.2.2.3 Vzorci bolnikov, obolelih s KME

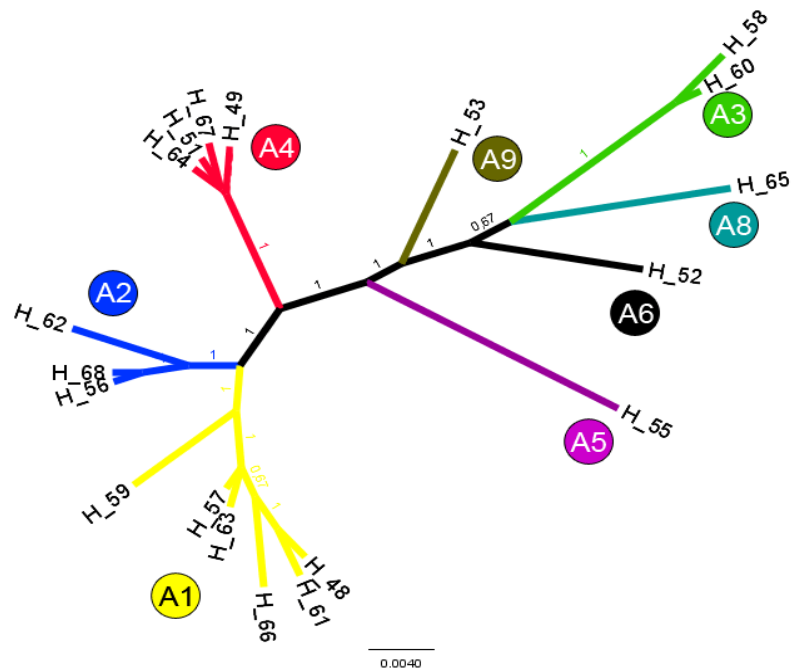
4.2.2.3.1 Analiza nukleotidnih zaporedij

Iz poravnav nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo z metodo BI (Slika 4-6a). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev bolnikov, so se med seboj razlikovala v 1,9 % oziroma so bila podobna v 98,1 %.

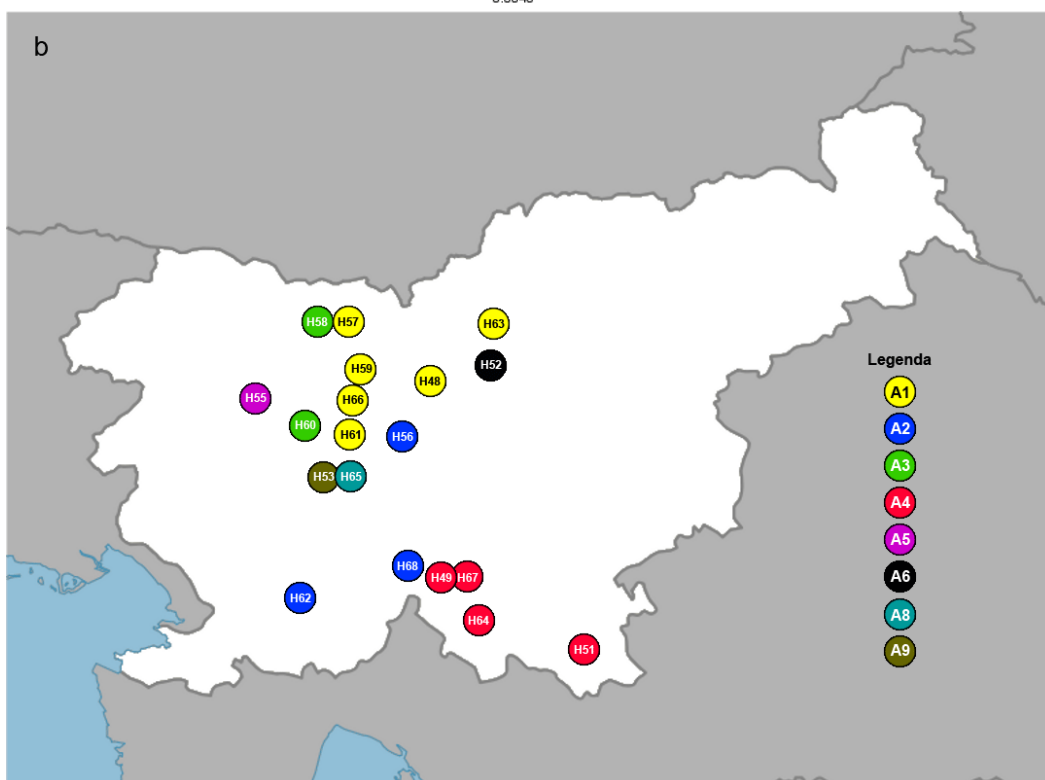
Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev bolnikov, smo primerjali med seboj. Na 1003 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 97 mutacij, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 9,7 % variabilnih mest (Priloga E). Vsa zaporedja so se medsebojno razlikovala za vsaj dva nukleotida; ni bilo identičnih zaporedij.

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med razlikami v zaporedjih in zemljepisnim poreklom vzorca, iz katerega je osamljena virusna RNA (v tem primeru smo uporabili kraj bivanja bolnika), smo na zemljevidu Slovenije označili mesto odvzema vzorca z barvo, ki ustreza filogenetski skupini označeni na filogenetskem drevesu. Na podlagi filogenetskega drevesa in zemljevida smo ugotovili, da se vzorci združujejo v skupine in da so skupine bolj heterogene kot pri zaporedjih virusa, pomnoženih iz vzorcev klopotov ali glodavcev (Slika 4-6). Nukleotidna razlika med skupinama A1 in A3 je znašala 2,7 %, med skupinama A3 in A4 je znašala 2,6 %, med skupinama A4 in A2 je znašala 2,1 % in med skupinama A2 in A1 je znašala 1,5 %.

a



b



Slika 4-6 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (1003 bp) beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov. Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine. b) Poveza med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov. Legenda prikazuje barvo izolatov iz različnih filogenetskih skupin. Oznaka H predstavlja vzorec bolnika. Številka zraven oznake H pomeni številko izolata.

4.2.2.3.2 Analiza aminokislinskih zaporedij

Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 334 aminokislin. S tem smo analizirali 37 % zaporedja beljakovine NS5 virusa KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokislinske. Od 97 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih neposredno iz vzorcev bolnikov, je bilo 92 tih mutacij. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 - 0,4 % oziroma so bila podobna v 99,6 – 100 %. Ugotovili smo, da se aminokislinska zaporedja razlikujejo na petih mestih (Tabela 4-11). Glede na prevedena aminokislinska zaporedja smo lahko vzorce razdelili na posamezna vzorca H51 in H55 ter štiri skupine, pri katerih so bila aminokislinska zaporedja identična. Skupina A z dvema vzorcema H48 in H61, skupina B z vzorci H49, H52, H53, H59, H62, H64 in H67, skupina C z vzorci H56, H57, H63, H66 in H68 in skupina D z vzorci H58, H60 in H65. Vzorec H51 se je od vseh ostalih prevedenih aminokislinskih zaporedij razlikoval po zamenjavi aminokislinske izolevcin v aminokislino levcin (I215L), vzorec H55 pa po zamenjavi aminokislinske arginin v aminokislino lizin (R275K). Skupina A se je od ostalih razlikovala po zamenjavi aminokislinske lizin v aminokislino glutamat (K319E). Pri skupinah B in D je prišlo do zamenjave aminokislinske arginin v aminokislino lizin (R61K), pri skupini D je prišlo še do zamenjave aminokislinske valin v aminokislino izolevcin (V138I).

Tabela 4-11 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih iz vzorcev bolnikov.

Zaporedje	Razlike v aminokislinah				
	61	138	215	275	319
H 48	R	V	I	R	K
H 49	K	.	.	.	E
H 51	K	.	L	.	E
H 52	K	.	.	.	E
H 53	K	.	.	.	E
H 55	K	.	.	K	E
H 56	.	.	.	.	E
H 57	.	.	.	.	E
H 58	K	I	.	.	E
H 59	K	.	.	.	E
H 60	K	I	.	.	E
H 61	.	.	.	.	.
H 62	K	.	.	.	E
H 63	.	.	.	.	E
H 64	K	.	.	.	E
H 65	K	I	.	.	E
H 66	.	.	.	.	E
H 67	K	.	.	.	E
H 68	.	.	.	.	E

4.3 NUKLEOTIDNE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE E VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME

4.3.1 Pomnoževanje tarčnega odseka beljakovine E

Za pridobitev nukleotidnega zaporedja odseka beljakovine E smo uporabili več začetnih oligonukleotidov (Tabela 3-5). Z začetnima oligonukleotidoma ENV 3F in ENV 3R smo pomnoževali 1309 bp dolg odsek zapisa za beljakovino E. Z začetnima oligonukleotidoma ENV 4.1F in ENV 3R smo pomnoževali 665 bp dolg odsek zapisa za beljakovino E. Začetne oligonukleotide ENV 3.1F, ENV 3.1R in ENV 4R smo uporabljali za vgnezdene PCR in sekveniranje. Z začetnima oligonukleotidoma TBE-1082 in TBE-c2022 smo pomnoževali 941 bp dolg odsek za beljakovino E. S kombinacijami začetnih oligonukleotidov smo uspešno pomnožili RNA virusa KME pri 8 od 27 vzorcev klopo, 7 od 17 vzorcev glodavcev in 22 od 22 vzorcev bolnikov s KME (Tabela 4-11).

Tabela 4-12 klopi, glodavci in bolniki, okuženi z virusom KME, pri katerih smo pomnožili tarčni odsek beljakovine E virusa KME.

Klopi		Glodavci		Bolniki	
Oznaka vzorca	E zaporedje	Oznaka vzorca	E zaporedje	Oznaka vzorca	E zaporedje
T1	-	R43	-	H47	+
T2	-	R44	-	H48	+
T3	+	R45	-	H49	+
T4	-	R29	-	H50	+
T5	-	R30	+	H51	+
T6	-	R41	+	H52	+
T7	-	R33	+	H53	+
T8	+	R31	-	H54	+
T9	+	R32	-	H55	+
T10	+	R42	+	H56	+
T11	-	R34	+	H57	+
T12	+	R35	-	H58	+
T13	-	R36	-	H59	+
T14	-	R37	+	H60	+
T15	+	R38	-	H61	+
T16	-	R39	+	H62	+
T17	-	R40	-	H63	+
T18	-			H64	+
T19	-			H65	+
T20	+			H66	+
T21	-			H67	+
T22	-			H68	+
T23	+				
T24	-				
T25	-				
T26	-				
T27	-				

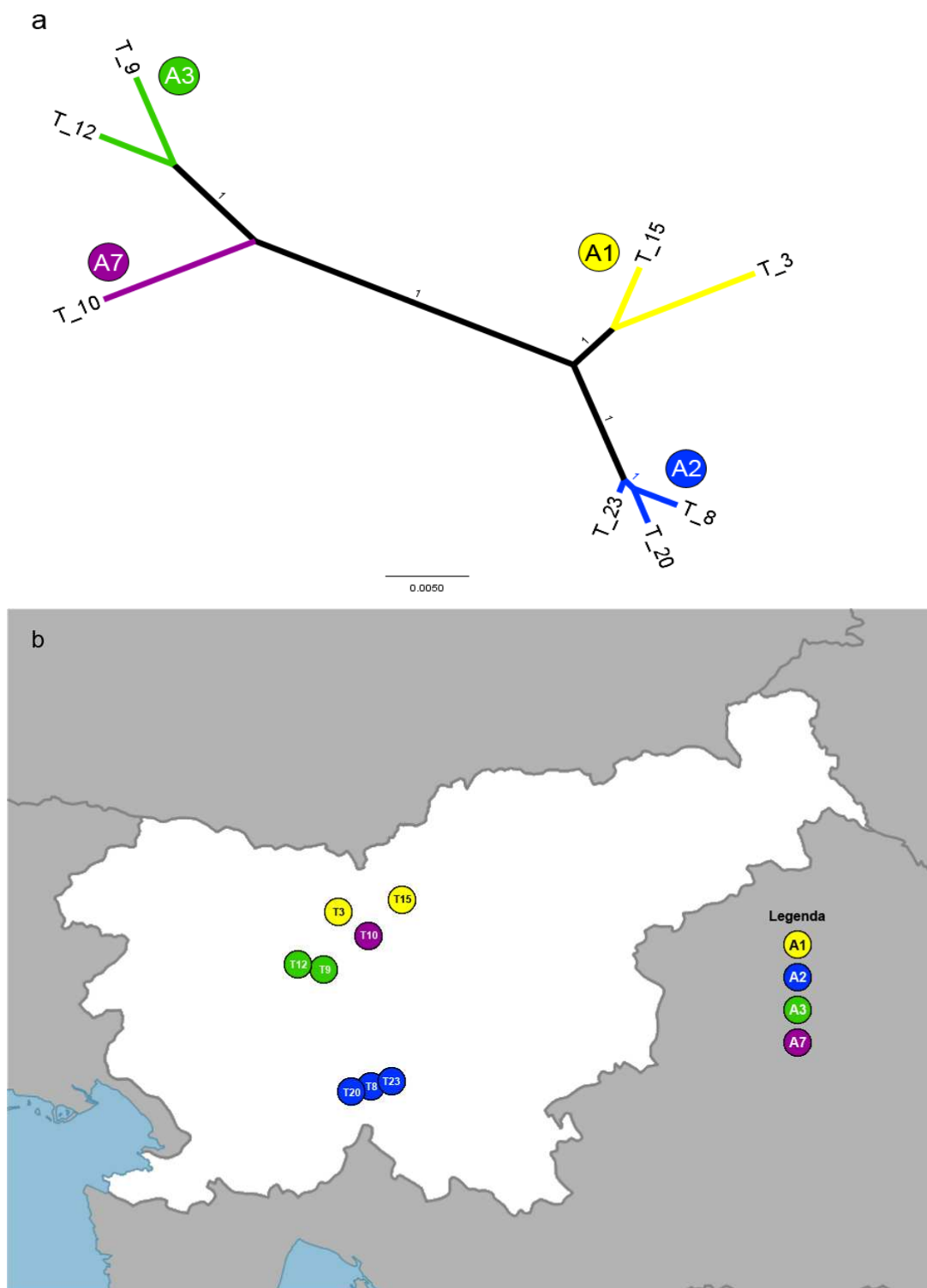
4.3.1.1 Vzorci klopov

4.3.1.1.1 Analiza nukleotidnih zaporedij

Iz poravnav nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo z metodo BI (Slika 4-7a). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev klopov, so se med seboj razlikovala v 0 - 2,3 % oziroma so bila podobna v 97,7 – 100 %. Nukleotidna zaporedja virusa, ki smo jih pomnožili iz klopov, nabranih na lokaciji Sodražica v različnih letih (T20 in T23), so bila med seboj identična, od vzorca T8 so se razlikovala v zamenjavi enega nukleotida iz nukleotida timin v nukleotid citozin.

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev klopov, smo primerjali med seboj. Na 931 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 55 mutacij, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 6 % variabilnih mest (Priloga F).

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med razlikami v zaporedjih in zemljepisnim poreklom vzorca, iz katerega je osamljena virusna RNA, smo na zemljevidu Slovenije označili mesto odvzema vzorca z barvo, ki ustreza filogenetski skupini, označeni na filogenetskem drevesu. Na podlagi filogenetskega drevesa in zemljevida smo ugotovili, da se vzorci združujejo v skupine glede na njihov zemljepisni izvor (Slika 4-7). Nukleotidna razlika med skupinama A1 in A3 je znašala 2,9 %, med skupinama A3 in A2 je znašala 3,1 %, med skupinama A7 in A2 je znašala 3,4 % in med skupinama A2 in A1 je znašala 1,6 %.



Slika 4-7 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (931 bp) beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov. Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine E virusa KME, pomnoženem neposredno iz vzorcev klopov. Legenda prikazuje barvo izolatov iz različnih filogenetskih skupin. Oznaka T predstavlja vzorec klopov. Številka zraven oznake T pomeni številko izolata.

4.3.1.1.2 Analiza aminokislinskih zaporedij

Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 310 aminokislin. Celotna beljakovina E je sestavljena iz 496 aminokislin, kar pomeni, da smo s tem analizirali 63 % zaporedja beljakovine E virusa KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokislinske. Od 55 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka beljakovine E virusa KME pri klopih, je bilo 46 tih mutacij. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 - 1,1 % oziroma so bila podobna v 98,9 – 100 %. Ugotovili smo, da se aminokislinska zaporedja razlikujejo na devetih mestih (Tabela 4-13). Prevedena aminokislinska zaporedja beljakovine E virusa KME, pridobljena iz klopov z lokacije Sodražica, so bila identična.

Tabela 4-13 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine E virusa KME, pridobljenih iz vzorcev klopov.

Zaporedje	Razlike v aminokislinah								
	11	87	89	193	206	265	269	276	305
T 8	N	T	Y	N	P	M	T	A	A
T 23	.	.	.	.	.	.	.	.	.
T 20	.	.	.	.	.	.	.	.	.
T 10	S	I	H	.	.	.	A	.	.
T 12	S	.	H	T	.	.	A	.	.
T 15	.	.	.	.	.	V	.	.	.
T 3	.	.	.	.	L	V	.	.	V
T 9	S	.	H	T	.	.	.	V	.

4.3.1.2 Vzorci glodavcev

4.3.1.2.1 Analiza nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev glodavcev, so se med seboj razlikovala v 0 - 2,3 % oziroma so bila podobna v 97,7 – 100 %. Nukleotidna zaporedja virusa KME, pomnožena iz glodavcev, ki smo jih ujeli na lokaciji Rakovnik v različnih letih, so bila med seboj identična (R30 in R37).

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev glodavcev, smo primerjali med seboj. Na 1203 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 51 mutacij, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 4 % variabilnih mest (Priloga G). Zaradi majhnega števila neposredno pomnoženih nukleotidnih zaporedij tarčnega odseka beljakovine NS5 iz vzorcev glodavcev nismo opravili filogenetske analize in povezave med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami.

4.3.1.2.2 Analiza aminokislinskih zaporedij

Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 400 aminokislin. S tem smo analizirali 81 % zaporedja beljakovine NS5 virusa KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokisline. Od 51 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenega neposredno iz vzorcev glodavcev, je bilo 44 tih mutacij. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 – 1 % oziroma so bila podobna v 99 – 100 %. Ugotovili smo, da se aminokislinska zaporedja razlikujejo na sedmih mestih (Tabela 4-14). Prevedena aminokislinska zaporedja beljakovine E virusa KME, pomnožena iz vzorcev glodavcev na lokaciji Rakovnik, so bila identična. Med vzorci, ki so pridobljeni iz glodavcev z lokacije Rakovnik in glodavca z lokacije Tenetiše R33, smo ugotovili šest aminokislinskih sprememb, in sicer: prišlo je do zamenjave aminokisline serin v aminokislino asparagin (S11N), aminokisline treonin v aminokislino izolevcin (T40I), aminokisline histidin v aminokislino tirozin (H89Y),

aminokisline treonin v aminokislino asparagin (T193N), aminokisline metionin v aminokislino valin (M265V) in aminokisline arginin v aminokislino lizin (R295K). Pri vzorcu R42, ki smo ga pomnožili iz glodavca z lokacije Vransko, smo ugotovili spremembo na štirih mestih, in sicer: prišlo je do zamenjave aminokisline izolevcin v aminokislino metionin (I96M), ostale tri zamenjave so bile enake kot pri vzorcu R33 za spremembe na mestih 11, 193 in 295 (Tabela 4-14).

Tabela 4-14 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine E virusa KME, pridobljenih iz glodavcev.

Zaporedje	Razlike v aminokislinah						
	11	40	89	96	193	265	295
R 30	S	T	H	I	T	M	R
R 33	N	I	Y	.	N	V	K
R 37	.	.	.	.	.	.	.
R 42	N	.	.	M	N	.	K

4.3.1.3 Vzorci bolnikov s KME

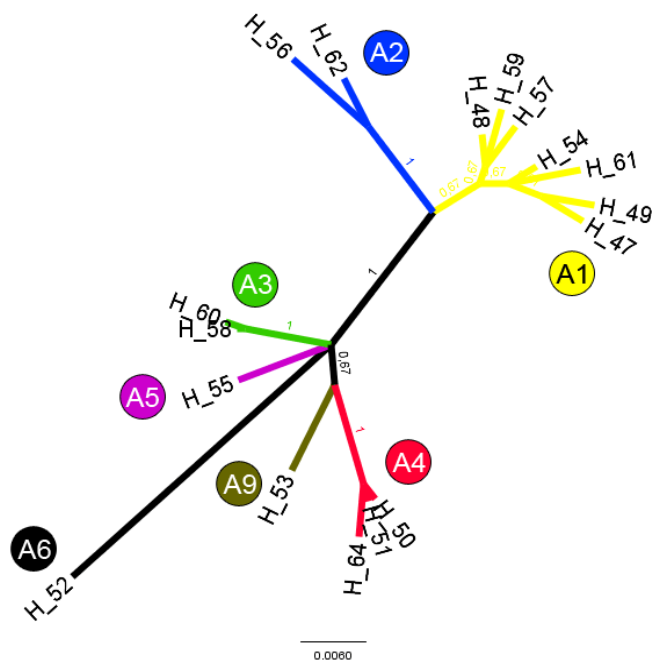
4.3.1.3.1 Analiza nukleotidnih zaporedij

Iz poravnav nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo z metodo BI (Slika 4-8a). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev bolnikov, so se med seboj razlikovala v 0 - 2,1 % oziroma so bila podobna v 97,9 – 100 %.

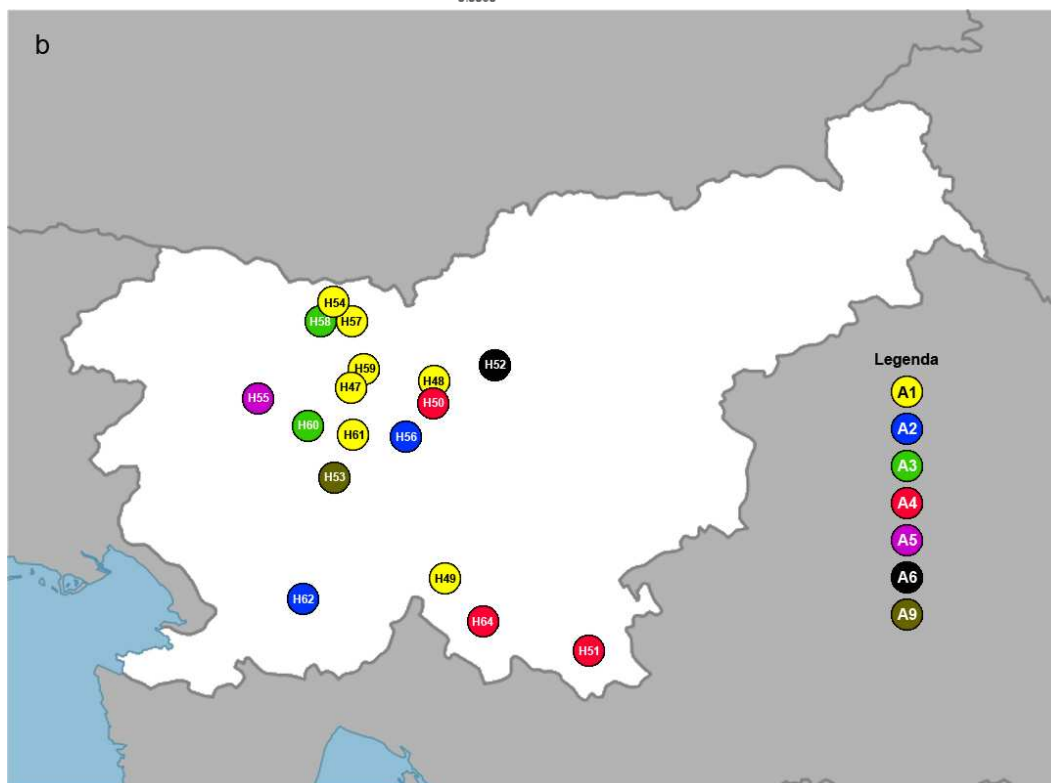
Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev bolnikov, smo primerjali med seboj. Na 757 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 72 mutacij, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 9,5 % variabilnih mest (Priloga H).

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med razlikami v zaporedjih in zemljepisnim poreklom vzorca, iz katerega je osamljena virusna RNA (v tem primeru smo uporabili kraj bivanja bolnika), smo na zemljevidu Slovenije označili mesto odvzema vzorca z barvo, ki ustreza filogenetski skupini, označeni na filogenetskem drevesu. Na podlagi filogenetskega drevesa in zemljevida smo ugotovili, da se vzorci združujejo v skupine in da so skupine bolj heterogene kot pri zaporedjih virusa, pomnoženih iz vzorcev klopotov ali glodavcev (Slika 4-8). Nukleotidna razlika med skupinama A1 in A2 je znašala 1,5 %, med skupinama A2 in A3 je 2,5 % ter je med skupinama A4 in A1 2,5 %.

a



b



Slika 4-8 a) Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka (757 bp) beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov. Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine. b) Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov. Legenda prikazuje barvo izolatov iz različnih filogenetskih skupin. Oznaka H predstavlja vzorec bolnika. Številka zraven oznake H pomeni številko izolata.

4.3.1.3.2 Analiza aminokislinskih zaporedij

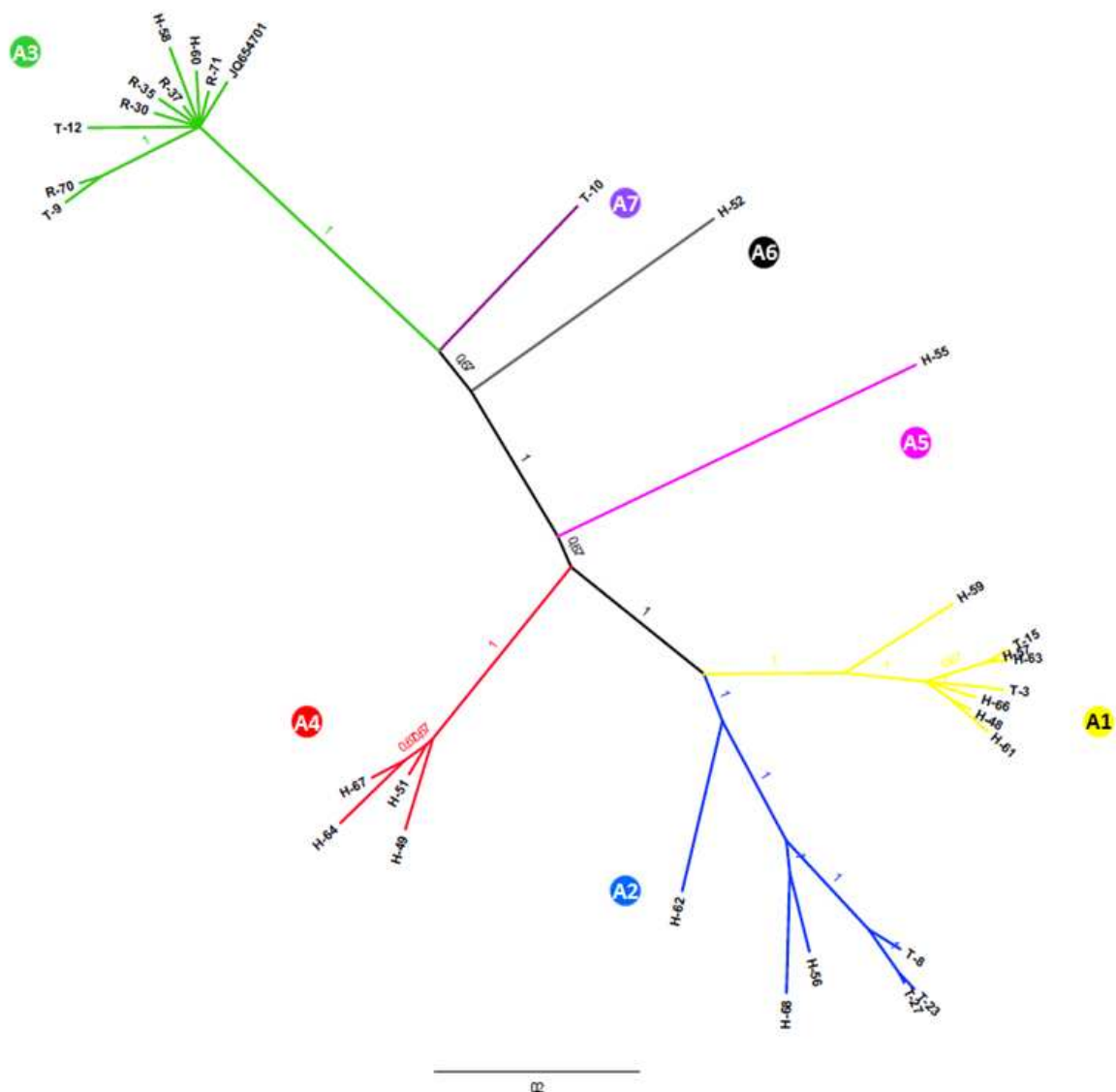
Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 252 aminokislin. S tem smo analizirali 51% zaporedja beljakovine E virusa KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokislina. Od 72 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pridobljenega neposredno iz vzorcev bolnikov, je bilo 66 tih mutacij. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 - 0,7 % oziroma so bila podobna v 99,3 – 100 %. Ugotovili smo, da se aminokislinska zaporedja razlikujejo na šestih mestih (Tabela 4-15). Najbolj izpostavljeni sta dve spremembi, in sicer Y73H in M249V. Prvo spremembo smo zaznali pri vzorcih H4, H47, H54, H56, H59, H61, H57 in H62, kjer je bila na mestu 73 aminokislina tirozin, pri vseh ostalih pa je bila aminokislina histidin, obe aminokislini imata aromatsko stransko verigo. Drugo spremembo smo zaznali pri vzorcih H49, H50, H51, H52, H53, H55, H56, H58, H64, H62 in H60, pri katerih je bila na mestu 249 aminokislina metionin pri vseh ostalih pa je bila aminokislina valin; obe aminokislini sta hidrofobni in nepolarni pri fiziološkem pH. Ostale spremembe so se pojavile v posameznih primerih. Pri H64 je prišlo do zamenjave aminokislina treonin v aminokislino izolevcin (T24I). Pri H59 je prišlo do zamenjave aminokislina tirozin v aminokislino histidin (Y82H). Pri H53 je prišlo do zamenjave aminokislina glutamat v aminokislino aspartat (E173D). Pri H58 je prišlo do zamenjave aminokislina asparagin v aminokislino treonin (N177T).

Tabela 4-15 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine E virusa KME, pridobljenih iz vzorcev bolnikov.

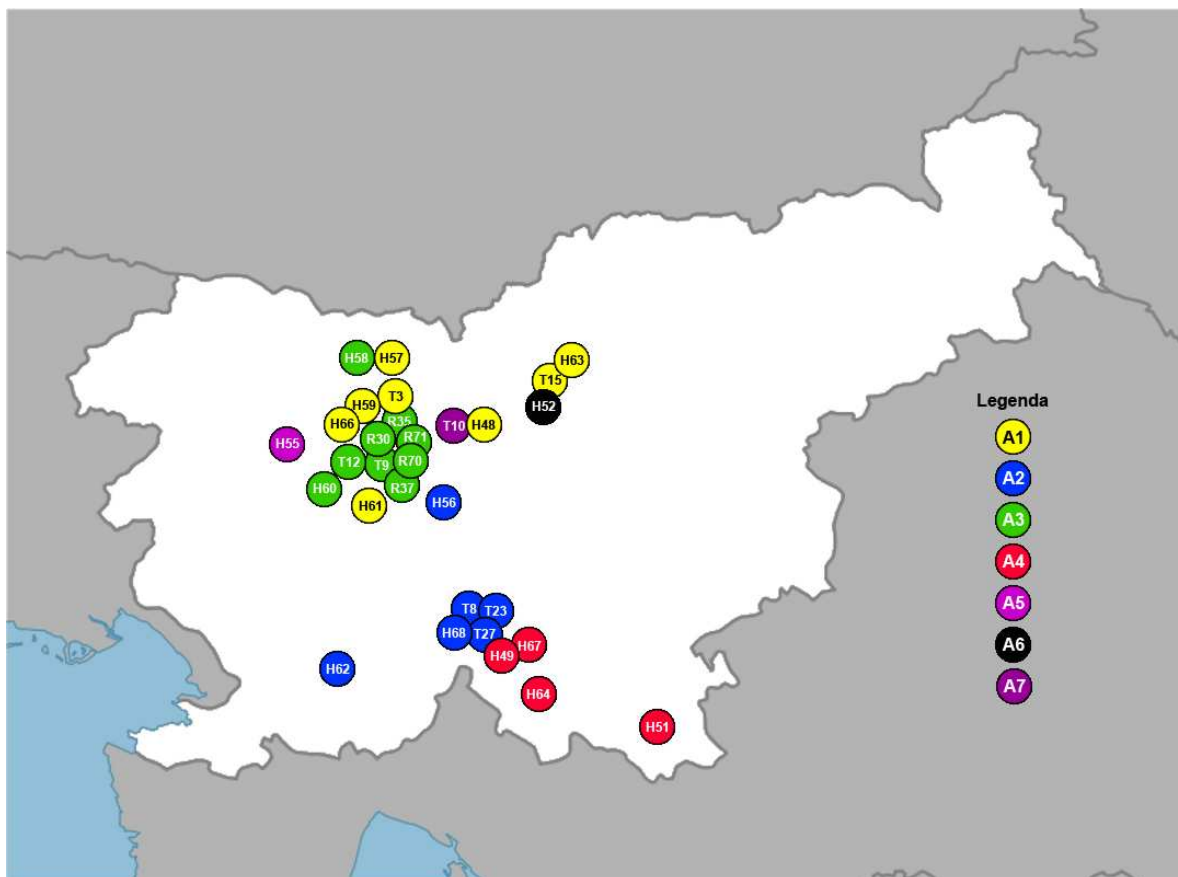
Zaporedje	Razlike v aminokislinah					
	24	73	82	173	177	249
H 49	T	Y	Y	E	N	M
H 50	.	H	.	.	.	.
H 48	.	H	.	.	.	V
H 47	.	.	.	.	.	V
H 51	.	H	.	.	.	.
H 52	.	H	.	.	.	.
H 53	.	H	.	D	.	.
H 54	.	.	.	.	.	V
H 55	.	H	.	.	.	.
H 56	.	.	.	.	.	.
H 58	.	H	.	.	T	.
H 59	.	.	H	.	.	V
H 64	I	H	.	.	.	.
H 61	.	.	.	.	.	V
H 57	.	.	.	.	.	V
H 62	.	.	.	G	.	.
H 60	.	H	.	.	T	.

4.4 CELOKUPNA ANALIZA

4.4.1 Filogenetska analiza tarčnega odseka beljakovine NS5



Slika 4-9 Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME (936 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopi, glodavcev in vzorcev bolnikov. Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine. Oznaka T predstavlja vzorec klopi. Oznaka R predstavlja vzorec glodavca. Oznaka H predstavlja vzorec bolnika. Številke poleg oznak T, R in H pomenijo številko izolata.



Slika 4-10 Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov. Legenda prikazuje barvo izolatov iz različnih filogenetskih skupin. Oznaka T predstavlja vzorec klopov. Oznaka R predstavlja vzorec glodavca. Oznaka H predstavlja vzorec bolnika. Številke poleg oznak T, R in H pomenijo številko izolata.

Iz poravnave 32 nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo z metodo BI (Slika 4-9). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnožena neposredno iz osmih vzorcev klopov, petih vzorcev glodavcev in 19 vzorcev bolnikov, so se med seboj razlikovala v 0 - 1,9 % oziroma so bila podobna v 98,1 – 100 %.

Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev, smo primerjali med seboj. Na 936 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 96 mutacij, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 10 % variabilnih mest (Priloga I).

Med zaporedji, ki so bila identična, smo izbrali enega predstavnika za filogenetske analize. Zaporedja, ki smo jih pridobili iz vzorcev klopov z lokacije Sodražica, so bila med seboj

identična, zato smo v analizo kot predstavnika vključili vzorec T8, vzorca T27 in T23 pa smo izključili. Zaporedji T9 iz klopa z lokacije Rakovnik in R39 iz glodavca z iste lokacije sta bili identični, zato smo v analizo kot predstavnika vključili vzorec T9. Med vzorci glodavcev, pridobljenih z lokacije Rakovnik (R30, R31, R35 in R37), ki so bili identični, smo izbrali vzorec R30 kot predstavnika v filogenetski analizi.

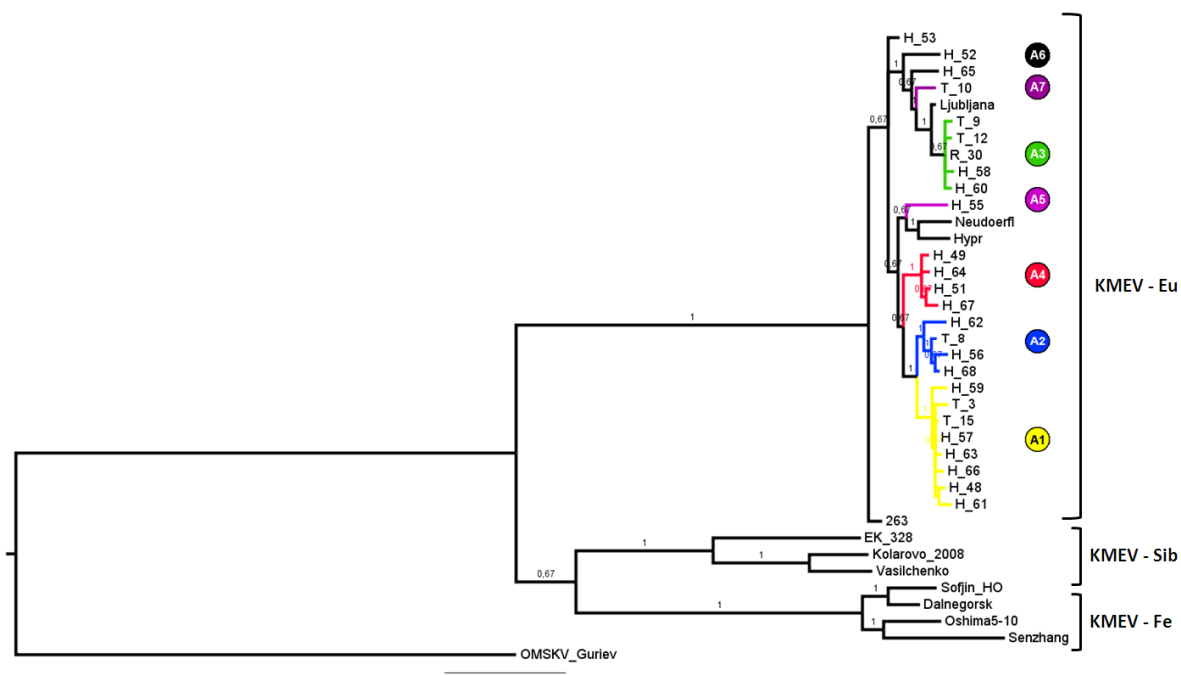
Filogenetska analiza 936 bp dolgih nukleotidnih zaporedij je pokazala, da se zaporedja združujejo v štiri glavne skupine z visokimi posteriornimi verjetnostmi. Skupine smo označili z različnimi barvami. Označili smo še dodatne skupine, ki imajo nižje posteriorne verjetnosti (sliki 4-9 in 4-11). Združevanje v filogenetske skupine je bilo neodvisno od gostitelja. Zaporedja, ki smo jih pridobili iz vzorcev klopotov, glodavcev ali vzorcev bolnikov, so se združila v skupne filogenetske skupine.

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med razlikami v zaporedjih in zemljepisnim poreklom vzorcev, iz katerih je osamljena virusna RNA, smo na zemljevidu Slovenije označili mesto odvzema vzorca z barvo, ki ustreza filogenetski skupini, označeni na filogenetskem drevesu. Na podlagi filogenetskega drevesa in zemljevida smo ugotovili, da se vzorci združujejo v skupine glede na njihov zemljepisni izvor (Sliki 4-9 in 4-10). Nukleotidna razlika med skupinama A1 in A3 je znašala 2,9 %, med skupinama A3 in A4 je 2,6 %, med skupinama A4 in A2 1 % ter je med skupinama A2 in A1 1,2 %.

Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 312 aminokislin. S tem smo analizirali 35 % zaporedja beljakovine NS5 virusa KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe aminokisline. Od 96 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih neposredno iz vzorcev bolnikov, klopotov in glodavcev, jih je bilo 88 tih mutacij. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 - 0,5 % oziroma so bila podobna v 99,5 – 100 %. Ugotovili smo, da se prevedena aminokislinska zaporedja, pridobljena v naši študiji v primerjavi z prototipnim sevom Neudoerfl, razlikujejo na osmih mestih (Tabela 4-16). Najbolj izrazite so bile tri zamenjave, od katerih sta bili zamenjavi V51M in K108R prisotni pri vseh zaporedjih vzorcev analiziranih v naši študiji ter zamenjava K253R, ki je bila prisotna pri vseh zaporedjih vzorcev analiziranih v naši študiji razen pri zaporedju H55.

Tabela 4-16 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine NS5 virusa KME, pridobljenih iz vzorcev klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov v primerjavi z referenčnim sevom Neudoerfl (TEU27495).

	Razlike v aminokislinah							
Zaporedje	39	51	108	116	193	253	297	311
Neudoerfl	K	V	K	V	I	K	E	R
Ljubljana	.	M	R	I	.	R	.	.
T 3	R	M	R	.	.	R	.	.
T 8	.	M	R	.	.	R	.	H
T 9	.	M	R	I	.	R	.	.
T 10	.	M	R	I	.	R	.	.
T 12	.	M	R	I	.	R	.	.
T 15	R	M	R	.	.	R	.	.
R 30	.	M	R	I	.	R	.	.
H 48	R	M	R	.	.	R	K	.
H 49	.	M	R	.	.	R	.	.
H 51	.	M	R	.	L	R	.	.
H 52	.	M	R	.	.	R	.	.
H 53	.	M	R	.	.	R	.	.
H 55	.	M	R	.	.	.	.	.
H 56	R	M	R	.	.	R	.	.
H 57	R	M	R	.	.	R	.	.
H 58	.	M	R	I	.	R	.	.
H 59	.	M	R	.	.	R	.	.
H 60	.	M	R	I	.	R	.	.
H 61	R	M	R	.	.	R	K	.
H 62	.	M	R	.	.	R	.	.
H 63	R	M	R	.	.	R	.	.
H 64	.	M	R	.	.	R	.	.
H 65	.	M	R	I	.	R	.	.
H 66	R	M	R	.	.	R	.	.
H 67	.	M	R	.	.	R	.	.
H 68	R	M	R	.	.	R	.	.



Slika 4-11 Filogenetsko drevo tarčnega daljšega odseka beljakovine NS5 (936 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov. Oznaka T predstavlja vzorec klopov. Oznaka R predstavlja vzorec glodavca. Oznaka H predstavlja vzorec bolnika. Številke poleg oznak T, R in H pomenijo številko izolata. Kot referenčne seve virusa KME smo uporabili zaporedja, ki smo jih dobili v genski banki GenBank: Ljubljana I – slovenski izolat virusa KME (JQ654701), Neudoerfl - prototipni sev evropskega podtipa virusa KME (TEU27495), Hypr – slovaški izolat virusa KME (TEU39292), TBE263 – finski izolat virusa KME (DQ153877), EK-328 – estonski izolat virusa KME (DQ486861), Kolarovo-2008 – ruski izolat virusa KME (FJ968751), Vasilchenko – prototipni sev sibirskega podtipa (L40361), Dalnegorsk – ruski izolat virusa KME (FJ402886), Oshima5-10 – japonski izolat virusa KME (AB062063), Senzhang – kitajski izolat virusa KME (AY182009), Sofjin-HO – prototipni sev daljnovzhodnega podtipa (AB062064); kot zunanjo referenco smo uporabili OMSKV_Guriev – virus hemoragične vročice OMSK (AB507800). Oznake na vejah predstavljajo posterioorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine.

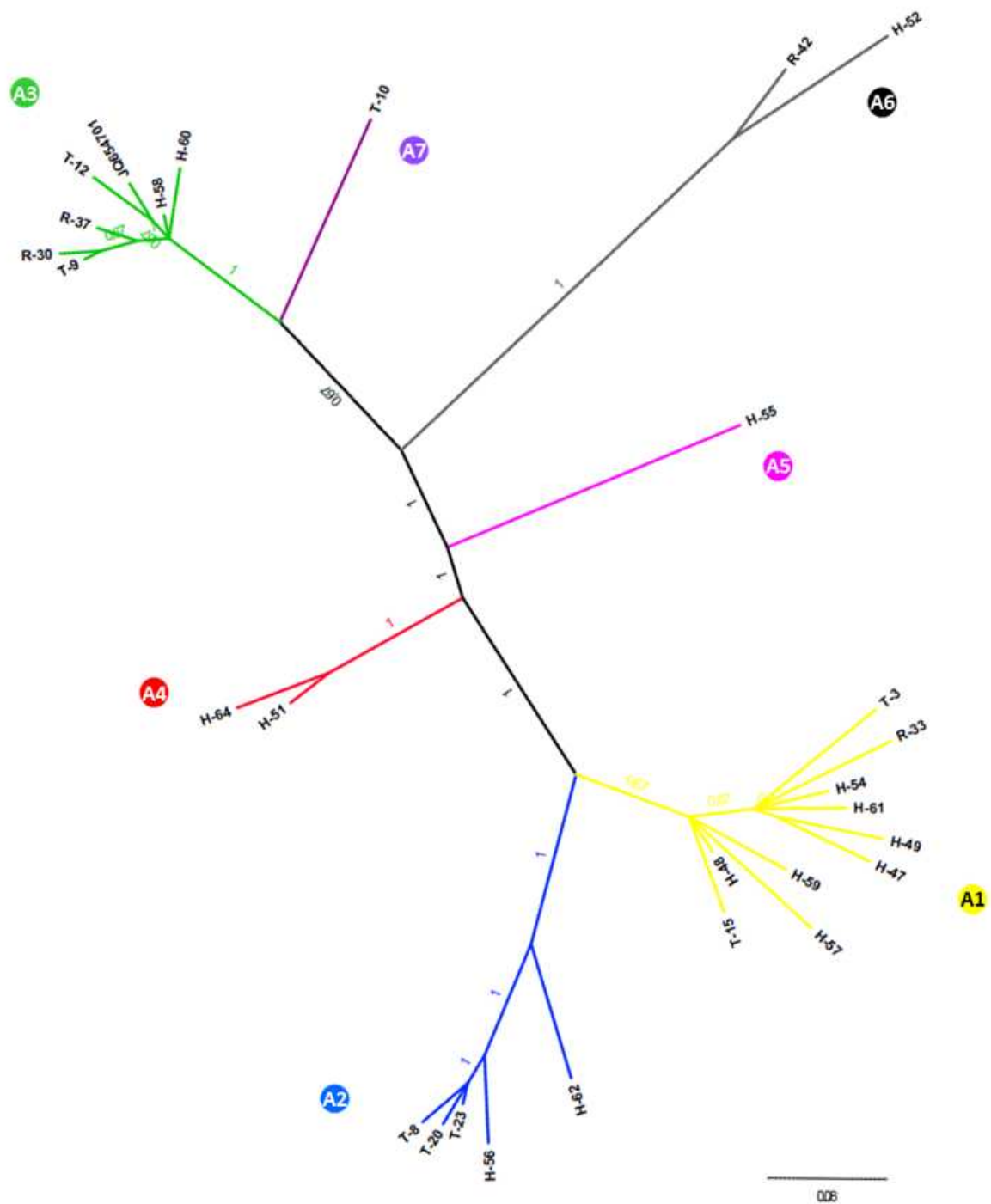
4.4.2 Filogenetska analiza tarčnega odseka beljakovine E

Iz poravnav 29 nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo z metodo BI (Slika 4-12). Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnožena neposredno iz osmih vzorcev klopov, štirih vzorcev glodavcev in 17 vzorcev bolnikov, so se med seboj razlikovala v 0 - 2,2 % oziroma so bila podobna v 97,8 – 100 %.

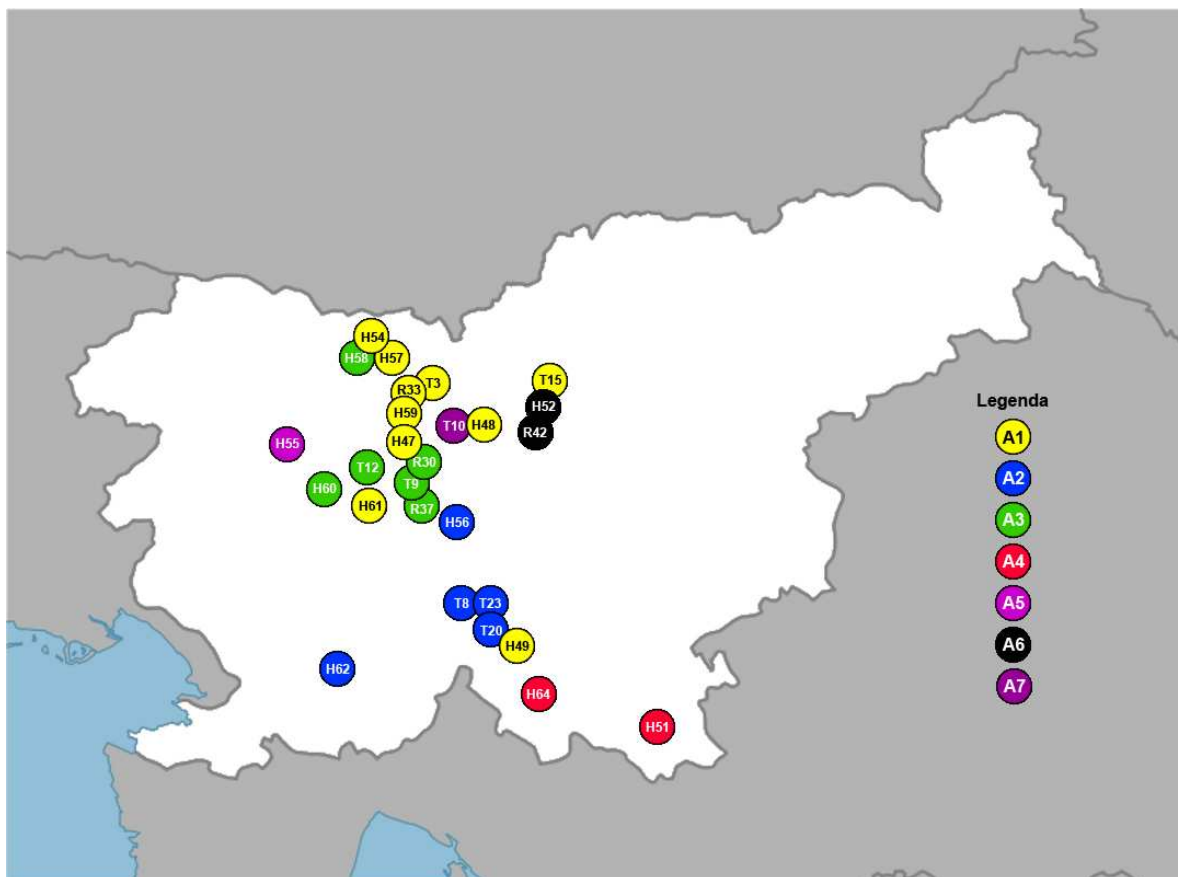
Nukleotidna zaporedja tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnožena neposredno iz vzorcev, smo primerjali med seboj. Na 757 bp dolgem tarčnem odseku smo ugotovili 88 mutacij, kar pomeni, da je na tem odseku v virusnem genomu 12 % variabilnih mest (Priloga J).

Med zaporedji, ki so bila identična, smo izbrali enega predstavnika za filogenetske analize. Zaporedji, ki smo ju pridobili iz vzorcev klopov z lokacije Sodražica, sta bili med seboj identični, zato smo v analizo vključili vzorec T20, vzorec T23 smo izključili. Zaporedja T9 iz klopa z lokacije Rakovnik ter zaporedji R30 in R37 iz glodavca z iste lokacije so bila identična, zato smo v analizo kot predstavnika vključili vzorec R37. Vzorca bolnikov H51 in H50 sta bila identična, zato smo v filogenetsko analizo vključili vzorec H50. Vzorca bolnikov H60 in H58 sta bila identična, zato smo v filogenetsko analizo vključili vzorec H60.

Filogenetska analiza 757 bp dolgih nukleotidnih zaporedij je pokazala da se zaporedja združujejo v štiri glavne skupine z visokimi posteriornimi verjetnostmi. Skupine smo označili z različnimi barvami. Označili smo še dodatne skupine, ki imajo nižje posteriorne verjetnosti (sliki 4-12 in 4-14). Združevanje v filogenetske skupine je bilo neodvisno od gostitelja. Zaporedja, ki smo jih pridobili iz vzorcev klopov, glodavcev ali vzorcev bolnikov, so se združila v skupne filogenetske skupine.



Slika 4-12 Nekoreninjeno filogenetsko drevo, izrisano po Bayesian filogenetski obdelavi tarčnega odseka beljakovine E virusa KME (757 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov. Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine. Oznaka T predstavlja vzorec klopov. Oznaka R predstavlja vzorec glodavca. Oznaka H predstavlja vzorec bolnika. Številke poleg oznak T, R in H pomenijo številko izolata.



Slika 4-13 Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov. Legenda prikazuje barvo izolatov iz različnih filogenetskih skupin. Oznaka T predstavlja vzorec klopov. Oznaka R predstavlja vzorec glodavca. Oznaka H predstavlja vzorec bolnika. Številke poleg oznak T, R in H pomenijo številko izolata.

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med razlikami v zaporedjih in zemljepisnim poreklom vzorcev, iz katerih je osamljena virusna RNA, smo na zemljevidu Slovenije označili mesto odvzema vzorca z barvo, ki ustreza filogenetski skupini, označeni na filogenetskem drevesu. Na podlagi filogenetskega drevesa in zemljevida smo ugotovili, da se vzorci združujejo v skupine glede na njihov zemljepisni izvor (Sliki 4-12 in 4-13). Nukleotidna razlika med skupinama A1 in A3 je znašala 3 %, med skupinama A3 in A4 je 2,5 %, med skupinama A4 in A2 je 2,9 % ter med skupinama A2 in A1 je 1,9 %.

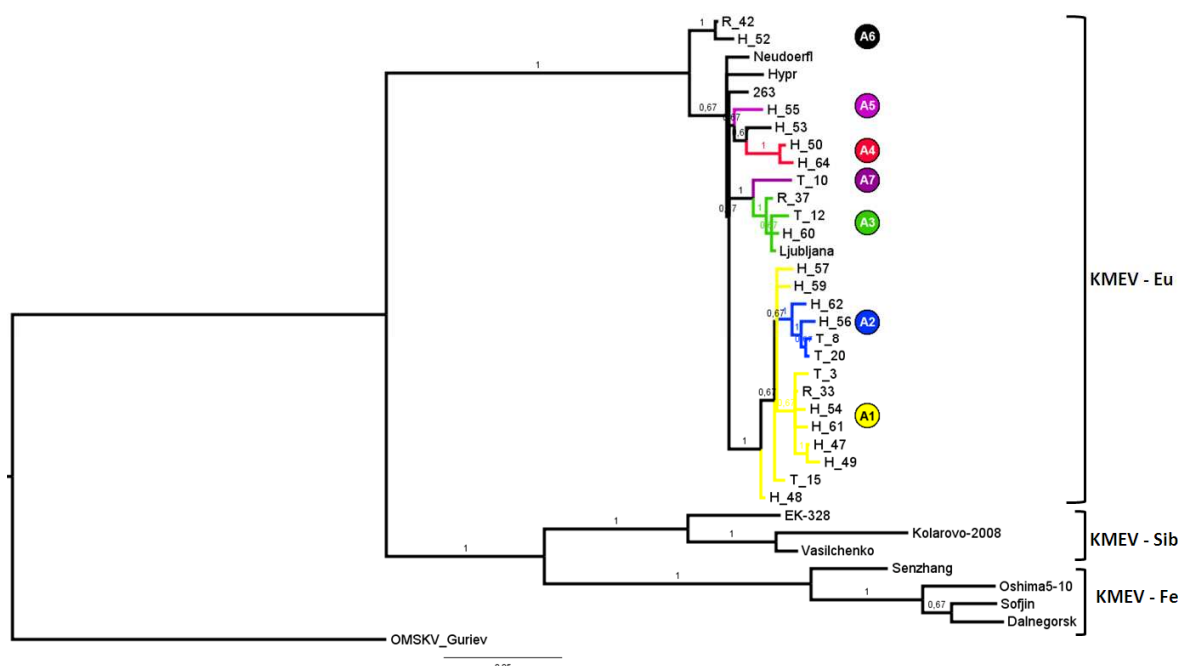
Pomnožena nukleotidna zaporedja smo s standardnim genetskim kodom prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 252 aminokislin. S tem smo analizirali 51 % zaporedja beljakovine E virusov KME. Zanimalo nas je, ali katera od mutacij privede do spremembe

aminokisline. Od 88 mutacij, ki smo jih ugotovili v nukleotidnem zaporedju tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pridobljenih neposredno iz vzorcev bolnikov, klopov in glodavcev, je bilo 78 tih mutacij. Prevedena aminokislinska zaporedja so se med seboj razlikovala v 0 - 0,7 % oziroma so bila podobna v 99,3 – 100 %. Ugotovili smo, da so se prevedena aminokislinska zaporedja, pridobljena v naši študiji v primerjavi z prototipnim sevom Neudoerfl, razlikovala na desetih mestih (Tabela 4-17). Najbolj izrazita zamenjava je I110V, do katere je prišlo pri vseh zaporedjih vzorcev analiziranih v naši študiji.

Pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij za beljakovino E smo ugotovili devet ohranjenih aminokislin cistein, ki so značilni za vse klopno prenosljive flaviviruse, ohranjen fuzijski peptid (DRGWGNHCGLFGKGS), ohranjen heksapeptid (EHLPTA) in glikozilacijsko mesto (NET) (Priloga K). Pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij vzorcev analiziranih v naši študiji in referenčnih sevov smo na mestu 206 opazili značilne aminokisline za vse tri podtipe virusa KME (Priloga K).

Tabela 4-17 Prikaz razlik pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij beljakovine E virusa KME, pridoljenih iz vzorcev klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov v primerjavi z referenčnim sevom Neudoerfl (TEU27495).

Zaporedje	Razlike v aminokislinah									
	24	71	73	80	82	110	173	177	190	249
Neudoerfl	T	T	H	I	Y	I	E	N	P	M
Ljubljana	.	.	.	.	.	V	.	T	.	.
T 8	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	.
T 10	.	I	.	.	.	V	.	.	.	.
T 12	.	.	.	.	.	V	.	T	.	.
T 15	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	V
T 20	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	.
T 23	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	.
R 30	.	.	.	.	.	V	.	T	.	.
R 33	I	.	Y	.	.	V	.	.	.	V
R 37	.	.	.	.	.	V	.	T	.	.
T 3	.	.	Y	.	.	V	.	.	L	V
R 42	.	.	.	M	.	V	.	.	.	.
H 47	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	V
H 48	.	.	.	.	.	V	.	.	.	V
H 49	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	.
H 50	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.
H 51	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.
H 52	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.
H 53	.	.	.	.	.	V	D	.	.	.
H 54	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	V
H 55	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.
H 56	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	.
H 58	.	.	.	.	.	V	.	T	.	.
H 59	.	.	Y	.	H	V	.	.	.	V
H 64	I	.	.	.	.	V	.	.	.	.
H 61	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	V
T 9	.	.	.	.	.	V	.	T	.	.
H 57	.	.	Y	.	.	V	.	.	.	V
H 62	.	.	Y	.	.	V	G	.	.	.
H 60	.	.	.	.	.	V	.	T	.	.



Slika 4-14 Filogenetsko drevo tarčnega odseka beljakovine E (757 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov. Oznaka T predstavlja vzorec klopov. Oznaka R predstavlja vzorec glodavca. Oznaka H predstavlja vzorec bolnika. Številke poleg oznak T, R in H pomenijo številko izolata. Kot referenčne seve virusa KME smo uporabili zaporedja, ki smo jih dobili v genski banki GenBank: Ljubljana I – slovenski izolat virusa KME (JQ654701), Neudoerfl - prototipni sev evropskega podtipa virusa KME (TEU27495), Hypr – slovaški izolat virusa KME (TEU39292), TBE263 – finski izolat virusa KME (DQ153877), EK-328 – estonski izolat virusa KME (DQ486861), Kolarovo-2008 – ruski izolat virusa KME (FJ968751), Vasilchenko – prototipni sev sibirskega podtipa (L40361), Dalnegorsk – ruski izolat virusa KME (FJ402886), Oshima5-10 – japonski izolat virusa KME (AB062063), Senzhang – kitajski izolat virusa KME (AY182009), Sofjin-HO – prototipni sev daljnovzhodnega podtipa (AB062064); kot zunanjo referenco smo uporabili OMSKV_Guriev – virus hemoragične vročice OMSK (AB507800). Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti. Oznake v obarvanih krogih predstavljajo določene filogenetske skupine.

4.4.3 Povezava filogenetske analize in zemljepisnega porekla vzorca

Nukleotidna zaporedja, ki so se združila v filogenetske skupine pri analizi zapisov za beljakovino NS5, so se združila v enake filogenetske skupine kot pri analizi zapisov za beljakovino E (slike od 4-9 do 4-14). Vzorci, pri katerih smo dobili zapisa za obe beljakovini, so se po filogenetski analizi združili v enake skupine tako pri analizi zapisov za beljakovino E kot pri analizi zapisov za beljakovino razen pri vzorcu H-49. Opazili smo pomembno razliko pri nukleotidnem zapisu, ki smo ga dobili iz vzorca bolnika H-49, ki se pri analizi zapisov za beljakovino NS5 združuje v skupino A4, pri analizi zapisov za beljakovino E pa v skupino A1.

Na slikah 4-10 in 4-13 po analizi nukleotidnih zapisov opazimo zemljepisno združevanje vzorcev pri zapisih za beljakovini NS5 in E. Skupini A1 in A3 sta sestavljeni iz zapisov, ki smo jih pridobili iz vzorcev z zemljepisnim poreklom iz severnega in osrednjega dela Slovenije. Skupini A2 in A4 sta sestavljeni iz zapisov, ki smo jih pridobili iz vzorcev z zemljepisnim poreklom iz južnega dela Slovenije. Med skupinama A1 in A3 lahko opazimo, da obstaja zemljepisna razporeditev, kjer skupino A1 sestavljajo zapisi, pridobljeni iz severnega področja Slovenije, skupino A3 pa sestavljajo zapisi iz osrednjega dela Slovenije. Tudi med skupinama A2 in A4 obstaja zemljepisna razporeditev. V skupini A2 se združujejo zapisi, pridobljeni iz jugozahodnega področja Slovenije, med tem ko se v skupini A4 združujejo zapisi s poreklom iz jugovzhodnega področja Slovenije.

5 RAZPRAVA

RNA virusi imajo visoko pogostost mutacij in zaradi tega potencial za hitro evolucijo (Ecker in sod., 1999; Lundkvist in sod., 2001). Kljub temu je virus KME glede na dostopne podatke o virusnih izolatih presenetljivo stabilen v naravnih ekoloških razmerah, tako da v naravi ni opaziti večjih antigenskih sprememb (Ecker in sod., 1999).

Z doktorsko nalogo smo želeli ugotoviti genetske različice virusa KME. Nameravali smo dokazati, da je genetska raznolikost virusa KME v Sloveniji zemljepisno razporejena in da med prenašalci oziroma gostitelji prevladuje enaka genetska različica virusa, ki je omejena na posamezna ekološka področja. V ta namen smo določili nukleotidna zaporedja genov, ki nosijo zapis za beljakovini NS5 in E, virusa KME neposredno iz klopo, glodavcev in vzorcev bolnikov, obolelih s KME. Z določevanjem nukleotidnih zapisov neposredno v vzorcih smo se poskušali izogniti spremembam v zapisih, ki bi nastale zaradi gojenja virusa v poskusnih živalih, celičnih kulturah ali pri kloniranju. V nam dostopni literaturi nismo zasledili raziskave, kjer bi neposredno določevali nukleotidno zaporedje in sočasno analizirali zaporedja virusa KME v rezervoarju, prenašalcu in končnemu gostitelju virusa KME na enem zemljepisnem področju. Prav tako je malo podatkov o genetski povezanosti sevov virusa KME med različnimi gostitelji na endemičnih področjih.

5.1 DOKAZ VIRUSA KME V VZORCIH KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME

Iz slovstva je znano, da je prekuženost klopo *I. ricinus* z virusom KME v Evropi od 0 do 5 %, v večini primerov manj kot 1 % (Oehme in sod., 2002; Danielova in sod., 2002; Süß in sod., 2003; Golovljova in sod., 2004; Casati in sod., 2006; Melik in sod., 2007; Carpi in sod., 2009; Barandika in sod., 2010; Jääskeläinen in sod., 2010). Preučevali smo klope, ki smo jih nabrali na osmih zemljepisnih področjih Slovenije, ki se razlikujejo v svojstvenih ekoloških pogojih. Lokacije, na katerih smo nabirali klope, smo izbrali glede na stopnjo endemičnosti naravnega žarišča KME v preteklosti in danes. V raziskavo smo vključili 9209 klopo, ki smo jih združili v 1192 skupin. Virusno RNA smo dokazali v 27-ih

skupinah klopov. Z RT-PCR v realnem času smo ugotovili različno stopnjo okuženosti klopov glede na leto vzorčenja, glede na zemljepisno področje in glede na razvojno stopnjo klopov. V štiriletni študiji v Sloveniji smo dokazali povprečno stopnjo okužbe klopov okrog 0,3 %. Najvišjo pogostost okužbe z virusom KME smo dokazali pri klopih, nabranih v letu 2005 (0,54 %), nekoliko nižjo v 2006 (0,43 %) in v 2007 (0,27 %). V letu 2008 pa virusa nismo dokazali v nobeni skupini klopov. Najvišjo stopnjo okužbe smo dokazali na lokaciji Sodražica. Področje, kjer se nahaja ta lokacija, je eno izmed regij z najvišjo incidenco KME pri ljudeh. Virus nismo dokazali na lokaciji Črni Kal in Murska Šuma, ki sodita med področja z najnižjo incidenco KME pri ljudeh. Primerjava posameznih stopenj je pokazala, da so odrasli klopi okuženi v višjem odstotku (0,75 %) kot nimfe (0,18 %). Nekoliko večji delež smo zaznali pri samcih (0,81 %), kot pri samicah (0,68 %). Ti podatki so bili podrobno analizirani v predhodni študiji (Knap, 2011; Durmiši in sod., 2010). Našo raziskavo smo nadeljevali z genetsko analizo pozitivnih vzorcev klopov, z namenom preučiti vzorce klopov iz različnih zemljepisnih področij Slovenije.

V raziskavo smo vključili glodavce, ki igrajo pomembno vlogo pri enzootskem kroženju virusa KME. Glodavci razvijejo kratko viremično fazo, zato je obdobje, ko je možen prenos virusa na klope, kratko. Za prenos virusa je zato bolj pomembno sočasno hranjenje klopov na glodavcih (Labuda in sod., 1997). Glodavci se premikajo na kratke razdalje, zato so naravna žarišča virusa KME, ki so odvisna od malih sesalcev, ohranjena na določenem, ekološko omejenem področju. Zaradi tega se na posameznih področjih ohranijo genetske različice virusa, ki so se razvile skozi čas (Labuda in sod., 1997; Casati in sod., 2006). Predhodna študija (Knap, 2011) je potrdila, da je v Sloveniji v regijah z večjo prisotnostjo malih sesalcev okuženih z virusom KME, tudi incidenca KME višja. Specifična protitelesa proti virusu KME so dokazali v 5,53 % serumov malih sesalcev. Pri voluharicah *Myodes glareolus* so v primerjavi z mišmi *Apodemus flavicollis* dokazali višje virusno breme kot tudi višje titre specifičnih protiteles proti virusu KME. Predvidevajo, da imajo voluharice *M. glareolus* verjetno pomembnejšo vlogo pri sistemskem prenosu virusa KME, medtem ko miši iz rodu *Apodemus* nudijo boljše možnosti za nesistemski prenos virusa med klopi (Knap, 2011; Knap in sod., 2012). Po analizi posameznih tkiv so ugotovili, da se virus najpogosteje nahaja v vranici ali možganih. V naši študiji smo zato uporabili vranice ali

možgane 842 glodavcev, ki smo jih vključili v raziskavo. RNA virusa KME smo dokazali pri 17-ih glodavcih.

S preliminarnimi rezultati naše raziskave, v kateri smo analizirali le kratek odsek segmenta NS5, smo pokazali, da je v Sloveniji virus KME v bolnikih soroden virusu KME v klopih in da je genetsko raznolik (Durmiši in sod., 2011). Da bi potrdili naše predhodne ugotovitve, smo raziskavo razširili tako, da smo vključili 121 primernih vzorcev bolnikov, obolelih s KME. Med vsemi preiskovanimi vzorci smo izbrali 22 vzorcev, ki so zadovoljili pogoje, da so vsebovali zadostno količino materiala (krvi ali seruma), da je bil rezultat RT-PCR v realnem času pozitiven, in da je bila čim večja zemljepisna razpršenost izolatov glede na naslov bivanja bolnika.

5.2 NUKLEOTIDNE IN AMINOKISLINSKE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE NS5 VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME

Na začetku študije smo opravili preliminarno filogenetsko analizo vzorcev. Pri 53 vzorcih, ki smo jih predhodno z metodo RT-PCR v realnem času določili kot pozitivne, smo pomnožili krajši tarčni odsek beljakovine NS5. Tako smo določili nukleotidno zaporedje 195 bp dolgega tarčnega odseka neposredno iz 17 vzorcev klopov, 14 vzorcev glodavcev in 22 vzorcev bolnikov. S filogenetsko analizo smo ugotovili, da so nukleotidna zaporedja slovenskih vzorcev najbolj podobna prototipnemu sevu evropskega podtipa virusa KME Neudoerfl. Opazili smo tudi, da se zaporedja združujejo v pet filogenetskih skupin. Skupine ali genetske različice so se oblikovale neodvisno od gostitelja, saj se v isti skupini združujejo zaporedja, pridobljena iz klopov, glodavcev in vzorcev bolnikov s KME. Opisani preliminarni rezultati pomenijo prve tovrstne podatke, kjer so analizirani zapisi za beljakovino NS5 pridobljeni neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov ene države (Durmiši in sod., 2011). Nekateri raziskovalci so za dokaz virusa KME in za analize nukleotidnih zapisov virusnega genoma v vzorcih klopov pomnožili krajši tarčni odsek beljakovine NS5, vendar zaradi nizke genetske raznolikosti in kratkih preučevanih zaporedij niso mogli izrisati zanesljivega filogenetskega drevesa (Han in sod., 2001; Han

in sod., 2005). Da bi potrdili naše predhodne rezultate, da je genetska raznolikost v Sloveniji zemljepisno razporejena in da med prenašalci in gostitelji na enem področju prevladuje enaka genetska različica, smo potrebovali daljša zaporedja virusnih genov. Odločili smo se pomnožiti dele genoma, ki nosijo zapise za beljakovini NS5 in E.

Pri devetih od 27-ih pozitivnih vzorcev klopov smo uspeli pomnožiti 1075 bp dolg tarčni odsek beljakovine NS5. Analiza nukleotidnih zaporedij molekularnih izolatov iz klopov je pokazala da so le-ta na posamezni lokaciji identična, med lokacijami pa je bila nukleotidna razlika do 2,4 %. V literaturi ni za zaslediti podatkov o genetski raznolikosti daljšega tarčnega odseka beljakovine NS5, pridobljenega iz vzorcev klopov. Za primerjavo z objavljenimi podatki so potrebna krajša 252 bp dolga zaporedja pri katerih smo ugotovili nukleotidno razliko do 3,9 % (Durmiši in sod., 2011). V Italiji so pri 252 bp dolgem tarčnem odseku beljakovine NS5, pridobljenem iz 5 vzorcev klopov, nabranih na enem omejenem zemljepisnem področju, ugotovili nukleotidno razliko od 0,4 do 1,2 % (D'Agaro in sod., 2009). Površina preiskovanega področja je lahko razlog, zakaj je nukleotidna razlika pri zaporedjih, analiziranih v Italiji, nižja od nukleotidne razlike pri zaporedjih, analiziranih v naši študiji, saj je površina zemljepisnega področja, ki so ga preiskovali v Italiji, 2,5-krat manjša od površine Slovenije. Pri 1075 bp dolgih nukleotidnih zapisih, pridobljenih v naši študiji, smo opazili manjšo nukleotidno razliko v primerjavi z 252 bp dolgimi odseki teh enakih zapisov, kar kaže, da je 252 bp dolg odsek zapisa za beljakovino NS5 dovolj spremenljiv in informativen za filogenetske analize. Zato menimo, da lahko v bodoče uporabimo tudi 252 bp dolge odseke, saj z daljšimi nukleotidnimi zapisi, čeprav pridobimo več informacij, ne potrdimo večjih nukleotidnih razlik.

Po prevedbi v aminokislinsko zaporedje smo ugotovili tri aminokislinske zamenjave. Pri vseh zamenjavah je prvotno aminokislino zamenjala druga, ki je bila glede polarnosti iste vrste. Zato predvidevamo, da spremembe niso vplivale na antigenske determinante beljakovine NS5.

Po ogledu zemljevida Slovenije, kjer smo prikazali povezavo med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, smo zaključili, da se molekularni izolati virusa KME iz vzorcev klopov iz Slovenije združujejo v skupine glede na njihov zemljepisni izvor (Slika 4-4). Našo trditev podpirajo ugotovitve D'Agaro in sodelavcev, ki

so poročali, da zaporedja njihovih izolatov kažejo podobnost z zaporedji izolatov virusov, ki krožijo v okoliških državah, natančneje z zaporedji, ki krožijo v Sloveniji (D'Agaro in sod., 2009).

Pri osmih od 17-ih pozitivnih vzorcih glodavcev smo pomnožili 536 bp dolg tarčni odsek beljakovine NS5. Ugotovili smo, da so nukleotidna zaporedja molekularnih izolatov glodavcev iz določene lokacije med seboj identična. Med posameznimi lokacijami so se izolati razlikovali v nukleotidnem zaporedju do 5 %.

Po ogledu zemljevida Slovenije, kjer smo prikazali povezavo med zemljepisno razporeditvijo in filogenetskimi skupinami, smo prišli do podobnih zaključkov kot pri preučevanju genetskih zapisov izolatov iz klopotov, in sicer da se molekularni izolati virusa KME iz glodavcev v Sloveniji združujejo v skupine glede na zemljepisni izvor (Slika 4-5). V nam dostopni literaturi nismo zasledili raziskave, v kateri bi določevali nukleotidna zaporedja beljakovine NS5 virusa KME pridobljenih iz glodavcev ujetih v naravi. Zasledili smo primerjavo nukleotidnih zapisov za celoten genom virusa KME, pridobljenih iz dveh glodavcev, ujetih na različnih, okoli 60 km oddaljenih, zemljepisnih področjih v Koreji. Izolata sta se razlikovala v nukleotidnem zaporedju v 1,8 do 19,2 % (Yun in sod., 2011). Zanimivo je, da so po filogenetski analizi celotnih genomov ugotovili, da se vzorca združujeta v skupino z evropskim podtipom virusa KME, ne pa, kot bi zaradi manjše oddaljenosti in vrste klopa, ki je razširjen v naravi, pričakovali, z daljnovzhodnim podtipom virusa KME (Yun in sod., 2011). To kaže na morebitno nenavadno širjenje virusa KME.

V raziskavi smo pomnožili 1003 bp dolg tarčni odsek beljakovine NS5 neposredno iz 19-ih od 22-ih vzorcev bolnikov, ki smo jih pridobili od leta 2000 do leta 2011. Kljub temu, da so se vsa nukleotidna zaporedja med seboj razlikovala, so se genetske različice združile v osem filogenetskih skupin (Slika 4-6). Med posameznimi skupinami so se nukleotidna zaporedja razlikovala do 2,7 %. Po prevodu v aminokislinsko zaporedje smo ugotovili pet aminokislinskih zamenjav. Najbolj izpostavljena je bila zamenjava aminokislina arginin v aminokislino lizin, ki jo lahko opazimo pri 12-ih prevedenih aminokislinskih zaporedjih. Predvidevamo, da zamenjava ni povzročila spremembe antigenskih determinant virusne beljakovine NS5, saj je prvotno aminokislino zamenjala aminokislina enake polarnosti.

Pri podrobni analizi filogenetskega drevesa in ogledu zemljevida Slovenije, kjer smo prikazali povezavo med zemljepisno raporeditvijo in filogenetskimi skupinami, smo opazili, da nekateri bolniki, glede na zemljepisni izvor vzorca, ne sodijo v isto genetsko linijo (Slika 4-6). Opaženo si razlagamo z dejstvom, da pri bolnikih za zemljepisni izvor upoštevamo kraj stalnega bivališča, saj dejanskega mesta okužbe ne poznamo. V nam dostopni literaturi nismo zasledili raziskave, kjer bi določevali nukleotidna zaporedja beljakovine NS5 pri več bolnikih s KME; poročajo le o posameznih primerih. Ternovoi in sodelavci so pridobili zapis za celoten genom virusa KME pri bolniku iz Rusije. V primerjavi z našo študijo je zanimivo, da tudi njihove ugotovitve kažejo na možnost vzporedne evolucije različic virusa KME na enem zemljepisnem področju (Ternovoi in sod., 2007).

5.3 NUKLEOTIDNE IN AMINOKISLINSKE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE E VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV KLOPOV, GLODAVCEV IN BOLNIKOV S KME

V raziskavi smo pri osmih od 27-ih vzorcev klopov uspeli pomnožiti 931 bp dolg tarčni odsek beljakovine E. Ugotovili smo, da so zaporedja molekularnih izolatov, iz klopov z določene lokacije, identična, med lokacijami pa je razlika v nukleotidnem zaporedju do 3,4 %. V literaturi sicer najdemo podatke o genetski raznolikosti odsekov beljakovine E, pridobljenih iz klopov iz različnih držav, vendar je prednost naših rezultatov v tem, da smo analizirali zaporedja, pridobljena neposredno iz klopov iz šestih različnih zemljepisnih področij, in da smo odkrili štiri različice (Slika 4-7). Na Švedskem so pridobili zapis za beljakovino E virusa KME neposredno iz enega združenega vzorca klopov, ki je vseboval 9 odraslih klopov in 106 nimf. Preučevali so le eno lokacijo in ugotovili, da je potrebno podrobno poznavanje razlik v zapisih med in znotraj populacij, da bi boljše razumeli evolucijo virusa (Melik in sod., 2007). V Italiji so virusno RNA izolirali neposredno iz klopov, vendar so obdelovali le eno ekološko področje, ki ima vsaj trikrat manjšo površino kot Slovenija. Pomnožili so 326 bp dolg tarčni odsek beljakovine E iz dveh vzorcev klopov in ugotovili da je razlika med nukleotidnimi zaporedji 2,54 % (Carpi in sod., 2009). Glede na to, da so v omenjeni študiji pomnožili trikrat krajši tarčni odsek beljakovine E kot smo

ga preučevali v naši raziskavi in da se tarčni odsek beljakovine E, ki so ga pomnožili v Italiji, ne prekriva z tarčnim odsekom zapisa za beljakovino E, ki smo ga pomnožili v naši študiji, rezultatov o nukleotidnih razlikah ne moremo neposredno primerjati.

Po ogledu zemljevida Slovenije, kjer smo prikazali povezavo med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, smo zaključili, da se genetske različice izolatov iz klopov združujejo enako kot pri zapisih za beljakovino NS5, v skupine glede na njihov zemljepisni izvor (Slika 4-7). Zanimiva je študija, ki so jo opravili v Švici, kjer so posredno s pomočjo celičnih kultur pridobili 72 izolatov virusa KME iz okuženih klopov in med celotnimi zapisi za beljakovino E ugotovili razlike v nukleotidnem zaporedju do 2,2 %. Pri večini molekularnih izolatov niso ugotovili zemljepisnega združevanja glede na zemljepisno poreklo vzorcev, čeprav so obdelovali zemljepisno področje, ki ima dvakrat večjo površino, kot je površina Slovenije. Tudi na širokem zemljepisnem področju Finske, Karelje in Burjatije Jääskeläinen in sodelavci niso uspeli dokazati zemljepisnega združevanja vzorcev (Jääskeläinen in sod., 2010). Weidmann in sodelavci so prvi na manjši razdalji (največja oddaljenost med zemljepisnim izvorom vzorcev je bila 272 km) potrdili pojav, ki so ga opisali Zanutto in sodelavci, da se je v preteklosti virus KME razširil po Evroaziji od vzhoda proti zahodu (Weidmann in sod., 2011., Zanutto in sod., 1995). Z rezultati, pridobljenimi v naši študiji nismo mogli potrditi smeri razširitve virusa KME v Sloveniji, ker nismo ugotovili povezave med genetskimi in zemljepisnimi razdaljami.

V raziskavi smo pomnožili 1203 bp dolg tarčni odsek beljakovine E neposredno iz osmih vzorcev glodavcev, ki smo jih ujeli na treh različnih zemljepisnih področjih Slovenije. Ugotovili smo, da so zaporedja molekularnih izolatov iz glodavcev z določene lokacije identična, med lokacijami pa je razlika v nukleotidnem zaporedju do 3,1 %. V Sloveniji so raziskovali pogostost okužbe malih sesalcev z virusom KME v dveh naravnih žariščih KME, ki se razlikujeta v stopnji zbolewnosti. Virusni genom so dokazali v 45,9% pregledanih živali (Malovrh in Marc, 1997). Ker je bil namen naše raziskave ugotoviti, ali obstaja genetska raznolikost virusa KME v Sloveniji, smo študijo podprli z metodami, s katerimi smo virusni genom potrdili s sekveniranjem.

Po ogledu zemljevida Slovenije, kjer smo prikazali povezavo med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, smo zaključili, da se genetske različice

izolatov iz glodavcev združujejo enako kot pri zapisih za beljakovino NS5, v skupine glede na njihov zemljepisni izvor. V literaturi poročajo o nukleotidnih zaporedjih za beljakovino E, ki so jih določili pri virusih, izoliranih iz glodavcev. Za razliko od naše študije so tam viruse osamili z gojenjem v celičnih kulturah ali v poskusnih živalih in niso opravili obsežnejše filogenetske analize (Yun in sod., 2009; Weidman in sod., 2006; Bakhvalova in sod., 2006). Weidmann in sodelavci so ugotovili 0,3 % razliko v nukleotidnem zaporedju pri 1640 bp dolgih nukleotidnih zapisih za beljakovino E, ki so jih pridobili iz treh vzorcev glodavcev iz leta 1989 (Weidmann in sod., 2011). V primerjavi z rezultati, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, je v njihovi študiji razlika v nukleotidnem zaporedju dokaj majhna, vendar ni presenetljiva, saj so vsi trije vzorci iz istega zemljepisnega področja.

V raziskavi smo pomnožili 757 bp dolg tarčni odsek beljakovine E neposredno iz 22-ih vzorcev bolnikov s KME, ki smo jih pridobili od leta 2000 do leta 2011 v Sloveniji. V nam dostopni literaturi je to najbolj obsežna analiza zapisov za beljakovino E virusa KME, pridobljenih neposredno iz kliničnih vzorcev. Molekularni izolati iz bolnikov so se po filogenetski analizi združili v štiri večje filogenetske skupine (Slika 4-8). Nukleotidne razlike med skupinami so bile do 2,5 %. Po prevedbi v aminokislinsko zaporedje smo ugotovili šest aminokislinskih zamenjav. Najbolj izpostavljeni sta dve spremembi. Prvo spremembo smo zaznali pri 8 od 22 aminokislinskih zaporedij: na mestu 73 je bila aminokislina tirozin, pri vseh ostalih pa je bila aminokislina histidin; obe aminokislini imata aromatsko stransko verigo. Drugo spremembo smo zaznali pri 11 od 22 vzorcev: na mestu 249 je bila aminokislina metionin, pri vseh ostalih pa je valin; obe aminokislini sta hidrofobni in nepolarni pri fiziološkem pH. Pri podrobni analizi filogenetskih dreves posameznih tarčnih odsekov smo opazili, da nekateri bolniki glede na zemljepisni izvor vzorca ne sodijo v isto genetsko linijo (Slika 4-8). Opaženo si razlagamo z dejstvom, da smo pri bolnikih za zemljepisni izvor upoštevali kraj stalnega bivališča, saj dejanskega mesta okužbe ne poznamo.

V literaturi je nekaj raziskav o zapisih za beljakovino E, vendar nobene, ki bi preučevala zapise za beljakovino E neposredno v vzorcih bolnikov s KME. Gritsun in sodelavci so pridobili zapis za beljakovino E pri bolniku s kroničnim KME. Posmrtno so z vzorcem možganov inokulirali sesajoče miši. Opisali so molekularne in biološke značilnosti

izoliranega virusa, ter pokazali da se je - kot so pričakovali po filogenetski analizi - zapis za beljakovino E uvrstil v skupino s sibirskim podtipom virusa KME (Gritsun in sod., 2003a). V Latviji so Lundkvist in sodelavci pridobili pet delnih zapisov za beljakovino E iz vzorcev bolnikov. Serum bolnikov so vbrizgali v dva dni stare sesajoče miši in potem iz mišjih možganov izolirali RNA. S filogenetsko analizo so ugotovili, da so vsi zapisi za beljakovino E ustrezali evropskem podtipu virusa KME. Niso pa poročali o genetski raznolikosti znotraj evropskega podtipa virusa KME (Lundkvist in sod., 2001). Obsežnejšo raziskavo so naredili na Švedskem, kjer so zapise za beljakovino E pridobili od 17 bolnikov posredno, z inokulacijo sesajočih miši in s kultivacijo na celičnih kulturah. Štirinajst od 17 vzorcev bolnikov je bilo iz obdobja od leta 1991 do leta 1994, ostali trije vzorci so bili okrog trideset let starejši. Preiskovani sevi izhajajo iz 250 km širokega zemljepisnega področja. Površina preiskovanega področja je primerljiva z našo študijo, vendar je pomembno poudariti, da je povprečna gostota prebivalstva na preiskovanem področju Švedske trikrat večja od povprečne gostote prebivalstva v Sloveniji. Nukleotidne razlike v beljakovini E, pridobljenih na Švedskem, so bile v primerjavi z našimi rezultati podobne; od 2 do 2,3 %. Zanimivo je, da so zaznali potencialno povezavo med filogenetskimi odnosi in zemljepisnim poreklom vzorca, niso pa ugotovili povezave med klinično sliko in lastnostmi virusa oziroma zemljepisnim poreklom sevov (Haglund in sod., 2003a). Prednost naših rezultatov v primerjavi z omenjeno študijo je v tem, da smo v študijo vključili večje število kliničnih vzorcev, ki so bili zbrani v daljšem neprekinjenem časovnem obdobju od leta 2000 do leta 2011. Izhodiščni material je bil v obeh študijah enak (prvi vzorec seruma, ko še ni zaščitnih protiteles proti virusu KME), pomembna razlika pa je, da smo v naši raziskavi neposredno pomnožili tarčne odseke in da smo ugotovili povezavo med filogenetskimi odnosi in zemljepisnim poreklom vzorca.

Na podlagi primerjave filogenetskih dreves, ki smo jih izrisali iz poravnave nukleotidnih zaporedij tarčnega odseka beljakovin NS5 in E z metodo BI, ugotavljamo, da sta za filogenetske analize primerna oba tarčna odseka. V literaturi poročajo, da so po primerjavi celotnih genomov virusa KME ugotovili, da sta nukleotidna zapisa za beljakovini NS5 in E dobra označevalca za robustne filogenetske analize (Kovalev in sod., 2009; Yun in sod., 2011).

Pri patogenih flavivirusih je samo 18 % aminokislin popolnoma ohranjenih. V zaporedju beljakovine E poznamo kratko zaporedje, tako imenovani fuzijski peptid, ki je odgovoren za stapljanje z membrano (sestavljen je iz 3,2 % aminokislin beljakovine E). Čeprav predstavlja zelo majhen del zapisa za beljakovino E, je sestavljen iz 13 % ohranjenih aminokislin in je najbolj ohranjen del zapisa beljakovine E, morda celo celotnega genoma flavivirusov. Dvanajst od 16 aminokislin fuzijskega peptida je popolnoma ohranjenih pri flavivirusih, ki imajo različne gostitelje. Pet od teh aminokislin so aminokislina glicin, ki lahko rotirajo okrog C-C in C-N vezi ter tako omogočajo konformacijske spremembe ključne za fuzijo. Zaradi pomembne vloge fuzijskega peptida so evolucijske spremembe na tem odseku zelo omejene, še posebej, ker se mora virus vezati s celicami vretenčarjev (Seligman, 2008). Pri poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij smo v 252 aminokislin dolgem tarčnem odseku beljakovine E pri slovenskih vzorcih ugotovili številna ohranjena področja (Priloga K). Prevedena aminokislinska zaporedja, ki smo jih pridobili iz slovenskih vzorcev, vsebujejo ohranjen fuzijski peptid (98 DRGWGNHCGLFGKGS I 113). Na variabilnih mestih peptida imajo vsa naša prevedena zaporedja enake aminokislina: 104 H, 107 L, 112 S in 113 I. Po poravnavi prevedenih aminokislinskih zaporedij smo zaznali ohranjene aminokislina, značilne za evropski podtip virusa KME (88G, 115A, 178E, 206V, 267A in 277E) (Ecker in sod., 1999). Aminokislina na mestu 206 je različna pri vseh treh podtipih virusa KME. Pri vseh podtipih se aminokislina valin nahaja neposredno pred ohranjenim heksapeptidom (207 EHLPTA 211), ki je značilen za klopno prenosljive flaviviruse (Ecker in sod., 1999). Klopno prenosljivi flavivirusi imajo ohranjeno N-glikozilacijsko mesto NET (154-156), ki smo ga zaznali tudi pri naših zaporedjih (Chambers in sod., 1990; Grard in sod., 2007). Vsa prevedena aminokislinska zaporedja beljakovine E iz vzorcev pridobljenih v naši študiji vsebujejo devet od dvanajstih ohranjenih cisteinov, ki ustvarjajo znotrajmolekulske disulfidne vezi (60, 74, 92, 105, 116, 121, 186, 290 in 307). Ker smo pomnožili le delno zaporedje za beljakovino E preostalih treh ohranjenih cisteinov nismo določili (Nowak in Wengler, 1987; Grard in sod., 2007). Po natančni analizi pomnoženih in prevedenih zaporedij lahko zaključimo, da vsebujejo zaporedja molekularnih izolatov virusa KME iz Slovenije značilne aminokislina in aminokislinska zaporedja za klopno prenosljive flaviviruse in evropski podtip virusa KME.

Khasantinov in sodelavci so pokazali, da lahko zamenjava le ene aminokisline v beljakovini E značilno poveča pomnoževanje virusa v klopih, ki se hranijo, in poveča učinkovitost prenosa virusa pri sočasnem hranjenju klopov na živali. Ugotovili so, da zamenjava aminokisline aspartat z aminokislino glicin na mestu 67 privede do spremembe naboja na površini beljakovine E. Zato takšni sevi virusa lažje prehajajo skozi krvno-možgansko pregrado, so bolj nevroinvazivni ali se hitreje širijo med nevroni (Khasnatinov in sod., 2009). V naši študiji smo ugotovili, da pri nobenem molekularnem izolatu virusa KME ni prišlo do zamenjave aminokislin na mestu 67 (Priloga K).

5.4 CELOKUPNA ANALIZA

Z analizo dela genoma virusa KME, izoliranega neposredno iz klopov, glodavcev in bolnikov, smo kljub celokupni nizki raznolikosti vektorsko prenosljivih flavivirusov potrdili, da v Sloveniji kroži več genetskih različic virusa KME, ki se združujejo v zemljepisno ločene monofiletske linije. Pokazali smo, da se nukleotidni zapisi vseh treh gostiteljev združujejo, kar je v skladu z nizko stopnjo mutacij virusa KME in njegovo konzervativno naravo zaradi selektivnega pritiska, povzročenega z menjavanjem gostiteljev (Woelk in Holmes, 2002; Bertrand in sod., 2012).

V Sloveniji smo kljub celokupni nizki raznolikosti virusa KME ugotovili številne genetske različice virusa KME. Pri analizi nukleotidnih zapisov za beljakovini NS5 in E smo določili sedem filogenetskih skupin (Sliki 4-9 in 4-12). Čeprav je v literaturi opisano sočasno kroženje različnih podtipov virusa KME na enem področju, je malo podatkov o genetskih različicah virusa na različnih zemljepisnih področjih, kjer je prisoten en podtip virusa KME (Han in sod., 2001; Hauglund in sod., 2003a). Nukleotidni zapisi pridobljeni iz vzorcev v naši študiji so bili podobni v 98 - 100 %, kar se ujema z objavljenimi podatki o raznolikosti virusa KME (Bakhvalova in sod., 2000; Han in sod., 2005; Jääskeläinen in sod., 2010; Gaumann in sod., 2011; Weidmann in sod., 2011).

Jääskeläinen in sodelavci, ki so analizirali vzorce pridobljene s širokega zemljepisnega področja, niso odkrili zemljepisnega združevanja vzorcev (Jääskeläinen in sod., 2010). V naši raziskavi pa smo pokazali in potrdili, da je filogenetsko združevanje različic virusa

KME v Sloveniji povezano z zemljepisnim poreklom vzorcev (Slike od 4-9 do 4-14). Združevanje genskih različic je na filogenetskih drevesih in zemljevidih nazorno in očitno. Opažamo, da so zaporedja, ki se združujejo v filogenetski skupini A1 in A3, pridobljena iz vzorcev, ki izhajajo iz severnega dela Slovenije, medtem ko zaporedja, ki se združujejo v skupini A2 in A4, izhajajo iz južnega dela Slovenije. Do take porazdelitve genskih različic virusa KME je najverjetneje prišlo zaradi vpliva naravnih biotopov in ekoloških niš (gozdovi, travniki in reke), v katerih se virus KME ohranja v dovolj visoki koncentraciji s kroženjem med majhnimi sesalci in klopi. Za takšno porazdelitev genskih različic je odgovoren tudi človek, saj je z izgradnjo cest in avtocest onemogočil prosto selitev gostiteljev s severa na jug države in obratno.

Pri molekularnih izolatih iz klopov in glodavcev smo dokazali povezavo med filogenetskim in zemljepisnim združevanjem zaporedij. Zaporedja, ki izhajajo iz enakih zemljepisnih področjih, so identična ali zelo podobna, medtem ko zaporedja, pridobljena iz klopov in glodavcev iz bolj oddaljenih področij, kažejo večje razlike. Podobno porazdelitev smo opazili pri molekularnih izolatih iz vzorcev bolnikov. Pri bolnikih smo namreč za zemljepisni izvor okužbe upoštevali kraj stalnega prebivališča bolnika, ker dejanskega mesta okužbe ne poznamo. Pri vzorcih bolnikov, kjer molekularni zapisi niso v skladu z zemljepisnim izvorom, obstaja velika verjetnost, da so se z virusom KME okužili na nekem drugem področju Slovenije. Čeravno, glede na rezultate naše raziskave, lahko povzamemo, da se ljudje večinoma okužijo z virusom KME, v bližini kraja bivanja.

Filogenetska skupina A4 je izjema, saj vključuje le vzorce bolnikov z jugovzhodnega dela Slovenije. V naši študiji nismo nabirali klopov na tem področju in zato nimamo molekularnih izolatov virusa KME iz vzorcev klopov s tega zemljepisnega področja. Čeprav smo iz 157-ih glodavcev iz jugovzhodnega dela Slovenije izolirali celokupno RNA, z reakcijo RT-PCR v realnem času nismo pridobili pozitivnega vzorca. Filogenetska skupina A4 tako nakazuje, da v naravi med klopi in glodavci na tem zemljepisnem področju najverjetneje kroži različica virusa KME, zaznana pri bolnikih s KME. Za potrditev bo potrebno vzorčiti in obdelati večje število klopov in glodavcev s tega področja (Slike od 4-9 do 4-14).

V študiji na Češkem in Nemčiji so pokazali, da se je virus KME razširil po srednji Evropi z vzhoda proti zahodu (Weidmann in sod., 2011). Iz naših podatkov ne moremo določiti

smeri razširitve virusa KME v Sloveniji, ker nismo ugotovili povezave med genetskimi in zemljepisnimi razdaljami, saj zaporedja, ki so manj oddaljena po zemljepisnem poreklu, niso bila nič bolj podobna kot tista bolj oddaljena. Pri zaporedjih, ki se združujejo v skupini A1 in A3, ki so pridobljena iz zemljepisno najbližjih področij, vidimo največje genetske razlike. Ta rezultat kaže na verjetnost, da se je virus KME v Slovenijo vnesel v večih, za zdaj še časovno, zemljepisno in izvorno neznanih dogodkih. Za potrditev omenjene hipoteze, bi potrebovali bolj obsežne raziskave z večjim številom molekularnih izolatov iz kloпов, glodavcev in bolnikov s KME, predvsem iz vzhodnega in zahodnega dela Slovenije.

Določili smo tri manjše skupine A5, A6 in A7, ki so jih podprle filogenetske analize nukleotidnih zapisov za obe beljakovini NS5 in E. Skupina A5 vključuje le en vzorec bolnika, ki je tudi edini vzorec iz goriške regije. Skupina A6 vključuje dva vzorca, in sicer vzorec bolnika in vzorec glodavca iz savinjske regije. Skupina A7 vključuje le en vzorec kloпов, ki je tudi edini vzorec iz Kamnika. Te tri skupine kažejo na obstoj še večje genetske raznolikosti virusa KME v Sloveniji. Za potrditev bi bilo potrebno vzorčiti in obdelati večje število kloпов in glodavcev s teh področij (Slike od 4-9 do 4-14).

Pri analizi filogenetskih dreves posameznih tarčnih odsekov za beljakovini NS5 in E smo ugotovili, da kažeta oba dela virusnega genoma enako filogenetsko sorodnost. Kljub temu smo zaznali izjemo, pri izolatu vzorca iz bolnika H-49 (Slike od 4-9 do 4-14). Nukleotidna zaporedja iz bolnika H-49 so se pri zapisu za beljakovino NS5 združila z ostalimi zaporedji v skupino A4, pri zapisu za beljakovino E pa v skupino A1. Takšni preskoki v filogenetskih analizah običajno kažejo na to, da je prišlo do rekombinacijskega dogodka. V literaturi so poročila o rekombinacijskih dogodkih pri klopno prenosljivih virusih zelo redka. V študiji Yun in sodelavci niso potrdili rekombinacijskih dogodkov pri izolatih virusa iz Koreje, čeprav so z računalniškimi metodami pri analizi 31-ih celotnih genomov virusa KME odkrili 11 možnih, oziroma domnevnih rekombinacijskih dogodkov (Yun in sod., 2011). V nedavni študiji so Bertrand in sodelavci ocenili, da je stopnja zamenjave nukleotidov pri genu za beljakovino E značilno nižja kot pri ostalih genih klopno prenosljivih flavivirusov, katerih gostitelji so sesalci. V genski bazi podatkov je sicer veliko zapisov za beljakovino E, vendar niso primerni za določanje rekombinantnih dogodkov, saj izhajajo iz različnih zemljepisnih področij. Zaradi tega priporočajo, da skupaj z določanjem zapisov za

beljakovino E določimo označevalec, ki se hitreje razvija, na primer zapis za beljakovino C (Bertrand in sod., 2012). V primerjavi s flavivirusi, ki jih prenašajo komarji, kjer so rekombinacije pogoste, se pri klopno prenosljivih flavivirusih evolucija dogaja klonalno. Na možnost rekombinacije pri klopno prenosljivih flavivirusih so opozorili že Twiddy in sodelavci. Poudarili pa so, da bo zaradi nizke genetske variabilnosti zaznavanje rekombinacij težavno (Twiddy in sod., 2003). Novejše objave nakazujejo, da imajo klopno prenosljivi flavivirusi potencial za pridobivanje in širjenje koristnih lastnosti in odstranjevanje škodljivih s homologno rekombinacijo (Yun in sod., 2011; Dzhioev in sod., 2011; Bertrand in sod., 2012). Woelk in Holmes sta predpostavila, da je zmanjšana pozitivna selekcija pri vektorsko prenosljivih virusih RNA rezultat treh potencialnih prilagoditev, povezanih z življenjskim ciklom, ki se odvija tako v prenašalcih kot gostiteljih (sesalcih in členonožcih): (1) nesinonimne mutacije, ki bi okrepile okužbo ali razmnoževanje v enem gostitelju, bi lahko imele antagonistični učinek v drugem; (2) razlike v strategijah razmnoževanja znotraj gostiteljev: v klopih je virus večinoma prisoten v mirujočem in ne citolitičnem stanju, medtem ko se v sesalcih celicah aktivno razmnožuje; (3) razlike v imunskem odgovoru gostiteljev: mutacije, ki bi olajšale imunski pobeg ali toleranco v enem gostitelju bi lahko povzročile prav nasprotno pri drugem gostitelju (Woelk in Holmes., 2002). Bertrand in sodelavci so ugotovili, da kaže gen za beljakovino E najnižjo stopnjo zamenjave, kar lahko povežemo s tretjim od zgoraj omenjenih kompromisov, saj nosi zapis za ovojnično beljakovino, ki je odgovorna za indukcijo protiteles pri sesalcih (Bertrand in sod., 2012; Heinz in sod., 1990). Zmanjšane stopnje razlik pri nestrukturnih beljakovinah in s tem tudi pri NS5 lahko razložimo s prvo in drugo prilagoditvijo. Zakaj do sedaj niso odkrili rekombinacijskega dogodka pri virusu KME bi lahko razložili z vpletenostjo večih dejavnikov. Med temi so: (1) ekologija klopa - klop je relativno nepremičen in se hrani le občasno, (2) nizek delež z virusom KME okuženih klopov – verjetnost, da več različnih sevov ali genetskih različic virusa sočasno okuži istega klopa, je zelo nizka, (3) kratka viremija pri sesalcih in (4) imunski odziv gostitelja. Da pride do rekombinacije, se mora klop sočasno hraniti v neposredni bližini drugih klopov, ki so okuženi z različnimi sevi/genetskimi različicami virusa KME ali se mora večkrat hraniti na različnih viremičnih gostiteljih, ki so okuženi z različnimi sevi virusa KME (Twiddy in sod. 2003). Glede na veliko podobnost sevov znotraj podtipov

virusa KME so Bertrand in sodelavci zaključili, da se rekombinantni dogodki lahko zaznajo le med podtipi virusa KME (Bertrand in sod., 2012). Tako je naša raziskava glede na dostopne podatke prva, ki nakazuje rekombinacijski dogodek med dvema različicama virusa pri bolniku. Da bi potrdili zanesljivost in verodostojnost tega dogodka, bo potrebno pridobiti zapis za celoten genom virusa, ki je okužil tega bolnika. Če želimo ugotoviti, ali je rekombinacijski dogodek posledica dvojne okužbe bolnika ali pa v naravi med prenašalci in gostitelji kroži rekombinantna različica virusa KME, bo na tem področju Slovenije potrebno vzorčiti in obdelati večje število klopov in glodavcev.

Z našo raziskavo smo potrdili, da obstaja genetska raznolikost virusa KME v Sloveniji. Rezultati naše študije pomenijo prve podatke o primerjavi genskih zapisov, pridobljenih iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov s KME iz enega endemičnega področja KME. Pridobili smo največje število nukleotidnih zapisov za beljakovini E in NS5 virusa KME iz vzorcev bolnikov. Vse genske zapise smo dobili neposredno iz preučevanih vzorcev in se s tem izognili morebitnim spremembam zapisov. Dokazali smo, da v treh različnih gostiteljih (klopi, glodavci, ljudje) krožijo podobne genetske različice virusa, oziroma da med prenašalci in gostitelji prevladuje enaka genetska različica virusa KME, ki je zemljepisno razporejena in omejena na posamezna ekološka področja.

V raziskavi smo podali podatke o možnem rekombinacijskem dogodku v genomu virusa KME, ki smo ga pridobili iz vzorca bolnika, vendar bo takšne dogodke potrebno potrditi z novimi, dodatnimi raziskavami.

6 ZAKLJUČKI

- V raziskavi smo z analizo dela genoma virusa KME neposredno iz klopov, glodavcev in bolnikov potrdili, da v Sloveniji kroži več genetskih različic virusa KME.
- Dokazali smo, da je genetska raznolikost virusa KME v Sloveniji zemljepisno razporejena, saj se genetska različice virusa KME združujejo v zemljepisno ločene monofiletske linije.
- Opazili smo razmeroma visoko genetsko raznolikost virusa KME in določili sedem filogenetskih skupin.
- Dokazali smo, da med prenašalci oziroma gostitelji prevladuje enaka genetska različica virusa KME in da je združevanje v filogenetske skupine neodvisno od gostitelja, iz katerega smo pridobili zapis za tarčna zaporedja beljakovin NS5 in E virusa KME.
- Pri vzorcih, pridobljenih iz klopov in glodavcev, smo dokazali povezavo med filogenetskim in zemljepisnom združevanjem. Pri zapisih, pridobljenih iz bolnikov s KME, smo pridobili bolj heterogene rezultate, saj pri njih za zemljepisni izvor okužbe upoštevamo kraj stalnega bivališča, ker dejanskega mesta okužbe ne poznamo.
- Z rezultati naše raziskave nismo mogli potrditi smeri razširitve virusa KME v Sloveniji, ker nismo ugotovili povezave med genetskimi in zemljepisnimi razdaljami. Ti rezultati kažejo na možnost večkratnega neodvisnega vnosa virusa KME v Slovenijo.
- Pri analizi filogenetskih dreves posameznih tarčnih odsekov za beljakovini NS5 in E smo ugotovili, da kažeta oba odseka enako filogenetsko sorodnost.

- Rezultati so nakazali možnost rekombinacijskega dogodka v genomu virusa KME, ki smo ga pridobili iz vzorca bolnika.
- Potrdili smo, da so zapisi za beljakovini NS5 in E dobri označevalci za robustne filogenetske analize.
- Naša raziskava je prva, ki proučuje nukleotidna zaporedja virusa KME, pridobljena neposredno iz prenašalca, gostitelja in končnega gostitelja na enem zemljepisnem področju.

7 LITERATURA

- Alcon-LePoder S., Drouet M.T., Roux P., Frenkiel M., Arborio M., Durand-Schneider A., Maurice M., Le Blanc I., Gruenberg J., Flamand M. 2005. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. *Journal of Virology* 79: 11403-11411.
- Arnež M., Lužnik-Bufon T., Avšič-Županc T., Ružić-Sabljić E., Petrovec M., Lotrič-Furlan S., Strle F. 2003. Etiology of tick-borne febrile illnesses in Slovenian children. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990: 353-354.
- Arnež M., Avšič-Županc T. 2009. Tick-borne encephalitis in children: an update on epidemiology and diagnosis. *Expert review of anti-infective therapy* 7: 1251-1260.
- Avšič-Županc T., Poljak M., Matičič M., Radsel-Medvescek A., LeDuc JW., Stiasny K., Kunz C., Heinz FX. 1995. Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clinical and diagnostic virology*, 4: 51-59.
- Avšič-Županc T., Petrovec M. 1997. Epidemiology of tick-borne encephalitis. V: Factors in the emergence of arbovirus diseases: emergency diseases. Saluzzo J.F., Dodet B. (eds). Paris, Elsevier: 215-222.
- Avšič-Županc T., Knap N., Korva M., Lotrič Furlan S. 2009. Z vektorji preneseni virusni povzročitelji okužb osrednega živčevja. *Medicinski razgledi*, 48: 61-65.
- Bakhvalova V.N., Rar v.A., Tkachev S.E., Matveev V.A., Matveev L.E., Karavanov E.S., Dobrotvorsky A.K., Morozova O.V. 2000. Tick-borne encephalitis virus strains of Western Siberia. *Virus Research*, 70: 1-12.
- Bakhvalova V.N., Dobrotvorsky A.K., Panov V.V., Matveeva V.A., Tkachev S.E., Morozova O.V. 2006. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of Western Siberia, Russia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 6: 32-41.
- Bakhvalova V.N., Potapova O.F., Panov V.V., Morozova O.V. 2009. Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents. *Virus Research*, 140: 172-178.
- Barandika J.F., Hurtado A., Juste R.A., Garcia-Perez A.L. 2010. Seasonal Dynamics of *Ixodes ricinus* in a 3-Year Period in Northern Spain: First Survey on the Presence of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 10: 1027-1035.
- Barkhash A.V., Perelygin A.A., Babenko V.N., Brinton M.A., Voevoda M.I. 2012. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with

- human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 93: 64-68.
- Bertrand Y., Töpel M., Elväng A., Melik W., Johansson M. 2012. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PloS ONE*, 7: e31981.
- Best S.M., Morris K.L., Shannon J.G., Robertson S.J., Mitzel D.N., Park G.S., Boer P.E., Wolfinbarger J.B., Bloom M.E. 2005. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of Virology*, 79:12828-12839.
- Bogovič P., Lotrič-Furlan S., Strle F. 2010. What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms. *Travel Medicine and Infectious Diseases*, 8: 246-250.
- Bollati M., Alvarez K., Assenberg R., Baronti C., Canard B., Cook S., Coutard B., Decroly E., de Lamballerie X., Gould E.A., Grard G., Grimes J.M., Hilgenfeld R., Jansson A.M., Malet H., Mancini E.J., Mastrangelo E., Mattevi A., Milani M., Moureau G., Neyts J., Owens R.J., Ren J., Selisko B., Speroni S., Steuber H., Stuart D.I., Unge T., Bolognesi M. 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87: 125-148.
- Botha E.M., Markotter W., Wolfaardt M., Paweska J.T., Swanepoel R., Palacios G., Nel L.H., Venter M. 2008. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 222-230.
- Carpi G., Bertolotti L., Rosati S., Rizzoli A. 2009. Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virus in host-seeking *Ixodes ricinus* in northern Italy. *Journal of General Virology*, 90: 2877-2883.
- Campbell M.S., Pletnev A.G. 2000. Infectious cDNA clones of Langat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence. *Virology*, 269: 225-237.
- Casati S., Gern L., Piffaretti J.C. 2006. Diversity of the population of Tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). *Journal of General Virology*, 87: 2235-2241.
- Chambers t.j., Hahn C.S., Galler R., Rice C.M. 1990. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annual Review Microbiology*, 44: 649-688.
- Chambers T.J. Diamond M.S. 2003. Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in Virus Research*, 60: 273-342.
- Cisak E., wojcik-Fatla A., Zajac V., Sroka J., Buczek A., Dutkiewicz J. 2010. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 17: 283-286.

- Čižman M., Jazbec J. 1993. Etiology of acute encephalitis in childhood in Slovenia. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 12: 903-908.
- D'Agaro P., Martinelli E., Burgnich P., Nazzi F., Fabbro S.D. Iob A., Ruscio M., Pischutti P., Campello C. 2009. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* from a novel endemic area of north eastern Italy. *Journal of Medical Virology*, 81: 309-316.
- Danecek P., Lu W. and Schein C.H. 2010. PCP-consensus sequences of Flaviviruses: correlating variance with vector competence and disease phenotype. *Journal of Molecular Biology*, 396(3), 550-563.
- Danielova V., Holubova J., Daniel M. 2002. Tick-borne encephalitis virus prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected in high risk habitats of the south-Bohemian region of the Czech Republic. *Experimental and Applied Acarology*, 26: 145-151.
- Dobler G. 2010. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Veterinary Microbiology*, 140: 221-228.
- Donoso Mantke O., Aberle S.W., Avšič-Županc T., Labuda M., Niedrig M. 2007. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections. *Journal of Clinical Virology*, 38: 73-77.
- Donoso Mantke O., Schadler R. Niedrig M. 2008. A Survey on Cases of Tick-Borne Encephalitis in European Countries. *Eurosurveillance*, 13: 9.
- Dorrbecker B., Dobler G., Spiegel M. Hufert F.T. 2010. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Diseases*, 8: 213-222.
- Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Duh D. 2002. Gozdni klop (*Ixodes ricinus*) kot prenašalec babezij v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 62 str.
- Dumpis U., Crook D., Oksi J. 1999. Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 28: 882-890.
- Durmiši E., Knap N., Saksida A., Trilar T., Duh D., Avšič-Županc T. 2011. Prevalence and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus in *ixodes ricinus* ticks collected in Slovenia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11: 659-664.
- Dzhioev Y.P., Paramonov A.I., Demina T.V., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Tkachev S.E., Pristavka A.A., Salovarova V.P., Zlobin V.I. 2011. Detection of recombinations in tick-borne encephalitis virus by using computer analysis of viral genomes. *Voprosy Virusologii*, 56; 14-18.

- Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*, 80: 179-185.
- Fauquet C.M., et al. (Eds.), *Virus Taxonomy*. 7th Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, pp. 859-878.
- Fischl W., Elshuber S., Schrauf S., Mandl C.W. 2008. Changing the protease specificity for activation of a Flavivirus, Tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology*, 82: 8272-8282.
- Fritz R., Blazevic J., Taucher C., Pangerl K., Heinz F.X., Stiasny K. 2011. The unique transmembrane hairpin of Flavivirus fusion protein E is essential for membrane fusion. *Journal of Virology*, 85: 4377-4385.
- Gäumann R., Ružek D., Mühlemann K., Strasser M., Beuret C.M. 2011. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland. *Journal of Medical Virology*, 83: 853-863.
- Grešikova M., Calisher C.H. 1989. Tick-borne encephalitis. *Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, 4: 177-202.
- Golovljova I., Vene S., Sjolander K.B., Vasilenko V., Plyusnin A. Lundkvist A. 2004. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *Journal of medical virology*, 74: 580-588.
- Golovljova I., Katargina O., Geller J., Tallo T., Mittzenkov V., Vene S., Nemirov K., Kutsenko A., Kilosanidze G., Vasilenko V., Plyusnin A. Lundkvist A. 2008. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype. *International journal of Medical Microbiology*, 298: 108-120.
- Gould E.A., de Lamballerie X., Zlotto P.M. Holmes E.C. 2003. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus. *Advances in Virus Research*, 59: 277-314.
- Grgič-Vitek M. in Klavs I. 2011. High burden of tick-borne encephalitis in Slovenia – Challenge for vaccination policy. *Vaccine*, 29: 5178-5183.
- Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A. de Lamballerie X. 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*, 361: 80-92.

- Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A. 1995. Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Research*, 35: 307-321
- Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57: 129-146.
- Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P., Pogodina V.V., Lashkevich V.A., Gould E.A. 2003a. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *Journal of Virology*, 77: 25-36.
- Gubler D., Kuno G. Markoff L. 2007. Flaviviruses. In: Knipe, DM in Howley, PM (Eds.) *Fields Virology* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, str. 1154-1252.
- Gustafson R. 1994. Epidemiological studies on Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplementum*, 92: 1-63.
- Haglund M., Gunther G. 2003. Tick-borne encephalitis-pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*, 21 Suppl 1: 11-18.
- Haglund M., Vene S., Forsgren M., Günther G., Johansson B., Niedrig M., Plyusnin A., Lindquist L., Lundkvist Å. 2003a. Characterization of human tick-borne encephalitis virus from Sweden. *Journal of Medical Virology*, 71: 610-621.
- Hayasaka D., Ivanov L., Leonova G.N., Ito A., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. 2001. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *Journal of General Virology*, 82: 1319-1328.
- Han X., Aho M., Vene S., Peltomaa M., Vaheri A., Vapalahti O. 2001. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *Journal of Medical Virology*, 64: 21-28.
- Han X., Juceviciene A., Uzcategui N.Y., Brummer-Korvenkontio H., Zygutiene M., Jaaskelainen A., Leinikki P., Vapalahti O. 2005. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania. *Journal of Medical Virology*, 77: 249-256.
- Heigl Z., Zeipel G. 1966. Experimental infection with tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. 1. Virological studies. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 66: 489-509.
- Heinz F.X., Mandl C.W., Guirakho F., Holtzmann H., Tuma W., Kunz C. 1990. The envelope protein E of tick-borne encephalitis virus and other flaviviruses: structure, function and evolutionary relationships. *Archives of Virology, Supplementum* 1: 125-135.

- Heinz F.X., Collet M.S., Purcell R.H., Gould E.A., Howard C.R., Houghton M., Moormann R.J.M., Rice C.M., Thiel H.J. 2000. Family Flaviviridae. In: van Regenmortel C.M.,
- Heinz F.X. 2003. Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine*, 3673: 1-8.
- Heinz F.X., Holzmann H., Essl A., Kundi M. 2007. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 25: 7559-7567.
- Holzmann H., Heinz F.X., Mandl C.W., Guirakhoo F., Kunz C. 1990. A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *Journal of Virology*, 64: 5156-5159.
- Holzmann H., Vorobyova M.S., Ladyzhenskaya I.P., Ferenczi E., Kundi M., Kunz C., Heinz F.X. 1992. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine*, 10: 345-349.
- Holzmann H., Stiasny K., Ecker M., Kunz C., Heinz FX. 1997. Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice. *Journal of General Virology*, 78: 31-37.
- Holzmann H. 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 21 Suppl 1: S36-40.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Jääskeläinen A.E., Tikkaoski T., Uzategui N.Y., Alekseev A.N., Vaheri A., Vapalahti O. 2006. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 1568-1571.
- Jääskeläinen A.E., Sironen T., Murueva G.B., Subbotina N., Alekseev A.N., Castren J., Alitalo I., Vaheri A., Vapalahti O. 2010. Tick-borne encephalitis virus in ticks in Finland, Russian Karelia, and Buryatia. *Journal of General Virology*, 91: 2706-2712.
- Jääskeläinen A.E., Tonteri E., Sironen T., Pakarinen L., Vaheri A., Vapalahti O. 2011. European Subtype Tick-borne Encephalitis Virus in *Ixodes persulcatus* Ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 323-325.
- Jereb M., Muzlovic I., Avšič-Županc T., Karner P. 2002. Severe tick-borne encephalitis in Slovenia: epidemiological, clinical and laboratory findings. *Wiener klinische Wochenschrift*, 114: 623-626.
- Jerzak G., Bernard K.A., Kramer L.D., Ebel G.D. 2005. Genetic variation in West Nile virus from naturally infected mosquitoes and birds suggests quasispecies structure and strong purifying selection. *Journal of General Virology*, 86: 2175-2183.

- Jiang W.R., Lowe A., Higgs S., Reid H., Gould E.A. 1993. Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. *Journal of General Virology*, 74: 931-935.
- Kaiser R. 2008. Tick-borne encephalitis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22: 561-575.
- Khasnatinov M.A., Ustanikova K., Frolova T.V., Pogodina V.V., Bochkova N.G., Levina L.S., Slovak M., Kazimirova M., Labuda M., Klempa B., Eleckova E., Gould E.A., Gritsun T.S. 2009. Non-hemagglutinating flaviviruses: Molecular mechanisms for the emergence of new strains via adaptation to European ticks. *PloS ONE*, 10: e7295.
- Kim S.Y., Yun S.M., Han M.G., Lee I.Y., Lee N.Y., Jeong Y.E., Lee B.C., Ju Y.R. 2008. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8: 7-14.
- Kim S.Y., Jeong Y.E., Yun S.M., Lee I.Y., Han M.G. 2009. Molecular evidence for tick-borne encephalitis virus in ticks in South Korea. *Medical and Veterinary Entomology*, 23: 15-20.
- Knap N., Durmiš E., Saksida A., Korva M., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Veterinary Parasitology*, 164: 275-281.
- Knap N. 2011. Poglavitni biotski, abiotski in antropogeni dejavniki za spremembe v incidenci klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani. Medicinska fakulteta.
- Knap N., Korva M., Dolinšek V., Sekirnik M., Trilar T., Avšič-Županc T. 2012. Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12: 236-242.
- Kovalev S.Y., Chernykh D.N., Kokorev V.S., Snitkovskaya T.E., Romanenko V.V. 2009. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. *Journal of General Virology*, 90: 2884-2892.
- Kovalev S.Y., Kokorev V.S., Belyaeva I.V. 2010. Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union. *Journal of general virology* 91: 2941-2946.
- Kozuch O., Labuda M., Lysy J., Weismann P., Krippel E. 1990. Longitudinal study of natural foci of Central European encephalitis virus in West Slovakia. *Acta Virologica*, 34, 537-544.

- Kraigher A., Grilc E., Blaško M., Praprotnik M., Klavs I., Kastelic Z., Kustec T., Bergant N., Grgič-Vitek M., Učakar V., Sočan M., Paragi M., Prosenc K., Berginc N., Šubelj V., Koren N., Pokrajac T. 2008. Transmisivne nalezljive bolezni. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2007 (Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije).
- Kraigher A., Grilc E., Sočan M., Klavs I., Grgič-Vitek M., Čakš Jager N., Blaško Markič M., Praprotnik M., Kustec T., Bergant N., Kastelic Z., Paragi M., Prosenc K., Berginc N., Šubelj V., Svetičič J. 2010. Transmisivne nalezljive bolezni: Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezni v Sloveniji 2009 (Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije).
- Kroschewski H., Allison S.L., Heinz F.X., Mandl C.W. 2003. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 308: 92-100.
- Kryštufek B. 1991. Sesalci Slovenije. Prirodoslovni muzej Slovenije, Ljubljana, VI, 294 str.
- Kunz C. 1992. Tick-borne encephalitis in Europe. *Acta Leiden*, 60, 1-14.
- Kupča A.M., Essbauer S., Zoeller G., Philippe G.M., Brey R., Rinder M., Pfister K., Spiegel M., Doerrbecker B., Pfeffer M. 2010. Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1: 44-51.
- Labuda M., Nuttall P.A., Kozuch O., Eleckova E., Williams T., Zuffova E., Sabo A. 1993. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia*, 49: 802-805.
- Labuda M., Austyn J.M., Zuffova E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysy J., Nuttall P.A. 1996. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology*, 219: 357-366.
- Labuda M., Kozuch O., Zuffova E., Eleckova E., Hails R.S., Nuttall P.A. 1997. Tick-borne encephalitis transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent host. *Virology*, 235: 138-143.
- Lindenbach B.D., Rice C.M. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 59: 23-61.
- Lindenbach B.D., Thiel H., Rice C.M. 2007. Flaviviridae: The viruses and Their Replication. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.) *Fields Virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, str. 1102-1152.
- Lindquist L., Vapalahti O. 2008. Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 371: 1861-1871.

- Logar L. 1999. Parazitologija v medicini. 1. izd. Ljubljana, DZS: 217 str.
- Logar M., Arnež M., Kolbl J., Avšič-Županc T., Strle F. 2000. Comparison of the epidemiological and clinical features of tick-borne encephalitis in children and adults. *Infection*, 28: 74-77.
- Logar M., Bogovič P., Cerar D., Avšič-Županc T., Strle F. 2006. Tick-borne encephalitis in Slovenia from 2000 to 2004: Comparison of the source in adult and elderly patients. *Wien Klin Wochenschr*, 118/ 21-22: 702-707.
- Lorenz I.C., Allison S.L., Henz F.X., Helenius A. 2002. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 76: 5480-5491.
- Lotrič-Furlan S., Petrovec M., Avšič-Županc T., Logar M., Strle F. 2002. Epidemiological, clinical and laboratory distinction between human granulocytic ehrlichiosis and the initial phase of tick-borne encephalitis. *Wien Klin Wochenschr*, 114/13-14: 636-640.
- Ludwig G.V., Iacono-Connors C. 1993. Insect-transmitted vertebrate viruses: *Flaviviridae*. *Vitro Cellular & Developmental Biology*, 29A: 296-309.
- Lundkvist Å., Vene S., Golovljova I., Mavtchoutko V., Forsgren M., Kalnina V., Plyusnin A. 2001. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: Evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *Journal of Medical Virology*, 65: 730-735.
- Mackenzie J.M., Jones M.K., Young P.R. 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*, 220: 232-240.
- Malovrh T., Marc M. 1997. Proučevanje naravnih gostiteljev virusa klopnega meningoencefalitisa v aktivnih in latentnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Medicinski razgledi*, 36: 465-478.
- Mandl C.W., Allison S.L., Holzmann H., Meixner T., Heinz F.X. 2000. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *Journal of Virology*, 74: 9601-9609.
- Mandl C.W. 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research*, 111, 161-174.
- Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephens J.R., Fooks A.R., Solomon T. 2009. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 90: 1781-1794.
- McMinn P.C. 1997. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *Journal of General Virology*, 78: 2711-2722.

- Melik W., Nilsson A.S., Johansson M. 2007. Detection strategies of tick-borne encephalitis virus in Swedish *Ixodes ricinus* reveal evolutionary characteristics of emerging tick-borne flaviviruses. *Archives of Virology*, 152: 1027-1034.
- Monath T.P., Heinz F.X. 1996. Flaviviruses. V: Fields virology. 3rd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott – Raven Publishers: 961-1034.
- Monath T.P., Tsai T.F. 1997. Flaviviruses. V: Clinical virology. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (eds.). New York, Churchill Livingstone Inc.: 1133-1185.
- Mukhopadhyay S., Kuhn R.J., Rossmann G. 2005. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Reviews, Microbiology*, 3: 13-22.
- Nowak T., Wengler G. 1987. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology*, 156: 127-137.
- Nuttall P., Labuda M. 1994. Tick-borne encephalitis subgroup. In: Sonenshine, D in Mather, T (Eds.) *Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses*. Oxford University Press, New York/Oxford., str. 351-391.
- Oehme R., Hartelt K., Backe H., Brockmann S., Kimmig P. 2002. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 291 Suppl 33: 22-29.
- Patkar C.G., Jones C.T., Chang y., Warriar R., Kuhn R. 2007. Functional requirements of the Yellow Fever Virus capsid protein. *Journal of Virology*, 81: 6471-6481.
- Perez-Eid C., Hannoun C., Rodhain F. 1992. The Alsatian tick-borne encephalitis focus: presence of the virus among ticks and small mammals. *European Journal of Epidemiology*, 8: 178-186.
- Petri E., Gniel D., Zent O. 2010. Tick-borne encephalitis (TBE) trends in epidemiology and current and future management. *Travel Medicine and Infectious Diseases*, 8: 233-245.
- Pletnev A.G., Bray M., Ali C.J. 1993. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *Journal of Virology*, 67: 4956-4963.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25:1253-1256.
- Pucek Z., jedrzejewski W., Jedrzejewska B., Pucek M. 1993. Rodent population dynamics in a primeval deciduous forest (Białowieża National Park) in relation to weather, seed crop and predation. *Acta Theriologica*, 38, 2: 199-232.

- Randolph S.E., Gern L., Nuttall P.A. 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, 12: 472-479.
- Randolph S.E., Storey K. 1999. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of Medical Entomology*, 36: 741-748.
- Randolph S.E., Rogers D.J. 2000. Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. *Proceedings. Biological Sciences*, 267: 1741-1744.
- Randolph S.E., Green R.M., Peacey M.F., Rogers D.J. 2000. Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology*, 121 (Pt 1), 15-23.
- Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison C.S. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375: 291-298.
- Ružek D., Salat J., Palus M., Gritsun T.S., Gould E.A., Dykova I., Skallová A., Jelinek J., Kopecky J., Grubhoffer L. 2009. CD8⁺ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology*, 384: 1-6.
- Ružek D., Dobler G., Donoso Mantke O. 2010. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Diseases*, 8: 223-232.
- Saksida A., Duh D., Lotrič-Furlan S., Strle F., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2005. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *Journal of Clinical Virology*, 33, 4: 331-335.
- Schlesinger S., Schlesinger M.J. 1991. Replication of *Togaviridae* and *Flaviviridae*. V: *Fundamental virology*. 2nd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Chanock R.M., Hirsch M.S., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B. (eds.). New York, Raven Press, Ltd.: 453-467.
- Seligman S.J. 2008. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. *Virology Journal*, 5:27.
- Solomon T., Mallewa M. 2001. Dengue and other emerging flaviviruses. *Journal of Infection*, 42: 104-115
- Sonenshine D.E. 1991. *Biology of ticks*. Vol 1. New York: Oxford University Press: 346 str.
- Sonenshine D.E. 1993. *Biology of ticks*. Vol 2. Oxford, Oxford University Press: 488 str.
- Sonenshine D.E. 2005. The biology of tick vectors of human disease. V: *Tick-borne diseases of humans*. Goodman J.L. (ed.). Washington, D.C., ASM Press: 12-36.

- Stadler K., Allison S.L., Schalich J., heinz F.X. 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*, 71: 8475-8481.
- Stiasny K., Allison S.L., Mandl C.W., Heinz F.X. 2001. Role of metastability and acidic pH in membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology*, 75: 7392-7398.
- Stiasny K., Heinz F.X. 2006. Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology*, 87: 2755-2766.
- Stiasny K., Kössl C., Lepault J., Rey F.A., Heinz F.X. 2007. Characterization of a structural intermediate of Flavivirus membrane fusion. *PloS Pathogens*, 3: 191-199.
- Süss J. 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, 21, Suppl. 1: S19-S35.
- Süss J., Klaus C., Diller R., Schrader C., Wohanka N., Abel U. 2006. TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, Suppl. 40: 63-68.
- Süss J., Klaus C., Gerstengarbe F.W., Werner P.C. 2008. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *Journal of Travel Medicine*, 15: 39-45.
- Süss J. 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13: 18916.
- Süss J. 2011. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia – An overview. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2: 2-15.
- Šumilo D., Asokliene L., Avšič-Županc T., Bormane A., Vasilenko V., Lucenko I., Golovljova I., Randolph S.E. 2008a. Behavioural responses to perceived risk of tick-borne encephalitis: vaccination and avoidance in the Baltics and Slovenia. *Vaccine*, 26: 2580-2588.
- Šumilo D., Bormane A., Asokliene L., Vasilenko V., Golovljova I., Avšič-Županc T., Hubalek Z., Randolph S.E. 2008b. Socioeconomic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe. *Reviews in Medical Virology*, 18: 81-95.
- 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*, 28: 2731-2739.
- Telford S.R. III, Foppa I.M. 2000. Tickborne encephalitides. V: Tickborne infectious Diseases. Cunha B.A. (ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 193-213.

- Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chaurov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., Loktev V.B. 2007. Novel Variant of Tickborne Encephalitis Virus, Russia. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1574-1578.
- Thiel H.J., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Meyers G., Purcell R.H., Rice C.M., Houghton M. 2005. *Flaviviridae*. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., et al. (Eds.), *Virus Taxonomy*. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, pp. 981-998.
- Tonteri E., Jääskeläinen A.E., Tikkakoski T., Voutilainen L., Niemimaa J., Henttonen H., Vaheri A., Vapalahti O. 2011. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 72-75.
- Twiddy S.S., Holmes E.C. 2003. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *Journal of General Virology*, 84: 429-440.
- Uzcategui N.Y., Sironen T., Golovljova I., Jääskeläinen A.E., Välimaa H., Lundkvist A., Plyusnin A., Vaheri A., Vapalahti O. 2011. The rate of evolution and molecular epidemiology of TBEV in Europe including two isolations from the same focus 44 years apart. *Journal of General Virology*, 93: 786-796.
- Venturi G., Martelli P., Mazzolini E., Fiorentini C., Benedetti E., Todone D., Villalta D., Fortuna C., Marchi A., Minelli G., Ciufolini M.G. 2009. Humoral immunity in natural infection by tick-borne encephalitis virus. *Journal of Medical Virology*, 81: 665-671.
- Vesjenjak-Zmijanac J., Bedjanič M., Rus S., Kmet J. 1955. Virus meningo-encephalitis in Slovenia. *Bulletin – WHO, World Health Organization*, 12: 513-520.
- Vorndam V., Mathews J.H., Barrett A.D., Roehrig J.T., Trent D.W. 1993. Molecular and biological characterization of a non-glycosylated isolate of St Louis encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 74: 2653-2660.
- Waldenstorm J., Lundkvist A., Falk K.I., Garpmo U., Bergstorm S., Lindegren G., Sjostedt A., Mejlon H., Fransson T., Haemih P.D., Olsen B. 2007. Migrating birds and tick-borne encephalitis virus. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1215-1218.
- Weidmann M., Schmidt P., Hufert F.T., Krivanec K., Meyer H. 2006. Tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus* in the Czech Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 6: 379-381.
- Weidmann M., Ružek D., Krivanec K., Zöller G., Essbauer S., Pfeffer M., Zanotto P.M. de A., Hufert F.T., Dobler G. 2011. Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *Journal of General Virology*, 92: 1906-19616.

- Woekl C.H., Holmes E.C. 2002. Reduced positive selection in vector-borne RNA viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2333-2336.
- Yun S.M., Kim S., Ju H., Han M., Jeong Y.E., Yong T., Lee C., Ju Y.R. 2009. Analysis of the envelope (E) protein gene of tick-borne encephalitis viruses in South Korea. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9: 287-293.
- Yun S.M., Kim S., Ju H., Han M., Jeong Y.E., Ryou J. 2011. First complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis virus isolates obtained from wild rodents in South Korea. *Virus Genes*, 42: 307-316.
- Zeman P. 1997. Objective assessment of risk maps of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis based on spatial patterns of located cases. *International Journal of Epidemiology*, 26: 1121-1129.
- Zeman P., Januška J. 1999. Epizootiologic background of dissimilar distribution of human cases of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a joint endemic area. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 22: 247-260.
- Zenz W., Pansi H., Zoehrer B., Mutz I., Holzmann H., Kraigher A., Berghold A., Spork D. 2005. Tick-borne encephalitis in children in Styria and Slovenia between 1980 and 2003. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24: 892-896.
- Zhang Y., Zhang W., Ogata S., Clements D., Strauss J.H., Baker T.S., Kuhn R.J., Rossmann M.G. 2004. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*, 12: 1607-1618.

8 PRILOGE

Priloga A: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij krajšega tarčnega odseka beljakovine NS5. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik.

	Razlike v nukleotidih																													
Zaporedje	8	11	17	18	26	29	32	38	62	65	71	74	80	95	111	116	119	128	131	134	140	146	158	161	170	173	182	185	191	
Lj.	C	T	A	T	C	T	G	G	A	T	C	C	C	A	A	C	C	T	T	G	C	G	T	C	C	C	A	A	C	
T1	-	-	-	-	T	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	-	-	-	-	T	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
T3	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
T4	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
T5	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
T6	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
T7	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
T8	-	-	-	-	T	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
T9	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T11	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T15	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T
T17	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T
T19	-	-	-	-	T	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
T22	-	-	-	-	T	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
T23	-	-	-	-	T	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
R29	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R33	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	T	-	-
R34	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	T	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	T	C	-
R36	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R40	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R41	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	T	-	-
R42	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	T	-	C	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-
R43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-
R44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R45	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-
H47	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
H48	-	-	C	-	-	-	A	T	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
H49	-	C	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-
H50	-	C	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
H51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H52	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	T	-	-	-	-	T	-	C	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
H53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H54	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
H55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H56	-	-	-	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
H57	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
H58	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H59	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	-
H60	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H61	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
H62	-	-	-	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
H63	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
H64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H65	T	C	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H66	-	-	C	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
H67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H68	-	-	-	-	-	-	A	-	-	C	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-

NS5.

R15

Priloga C: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij (1075 bp) tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženih neposredno iz vzorcev klopov. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik.

[illegible]

Priloga D: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij (536 bp) tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženih neposredno iz vzorcev glodavcev. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik.

	Razlike v nukleotidih																																		
Zaporedje	13	35	40	52	69	75	87	90	94	114	120	123	128	129	153	177	189	192	211	216	240	265	336	381	390	408	411	429	437	438	443	450	456	472	
R 30	A	A	A	A	T	A	T	G	A	T	A	T	A	C	A	C	T	G	A	T	A	A	G	C	G	A	G	A	A	T	A	A	T	T	
R 31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R 35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R 37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R 39	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R 41	G	G	G	G	.	C	.	A	G	A	G	C	G	T	T	.	.	.	G	C	T	G	.	T	.	G	.	G	G	C	G	G	C	C	
R 42	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	T	C	A	.	C	.	G	T	.	A	.	A	.	.	.	.	.	C	C	

Priloga E: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij (1003 bp) tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME pomnoženih neposredno iz vzorcev bolnikov. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik.

[illegible]

Priloga F: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij (931 bp) tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnoženih neposredno iz vzorcev klopov. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik.

[illegible]

Priloga G: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij (1203 bp) tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnoženih neposredno iz vzorcev glodavcev. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik

	Razlike v nukleotidih																																																				
Zaporedje	7	16	33	40	43	61	82	120	122	130	197	208	223	229	266	277	289	331	337	340	346	361	409	427	466	469	511	545	579	595	644	733	751	784	793	794	832	838	850	871	874	885	907	919	943	1027	1081	1102	1165	1192	1201		
R30	A	C	G	C	G	A	T	C	T	G	C	G	C	T	C	C	A	T	G	C	A	G	T	C	A	T	G	C	C	A	A	T	A	C	A	A	C	T	A	A	C	G	A	C	C	T	G	A	T	C	T		
R33	G	C	A	T	A			T	C	A	T		T	C	T				A						T	G	C	A	A	G	G	C			T	G				G		A	G	T					T				
R37																																																					
R42	G	T	A	T		G	C			A		A		C		T	G	C	A	T	G	A	A	T		C		T	A				G	T				G	T	C		T	A	G	T			C	A	G	C	T	C

Priloga H: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij (757 bp) tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnoženih neposredno iz vzorcev bolnikov. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik.

[illegible]

Priloga I: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij (936 bp) tarčnega odseka beljakovine NS5 virusa KME, pomnoženih neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik.

[illegible]

Priloga J: Prikaz razlik v nukleotidih pri poravnavi nukleotidnih zaporedij (757 bp) tarčnega odseka beljakovine E virusa KME, pomnoženih neposredno iz vzorcev klopov, glodavcev in bolnikov. Številkam ustrezajo zaporedna mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do razlik.

[illegible]

Priloga K: Poravnava prevedenih aminokislinskih zaporedij (309 ak) tarčnega odseka beljakovine E.

[illegible]

Legenda:

	Ohranjeni cisteini pri vseh klopno prenosljivih flavirusih
	Ohranjen fuzijski peptid
	Variabilna mesta fuzijskega peptida
	Aminokisliline, značilne za evropski podtip virusa KME
	Aminokisliline, značilne za sibirski podtip virusa KME
	Aminokisliline, značilne za daljnovzhodni podtip virusa KME
	Ohranjen heksapeptid EHLPTA
	Glikozilacijsko mesto

**9. OBJAVLJENI ČLANKI, KI ZAJEMAJO IZSLEDKE RAZISKAV
PREDSTAVLJENIH V DOKTORSKI NALOGI**

**Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in
Slovenia.**

Knap N., Durmiši E., Saksida A., Korva M., Petrovec M., Avšič-Županc T.

Veterinary parasitology 2009; 164: 275-281

(IF=2,278)

**Prevalence and Molecular Characterization of Tick-Borne Encephalitis
Virus in *Ixodes ricinus* Ticks Collected
in Slovenia.**

Durmiši E., Knap N., Saksida A., Trilar T., Duh D., Avšič-Županc T.

Vector borne and zoonotic diseases 2011; 11: 659-664
(IF=2,607).

**Phylogeographic Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus
from Patients, Rodents and Ticks in Slovenia**

Fajs L., Durmiši E., Knap N., Strle F., Avšič-Županc T.

PLOS ONE 2012; 7: e48420

(IF=4,092).