

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja BIZIMOSKA

**DOKAZ VIRUSA LIMFOCITNEGA
HORIOMENINGITISA PRI MALIH SESALCIH V
SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja BIZIMOSKA

**DOKAZ VIRUSA LIMFOCITNEGA HORIOMENINGITISA PRI
MALIH SESALCIH V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**LYMPHOCYTIC CHORIOMENINGITIS VIRUS IN SMALL
MAMMALS IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in WHO laboratoriju.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Avšič-Županc, za somentorico dr. Darjo Duh in za recenzenta prof. dr. Maria Poljaka.

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

Somentorica: dr. Darja Duh, univ. dipl. mikrobiol.

Recenzent: prof. dr. Mario Poljak, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: dr. Darja Duh, univ. dipl. mikrobiol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Mario Poljak, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja BIZIMOSKA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.7.083: 616.831.9 – 002 (043)=163.6
KG	virusi/virus limfocitnega horiomeningitisa/LCMV/horiomeningitis/mali sesalci/ protitelesa/ metoda posredne imunofluorescence/ RT-PCR v realnem času/ prekuženost v Sloveniji
AV	BIZIMOSKA, Tanja
SA	AVŠIČ – ŽUPANC, Tatjana (mentorica) / DUH, Darja (somentorica) / POLJAK, Mario (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	DOKAZ VIRUSA LIMFOCITNEGA HORIOMENINGITISA PRI MALIH SESALCIH V SLOVENIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 47 str., 4 pregl., 16 sl., 7 pril., 74 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Virus limfocitnega horiomeningitisa (LCMV) je prvi odkrit arenavirus. Družino <i>Arenaviridae</i> delimo na viruse Starega in Novega sveta. Virus LCMV uvrščamo med arenaviruse Starega sveta. Naravni gostitelj virusa LCMV je hišna miš. Med gostitelji se virus LCMV prenaša horizontalno in vertikalno, vendar naj bi samo vertikalni prenos zagotavljal kronične nosilce. Pri naravem gostitelju povzroča trajno, asimptomatsko okužbo. Poleg naravnih gostiteljev lahko virus LCMV okuži tudi naključne gostitelje, pri katerih je okužba prehodne narave. Leta 2002 so v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, naredili pilotsko raziskavo o prekužnosti gozdnih delavcev z virusom LCMV v Sloveniji. Ta raziskava nam je služila kot povod, da izvedemo pilotsko testiranje malih sesalcev v Sloveniji na prisotnost virusa LCMV. Uporabili smo vzorce malih sesalcev iz zbirke Laboratorija za diagnostiko zoonoz. Vzorci so bili iz 5 različnih regij v Sloveniji in sicer: iz Gorenjske, Podravske, Notranjsko – Kraške in Osrednjeslovenske regije ter Savinjske doline. Vzorce malih sesalcev smo razdelili na vzorce naravnih in naključnih gostiteljev. Za dokaz protiteles proti virusu LCMV smo uporabili metodo posredne imunofluorescence, za neposreden dokaz pa RT – PCR v realnem času. Z metodo posredne imunofluorescence smo pregledali 6 vzorcev serumov hišne miši (1 vzorec pozitiven) in 290 vzorcev serumov naključnih gostiteljev. Od tega je bilo 197 serumov rumenogrlih miši, 9 je bilo pozitivnih, 88 serumov gozdnih voluharic, od tega je bilo 6 pozitivnih, 4 vzorci gozdne rovke, 1 pozitiven in 1 vzorec serumca navadnega polha, ki je bil negativen. Prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV v Sloveniji je 5,7 %, lokalna prekuženost pa se giblje med 2,4 – 8,2 %. Z RT – PCR v realnem času smo pregledali vzorce 310 malih sesalcev. Od tega je bilo 10 vzorcev hišne miši in 300 vzorcev naključnih gostiteljev. Vsi vzorci so bili negativni, vključno s tistimi, pri katerih smo dokazali protitelesa proti virusu LCMV. Diplomska naloga daje preliminaren vpogled v razširjenost virusa LCMV pri malih sesalcih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.7.083: 616.831.9 – 002 (043)=163.6
CX viruses/ lymphocytic choriomeningitis virus/ LCMV/ choriomeningitis/ small mammals/ antibodies/ immunofluorescence assay/ real-time RT-PCR/ prevalence in Slovenia
AU BIZIMOSKA, Tanja
AA AVŠIČ – ŽUPANC, Tatjana (supervisor) / DUH, Darja (co-adviser) / POLJAK, Mario (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI LYMPHOCYTIC CHORIOMENINGITIS VIRUS IN SMALL MAMMALS IN SLOVENIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 47 p., 4 tab., 16 fig., 7 app., 74 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) was the first discovered arenavirus. The *Arenaviridae* family are classified into two groups: Old World arenaviruses and New World arenaviruse. The LCMV virus is classified in to the Old World group. It's natural host is the domestic house mouse. Virus transmition within rodent populations can occur through vertical and horizontal transmition. Neonatally infected rodents usually become chronic carriers of LCMV virus and excrete it throughout their life. In their natural hosts LCMV causes asymptomatic and persistant infection but LCMV can also infects secondary hosts in which the infection is not permanent. In 2002 there was a preliminary study conducted on loggers in Slovenia to determine if these loggers have been in contact with LCMV virus. The study was carried out in Laboratory for diagnosis of zoonoses, Institute of Microbiology and Immunology, Ljubljana. This study was used as an indication that LCMV is present in Slovenia. We decided to do a survey of small mammals in Slovenia to determine if LCMV virus is present in his natural and secondary hosts. Samples used were colected from 5 different regions in Slovenia: Gorenjska, Podravska, Notranjsko-Kraška, Osrednjeslovenska and Savinjska. Samples were separated in to two groups: samples of natural hosts and samples of secondary hosts. For serological detection we used immunofluorescence assay and for viral RNA detection we used real-time RT-PCR. Using immunofluorescence assay we detected antibodies against LCMV in 1 house mouse (6 tested), in 9 yellow-necked mouse (197 tested), in 6 bank voles (88 tested) and in 1 common shrew (4 tested). We also tested 1 serum sample of edible dormouse but it was negative. In total we detected antibodies against LCMV virus in 5,7 % of the tested small mammals. Locally the percentage varied between 2,4 – 8,2 %. Using real-time RT-PCR we tested 10 samples of house mice and 300 samples of secondary hosts. In all tested samples we were unable to detect viral RNA. This graduation thesis is a preliminary insight into LCMV prevalence in their natural and secondary hosts in Slovenia

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED	3
2.2 ZNAČILNOSTI VIRUSA LCMV	4
2.2.1 Zgradba	4
2.2.2 Razmnoževanje virusa LCMV	6
2.3 TAKSONOMIJA IN FILOGENETSKE ANALIZE	7
2.3.1 Mehanizem virusne evolucije	10
2.4 NARAVNI IN NAKLJUČNI GOSTITELJI VIRUSA LCMV	11
2.4.1 Hišna miš	11
2.4.2 Rumenogrla miš	12
2.4.3 Gozdna voluharica	13
2.4.4 Navadni polh	14
2.4.5 Gozdna rovka	15
2.5 RAZŠIRJENOST IN EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA LIMFOCITNEGA HARIOMENINGITISA	15
2.5.1 Epidemiologija	17
2.6 KLINIČNA SLIKA	18
2.7 DIAGNOSTIKA IN ZDRAVLJENJE	19
2.7.1 Diagnostika	19
2.7.1.1 Neposredno dokazovanje	19
2.7.1.2 Posredno dokazovanje	21
2.7.2 Zdravljenje	22
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 VZORCI	23
3.2 METODE	24
3.2.1 Metoda posredne imunofluorescence	24
3.2.2 Izolacija celokupne RNA z reagentom Trizol	25
3.2.3 Enostopenjski RT – PCR v realnem času	27
4 REZULTATI	29
4.1 REZULTATI METODE POSREDNE IMUNOFLUORESCENCE	30
4.1.1 Rezultati metode posredne imunofluorescence naravnega gostitelja, hišne miši	31
4.1.2 Rezultati metode posredne imunofluorescence naključnih gostiteljev ...	31
4.2 REZULTATI RT-PCR V REALNEM ČASU	32
4.2.1 Rezultati RT – PCR v realnem času naravnega gostitelja, hišne miši....	33

4.2.2 Rezultati RT – PCR V realnem času naključnih gostiteljev.....	34
5 RAZPRAVA in SKLEPI.....	35
5.1 RAZPRAVA.....	35
5.2 SKLEPI.....	39
6 POVZETEK.....	40
7 VIRI	41
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Število hišnih miši testiranih z metodo posredne imunofluorescence	31
Preglednica 2: Število malih sesalcev testiranih z metodo posredne imunofluorescence ...	32
Preglednica 3: Število preiskanih hišnih miši z metodo posredne imunofluorescence in RT – PCR v realnem času.....	34
Preglednica 4: Prikaz števila serološko pozitivnih malih sesalcev, analiziranih z RT-PCR v realnem času.	34

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema zgradbe virusa LCMV (Rodas in Salvato, 2006)	4
Slika 2: Shematski prikaz genoma virusa LCMV (Rojek in Kunz, 2008).....	5
Slika 3: Razmnoževanje virusa LCMV (Rodas in Salvato, 2006)	7
Slika 4: Filogenetsko drevo arenavirusov (Rodas in Salvato, 2006).....	9
Slika 5: Hišna miš, <i>Mus musculus</i> (Hlasek J., 2008)	12
Slika 6: Rumenogrla miš, <i>Apodemus flavicollis</i> (Hlasek L., 2008).....	13
Slika 7: Gozdna voluharica, <i>Myodes glareolus</i> (Hlasek L., 2008)	14
Slika 8: Navadni polh, <i>Glis glis</i> (Andera, 2007).....	14
Slika 9: Gozdna rovka, <i>Sorex araneus</i> (Hlasek J., 2008)	15
Slika 10: Prekuženost glodavcev z virusom LCMV po svetu (Kallio-Kokko in sod., 2005; Lledó in sod., 2003; Ackermann in sod., 1964; Becker in sod., 2006; Laakkonen in sod., 2006; Morita in sod., 1991; Childs in sod., 1992; Emmons in sod., 1978).	16
Slika 11: Prikaz lokacij ulovljenih malih sesalcev.	29
Slika 12: Pozitiven rezultat – hišna miš, redčina 1:10	30
Slika 13: Pozitiven rezultat – hišna miš, redčina 1:40	30
Slika 14: Pozitiven rezultat – gozdna voluharica, redčina 1:10.....	30
Slika 15: Negativen rezultat	30
Slika 16: Prikaz pomnoževanja izolirane RNA z metodo RT – PCR v realnem času.....	33

KAZALO PRILOG

	str.
Priloga A1: Seznam vzorcev hišnih miši (<i>Mus musculus</i>) testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času.....	49
Priloga A 2: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Pohorje.....	50
Priloga A3: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Rakovnik.....	51
Priloga A4: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Vransko.....	55
Priloga A5: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Ig	56
Priloga A6: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Cerknica.....	57
Priloga A7: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Tenetiše.....	58

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
Ct	fluorescenčni prag (angl. cycle threshold)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
IFA	metoda posredne imunofluorescence (angl. indirect immunofluorescent assay)
LCMV	virus limfocitnega horiomeningitisa
NK	negativna kontrola
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PK	pozitivna kontrola
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic acid)
RT – PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (angl. polymerase chain reaction with reverse transcriptase)

SLOVARČEK

<i>Apodemus flavicollis</i>	rumenogrla miš
<i>Glis glis</i>	navadni polh
horiorenitis	vnetje mrežnice in horoide
levkopenija	znižanjekoncentracije levkocitov v krvi
<i>Mus musculus</i>	hišna miš
<i>Myodes glareolus</i>	gozdna voluharica
<i>Sorex araneus</i>	gozdna rovka
trombocitopenija	znižana koncentracija trombocitov v krvi
viremija	prisotnost virusa v krvi
virurija	prisotnost virusa v urinu

1 UVOD

Virus limfocitnega horiomeningitisa (LCMV) uvrščamo v družino *Arenaviridae*, ki jo sestavlja 22 vrst virusov. Arenaviruse delimo na viruse Starega in Novega sveta. Virus LCMV je predstavnik arenavirusov Starega sveta (Salvato in sod., 2005). Najdemo ga po celem svetu, vendar je omejen na življenjski prostor naravnega gostitelja, hišno miš (*Mus musculus*) (Peters in sod., 1996). Med gostitelji se virus LCMV prenaša horizontalno in vertikalno, vendar samo vertikalni prenos zagotavlja kronično okužene nosilce. V okolico se izloča preko urina, fecesa, slin ali mleka. Poleg naravnega gostitelja lahko virus LCMV okuži tudi naključne gostitelje iz družine Muridae (miši), Gliridae (polhi), Arvicolidae (voluharice) in Soricidae (rovke) (Gonzalez in sod., 2007; Kraus in sod., 2003).

Človek se okuži z neposrednim (ugriz glodavca) ali posrednim stikom (okužba z aerosolom izločka) okuženega glodavca. Okužbe pri človeku običajno potekajo v blažji obliki, lahko pa se razvije tudi težja oblika z meningitisom (Rollin in sod., 2007; Emonet in sod., 2007; Peters in sod. 1996). Okužba z virusom LCMV je nevarna za nosečnice, ker lahko vodi do poškodb in nenormalnega razvoja plodu (Barton in Mets, 2001). Gozdni delavci, lovci in kmetje so zaradi narave dela skupina ljudi, ki je bolj izpostavljen za okužbe z virusom LCMV (Kraus in sod., 2003).

1.1 NAMEN DELA

Naravni gostitelj virusa LCMV je hišna miš, *Mus musculus*. Poleg naravnega gostitelja lahko virus LCMV okuži tudi naključne gostitelje kot so druge sorodne miši, gozdne voluharice, gozdne rovke in drugi mali sesalci. Do okužb med vrstami prihaja zaradi prekrivajočega se življenjskega prostora med hišno mišjo in drugimi malimi sesalci (Gonzalez in sod., 2007; Kraus in sod., 2003).

Leta 2002 so v Sloveniji izvedli prvo pilotsko raziskavo o prekuženosti gozdnih delavcev z virusom LCMV. Z metodo posredne imunofluorescence so ugotovili prisotnost protivirusnih

protiteles IgG proti virusu LCMV. To je prva, preliminarna raziskava v Sloveniji, ki nakazuje na prisotnost virusa LCMV, vendar rezultati raziskave še niso objavljeni.

Podatkov o prekuženosti malih sesalcev z virusom LCMV v Sloveniji ni. Glede na pilotsko raziskavo pri gozdnih delavcih smo se odločili za izdelavo diplomske naloge, v kateri bi v naravnih in naključnih gostiteljih virusa LCMV skušali dokazati virus s serološkimi in molekularnimi metodami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Virus limfocitnega horiomeningitisa (LCMV) je prvi arenavirus, ki so ga uspeli osamiti in kultivirati. Leta 1933 sta ga Armstrong in Lillie (1934) izolirala iz likvorja obolele ženske med prvo dokumentirano epidemijo encefalitisa St. Louis. Izolat je pri miših in opicah povzročil vročino in aseptični meningitis. Leto dni kasneje sta Rivers in Scott (1935) iz likvorja dveh bolnikov, obolelih za meningitisom, izolirala povzročitelja s pomočjo filtracije. Ponovno je izolat pri miših povzročil enake značke obolenja kot leto dni prej dokumentiran virus LCMV. Istočasno je Traub (1935) v laboratoriju Rockafeller odkril miši okužene z neznanim povzročiteljem. Po izmenjavi virusnih izolatov so potrdili, da gre v vseh treh primerih za virus LCMV (Rivers in Scott, 1936).

Leta 1956 so izolirali virus Tacaribe iz vrste južnoameriškega netopirja *Artibeus spp.* (Downs in sod., 1963). Za razliko od drugih arenavirusov je gostitelj virusa Tacaribe netopir. Ob odkritju virusa Junin (Parodi in sod., 1958) in Machupo (Johnson in sod., 1965) so znanstveniki laboratorija Yale Arbovirus Laboratory v sodelovanju z laboratorijem Rockefeller uvrstili virus Tacaribe, Junin in Machupo v skupino Tacaribe (Rodas in Salvato, 2006).

Šele v poznih šestdesetih letih prejšnjega stoletja so odkrili podobnost med virusom LCMV in skupino Tacaribe. Oboji so virusi z ovojnico in pod elektronskim mikroskopom jimi ribosomi dajejo peščen izgled. Serološke raziskave so potrdile sorodnost in s tem novo uvrstitev. Prav po peščenem izgledu, so jih poimenovali arenavirusi (lat. arena = pesek). (Dalton in sod., 1968; Murphy in sod., 1969; Rowe in sod., 1970).

2.2 ZNAČILNOSTI VIRUSA LCMV

2.2.1 Zgradba

Virus LCMV je nepravilnih oblik, premera 50 – 300 nm. Virus obdaja lipidna ovojnica, v katero so vključene mrežasto razporejene beljakovine. V nukleokapsidi se nahaja enovijačna segmentirana ribonukleinska kislina (RNA, angl. ribonucleic acid) (Slika 1). RNA molekula je dvojno polarna ali bipolarna. Del molekule RNA je pozitivno polaren, drugi del molekule je negativno polaren. Pozitivni del genoma se neposredno prevede v beljakovine, negativni del pa najprej virusna transkriptaza prepiše v komplementarno mRNA (Southern, 1996; Koren in Marin, 2002).

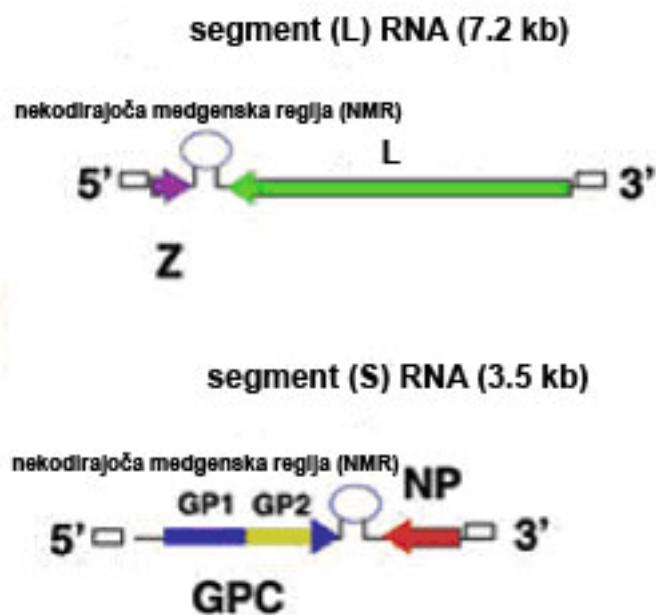


Slika 1: Shema zgradbe virusa LCMV (Rodas in Salvato, 2006)

Genom je sestavljen iz dveh segmentov: L (L, angl. large) ali velik segment in S (S, angl. small) majhen segment. Segment L je velik približno 7200 bp, S pa 3500 bp (Southern, 1996). Segment S nosi zapis za dve strukturni beljakovini: NP in GPC (Slika 2). Zapis za beljakovino NP je pozitivno polaren, zato se lahko ta del segmenta neposredno prevede v beljakovino. Regija, ki kodira zapis za GPC, je negativno polarna, zato je potrebna virusna transkriptaza, da najprej prepiše zapis v mRNA. Šele nato sledi sinteza beljakovine GPC. Beljakovina NP je sestavni del nukeokapside, beljakovina GPC je pa prekurzor za glikoproteina GP1 in GP2. GP1 in GP2 nastaneta s posttranslacijsko cepitvijo prekurzorja in sta sestavnici ovojnice in peplomerov (Rollin in sod., 2007).

Na segmentu L se nahaja zapis za beljakovino L (od RNA odvisna RNA polimeraza) in zapis za manjši strukturni element, beljakovino Z (Slika 2). Zapis za beljakovino L je pozitivno polaren, zato se ta neposredno prevede v beljakovino. Beljakovino Z kodira negativno polarni del segmenta L, zato je potrebna virusna traskriptaza, da najprej prepiše zapis gena v mRNA (Salvato in sod., 1989; Salvato in sod., 1992).

Beljakovine so kodirane v neprekričajočih se bralnih okvirjih. Ločuje jih medgenska nekodirajoča regija, ki tvori zanko. 5' in 3' konec vsakega segmenta sta nekodirajoča. Na vsakem koncu se nahaja 19 terminalnih nukleotidov, ki so reverzno komplementarni nasprotnemu koncu. Beljakovine NP, GP1 in GP2 so pomembni antigeni, na katerih je zasnovana filogenetska razdelitev. Izmed vseh je beljakovina NP najbolje ohranjena (Southern, 1996).



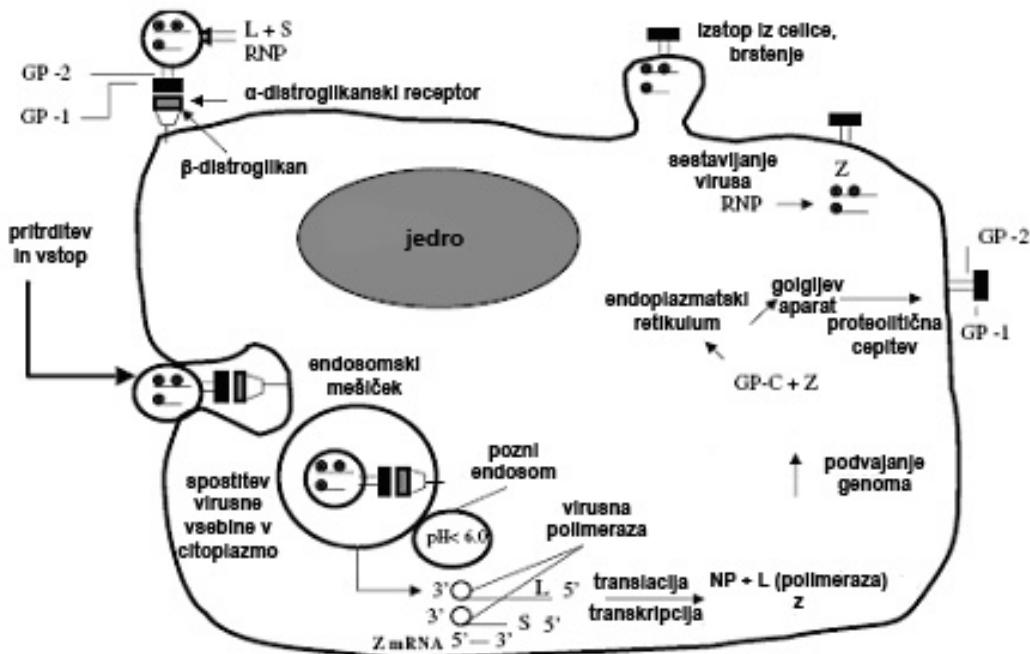
Slika 2: Shematski prikaz genoma virusa LCMV (Rojek in Kunz, 2008)

2.2.2 Razmnoževanje virusa LCMV

Virusi so znotrajcelični paraziti. Samostojno se ne morejo razmnoževati, ker nimajo vseh potrebnih encimov in celičnih struktur. Zato za svoj obstoj potrebujejo celico v kateri se lahko razmnožujejo (Koren in Marin, 2002).

Za vstop v celico se virus LCMV najprej pritrdi na celične receptorje (Slika 3). Eden izmed glavnih celičnih receptorjev je α -distroglikan. Virus LCMV vstopa v celico z endocitozo (Cao in sod., 1998; Kunz in sod., 2002). Po pritrditvi virusa LCMV na celični receptor, se citoplazemska membrana uviha navznoter in obda virus. Nastane endosom, ki se sprosti v notranjost celice. Endosom se združi z lizosomom in zaradi nastalega kislega okolja se nukleokapsida sprosti iz endolizosoma (Koren in Marin, 2002).

Ko je virus v citoplazmi, sleče kapsido in sprosti RNA. Del segmenta L in S je pozitvno polaren, del pa negativno. Pozitivno polarna RNA deluje kot mRNA in omogoča neposreden prepis beljakovine NP in L (od RNA odvisne RNA polimeraze). Zapis za prekurzor GPC kodira negativno polarni del, zato mora najprej virusna transkriptaza prepisati zapis v mRNA. Podvojevanje genoma in sinteza beljakovin poteka v citoplazmi. Prekurzorska molekula GPC se sintetizira kot enoten polipeptid, ki vstopa v Golgijev aparat, kjer se obogati z manozami in proteolitično cepi v GP1 in GP2 ter transportira na citoplazemske membrane, kjer se virus sestavi in zapusti celico (Salvato in sod., 1989; Buchmeier, 2002).



Slika 3: Razmnoževanje virusa LCMV (Rodas in Salvato, 2006)

2.3 TAKSONOMIJA IN FILOGENETSKE ANALIZE

Družino *Arenaviridae* sestavlja 22 vrst virusov. Vsaka vrsta je specifično povezana s svojim naravnim gostiteljem. V večini primerov so naravnii gostitelji glodavci iz družine Muridae ali Sigmodontinae. Izjema je le virus Tacaribe, čigar naravni gostitelj ni glodavec temveč netopir. Filogenetski razvoj gostiteljev se ujema s filogenetskim razvojem arenavirusov, kar nakazuje na dolgotrajno povezavo in koevolucijo (Salvato in sod., 2005).

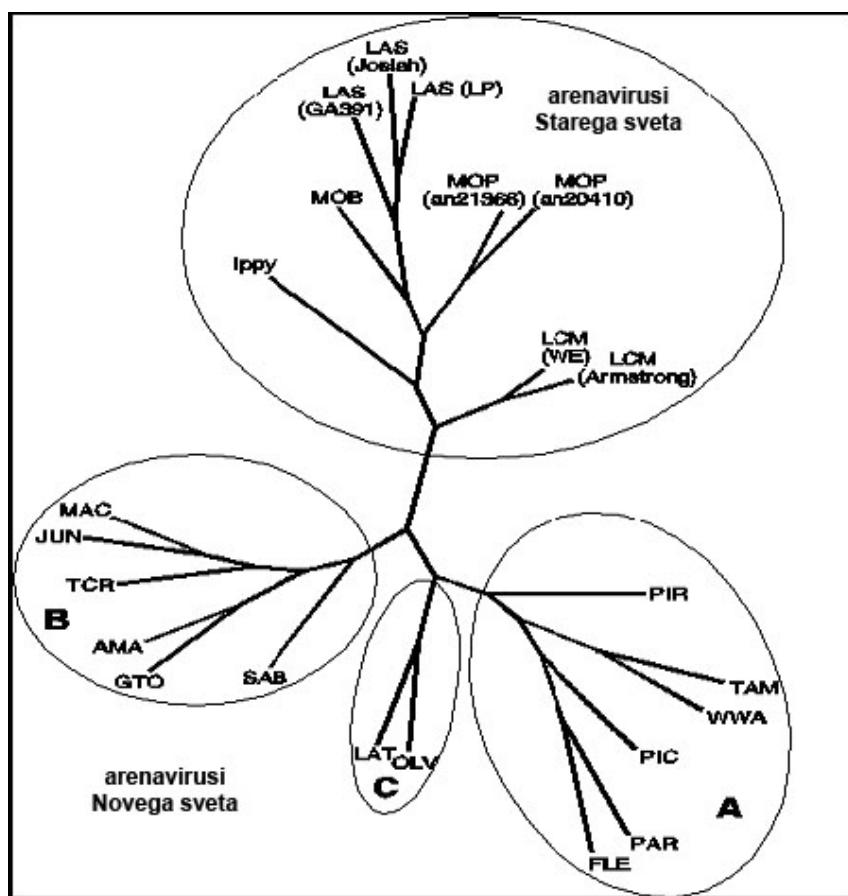
Gonzalez in sod. (2007) so predstavili koevolucijsko hipotezo za razvoj arenavirusov in njihovih naravnih gostiteljev. Predpostavljajo, da je prednik arenavirusov kronično okužil prednika glodavcev, preden se je le-ta razvil v dve ločeni družini; družino Sigmodontinae in družino Muridae. Razcep naj bi se zgodil pred približno 35 milijoni let. Po cepitvi, se je vsaka veja (Novi svet – družina Sigmodontinae, Stari svet – družina Muridae) neodvisno razvijala s svojimi vrstami arenavirusov. Iz tega naj bi sledila specifična povezava med vrsto glodavca in vrsto arenavirusa. Dodatni dokaz v prid tej hipotezi je primerjava filogenetskega

drevesa glodavcev in arenavirusov. Glavna delitev glodavcev v družini Muridae in Sigmodontinae se ujema z razdelitvijo arenavirusov med viruse Starega in Novega sveta.

Arenaviruse razvrščamo v 4 filogenetske linije. Ena linija predstavlja arenaviruse Starega (Lassa – LCMV skupina) sveta. V to skupino poleg virusa LCMV (Armstrong in Lillie, 1934) uvrščamo še virus Lassa (Buckley in Casals, 1970), Mopeia (Wulff in sod., 1977), Mobala (Gonzalez in sod., 1983) in Ippy (Swanepoel in sod., 1985). Z izjemo virusa LCMV, ki je razširjen po celi svetu, najdemo preostale arenaviruse Starega sveta v Afriki.

V ostale tri filogenetske linije uvrščamo skupino arenavirusov Novega sveta (Slika 4) in jih poimenujemo A, B in C. **Skupino A** sestavlja virusi: Whitewater Arroyo (Fulhorst in sod., 1996), Tamiami (Calisher in sod., 1970), Bear Canyon (Peters in sod., 1996) Flexal (Pinheiro in sod., 1977), Pichinde (Trapido in Sanmartin, 1971), Parana (Webb in sod., 1970), Allpahuayo (Moncayo in sod., 2001) in Pirital (Fullhorst in sod., 1997). V **skupino B** spadajo virusi: Sabia (Lisieux in sod., 1994), Junin (Parodi in sod., 1958) Machupo (Johnson in sod., 1965), Guanarito (Salas in sod., 1991), Amapari (Pinheiro in sod., 1966), Tacaribe (Downs in sod., 1963) in Cupixi (Charrel in sod., 2002). V **skupino C** prištevamo virusa: Oliveros (Mills in sod., 1996) in Latino (Webb in sod., 1970).

Virusi Bear Canyon, Tamiami in Whitewater Arroyo se nahajajo v ZDA, preostali predstavniki arenavirusov Novega sveta, pa se nahajajo v južni Ameriki (Bowen in sod., 1997).



Slika 4: Filogenetsko drevo arenavirusov (Rodas in Salvato, 2006)

Legenda: **LAS:** Lassa, **OLV:** Oliveros, **LCM:** Lymphocytic choriomeningitis, **MAC:** Machupo, **JUN:** Junin, **TCR:** Tacaribe, **AMA:** Amapari, **GTO:** Guanarito, **SAB:** Sabia, **MOP:** Mopeia, **LAT:** Latino, **PIR:** Pirital, **TAM:** Tamiami, **WWA:** Whitewater arroyo, **PIC:** Pichinde, **PAR:** Parana, **FLE:** Flexal

Čeprav so arenavirusi geografsko razširjeni po celiem svetu, so omejeni na življenjski prostor naravnih gostiteljev. Le virus LCMV najdemo na vseh celinah zaradi po celiem svetu razširjenega naravnega gostitelja, hišne miši (Peters in sod., 1996).

Razvrščanje arenavirusov v dva serokompleksa, serokompleks Tacaribe (arenavirusi Novega sveta) in serokompleks Lassa – LCMV (arenavirusi Starega sveta), temelji na seroloških in filogentskih analizah. Serološka klasifikacija temelji na antigenih nukleoproteina in glikoproteina. Antigeni nukleoproteina so najbolj ohranjeni in delijo arenaviruse na viruse Starega in Novega sveta. Podrobnejšo identifikacijo in uvrstitev dosežemo z nevtralizacijskim testom. Test deluje na osnovi prepoznavanja specifičnih epitopov glikoproteinske ovojnici (Bowen in sod., 1997).

Filogenetska klasifikacija temelji na analizi genov za beljakovine NP, GPC, Z in L. Analize vseh štirih genov potrjujejo monofiletski izvor arenavirusov Starega sveta in potrjujejo serološko razvrstitev (Emonet in sod., 2006).

2.3.1 Mehanizem virusne evolucije

Glavni mehanizem, zaradi katerega prihaja do raznolikosti znotraj posamezne vrste, je kopiranje točkovnih mutacij. Točkovne mutacije nastajajo, zaradi odsotnosti popravljalnih mehanizmov virusne RNA polimeraze (Koren in Avšič-Županc, 2002; Gonzalez in sod. 2007). Najpogosteje točkovne mutacije so substitucije (zamenjava enega nukelotida), ki se lahko fenotipsko odražajo kot spremenjeni epitopi antigenov. Vendar se le najbolje prilagojeni virusi ohranijo in uspešno razmnožujejo (Gonzalez in sod. 2007).

Arenavirusi imajo segmentiran genom, zaradi tega je možnost prerazporeditve in intramolekularne rekombinacije toliko večja. Pri intramolekularni rekombinaciji se med sintezo genoma izmenjujejo različno dolgi odseki RNA sorodnih virusov. Novo nastali virus ima tako genetski zapis obeh starševskih virusov. Do prerazporeditve genoma lahko pride, če celico okužita dva sorodna virusa in izmenjata celoten genski segment (Emonet in sod., 2006).

Dokaz, da prihaja pri arenavirusih do prerazporeditve, je zaenkrat le eksperimentalno potrjen. Lukashevich (1992) je potrdil zmnožnost, da prihaja do prerazporeditve genoma na celični liniji okuženi z dvema sorodnima virusoma, toda za zdaj ni podatkov, ki bi potrjevali, da prihaja do genske rekombinacije tudi v naravi.

Do intramolekularne rekombinacije pogosto prihaja pri sorodnih RNA virusih. Dokazali so jo pri treh severnoameriških arenavirusih: Whitewater arroyo, Tamiami in Bear Canyon virus. Da prihaja do intramolekularne rekombinacije tudi pri drugih arenavirusih, za zdaj ni podatkov (Charrel in sod., 2001).

2.4 NARAVNI IN NAKLJUČNI GOSTITELJI VIRUSA LCMV

Naravni gostitelj virusa LCMV je hišna miš, pri kateri virus LCMV povzroča trajno, asimptomatsko okužbo. Poleg naravnega gostitelja lahko virus LCMV okuži tudi naključne gostitelje, pri katerih je okužba prehodne narave. Do okužbe naključnih gostiteljev prihaja zaradi prekrivajočega se življenjskega prostora. Naključni gostitelji virusa LCMV so običajno iz drugih rodov miši (družina: Muridae), polhov (družina: Gliridae), voluharic (družina: Arvicolidae) ter iz družine rovk (Soricidae) (Gonzalez in sod., 2007, Kraus in sod., 2003).

2.4.1 Hišna miš

Hišno miš, *Mus musculus*, najdemo po celotni Evrazijski celini, severni Afriki in Novem svetu. V Sloveniji je prisotna na celiem ozemlju, vendar je njena geografska razširjenost pogojena s prisotnostjo človeka. Je splošno razširjena, vendar jo v višjih legah najdemo le izjemoma. Običajno se naseli v človeških domovih, shrambah, hlevih in drugih gospodarskih objektih. V Sloveniji sta prisotni dve podvrsti: *Mus musculus musculus* in *Mus musculus domesticus*. *M. m. domesticus* živi v trstičevju in na obdelovalnih površinah submediteranskega sveta, populacije *M. m. musculus* pa najdemo v subpanonski Sloveniji (Kryštufek, 1991).

Hišno miš uvrščamo v rod: hišnih miši (*Mus*), družino: miši (Muridae) ter red: glodavci (Rodentia). Hišna miš ima sivo rjav hrbet in siv trebuh z rjavimi toni (Slika 5). Aktivne so predvsem ponoči, so zelo urne, dobro plazajo in plavajo. Živijo v majhnih skupnostih, ki so sestavljene iz dominantnega samca in ene ali več samic. So vsejede, jedo tako rastlinsko kot živalsko hrano. Samice so breje od 20 do 21 dni in skotijo od 4 do 8 golih in slepih mladičev. Kotijo preko celega leta, spolno zrelost dosežejo z 2 – 3 meseci. Življenjska doba v naravi je 18 mesecev, v ujetništvu lahko živijo do 4 leta. V naravi jih lovijo male in srednje zveri, sove in ujede; v urbanem okolju pa domače mačke (Kryštufek, 1991).



Slika 5: Hišna miš, *Mus musculus* (Hlasek J., 2008)

2.4.2 Rumenogrla miš

Rumenogrla miš, *Apodemus flavicollis*, je razširjena od severozahoda Pirenejskega polotoka do Urala na vzhodu. Na severu sega do južne Skandinavije, na jugu pa do Apeninskega in Balkanskega polotoka. Pri nas je razširjena po celi državi, z izjemo priobalnega pasu. Poseljuje gozdnata območja do višine 1500 m (Kryštufek, 1991).

Rumenogrla miš spada v rod belonogih miši (družina: Muridae). Ima velike oči, dolge uhlje in rep daljši od telesa. Trebuhan je bele barve in ostro omejen od rjavega hrbta (Slika 6). Značilen je sklenjen rumen trak preko grla (Kryštufek, 1991).



Slika 6: Rumenogrla miš, *Apodemus flavicollis* (Hlasek L., 2008)

2.4.3 Gozdna voluharica

Gozdne voluharice, *Myodes glareolus*, naseljujejo gozdove zmernega pasu, tajgo in tundro. V Evropi je razširjena od Pirenejev do Rusije, na jugu do Apeninov in severne Grčije, na sever pa seže do polarnega kroga. V Sloveniji jo najdemo v celinskem delu nižin do višine 2000 m. Najpogosteje naseljuje nižinske gozdove ob velikih vodnih tokovih subpanonskega sveta, bukove-jelove gozdove dinarskega in mešane gozdove alpskega sveta. Naseljuje tudi vlažne listnate gozdove, najdemo jo tudi v barjanskih grmičevjih ter gostem rastlinju ob vodah in v živih mejah (Kryštufek, 1991).

Gozdna voluharica je manjša voluharica z dolgim dvobarvnim repom ter čopom dlak na koncu. Zgrodnji del repa je temno rjav, spodnji del je svetel. Ima zašiljen smrček in velike uhlje. Hrbet je rdečerjave barve, trebuh je siv z rumenimi odtenki (Slika 7). Od drugih glodavcev se gozdna voluharica razlikuje po tem, da nima stalno rastočih meljakov (Kryštufek, 1991).



Slika 7: Gozdna voluharica, *Myodes glareolus* (Hlasek L., 2008)

2.4.4 Navadni polh

Navadni polh, *Glis glis*, je razširjen po celotni Evropi. Na severu njegov življenjski prostor seže do Baltika, na jugu Evrope pa do Krete. Najdemo ga tudi na Kavkazu in na severu Male Azije. V Sloveniji ga najdemo v listnatih in mešanih gozdovih. Pogosto ga najdemo v apneničkih Alpah in Dinarskem gorstvu ter v submediteranski Sloveniji. Za zimsko spanje najraje izbere globoke skalne razpoke ali podzemski jame. Pogosto se zateka tudi v človeška bivališča. Ima velike oči, obrobljene s kolobarjem. Hrbet je srebrno siv (Slika 8), trebuhi bele barve z rjavimi toni (Kryštufek, 1991).



Slika 8: Navadni polh, *Glis glis* (Andera, 2007)

2.4.5 Gozdna rovka

Gozdno rovko, *Sorex araneus*, (uvrščamo v red žužkojedov (Insectivora). Na prvi pogled je podobna mišim, vendar se razlikuje po gostejšem žametnem kožuhu, daljšem gobčku, drobnih očeh in petih prstih na prednjih nogah (miši imajo samo štiri prste). Najdemo jo pretežno v srednji in vzhodni Evropi, ne naseljuje Francije in Pirenejskega polotoka (z izjemo Pirenejev). Najdemo jo v celinskem delu Slovenije; v nižinah (145 m) do višine 1900 m. Naseljuje nižinske gozdove subpanonskega območja, iglaste gozdove Alp ter bukov – jelov gozd. Gozdna rovka je srednje velika rovka (Slika 9). Ima temno rjav hrbet, svetlejše boke in sivkast trebuh (Kryštufek, 1991).



Slika 9: Gozdna rovka, *Sorex araneus* (Hlasek J., 2008)

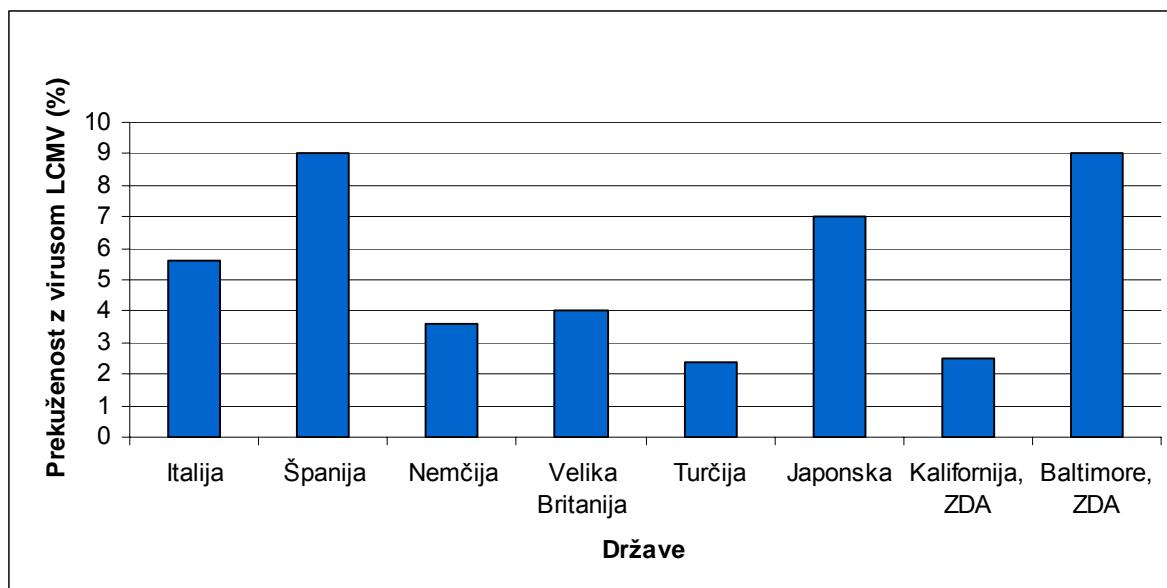
2.5 RAZŠIRJENOST IN EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA LIMFOCITNEGA HORIOMENINGITISA

Virus LCMV je razširjen po celiem svetu, kot njegov naravni gostitelj. Življenjski prostor hišne miši je omejen in tesno prepleten s človeško prisotnostjo (Kryštufek, 1991; Gonzalez in sod., 2007).

Podatki o prekuženosti glodavcev z virusom LCMV temeljijo na seroloških rezultatih posredne imunofluorescence. Prekuženost glodavcev z virusom LCMV je v Evropi od 3,6 % do 9 %. Slika 10 prikazuje prekuženost glodavcev z virusom LCMV v različnih Evropskih državah, na Japonskem in v ZDA. Najnižjo prekuženost glodavcev z virusom LCMV v Evropi najdemo v Turčiji (2,4 %), kjer so testirali le naključne gostitelje iz rodu *Apodemus*,

družine Gliridae in Arvicolidae (Laakkonen in sod., 2006). Nekoliko višjo prekuženost najdemo v Nemčiji (3,6 %) in Veliki Britaniji (4 %) (Ackerman in sod., 1964; Becker in sod., 2006). V Italiji je z virusom LCMV prekuženih 5,6 % glodavcev. Od tega znaša prekuženost rumenogrle miši z virusom LCMV 6,1 %, prekuženost gozdne voluharice 3,3 % in prekuženost poljske voluharice (*Microtus arvalis*) 14,3 % (Kallio – Kokko in sod., 2005). Izmed Evropskih držav najdemo najvišjo prekuženost glodavcev z virusom LCMV v Španiji (9 %), prekuženost hišne miši z virusom LCMV znotraj Španije je pa še višja in znaša 11,7 % (Lledó in sod., 2003).

V svetu se podatki o razširjenosti virusa LCMV pri glodavcih gibljejo med 2,5 % - 9 %. Največji razpon prekuženosti (2,5 – 9 %) najdemo v ZDA (Childs in sod., 1992; Emmons in sod., 1987), medtem ko prekuženost glodavcev z virusom LCMV na Japonskem znaša 7 % (Morita in sod., 1991).



Slika 10: Prekuženost glodavcev z virusom LCMV po svetu (Kallio-Kokko in sod., 2005; Lledó in sod., 2003; Ackermann in sod., 1964; Becker in sod., 2006; Laakkonen in sod., 2006; Morita in sod., 1991; Childs in sod., 1992; Emmons in sod., 1978).

Kallio – Kokko in sod. (2005) so v serološki raziskavi poleg glodavcev testirali še gozdne delavce na prisotnost IgG protiteles proti virusu LCMV. V raziskavo so vključili 488 gozdnih delavcev in jih serološko testirali z metodo posredne imunofluorescence. Pri 12

gozdnih delavcih (2,5 %) so dokazali protitelesa IgG proti virusu LCMV. V Španiji so Lledó in sod. (2003) testirali splošno populacijo ljudi, živečih na podeželju in v mestih. Prevalenca protiteles proti virusu LCMV pri ljudeh, ki živijo na podeželju je bila 2,3 % in 1,1 % pri ljudeh, ki živijo v urbanem okolju. Skupna prevalenca protiteles proti virusu LCMV za Španijo je 1,7 %. Zanimivo je, da so v raziskavi prisotnost protiteles proti virusu LCMV dokazali le pri ženskah.

Na Hrvaškem je serološko raziskavo o prekuženosti ljudi izvedel Dobec in sod. (2006) na otoku Vir. Testirali so 425 ljudi, obeh spolov, starosti od 6 do 88 let. Za dokaz protiteles proti virusu LCMV so uporabili metodo posredne imunofluorescence. Izmed 425 testiranih oseb, so dokazali protitelesa proti virusu LCMV pri 155 (36 %). Tako visoka prekuženost ljudi z virusom LCMV je neobičajna in uvršča otok Vir, v sam vrh prekuženosti. Prekuženost ljudi z virusom LCMV je v ZDA od 3,5 do 5,1 % (Stephensen in sod., 1992; Park in sod., 1997), v Kanadi 4 % (Marrie in Saron, 1998) in v Argentini 4,6 % (Riera in sod., 2005).

Gozdni delavci, lovci, kmetje ter nenazadnje tudi ljubitelji malih živali, kot so hišne miši in hrčki, sodijo v izpostavljenou skupino ljudi za okužbe z virusom LCMV (Kraus in sod., 2003). Leta 2002 so izvedli pilotsko raziskavo o prekuženosti gozdnih delavcev z virusom LCMV v Sloveniji (rezultati še niso objavljeni). V laboratoriju za diagnostiko zoonoz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo so zbrali in testirali serume gozdnih delavcev iz različnih lokacij Slovenije. Serume so testirali z metodo posredne imunofluorescence in potrdili prisotnost protiteles IgG proti virusu LCMV.

2.5.1 Epidemiologija

Naravni gostitelj virusa LCMV je hišna miš. Virus se med gostitelji prenaša horizontalno in vertikalno, vendar naj bi samo vertikalnen prenos zagotavljal kronične nosilce. Neonatalno okužene hišne miši razvijejo imunske toleranco na virus LCMV in postanejo kronični nosilci virusa. S serološkimi tehnikami so protitelesa proti virusu LCMV našli tudi pri psih, opicah, laboratorijskih miših, morskih prašičkih in hrčkih. Prav slednji naj bi bili največji potencialni vir okužbe za človeka, saj so kot domače živali v tesnem stiku s človekom

(Krauss in sod., 2003). Protitelesa proti virusu LCMV so našli tudi pri drugih malih sesalcih t.i. naključnih gostiteljih, kot so rumenogrle miši, gozdne voluharice in gozdne rovke (Kallio – Kokko in sod., 2005, Laakkonen in sod., 2006).

Virus LCMV je zoonotski agens in pri ljudeh povzroča zoonozo, ki se sporadično pojavlja povsod po svetu. Človek se lahko okuži preko neposrednega stika z ugrizom glodavca ali preko kontaminiranega aerosola iz izločkov okuženih glodavcev (Rollin in sod., 2007, Emonet in sod., 2007).

Možna je tudi okužba z virusom LCMV s presaditvijo organa. Leta 2005 so v ZDA presadili z virusom LCMV okužene organe (jetra, pljuča in ledvica) štirim bolnikom. Vsi širje so razvili hudo obliko limfocitnega horiomeningitisa, pri čemer so trije bolniki umrli. Predvidevajo, da se je donor organov okužil od svojega hrčka (CDC, 2005).

Posebno rizična skupina so nosečnice, pri katerih lahko okužba z virusom LCMV vodi do poškodbe plodu (Rollin in sod., 2007, Emonet in sod., 2007).

Okužba z virusom LCMV je možna preko celega leta, vendar je največ okužb jeseni, ko miši iščejo zavetja pred mrazom v hišah, hlevih in drugih gospodarskih objektih. Človek je tako pogosteje izpostavljen tveganju za obolenje (Gonzalez in sod., 2007). Po dosedanjih podatkih, prenos s človeka na človeka ni možen oz. še ni bil dokumentiran (Charrel in de Lamballerie, 2002).

2.6 KLINIČNA SLIKA

Po okužbi z virusom LCMV hišna miš razvije trajno asimptomatsko okužbo s sporadično viremijo ali virurijo. V okolico se virus izloča preko urina, fecesa ali sline (Gonzalez in sod., 2007). Pri eksperimentalno okuženih hišnih miših z virusom LCMV, hišne miši razvijejo hudo obliko hepatitisa in encefalitisa, ki je smrten (Kraus in sod., 2003).

Pri človeku se lahko okužba izrazi na različne načine: subklinična oblika, blažja bolezen z kliničnimi znaki gripe ali težja oblika z meningitisom. Prva faza bolezni se izrazi s povišano telesno temperaturo, utrujenostjo, glavobolom, levkopenijo in trombocitopenijo. Po 3 – 5 dneh vročina pade, vendar se povrne v 2 – 4 dneh z močnejšim glavobolom. V tej drugi fazi lahko bolezen napreduje v meningitis. V likvorju obolelih zaznamo povišano število limfocitov ter znižano koncentracijo glukoze (Peters in sod., 1996).

Virus LCMV je nevaren predvsem za nosečnice, pri katerih lahko okužba vodi do poškodb in nenormalnega razvoja plodu (Rollin in sod., 2007; Emonet in sod., 2007). Plod se okuži že v maternici ali med porodom. Najpogosteji poškodbi plodu so horiorentis in nastanek vodene glave, okužba v prvem trimestru nosečnosti pa povečuje tveganje za spontani splav. Znaki akutne okužbe se pojavijo pri dveh tretjinah nosečnic. Pri ostali tretjini okužba poteka brez bolezenskih znakov (Barton in Mets, 2001).

Virus LCMV je patogen tudi za južnoameriške opice iz družine Callitrichidae. Pri opicah virus LCMV ne povzroča meningitisa, temveč hepatitis. Leta 2001 je v nemškem živalskem vrtu izbruhnila epidemija hepatitisa pri opicah. Po obdukciji so ugotovili, da so poginile zaradi okužbe v virusom LCMV. Skrbniki so domnevali, da so se opice okužile od divjih miši. Ulovljene miši v živalskem vrtu so testirali na prisotnost virusa LCMV. Analize iz opic in miši so potrdile isti sev virusa LCMV (Asper in sod., 2001).

2.7 DIAGNOSTIKA IN ZDRAVLJENJE

2.7.1 Diagnostika

Za dokaz virusa LCMV lahko uporabimo neposredno (izolacija virusa na celični kulturi; dokaz virusnih antigenov; dokaz virusne RNA) ali posredno dokazovanje (dokaz protiteles).

2.7.1.1 Neposredno dokazovanje

Virus LCMV lahko osamijo na celični kulturi, vendar zaradi dolgotrajnosti metode, le-te v rutinski diagnostiki ne izvajajo. Običajno v diagnostične namene uporabljam posredno dokazovanje, to je dokaz specifičnih protiteles proti virusu LCMV (Charrel in de Lamballerie, 2002).

Verižna reakcija s polimerazo je metoda za pomnoževanje DNA. Vzorcu DNA dodamo reakcijsko mešanico, ki vsebuje deoksinukleotidtrifosfate, par začetnih oligonukleotidov, temperaturno obstojno DNA polimerazo in pufer, ki ji zagotavlja optimalne pogoje delovanja. V vsakem naslednjem ciklu podvojimo količino DNA. Običajno število ciklov je od 25 do 40 (Poljak, 2002; Wong in Medrano, 2005).

RNA molekule ne moremo pomnoževati z navadno verižno reakcijo s polimerazo, ker polimeraza DNA ne more uporabiti RNA molekule za matrico. RNA lahko pomnožujemo z RT-PCR, ki se od navadnega PCR-ja razlikuje le po tem, da najprej prepiše RNA v cDNA z encimom reverzne transkriptaze (RT, angl. reverse transcriptase). Vsi nadaljni koraki med obema metodama so identični (Bustin, 2000). Reverzna traskriptaza (RT) uporablja RNA vijačnico kot matrico, na kateri sintetizira cDNA. Nastane dvovijačni hibrid RNA/DNA. Encim RT ima še aktivnost RNase H, ki razgradi RNA v RNA/DNA hibridu. Na enoverižni matrici cDNA se nato sintetizira komplementarna veriga, tako da dobimo dvovijačno DNA, ki se nato pomnožuje v PCR ciklih (Lewin, 2004).

PCR v realnem času se od navadnega PCR-ja ločuje po zaznavanju pridelkov PCR. Pri navadnem PCR-ju pridelke zaznavamo po končani reakciji z gelsko elektroforezo. Pri PCR-ju v realnem času gelska elektroforeza ni potrebna, ker zaznavamo pridelke že med pomnoževanjem. Pridelke zaznavamo z različnimi fluorescenčnimi barvili ali s sondami označenimi s fluorofori (Mackay in sod., 2002). Najpogosteje uporabljam hidrolizirajočo sondu. Sonda ima na 5' koncu vezan reporterski fluorofor, na 3' koncu pa dušilec. Ko je sonda intaktna, dušilec preprečuje reporterskemu fluoroforu da oddaja svetlobo. Sonda specifično nalega na enoverižne pridelke za začetnim oligonukleotidom. Polimeraza Taq DNA prične pomnoževati pridelek med obema začetnima oligonukleotidoma. Polimeraza Taq DNA ima 5' eksonukleazno aktivnost. Ko pride polimeraza Taq DNA do sonde, hidrolitsko odcepi reporterski fluorofor od dušilca in fluorofor začne oddajati svetlobo (Bustin, 2000). Dokaz pridelkov temelji na intenziteti fluorescence. Fluorescenco spremljamo tekom vsakega cikla. Intenziteta svetlobe predstavlja količino pomnoženega pridelka v vsakem ciklu. Večja količina DNA ali RNA v vzorcu na začetku reakcije, skrajša število ciklov potrebnih, da se doseže fluorescenčni prag (C_t , angl. cycle threshold). C_t je vrednost

fluorescence, ko ta doseže večjo intenziteto od ozadja. Če določimo v eksponetni fazi pomnoževanja pridelka (Bustin, 2000).

Dokaz virusne RNA z metodo RT-PCR v realnem času je zelo hitra in občutljiva metoda. Omogoča dokazovanje zelo nizkih koncentracij virusne RNA in zaznavanje pridelkov reakcije že med samim pomnoževanjem. RT – PCR v realnem času se čedalje bolj uveljavlja tudi v rutinski diagnostiki in predstavlja dobro in učinkovito orodje za dokaz virusa LCMV (Charrel in de Lamballerie, 2002).

Za dokaz virusnih antigenov lahko uporabimo metodo neposredne imunofluorescence ali encimskoimunsko metodo. Pri metodi neposredne imunofluorescence uporabimo specifična monoklonska ali poliklonska protitelesa označena s fluorescinom, ki se vežejo na virusne antogene. Pri encimskoimunski metodi uporabimo dvojna protitelesa. Prva so vezana na nosilec in vežejo antigen, ki ga hočemo dokazati. Na nastali imunski kompleks vežemo še druga, z encimom označena, protitelesa. Dodamo še substrat, ki po delovanju encima spremeni barvo (Marin, 2002; Rollin in sod., 2007).

2.7.1.2 Posredno dokazovanje

Z metodo posredne imunofluorescene dokazujemo protivirusna protitelesa v serumu. Specifična protitelesa iz seruma vežemo z virusnim antigenom, ki smo ga predhodno pritrdirili na predmetnik. Kompleksu dodamo sekundarna protitelesa, označena s fluorokromi. Fluorokromi so snovi, ki absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine in oddajajo svetlobo druge valovne dolžine (Avšič-Županc, 2002).

Sekundarna protitelesa se vežejo na primarna in tvorijo imunski kompleks, ki ga opazujemo pod mikroskopom. Rezultate izrazimo s titrom protiteles. Metoda posredne imunofluorescence je visoko specifična, občutljiva in hitro izvedljiva. Ena izmed pomanjkljivosti metode je subjektivna ocena rezultatov. Zato je odločilnega pomena, da rezultate podaja izkušena in strokovno usposobljena oseba (Avšič-Županc, 2002). Druga pomanjkljivost metode posredne imunofluorescence so križne reakcije. Te nastanejo zaradi nespecifične vezave protitelesa na podobne epitope različnih antigenov. Križne reakcije so

pogoste med virusom LCMV in virusom Lassa oz. z ostalimi sorodnimi arenavirusi Starega sveta (Vozelj, 2000; Rollin in sod., 2007).

Metoda posredne imunofluorescence je hitra, zanesljiva in enostavna metoda, ki temelji na zaznavanju specifičnih protivirusnih protiteles IgG. Protitelesa IgG se ne pojavijo takoj po okužbi, zato je za dokaz akutne okužbe, potreben parni serum. Titer IgG določamo na začetku bolezni ter ponovno čez dva do tri tedne, ko bolnik že okreva. Štirikratni porast titra protiteles IgG je dokaz za akutno prebolelo okužbo. Protitelesa IgM se pojavijo takoj po okužbi, vendar sčasoma izzvenijo, zato drugi vzorec seruma ni potreben. Dokaz protiteles IgM je dovolj za potrditev akutne okužbe. Za določitev protiteles poleg posredne imunofluorescence uporabljajo še encimskoimunsko metodo (Charrel in de Lamballerie, 2002).

2.7.2 Zdravljenje

Okužba z virusom LCMV običajno poteka asimptomatsko oz. z zelo blagimi neizrazitimimi bolezenskimi znaki, zato zdravljenje ni potrebno. Simptomatsko zdravimo hujše znake bolezni, kot je meningitis. Specifično zdravljenje s protivirusnimi zdravili (ribavirin) je na voljo in zelo učinkovito na začetku bolezni. Kljub vsemu je simptomatsko zdravljenje zadostno za ozdravitev okužbe z virusom LCMV. Možnost za okužbo zmanjšamo z redno deratizacijo in higieno bivalnih ter gospodarskih objektov (Charrel in de Lamballerie, 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

Testirali smo 296 vzorcev serumov in 310 vzorcev tkiv malih sesalcev, ki so naravni in naključni gostitelji virusa LCMV (Priloga A1 do A7). Naravni gostitelj je hišna miš, naključni gostitelji pa so iz drugih rodov ali družin glodavcev ter žužkojedov (rumenogrla miš, gozdna voluharica, navadni polh in gozdna rovka). Pri vzorcih hišne miši smo RNA izolirali iz vranice, ledvice in pljuč, pri naključnih gostiteljih pa smo RNA izolirali samo iz vranice.

Uporabili smo vzorce živali iz zbirke Laboratorija za diagnostiko zoonoz, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo. V diplomsko nalogu smo vključili vzorce živali iz 5 regij v Sloveniji in sicer: Gorenjsko regijo (lokacija: Tenetiše – smetišče), Podravsko regijo (lokacija: Pohorje, nadmorska višina do 1500 m), Notranjsko – Kraško regijo (lokacija: Cerknica), Osrednje-slovensko regijo (lokacija: Rakovnik in Ig) in Savinjsko regijo (lokacija: Vransko).

Pri terenskem delu smo sodelovali s Prirodoslovnim muzejem Slovenije. Na lokacijah Pohorje in Rakovnik so glodavce lovili v dveh različnih letih, medtem ko so na ostalih lokacijah lovili živali le v posameznih letih. Na Pohorju so glodavce lovili leta 2005 in 2007, na Rakovniku pa 2006 in 2007. Vzorce glodavcev smo razdelili na dve skupini: na vzorce naravnega gostitelja in na vzorce naključnih gostiteljev.

Živali so lovili z živilovkami ter jih humano žrtvovali v laboratoriju. Sterilno so jim odvzeli kri in notranje organe (srce, jetra, pljuča, vranica, ledvica, sečni mehur). S centrifugiranjem so ločili serum od krvi in ga shranili na – 20 °C, odvzete organe so natančno označili in shranili na – 80 °C.

3.2 METODE

3.2.1 Metoda posredne imunofluorescence

Predmetna stekelca z nanešenim antigenom smo pripravili v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz. Na celični kulturi celic L929 smo namnožili virus LCMV, sev Armstrong, in ga uporabili kot antigen za dokazovanje protiteles IgG proti virusu LCMV.

Predmetna stekelca z nanešenim antigenom shranjujemo na – 20 °C. Pred uporabo smo predmetnike vzeli iz zamrzovalnika, jih postavili na staničevino in počakali 15 minut, da so se odtalila in posušila.

Serume smo redčili v mikrotitracijski ploščici v razmerju 1:10 s fosfatnim pufrom (PBS, angl. phosphate buffered saline). Predmetnik smo položili v vlažno komoro in dodali 7 µL redčenega seruma na preiskovalno polje. Za pozitivno kontrolo smo uporabili monoklonsko protitelo proti virusu LCMV (Biodesign International, Meridian Life Science, Ohio, ZDA), ki smo ga direktno nanesli na predmetnik. Kot negativno kontrolo smo uporabili pufer PBS.

Vlažno komoro s predmetnikom smo inkubirali v inkubatorju (Kambič, Semič, Slovenija) 30 minut pri 37 °C. Po inkubaciji smo predmetnik nežno oplaknili s pufrom PBS in pri tem pazili, da curek ni tekel neposredno čez opazovalna polja. Postavili smo ga v kadičko za spiranje predmetnih stekelc in spirali 3-krat po 5 minut. Nato smo predmetnik nežno oplaknili z destilirano vodo in pustili, da se posuši na sobni temperaturi.

Na suh predmetnik smo nato nanesli 7 µL konjugata (zajčja protitelesa razreda IgG proti mišjim protitelesom; Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, ZDA), ki smo ga predhodno redčili v razmerju 1:128 (600 µL PBS, 35 µL Evansovega modrila, 5µL konjugata). Ponovno smo predmetnike inkubirali v inkubatorju (Kambič) 30 minut pri 37 °C.

Ponovili smo korak spiranja in sušenja. Nato smo na suho stekelce nakapljali nekaj kapljic reagenta Mounting Media (Sigma – Aldrich) in pokrili s krovnim stekelcem tako, da smo izpodrinili zračne mehurčke. Tako pripravljen predmetnik smo mikroskopirali s

fluorescentnim mikroskopom pri 400x povečavi. Kot pozitivni rezultat smo določili tiste vzorce, ki so imeli značilno fluorescenco znotraj celice.

Za določanje titra protiteles pozitivnih vzorcev smo pripravili redčitveno vrsto. Serum smo redčili s pufom PBS in sicer: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 in 1:640. Vsako redčino smo nato ponovno pripravili za mikroskopiranje s fluorescentnim mikroskopom, da smo lahko določili titer protiteles.

3.2.2 Izolacija celokupne RNA z reagentom Trizol

RNA (RNA, angl. ribonucleic acid) je izredno občutljiva molekula. Glavni problem izolacije predstavljajo RNAAze. RNAAze so encimi, ki hitro in učinkovito razgradijo RNA molekule. So splošno razširjene, zato je za uspešno izolacijo RNA izredno pomembno, da jih iz vzorcev odstranimo. Reagent Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carsbad, Kalifornija, ZDA) je reagent za izolacijo celokupne RNA iz celic in tkiv. Med homogenizacijo vzorca ohranja integriteto RNA. S kloroformom ločimo vodno in organsko fazo. RNA se nahaja v vodni fazi, ki jo nato oborimo z izopropanolom in speremo z 75 % etanolom.

Izolacijo smo izvajali v aseptični komori. Uporabili smo le avtoklavirane pripomočke (pincete, rezila), ki smo jih pred začetkom dela dodatno razkužili s 5 % natrijevim hipokloridom in raztopino, ki inaktivira delovanje RNAAz (Rnase Free Solution; Qbiogene Inc., Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Kot dodatni ukrep za preprečevanje razgradnje in kontaminacije RNA priporočajo pogosto menjavanje rokavic in uporaba UV luči v aseptični komori, ko ta ni v uporabi.

Pred začetkom dela smo aseptično komoro in vse pripomočke obrisali s 5 % natrijevim hipokloridom in raztopino, ki odstranjuje encime RNAAze.

Pripravili smo sterilno 2 mL tubico, ki smo jo natančno označili, odpipetirali 200 µL filtriranega pufra PBS ter dodali sterilno kroglico. Nato smo na očiščenem objektnem stekelcu odrezali košček tkiva ledvice ali vranice ($\sim 25 \text{ mg}$ ali 1 mm^3) in ga prenesli v tako pripravljeno 2 mL sterilno tubico. Vzorec smo homogenizirali v homogenizatorju (Tissue Lyser; Qiagen, Hilden, Nemčija).

Po končani homogenizaciji, smo odstranili kroglico in dodali 600 µL hladnega (4 °C) reagenta Trizol (Invitrogen). Vzorce smo premešali s sunkovitim obračanjem in vorteksiranjem, ter jih inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. S tem smo omogočili razgradnjo celic in razpad nukleoproteinskih kompleksov. Vzorcu smo dodali 120 µL kloroform, ponovno smo vsebino sunkovito premešali in vorteksirali, ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 15 000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo dobili v tubici tri ločene plasti.

Pripravili smo nove 1,5 mL sterilne tubice, ki smo jih prav tako natančno označili. Po končanem centrifugiranju smo previdno prenesli zgornjo (vodno fazo) plast v nove 1,5 mL tubice. Pri tem smo pazili, da se nismo dotaknili stene tubice in beljakovinskega obroča med vodno in organsko fazo. Beljakovine se nahajajo v srednji plasti in tvorijo bel obroč med vodno in organsko fazo. V vodni fazi se nahaja RNA, v organski pa DNA (DNA, angl. deoxyribonukleic acid). Preostanek smo zavrgli v poseben zabožnik za organska topila.

Vodni fazi smo dodali 300 µL hladnega (- 20 °C) izopropanola. Zopet smo sunkovito premešali, vorteksirali in ponovno centrifugirali 15 minut, pri 4°C in 15000 rpm. Po centrifugiranju smo odstranili čim več supernatanta. Dodali smo 600 µL hladnega (- 20 °C) 75 % etanola in vorteksirali 1 minuto ter ponovno centrifugirali 7 minut, pri 4 °C in 12000 rpm.

Ponovno smo odstranili čim več supernatanta in RNA posušili v aseptični komori, približno 30 – 40 minut. Posušeno RNA smo resuspendirali v 30 – 50 µL vode brez nukleaz. Izolirano RNA smo takoj analizirali ali pa shranili na – 20 °C oz. – 80 °C.

V vzorcih malih sesalcev smo pričakovali nizko prevalenco virusa LCMV (Kallio – Kokko in sod., 2005; Laakkonen in sod., 2006), zato smo izolirano RNA pred uporabo združili v skupine. V posamezno skupino smo združili 10 vzorcev RNA, ki smo jo izolirali iz glodavcev iz istih lokacij. V skupino smo dodali najmanj 5 µL RNA iz vsakega vzorca.

3.2.3 Enostopenjski RT – PCR v realnem času

Za dokazovanje virusa LCMV smo uporabili RT-PCR v realnem času. Protokol nam je posredoval dr. Marcus Panning iz Inštituta za tropsko medicino Bernhard – Nocht, Hamburg, Nemčija.

Po njegovih navodilih smo za dokazovanje virusa LCMV uporabili specifična začetna oligonukleotida LCMVS ($5' - \text{GGGATCCTAGGCTTTGGAT} - 3'$) in LCMVAS ($5' - \text{GCACAATAATGACAATGTTGAT} - 3'$) ter sondu LCMVP ($5' - \text{FAM} - \text{CCTCAAACATTGTCACAATCTGACCCAT} - \text{TAMRA} - 3'$). Začetna oligonukleotida prilegata na tarčno zaporedje gena NP, ki se nahaja na segmentu S. Prvi začetni oligonukelotid (LCMVS) prilega na mesto 8 – 28, drugi (LCMVAS) na mesto 132 – 153. Hidrolizirajoča sonda (LCMVP) prilega med prvim in drugim začetnim oligonukleotidom na mestu 78 – 105. Pomnoževali smo 146 bp dolg pridelek.

Za pripravo reakcijske mešanice smo uporabili komplet reagentov SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen). Za pozitivno kontrolo smo uporabili izolirano RNA iz virusa LCMV, sev Armstrong, namnoženega na celični kulturi iz celic L929. Negativna kontrola je bila reakcijska mešanica brez dodane RNA.

Izolirano RNA smo združili v skupine. Posamezna skupina je bila sestavljena iz desetih vzorcev izolirane RNA in te skupine smo nato analizirali z metodo RT – PCR v realnem času. Posamezno smo analizirali vse vzorce pri katerih smo dokazali protitelesa IgG proti virusu LCMV in vse vzorce hišnih miši.

Za analizo enega vzorca RNA oz. skupine združenih RNA vzorcev smo potrebovali $25 \mu\text{L}$ reakcijske mešanice, ki je vseboval:

- $12,5 \mu\text{L}$ 2x koncentrirane reakcijske mešanice
- $0,3 \mu\text{L}$ začetnega oligonukleotida LCMVS ($50 \mu\text{M}$)
- $0,3 \mu\text{L}$ začetnega oligonukleotida LCMVAS ($50 \mu\text{M}$)
- $0,25 \mu\text{L}$ sonde LCMVP FAM-TAMRA ($20 \mu\text{M}$)

- 0,5 µL SSIII RT Platinum Taq Mix
- 6,15 µL sterilizirane in deionizirane vode
- 5 µL RNA posameznega vzorca ali skupine združenih RNA vzorcev

Reakcija je potekala v aparaturi Rotor Gene (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Avstralija). Najprej je potekla reakcija prepisa RNA molekule v cDNA z encimom reverzne transkriptaze in sicer 30 minut pri 50 °C. Sledila je inaktivacija encima RT in aktivacija polimeraze Platinum (4 minute pri 95 °C). Sledilo je 45 pomnoževalnih cikov; 15 sekund pri 95 °C za potek denaturacije dvostranske DNA, nato 60 sekund pri 57 °C za prileganje začetnih oligonukleotidov, pomnoževanje pridelka in branje fluorescence v oknu z valovno dolžino FAM (λ_{ex} : 492 nm, λ_{em} : 517).

4 REZULTATI

Z metodo posredne imunofluorescence smo pregledali 296 serumov, z metodo RT-PCR v realnem času pa 310 vzorcev tkiv malih sesalcev. Vzorce smo razdelili v dve skupini: na vzorce naravnih in naključnih gostiteljev. Vzorce živali smo izbrali iz 5 različnih regij Slovenije. V okvirju teh regij smo izbrali 6 različnih lokacij in sicer: Rakovnik, Ig, Cerknica, Tenetiše, Vransko in Pohorje (Slika 11). Izmed 296 vzorcev serumov je bilo 6 serumov hišnih miši, 197 serumov rumenogrle miši, 88 serumov gozdne voluharice in 1 vzorec seruma navadnega polha. Z metodo RT – PCR v realnem času smo pregledali 10 vzorcev tkiv hišnih miši, 202 vzorca rumenogrilih miši, 91 vzorcev gozdne voluharice, 6 vzorcev gozdne rovke in 1 vzorec tkiva navadnega polha.



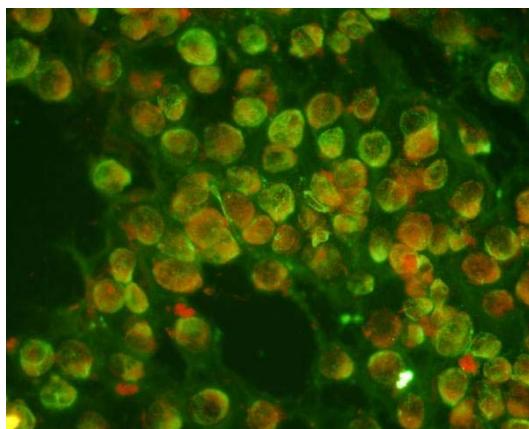
Slika 11: Prikaz lokacij ulovljenih malih sesalcev.

Z metodo posredne imunofluorescence smo pri 17 vzorcih od 296 potrdili prisotnost protiteles proti virusu LCMV. Prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV je 5,7 %. Pri vzorcih hišne miši smo RNA izolirali iz vranice, ledvice in v enem primeru iz pljuč. Iz

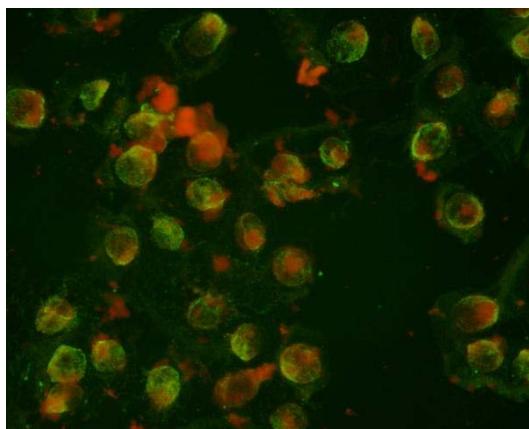
vzorcev naključnih gostiteljev smo RNA izolirali le iz vranice. Z metodo RT – PCR v realnem času nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata.

4.1 REZULTATI METODE POSREDNE IMUNOFLUORESCENCE

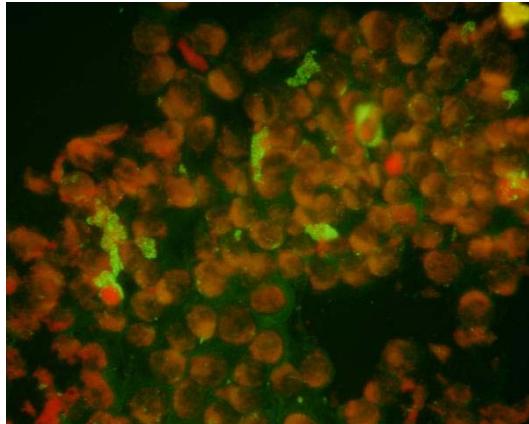
Z metodo posredne imunofluorescence smo testirali 296 serumov malih sesalcev vrst hišne miši, rumenogrlene miši, gozdne voluharice, polha in gozdne rovke. Rezultate smo razdelili na prekuženost naravnega in naključnega gostitelja z virusom LCMV.



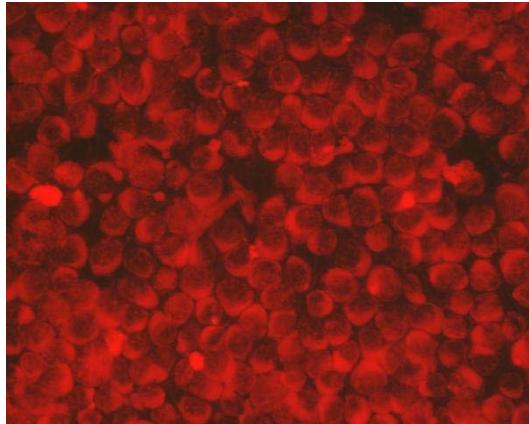
Slika 12: Pozitiven rezultat – hišna miš, redčina 1:10



Slika 13: Pozitiven rezultat – hišna miš, redčina 1:40



Slika 14: Pozitiven rezultat – gozdna voluharica, redčina 1:10



Slika 15: Negativen rezultat

Podajanje rezultatov metode posredne imunofluorescence je bilo težavno zaradi nespecifičnih, križnih reakcij pri naravnem gostitelju in še težje določljivo pri naključnem gostitelju. Kot pozitiven rezultat smo določili tiste vzorce hišnih miši, pri katerih smo na predmetniku zaznali značilno fluorescenco znotraj celic (Slika 12). Fluorescenza je z redčenjem vzorca upadala, kar je prikazano na Sliki 13. Pri naključnem gostitelju je bila fluorescenza enaka, vendar šibkejša (Slika 14). Slika 15 prikazuje negativni rezultat metode posredne imunofluorescence.

4.1.1 Rezultati metode posredne imunofluorescence naravnega gostitelja, hišne miši

V zbirki živalskih vzorcev Laboratorija za diagnostiko zoonoz, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo so imeli le 10 vzorcev hišne miši. S serološko metodo smo testirali 6 vzorcev hišnih miši (Preglednica 1), ker pri 4 vzorcih ni bilo na voljo seruma. Pri eni hišni miši smo dokazali protitelesa IgG proti virusu LCMV. Prekuženost naravnega gostitelja z virusom LCMV tako znaša 16,7 %.

Preglednica 1: Število hišnih miši testiranih z metodo posredne imunofluorescence.

Lokacija	Leto	<i>Mus musculus</i>	
		Št. vseh	Št. pozitivnih
Ljubljana	1998	4	1
Dekani	2004	1	0
Rakovnik	2007	1	0
Skupaj		6	1 (16,7 %)

4.1.2 Rezultati metode posredne imunofluorescence naključnih gostiteljev

Prekuženost virusa LCMV naključnih gostiteljev je zbrana v Preglednici 2 in znaša 5,5 %. Od tega je prekuženost rumenogrle miši z virusom LCMV 4,6 %, gozdne voluharice pa 6,8 %. Najvišja prekuženost rumenogrle miši in gozdne voluharice z virusom LCMV je na Vranskem (9,8%) in Rakovniku (12 %). Dokazali smo še 1 pozitivno gozdno rovko, ter testirali en vzorec navadnega polha, ki je bil negativen.

Preglednica 2: Število malih sesalcev testiranih z metodo posredne imunofluorescence.

Lokacija	Leto	<i>G. glis</i>		<i>A. flavicollis</i>		<i>S. araneus</i>		<i>M. glareolus</i>		Skupaj	
		Št. vseh	Št. pozitivnih	Št. vseh	Št. pozitivnih	Št. vseh	Št. pozitivnih	Št. vseh	Št. pozitivnih	Št. vseh	Št. pozitivnih
Ig	2005	0	0	8	0	0	0	2	0	10	0
Cerknica	2006	0	0	30	2 (6,6%)	2	1 (50%)	10	0	42	3 (7,1%)
Tenetiše	2007	0	0	33	1 (3%)	0	0	9	0	42	1 (2,4%)
Vransko	2007	0	0	41	4 (9,8%)	0	0	8	0	49	4 (8,2%)
Pohorje	2005	1	0	3	0	1	0	1	0	6	0
	2007	0	0	5	0	0	0	8	0	13	0
Pohorje skupaj		1	0	8	0	1	0	9	0	19	0
Rakovnik	2006	0	0	10	1 (10%)	1	0	15	2 (13,3%)	26	3 (11,5%)
	2007	0	0	67	1 (1,5%)	0	0	35	4 (11,4%)	102	5 (4,9%)
Rakovnik skupaj		0	0	77	2 (2,6%)	1	0	50	6 (12%)	128	8 (6,3%)
Skupaj		1	0	197	9 (4,6%)	4	1 (25%)	88	6 (6,8%)	290	16 (5,5%)

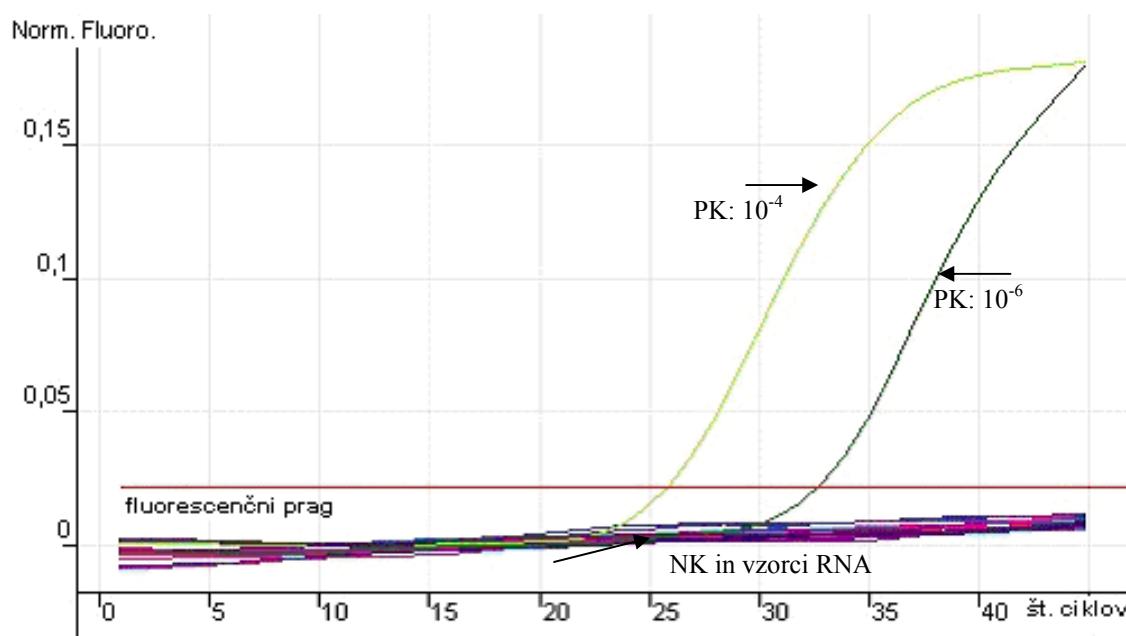
Na lokaciji Ig in Pohorje nismo dokazali protiteles proti virusu LCMV pri naključnih gostiteljih. Prekuženost naključnih gostiteljev z virusom LCMV na lokaciji Cerknica znaša 7,1 %. Pozitivni sta bili 2 od 30 (6,6 %) rumenogrilih miši in 1 gozdna rovka od dveh. Na Tenetišah je prekuženost naključnih gostiteljev z virusom LCMV 2,4 %, na Vranskem 8,2 % in v Rakovniku 6,3 %. Znotraj lokacij Pohorje in Rakovnik smo testirali vzorce malih sesalcev iz dveh različnih let. Na lokaciji Rakovnik je prekuženost z virusom LCMV za leto 2006 11,5 %, za leto 2007 pa 4,9 %. Skupna prekuženost naravnega in naključnega gostitelja je 5,7 %.

4.2 REZULTATI RT-PCR V REALNEM ČASU

Z molekularno metodo RT – PCR v realnem času smo pregledali vzorce 310 malih sesalcev. Pregledali smo 10 vzorcev hišne miši (naravni gostitelj) in 300 vzorcev naključnih gostiteljev (rumenogrla miš, gozdna voluharica, navadni polh in gozdna rovka).

RNA smo pri vzorcih hišne miši osamili po postopku z reagentom Trizol (Invitrogen) iz tkiva vranice ali ledvice in v enem primeru iz pljuč. Pri naključnih gostiteljih smo RNA osamili samo iz tkiva vranice. Izolirano RNA smo združili v skupine, ker smo pričakovali nizko prekuženost naravnih gostiteljev z virusom LCMV (Kallio – Kokko in sod., 2005; Laakkonen in sod., 2006). V posamezno skupino smo vključili 10 vzorcev RNA (5 µL vsakega vzorca; skupaj 50 µL posamezne skupine). Vzorce smo združevali v skupine glede

na lokacijo, kjer smo lovili male sesalce. Za pozitivno kontrolo smo uporabili dve redčini (10^{-4} in 10^{-6}) izolirane RNA iz virusa LCMV, sev Armstrong, namnoženega na celični kulturi celic L929. Negativna kontrola je bila reakcijska mešanica brez RNA (Slika 16).



Slika 16: Prikaz pomnoževanja izolirane RNA z metodo RT – PCR v realnem času.

Vzorce RNA, katerih pripadajoči serumi so imeli protitelesa IgG proti virusu LCMV, in vse vzorce RNA izoliranih hišnih miši, smo pregledali posamezno.

4.2.1 Rezultati RT – PCR v realnem času naravnega gostitelja, hišne miši

Preglednica 3 prikazuje rezultate, ki smo jih dobili s testiranjem hišnih miši z RT – PCR v realnem času. Vsi vzorci hišnih miši pregledanih z RT – PCR v realnem času so bili negativni.

Preglednica 3: Število preiskanih hišnih miši z metodo posredne imunofluorescence in RT – PCR v realnem času

Lokacija	<i>Mus musculus</i>			
	Rezultati metode posredne imunofluorescence		Rezultati RT- PCR v realnem času	
	Št. vseh	Št. pozitivnih	Št. vseh	Št. pozitivnih
Ljubljana	4	1	6	0
Dekani	1	0	1	0
Rakovnik	1	0	1	0
/	0	0	2	0
Skupaj	6	1	10	0

4.2.2 Rezultati RT – PCR V realnem času naključnih gostiteljev

Rezultati naključnih gostiteljev testiranih z metodo RT – PCR v realnem času so zbrani v Preglednici 4. Izmed vseh testiranih RNA vzorcev nismo v nobeni skupini dokazali virusne RNA. Podrobnejši prikaz vzorcev združenih v skupine, rezultatov metode posredne imunofluorescence in RT – PCR v realnem času je razviden iz Priloge A1 do A7.

Preglednica 4: Prikaz števila serološko pozitivnih malih sesalcev, analiziranih z RT-PCR v realnem času.

Vrsta	Rezultati metode posredne imunofluorescence		Rezultati RT- PCR v realnem času	
	Št. vseh	Št. pozitivnih	Št. vseh	Št. pozitivnih
<i>A. flavigollis</i>	197	9	202	0
<i>M. glareolus</i>	88	6	91	0
<i>S. araneus</i>	4	1	6	0
<i>G. glis</i>	1	0	1	0
Skupaj	290	16	300	0

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Virus LCMV je bil prvi arenavirus, ki so ga uspeli osamiti in kultivirati (Armstrong in Lille, 1934). Arenaviruse delimo na viruse Starega in viruse Novega sveta. Virus LCMV uvrščamo med arenaviruse Starega sveta. Je edini iz skupine arenavirusov, ki je razširjen po celiem svetu. Tako obširno geografsko razširjenost mu omogoča prav tako globalno razširjen naravni gostitelj, hišna miš. Kljub temu, da hišno miš najdemo na vseh celinah, je njena prisotnost pogojena z ljudmi, saj se njen življenjski prostor tesno prepleta s človeškim (Peters in sod., 1996; Kryštufek, 1991).

Virus LCMV se med gostitelji prenaša horizontalno in vertikalno, vendar najverjetneje le vertikalna okužba povzroča doživljenjsko izločanje virusa v okolje. Človek se z virusom LCMV najpogosteje okuži, če pride v stik z mišjimi izločki ali okuženimi hrčki, ki prav tako prenašajo virus LCMV (Gonzalez in sod., 2007; Krauss in sod., 2003). Pri človeku virus LCMV povzroča blažjo obliko bolezni, ki ima znake podobne gripi ali težjo obliko, ki se kaže z meningitisom (Peters in sod, 1996).

Poleg naravega gostitelja lahko virus LCMV okuži tudi druge male sesalce kot so rumenogrle miši, gozdne rovke, voluharice in polhi. Tem gostiteljem pravimo naključni gostitelji in pri njih je okužba z virusom LCMV prehodne narave. Do okužb med različnimi gostitelji prihaja zaradi prekrivajočega se življenjskega prostora (Gonzalez in sod., 2007, Kraus in sod., 2003).

Z diplomsko nalogo smo žeeli dokazati, da se virus LCMV nahaja pri malih sesalcih v Sloveniji. Pilotsko študijo, ki so jo opravili pri gozdnih delavcih leta 2002, je nakazovala na prisotnost virusa LCMV v Sloveniji. V nalogu smo poleg naravnega gostitelja, hišne miši, vključili še druge, naključne gostitelje, pri katerih virus LCMV prav tako kroži. Do okužb med naravnimi in naključnimi gostitelji prihaja zaradi prekrivajočega se življenjskega prostora hišne miši in drugih malih sesalcev (Gonzalez in sod., 2007; Kraus in sod., 2003).

V diplomsko nalogu smo vključili vzorce malih sesalcev, ki smo jih lovili na 6 različnih lokacijah in sicer: Ig, Rakovnik, Cerknica, Tenetiše, Vransko in Pohorje. Skupaj smo pregledali 310 malih sesalcev, od tega 10 vzorcev hišnih miši in 300 vzorcev naključnih gostiteljev.

Za dokaz protiteles proti virusu LCMV smo uporabili metodo posredne imunofluorescence. Metoda je zelo hitra, zanesljiva in specifična. Za interpretacijo rezultatov metode potrebujemo izkušeno osebo, kajti velik problem predstavljajo nespecifične križne reakcije (Vozelj, 2000).

Izmed 296 serološko pregledanih vzorcev je bilo 17 (5,7 %) pozitivnih. Protitelesa proti virusu LCMV smo dokazali pri naravnem gostitelju, hišni miši in pri naključnih gostiteljih kot so rumenogrla miš, gozdna voluharica in gozdna rovka.

Z metodo posredne imunofluorescence smo pregledali 6 vzorcev hišne miši (naravni gostitelj), od katerih je bil 1 vzorec pozitiven. Prekuženost hišne miši z virusom LCMV je 16,6 %, vendar nerealna zaradi tako majhnega števila analiziranih vzorcev. Vpogled v dejansko stanje prekuženosti hišne miši z virusom LCMV bi dobili s testiranjem večjega števila hišnih miši (Becker in sod., 2006; Lledó in sod., 2003).

Z isto serološko metodo smo pregledali 290 vzorcev naključnih gostiteljev. Prekuženost naključnih gostiteljev z virusom LCMV je 5,5 %. Pregledali smo 197 vzorcev rumenogrle miši (9 pozitivnih; 4,6 %), 88 vzorcev gozdne voluharice (6 pozitivnih; 6,8 %), 4 vzorce gozdne rovke (1 pozitivna) in 1 vzorec navadnega polha, ki je bil negativen. Prekuženost naključnih gostiteljev z virusom LCMV znotraj posamezne vrste je smiselno podajati le v primeru rumenogrle miši (4,6 %) in gozdne voluharice (6,8 %). Pri gozdni rovki in navadnem polhu, ni smiselno govoriti o odstotku prekuženosti, ker je bilo testiranih premalo vzorcev.

Skupna prekuženost naravnega in naključnega gostitelja z virusom LCMV znaša 5,7%. Vzorce malih sesalcev smo imeli iz različnih lokacij Slovenije. Lokalna prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV znotraj Slovenije se giblje 2,4 – 8,2 %. Najnižjo prekuženost

malih sesalcev z virusom LCMV najdemo v Tenetišah, kjer je 2,4 %, 6,3 % v Rakovniku, 7,1 % v Cerknici in najvišja na Vranskem 8,2 %. Na Pohorju in Igu nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata z metodo posredne imunofluorescence. Za Pohorje je to pričakovani rezultat, zaradi izoliranosti lokacije in manjšega prekrivanja življenjskega prostora hišne miši z drugimi glodavci. Lokalna in skupna prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV v Sloveniji se ujema z že objavljenimi podatki v Turčiji (2,4 %) (Laakkonen in sod., 2006), Nemčiji (3,6 %) (Ackerman in sod., 1964), Veliki Britaniji (4 %) (Becker in sod., 2006), Italiji (5,6 %) (Kallio – Kokko in sod., 2005) in Španiji (9 %) (Lledó in sod., 2003).

Znotraj lokacije Pohorje in Rakovnik smo imeli vzorce iz dveh različnih let. Iz lokacije Pohorje smo imeli 6 vzorcev malih sesalcev iz leta 2005 in 13 iz leta 2007. Pri nobenem vzorcu nismo našli protiteles proti virusu LCMV. Na lokaciji Rakovnik je prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV za leto 2006 znašala 11,5 %, za leto 2007 pa 4,9 %. Takšna velika razlika med letoma je posledica različnega števila pregledanih vzorcev. Iz leta 2006 smo imeli na voljo 26 vzorcev, leta 2007 pa 102. Vsekakor nam vzorci iz leta 2007 in skupna prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV na Rakovniku, dajeta bolj realistično sliko.

Z molekularno metodo RT – PCR v realnem času smo pregledali vzorce 310 malih sesalcev. Rezultati RT – PCR v realnem času so bili vsi negativni, vključno z vzorci, pri katerih smo dokazali prisotnost protiteles proti virusu LCMV. Z molekularno metodo tako nismo mogli dokazati virusa LCMV pri naravnem ali naključnem gostitelju. Podobne rezultate so dobili Laakkonen in sod. (2006), kjer so poleg metode posredne imunofluorescence za dokaz protiteles proti virusu LCMV pri malih sesalcih, uporabili še molekularno metodo RT – PCR, s katero virusa LCMV niso dokazali.

Razloge za negativne rezultate tudi pri serološko pozitivnih vzorcih, lahko pojasnimo s tem, da so kronični nosilci virusa LCMV le tiste hišne miši, ki se okužijo z virusom LCMV ob skotitvi. Pri naključnih gostiteljih, kjer je prenos virusa horizontalen, je okužba prehodne narave in virus LCMV se doživljenjsko ne ohranja v telesu gostitelja (Gonzalez in sod., 2007, Kraus in sod., 2003).

Za analizo vzorcev RT – PCR v realnem času smo uporabili specifične začetne oligonukleotide za virus LCMV. Mogoče bi bilo smiselno uporabiti manj specifične začetne oligonukleotide za arenaviruse, da bi ugotovili ali imamo nov genotip virusa LCMV ali drugo vrsto, sorodno virusu LCMV.

Diplomska naloga daje prvi preliminaren vpogled v razširjenost virusa LCMV pri malih sesalcih v Sloveniji.

5.2 SKLEPI

- Virus LCMV je prisoten pri malih sesalcih v Sloveniji.
- Z metodo posredne imunofluorescence smo dokazali protitelesa proti virusu LCMV pri naravnem gostitelju (*Mus musculus*) in pri treh naključnih gostiteljih (*Apodemus flavicollis*, *Myodes glareolus* in *Sorex araneus*).
- Prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV v Sloveniji je 5,7 %. Lokalna prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV po posameznih lokacijah se giblje od 2,4 % do 8,2 %.
- Virusa LCMV z molekularno metodo RT – PCR v realnem času nismo dokazali v nobenem vzorcu.
- Diplomska naloga daje preliminaren vpogled v razširjenost virusa LCMV pri malih sesalcih v Sloveniji.

6 POVZETEK

Virus limfocitnega horiomeningitisa (LCMV) je prvi odkrit arenavirus. Družino *Arenaviridae* delimo na viruse Starega in Novega sveta. Virus LCMV uvrščamo med arenaviruse Starega sveta (Salvato in sod., 2005). Naravni gostitelj virusa LCMV je hišna miš, *Mus musculus*. Med gostitelji se virus LCMV prenaša horizontalno in vertikalno, vendar naj bi samo vertikalni prenos zagotavljal kronične nosilce. Pri naravem gostitelju povzroča trajno, asimptomatsko okužbo. Poleg naravnih gostiteljev lahko virus LCMV okuži tudi naključne gostitelje, pri katerih je okužba prehodne narave (Gonzalez in sod., 2007; Kraus in sod., 2003).

Leta 2002 so v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz naredili pilotsko raziskavo o prekuženosti gozdnih delavcev z virusom LCMV v Sloveniji. Ta raziskava nam je služila kot povod, da izvedemo pilotsko testiranje malih sesalcev v Sloveniji na prisotnost virusa LCMV. Uporabili smo vzorce malih sesalcev iz zbirke Laboratorija za diagnostiko zoonoz. Vzorci so bili iz 5 različnih regij v Sloveniji in sicer: iz Gorenjske, Podravske, Notranjsko – Kraške in Osrednjeslovenske regije ter Savinjske doline. Vzorce malih sesalcev smo razdelili na vzorce naravnih in naključnih gostiteljev. Za dokaz protiteles proti virusu LCMV smo uporabili metodo posredne imunofluorescence, za neposreden dokaz pa RT – PCR v realnem času. Z metodo posredne imunofluorescence smo pregledali 6 vzorcev serumov hišne miši (1 vzorec pozitiven) in 290 vzorcev serumov naključnih gostiteljev. Od tega je bilo 197 serumov rumenogrlih miši (*Apodemus flavicollis*); 9 je bilo pozitivnih (4,6 %), 88 serumov gozdnih voluharic (*Myodes glareolus*); 6 pozitivnih (6,8 %), 4 vzorci gozdne rovke (*Sorex araneus*); 1 pozitiven in 1 vzorec seruma navadnega polha (*Glis glis*), ki je bil negativen. Prekuženost malih sesalcev z virusom LCMV v Sloveniji je 5,7 %, lokalna prekuženost pa se giblje med 2,4 – 8,2 %. Z RT – PCR v realnem času smo pregledali vzorce 310 malih sesalcev. Od tega je bilo 10 vzorcev hišne miši in 300 vzorcev naključnih gostiteljev. Vsi vzorci so bili negativni, vključno s tistimi, pri katerih smo dokazali protitelesa proti virusu LCMV. Diplomska naloga daje preliminaren vpogled v razširjenost virusa LCMV pri malih sesalcih.

7 VIRI

- Ackermann R., Bloedhorn H., Kupper B., Winkens I., Scheid W. 1964. Spread of the lymphocytic choriomeningitis virus among West German mice. Investigations mostly on domestic mice (*Mus musculus*). Zentralblatt für Bakteriologie, 194: 407 – 430.
- Andera M. 2007. Navadni polh. V: Polh in človek. Flajšman B., Kryštufek B. (ur.). Ljubljana, Ekološki forum LDS, Liberalna akademija: 1 – 1.
- Armstrong C, Lillie R.D. 1934. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Public Health Reports, 49: 1019 – 1027.
- Avšič-Županc T. 2002. Posredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 119 – 128.
- Asper M., Hofmann P., Osmann C., Funk J., Metzger C., Bruns M., Kaup F.J., Schmith H., Günter S. 2001. First outbreak of Callitrichid hepatitis in Germany: Genetic characterization of the causative lymphocytic choriomeningitis virus strains. Virology, 284: 203 – 213.
- Barton L.L., Mets M.B. 2001. Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. Clinical Infectious Diseases, 33: 370 – 374.
- Becker S.D., Bennett M., Stewart J.P., Hurst J.L. 2007. Serological survey of virus infection amoong wild house mice (*Mus domesticus*) in the UK. Laboratory Animals, 41: 229 – 238.
- Bowen M.D., Peters C.J., Nichol S.T. 1997. Phylogenetic analysis of the *Arenaviridae*: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent host. Molecular Phylogenetics and Evolution, 8: 301 – 316.
- Buchmeier M.J. 2002. Arenaviruses: protein structure and function. Current Topics in Microbiology and Immunology, 262: 159 – 173.
- Buckley S.M., Casals J. 1970. Lassa fever: a new virus disease of man from West Africa. III. Isolation and characterization of the virus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 19: 680 – 691.
- Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25: 169 – 193.

- Calisher C.H., Tzianabos T., Lord R.D., Coleman P.H. 1970. Tamiami virus, a new member of the TaCaribe group. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 19: 520 – 526.
- Cao W., Henry M.D., Borrow P., Yamada H., Elder J.H., Ravkov E., Nichol S.T., Compans R.W., Campbell K.P., Oldstone B.A. 1998. Identification of alfa-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*, 282: 2079 – 2081.
- Center for Disease Control and Prevention Atlanta. 2005. Lymphocytic choriomeningitis virus infection in organ transplant recipients, Massachusetts Rhode Island. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 54: 537 – 539.
- Charrel R.N., Feldmann H., Fulhorst C.F., Khelifa R., de Chesse R., de Lamballerie X. 2002. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296: 1118 – 1124.
- Charrel R.N., de Lamballerie. 2002. Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Research* 57: 89 – 100.
- Charrel R.N. de Lamballerie X., Fullhorst C.F. 2001. The Whitewater Arroyo virus: natural evidence for genetic recombination among Tacaribe serocomplex viruses (family *Areaviridae*). *Virology*, 283: 161 – 166.
- Childs J.E., Glass G.E., Korch G.W., Ksiazek T.G., Leduc J.W. 1992. Lymphocytic choriomeningitis virus infection and house mouse (*Mus musculus*) distribution in urban Baltimore. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47: 27 – 34.
- Dalton A.J., Rowe W.P., Smith G.H., Wilsnack R.E., Pugh W.E. 1968. Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology*, 2: 1465 – 1478.
- Dobec M., Dzelalija B., Punda – Polic V., Zoric I. 2006. High prevalence of antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus in a Murine typhus endemic region of Croatia. *Journal of Medical Virology*, 78: 1643 – 1647.
- Downs W.G., Anderson C.R., Spence L., Aitken T.H.G., Greenhall A.H. 1963. Tacaribe virus: a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 12: 640 – 646.

- Emmons R.W., Yescott R.E., Dondero D.V. 1978. A survey for lymphocytic choriomeningitis virus in the San Francisco Bay area. California Vector Views, 25: 21 – 24.
- Emonet S., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., de Lamballerie X., Charrel R.N. 2006. Phylogeny and evolution of old world arenaviruse. Virology, 350: 251 – 257.
- Emonet S., Retornaz K., Gonzalez J.P., de Lamballerie X., Charrel R.N. 2007. Mouse to human transmition of variant lymphocytic choriomeningitis virus. Emerging Infectious Disease, 13, 3: 472 – 475.
- Fulhorst C.F., Bowen M.D., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Nichol S.T., Kosoy M.Y., Peters C.J. 1996. Isolation and characterization of Whitewater Arroyo virus, a novel North American arenavirus. Virology, 224: 114 – 120.
- Fulhorst C.F., Bowen M.D., Salas R.A., De Manzione N.M.C., Duno G., Utrera A., Ksiazek T.G., Peters C.J., Nichol S.T., De Miller E., Tovar D., Ramos B., Vasquez C., Tesh R.B. 1997. Isolation and characterization of Pirital virus, a newly dicovered South American arenavirus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 56, 5: 548 – 553.
- Gonzalez J.P., Emonet S., de Lamballerie X., Charrel R. 2007. Arenaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology, 315: 253 – 288.
- Gonzalez J.P., McCormick J.B., Herve J.P., Jonhson K.M., Georges A.J. 1983. An arenavirus isolated from wild-caught rodents in the Central African Republic. Intervirology, 19: 105 – 112.
- Hlasek J. 2008. Wildlife photo gallery, birds, mammals, plants, insects, butterflies, beetles. <http://www.hlasek.com> (september 2008) josef.hlasek@tiscali.cz
- Hlasek L. 2008. Wildlife photo gallery, birds, mammals, plants, insects, butterflies, beetles. <http://www.hlasek.com> (september 2008) josef.hlasek@tiscali.cz
- Johnson K.M., Mackenzie R.B., Webb P.A., Kuns M.L. 1965. Chronic infection of rodents by Machupo virus. Science, 150: 1618 – 1619.
- Kallio-Kokko H., Laakkonen J., Rizzoli A., Tagliapietra V., Cattadori I., Perkins S.E., Hudson P.J., Cristofolini A., Versini W., Vapalahti O., Vaheri A., Henttonen. 2005. Hantavirus and arenavirus antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, Northern Italy. Epidemiology and Infection, 134: 830 – 836.

- Koren S., Avšič – Županc T. 2002. Virusna genetika in izvor virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 37 – 47
- Koren S., Marin J. 2002. Razmnoževanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 23 – 35
- Kraus H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg H.D., Schiefer H.G.; Slenczka W., von Graevenitz A., Zahner H. 2003. Zoonoses, Infectius disesases transmissible from animals to humas. 3rd ed. Washington DC, ASM Press: 92 – 94.
- Kryštufek B. 1991. Sesalci Slovenije. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 35 – 171
- Kunz S., Borrow P., Oldstone M.B. 2002. Receptor structure, binding, and cell entry of arenaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology, 262: 111 – 137.
- Laakkonen J., Kallio – Kokko H., Öktem M.A., Blasdell K., Plyusnina A., Niemimaa J., Karataş A., Plyusnin A., Vaheri A., Henttonen H. 2006. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. Journal of Wildlife Diseases, 42, 3: 672 – 676.
- Lewin B. 2004. Retriviruses and retroposons. V: Genes. 8th ed. Carlson G. (eds.). New Jersey, Pearson Prentice Hall: 493 – 512.
- Lisieux T., Coimbra M., Nassar E.S., Burattini M.N., de Souza L.T., Ferreira I., Rocco I.M., da Rosa A.P., Vasconcelos P.F., Pinheiro F.P. 1994. New arenavirus isolated in Brazil. Lancet, 343: 391 – 392.
- Lledó L., Genundez M.I., Saz J.V., Bahamontes N., Meltran M. 2003. Lymphocytic choriomeningitis virus infection in a province of Spain: Analysis of sera from the general population and wild rodents. Journal of Medical Virology, 70: 273 – 275.
- Lukashevich I.S. 1992. Generation of reassortants between African arenaviruses. Virology, 188: 600 – 605.
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acid Research, 30, 6: 1292 – 1305.
- Marin J. 2002. Neposredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 109 – 118
- Marrie T.J., Saron M.F. 1998. Seroprevalence of lymphocytic choriomeningitis virus in Nova Scotia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 58: 47 – 49.
- Mills J.N., Barrera Oro J.G., Bressler D.S., Childs J.E., Tesh R.B., Smith J.F., Enria D.A., Geisbert T.W., McKee K.T. Jr., Bowen M.D., Peters C.J., Jahrling P.B. 1996. Characterization of Oliveros virus, a new member of the Tacaribe complex

(*Arenaviridae*: Arenavirus). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 54 : 399 – 404.

Moncayo A.C., Hice C.L., Watts D.W., Travassos da Rosa A.P., Guzman H., Russell K.L., Calampa C., Gozalo A., Popov V.L., Weaver S.C., Tesh R.B. 2001. Allpahuayo virus: a newly recognized arenavirus (*Arenaviridae*) from arboreal rice rats (*Oecomys bicolor* and *Oecomys paricola*) in northeastern Peru. Virology, 284: 277 – 286.

Morita C., Matsuura Y., Kawashima E., Takahashi S., Kawaguchi J., Iida S., Yamsnaka T., Jitsukawa W. 1991. Seroepidemiological survey of Lymphocytic choriomeningitis virus in wild house mouse (*Mus musculus*) in Yokohama Port, Japan. Journal of Veterinary Medicine Science, 53: 219 – 222.

Murphy F.A., Webb P.A., Johnson K.M., Whitfield S.G. 1969. Morphological comparison of Machupo virus with lymphocytic choriomeningitis: basis for a new taxonomic group. Journal of Virology, 4: 535 – 541.

Park J.Y., Peters C.J., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Katholi C.R., Waites K.B., Gray B., Maetz H.M., Stephensen C.B. 1997. Age distribution of lymphocytic choriomeningitis virus serum antibodies in Birmingham, Alabama: evidence of a decreased risk of infection. Journal of Medical Virology, 51: 107 – 114 .

Parodi A.S., Greenway D.J., Rugiero H.R., Rivero S. 1958. Sobre la etiologia del brote epidemico de Junin. Dia Medico, 30: 2300 – 2302.

Peters C.J., Buchmeier M., Rollin P.E., Ksiazek T.G. 1996. Arenaviruses. V: Fields virology. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E. (eds.). Philadelphia, PA, Lippincott – Raven Publishers: 1521 – 1551.

Pinheiro F.P., Woodal J.P., Travassos da Rosa A.P.A, Ravassos da Rosa J.F. 1977. Studies on arenavirus in Brasil. Medicina B Aires, 3: 175 – 197.

Poljak M. 2002. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129 – 142

Riera L., Castillo E., Del Carmen Saavedra M., Priotto J., Sottosanti J., Polop J., Ambrosio A.M. 2005. Serological study of the lymphochoriomeningitis virus (LCMV) in an inner city of Argentina. Journal of Medical Virology, 76: 285 – 289.

Rivers T.M., Scott T.F.M. 1935. Meningitis in man caused by a filterable virus. Science, 81: 439 – 440.

- Rivers T.M., Scott T.F.M. 1936. Meningitis in man caused by a filterable virus. Identification of the etiological agent. *Journal of Experimental Medicine*, 63: 415 – 432.
- Rodas J.D., Salvato M.S. 2006. Tales of mice and men: Natural history of arenaviruses. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19, 4: 382 – 400.
- Rojek J.M., Kunz S. 2008. Cell entry by human pathogenic arenaviruses. *Cellular Microbiology*, 10, 4: 828 – 835.
- Rollin P.E., Nichol S.T., Zaki S., Ksiazek T.G. 2007. Arenaviruses and filoviruses. V: *Manual of clinical microbiology*. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Phaller M.A. (eds.). Washington DC, ASM Press: 1510 – 1522
- Rowe W.P., Murphy F.A., Bergold G.H., Casals J., Hotchin J., Johnson K.M., Lehmann-Grube F., Mims C.A., Traub E., Webb P.A. 1970. Arenoviruses: proposed name for a newly defined virus group. *Journal of Virology*, 5: 651 – 652.
- Salas R., de Manzione N., Tesh R.B., Rico – Hesse R., Shope R.E., Betancourt A., Godoy O., Bruzual R., Pacheco M.E., Ramos B., Taibo M.E., Tamayo J.G., Jaimes E., Vasquez C., Araoz F., Querales J. 1991. Venezuelan hemorrhagic fever. *Lancet*, 338: 1033 – 1036.
- Salvato M., Clegg JCS., Bowen MD., Buchmeier M.J., Gonzalez J.P., Lukashevich I.S., Peters C.J., Rico – Hesse R., Romanowski V. 2005. *Arenaviridae*. V: *Virus taxonomy. 8th ICTV Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses*. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carsten E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle D.R., Wickner R.B. (eds.). New York, Academic: 633 -640
- Salvato M.S., Schweighofer K.J., Burns J., Shimomaye E.M. 1992. Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Research*, 22: 185 – 198.
- Salvato M., Shimomaye E., Oldstone M.B. 1989. The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. *Virology*, 169: 377 – 384.

- Southern P.J. 1996. Arenaviruses. V: Fields virology. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E. (eds.). Philadelphia, PA, Lippincott-Raven Publishers: 1505 – 1519
- Stephensen C.B., Blout S.R., Lanford R.E., Holmes K.V., Montali R.J., Fleenor M.E., Shaw J.F. 1992. Prevalence of serum antibodies against lymphocytic choriomeningitis virus in selected populations from two U.S. cities. *Journal of Medical Virology*, 38: 27 – 31.
- Swanepoel R., Leman P.A., Shepherd A.J., Shepherd S.P., Kiley M.P., McCormick J.B. 1985. Identification of Ippy as a Lassa-fever-related virus. *Lancet*, 1: 639 – 639.
- Trapido H., Sanmartin C. 1971. Pichinde virus: a new virus from Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 20: 631 – 664.
- Traub E. 1935. A filterable virus recovered from white mice. *Science*, 81: 298 – 299.
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 91 – 120
- Webb P.A., Johnson K.M., Hibbs J.B., Kuns M.L. 1970. Parana, a new Tacaribe complex virus from Paraguay. *Arhciv für die gesamte Virusforschung*, 32: 379 – 388.
- Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechnics*, 39, 1: 1 – 11.
- Wulff H., McIntosh B.M., Hammer D.B., Johnson K.M. 1977. Isolation of arenavirus closely related to Lassa virus from *Mastomys natalensis* in South East Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 55: 441 – 444.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tatjani Avšič – Županc in somentorici dr. Darji Duh za mentorstvo, spodbudo, nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se vsej strokovni ekipi Laboratorija za diagnostiko zoonoz, ki so mi omogočili prijetno opravljanje diplomskega dela.

Hvala recenzentu prof. dr. Mariu Poljaku za hitro in konstruktivno kritiko pisnega dela.

Hvala Matjažu, Simoni in Mateji za vso tehnično pomoč in moralno spodbudo.

Hvala Janku za zaupanje, vztrajnost in dobro voljo.

Hvala moji družini, ki me je podpirala ves čas mojega izobraževanja in mi omogočila, da sem danes tukaj, kjer sem.

PRILOGE

Priloga A1: Seznam vzorcev hišnih miši (*Mus musculus*) testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času.

Leto	Oznaka vzorca	Lokacija	IFA	Št. RNA	Organ	RT-PCR v realnem času
1991	TT 11/91	Ljubljana, TOMAČEVO	ni seruma	12058	pljuča	NEG
1996	TT 12/96	Ljubljana, KOSEZE	ni seruma	12059 12060	vranica ledvica	NEG NEG
1998	TT 01/98	Ljubljana, Rožna dolina, ZOO	-	12061 12062	vranica ledvica	NEG NEG
	TT 02/98	Ljubljana, Rožna dolina, ZOO	-	12063 12064	vranica ledvica	NEG NEG
	TT 03/98	Ljubljana, Rožna dolina, ZOO	1:160	12065 12066	vranica ledvica	NEG NEG
	TT 04/98	Ljubljana, Rožna dolina, ZOO	-	12067 12068	vranica ledvica	NEG NEG
2000	5/39-2000	ni lokacije	ni seruma	12069 12070	vranica ledvica	NEG NEG
	6/53-2000	ni lokacije	ni seruma	12071 12072	vranica ledvica	NEG NEG
2004	TT 01/04	Dekani, Miši, potok Maretežan	-	12073 12074	vranica ledvica	NEG NEG
2007	TT 86/07	Rakovnik	-	11551 12075	vranica ledvica	NEG NEG

Priloga A 2: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Pohorje

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCRv realnem času
2005	TT 01/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11892	1	NEG
	TT 02/05	<i>Myodes glareolus</i>	-	8913		
	TT 03/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	ni seruma	11893		
	TT 04/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11894		
	TT 05/05	<i>Neomys fodiens</i>	-	11895		
	TT 06/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11896		
	TT 07/05	<i>Glis glis</i>	-	11897		
2007	TT 203/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	10625	2	NEG
	TT 204/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	10626		
	TT 205/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	10627		
	TT 206/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11886		
	TT 207/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	10628		
	TT 208/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	10555		
	TT 209/07	<i>Apodemus sylvaticus</i>	-	11887		
	TT 210/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	10629		
	TT 211/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11888		
	TT 212/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	10630		
	TT 213/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	10631		
	TT 214/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11889		
	TT 215/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11890		

Priloga A3: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Rakovnik

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCR v realnem času
2006	TT 50/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8767	3	NEG
	TT 51/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8768		
	TT 52/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8769		
	TT 53/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8770		
	TT 54/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8777		
	TT 55/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8778		
	TT 56/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8755		
	TT 57/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8756		
	TT 58/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8757		
	TT 59/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8758		
	TT 60/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8779	4	NEG
	TT 61/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8780		
	TT 62/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8791		
	TT 63/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8792		
	TT 64/06	<i>Sorex araneus</i>	-	8793	4	NEG
	TT 66/06	<i>Myodes glareolus</i>	1:160	8795		
	TT 67/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8796		
	TT 68/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8797		
	TT 69/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8798	5	NEG
	TT 70/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8799		
	TT 71/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8800		
	TT 72/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8801		
	TT 73/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8808	6	NEG
	TT 74/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	8809		
	TT 75/06	<i>Myodes glareolus</i>	1:80	8810		
2007	TT 01/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11369	5	NEG
	TT 02/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11370		
	TT 03/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11399		
	TT 04/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11400		
	TT 05/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11401		
	TT 06/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11402		
	TT 07/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11403		
	TT 08/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11404	6	NEG
	TT 09/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11405		
	TT 10/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10154		
	TT 11/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11406		
	TT 12/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11407		
	TT 13/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11408		
	TT 14/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11412		
	TT 15/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11415		
	TT 16/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11416		
	TT 17/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11415		
	TT 18/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10155	7	NEG

se nadaljuje

Priloga A3: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Rakovnik

nadaljevanje

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCR v realnem času	
2007	TT 19/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:40	11416	/	NEG	
	TT 20/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11417		NEG	
	TT 21/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11418			
	TT 22/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11419			
	TT 23/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11420			
	TT 24/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11421			
	TT 25/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10156			
	TT 26/07	<i>Myodes glareolus</i>	1:40	11436	/	NEG	
	TT 69/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11525	7	NEG	
	TT 70/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11526			
	TT 71/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11527			
	TT 72/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11528			
	TT 73/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11529	8	NEG	
	TT 74/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11530			
	TT 75/07	<i>Myodes glareolus</i>	1:20	11531			
	TT 76/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11542			
	TT 77/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11543	8	NEG	
	TT 78/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11544			
	TT 79/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11545			
	TT 80/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11546			
	TT 81/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11547	9	NEG	
	TT 82/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11548			
	TT 83/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10180			
	TT 84/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11549			
	TT 85/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11550	9	NEG	
	TT 86/07	<i>Mus musculus</i>	-	11551			
	TT 87/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11552			
	TT 88/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11553			
	TT 89/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11554	10	NEG	
	TT 90/07	<i>Myodes glareolus</i>	1:40	11555			
	TT 141/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11437		9	NEG
	TT 142/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11438			
	TT 143/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11439			
	TT 144/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11440	10	NEG	
	TT 145/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11441			
	TT 146/07	<i>Myodes glareolus</i>	1:10	11442			
	TT 147/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11443	10	NEG	
	TT 148/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11444			
	TT 149/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11445			
	TT 150/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11447			
	TT 151/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11448			
	TT 152/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11449			
	TT 153/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11450			

se nadaljuje

Priloga A3: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Rakovnik

nadaljevanje

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCR v realnem času
2007	TT 154/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	/	11451	10	NEG
	TT 155/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11452		
	TT 156/07	<i>Myodes glareolus</i>	/	11453		
	TT 157/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11454		
	TT 158/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11455		
	TT 159/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11456		
	TT 160/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11465		
	TT 161/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11466		
	TT 162/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11467		
	TT 163/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11468		
	TT 164/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11469		
	TT 165/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11470	11	NEG
	TT 166/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	/	11471		
	TT 167/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11472		
	TT 168/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11473		
	TT 169/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11474		
	TT 170/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11475		
	TT 171/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	/	11476		
	TT 172/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11477		
	TT 173/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11478		
	TT 174/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11479		
	TT 175/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11480	12	NEG
	TT 176/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11481		
	TT 177/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11482		
	TT 178/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11483		
	TT 179/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11484		
	TT 180/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11485		
	TT 181/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11486		
	TT 182/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11487		
	TT 183/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11488		
	TT 184/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11489		
	TT 185/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11490	13	NEG
	TT 186/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11491		
	TT 187/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11492		
	TT 188/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11493		
	TT 189/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11494		
	TT 190/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11495		
	TT 191/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	/	11496		
	TT 192/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11497		
	TT 193/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11498		
	TT 195/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11500		
	TT 194/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11499	14	NEG

se nadaljuje

Priloga A3: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Rakovnik

nadaljevanje

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCR v realnem času
2007	TT 196/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11501	15	NEG
	TT 197/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11502		
	TT 198/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11503		
	TT 199/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11504		
	TT 200/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11522		
	TT 201/07	<i>Myodes glareolus</i>	/	11523		
	TT 202/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11524		

Priloga A4: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Vrtransko

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCR v realnem času
2007	TT 91/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:40	11385	/	NEG
	TT 92/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11386	16	NEG
	TT 93/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:80	11387	/	NEG
	TT 94/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11388	16	NEG
	TT 95/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11389		
	TT 96/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11390		
	TT 97/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11391		
	TT 98/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11392		
	TT 99/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11393		
	TT 100/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:10	11394		
	TT 101/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11395		
	TT 102/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11396		
	TT 103/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11397	17	NEG
	TT 104/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11398		
	TT 105/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11664		
	TT 106/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11665		
	TT 107/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11666		
	TT 108/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11667		
	TT 109/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11668		
	TT 110/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11669	18	NEG
	TT 111/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11670		
	TT 112/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11671		
	TT 113/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11672		
	TT 114/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11673		
	TT 115/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:10	11711	/	NEG
	TT 116/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11712		
	TT 117/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11713	18	NEG
	TT 118/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11714		
	TT 119/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11715		
	TT 120/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11716		
	TT 121/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11717		
	TT 122/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	/	11718		
	TT 123/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11727		
	TT 124/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11728	19	NEG
	TT 125/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11729		
	TT 126/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11730		
	TT 127/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11731		
	TT 128/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11732		
	TT 129/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11733		
	TT 130/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11734		
	TT 131/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11780	20	NEG
	TT 132/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11781		
	TT 133/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11782		
	TT 134/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11783		
	TT 135/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11784		
	TT 136/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11785		
	TT 137/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11786		
	TT 138/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11787		
	TT 139/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11788		
	TT 140/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11789		

Priloga A5: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Ig

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCR v realnem času
2005	TT 09/05	<i>Myodes glareolus</i>	-	11314	21	NEG
	TT 10/05	<i>Myodes glareolus</i>	-	11316		
	TT 11/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11318		
	TT 12/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11320		
	TT 13/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11322		
	TT 14/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11323		
	TT 15/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11321		
	TT 16/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11319		
	TT 17/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11317		
	TT 18/05	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11315		
2006	TT 65/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:10	8794	/	NEG

Priloga A6: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Cerknica

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCR v realnem času
2006	TT 01/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:10	11324	22	NEG
	TT 02/06	<i>Sorex araneus</i>	/	11333		NEG
	TT 03/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11325		
	TT 04/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11332		
	TT 05/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	9506		
	TT 06/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11326		
	TT 07/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11331		
	TT 08/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11327		
	TT 09/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11330		
	TT 10/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11328		
	TT 11/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11329		
	TT 12/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	11341	23	
	TT 13/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11343		
	TT 14/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	11345		
	TT 15/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11347		
	TT 16/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11361		
	TT 17/06	<i>Sorex araneus</i>	/	11362		NEG
	TT 18/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11363		
	TT 19/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11364		
	TT 20/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	9507		
	TT 21/06	<i>Sorex araneus</i>	-	11365		
	TT 22/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11366	24	NEG
	TT 23/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8911		
	TT 24/06	<i>Sorex araneus</i>	1:40	11367		NEG
	TT 25/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11368		
2007	TT 32/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11349	24	NEG
	TT 33/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:40	11350		NEG
	TT 34/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11348		
	TT 35/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11346		
	TT 36/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11344	24	
	TT 37/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11342		
	TT 38/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	11351		
	TT 39/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11352		
	TT 40/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	11353		
	TT 41/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11354		
	TT 42/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11355		
	TT 43/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11356	25	
	TT 44/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11357		
	TT 45/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11358		
	TT 46/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	9508		
	TT 47/06	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11359		
2008	TT 48/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	11360	25	
	TT 49/06	<i>Myodes glareolus</i>	-	8912		NEG

Priloga A7: Seznam vzorcev naključnih gostiteljev testiranih z metodo posredne imunofluorescence (IFA) in z molekularno metodo RT – PCR v realnem času, lokacija: Tenetiše

Leto	Oznaka vzorca	Vrsta	IFA	Št. RNA	Skupina	RT-PCR v realnem času
2007	TT 27/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11814	26	NEG
	TT 28/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	1:10	11815	/	NEG
	TT 29/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11816	26	NEG
	TT 30/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11817		
	TT 31/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11818		
	TT 32/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11819		
	TT 33/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11820		
	TT 34/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11821		
	TT 35/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11822		
	TT 36/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11823		
	TT 37/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11830		
	TT 38/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11831	27	NEG
	TT 39/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11832		
	TT 40/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11833		
	TT 41/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11834		
	TT 42/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11835		
	TT 43/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10157		
	TT 44/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10158		
	TT 45/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10159		
	TT 46/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11839		
	TT 47/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11852		
	TT 48/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10157	28	NEG
	TT 49/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11854		
	TT 50/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11855		
	TT 51/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10176		
	TT 52/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10177		
	TT 53/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11858		
	TT 54/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11859		
	TT 55/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11860		
	TT 56/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11861		
	TT 57/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11862		
	TT 58/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11863	29	NEG
	TT 59/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10178		
	TT 60/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11865		
	TT 61/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11866		
	TT 62/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11867		
	TT 63/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10179		
	TT 64/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11869		
	TT 65/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11870		
	TT 66/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	10181		
	TT 67/07	<i>Apodemus flavicollis</i>	-	11885		
	TT 68/07	<i>Myodes glareolus</i>	-	11891		