

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vesna DOLINŠEK

**POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KLOPNEGA
MENINGOENCEFALITISA PRI MALIH SESALCIH
V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vesna DOLINŠEK

**POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KLOPNEGA
MENINGOENCEFALITISA PRI MALIH SESALCIH V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FREQUENCY OF THE TICK BORNE MENINGOENCEPHALITIS
VIRUS INFECTION AMONG SMALL MAMMALS IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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, in sicer v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in WHO laboratoriju.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Tatjano Avšič Županc in za recenzenta doc. dr. Miroslava Petrovca.

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

Recenzent: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

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

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

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vesna Dolinšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.7 : 599.322/.324 + 599.35/.38 : 616.831.9 - 002 (043) =163.6
KG	virusi/ flavivirusi/ virus klopnega meningoencefalitisa/ klopni meningoencefalitis/ mali sesalci/ glodavci/ žužkojedi/ serologija/ metoda posredne imunofluorescence
AV	DOLINŠEK, Vesna
SA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentorica) / PETROVEC, Miroslav (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA PRI MALIH SESALCIH V SLOVENIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 70 str., 3 pregl., 34 sl., 61 vir.
IJ	Sl
JI	sl/an
AI	Virus klopnega meningoencefalitisa (KME) je pomemben povzročitelj okužb osrednjega živčevja pri ljudeh. Virus KME kroži v naravi med naravnimi rezervoarji ter gostitelji s pomočjo prenašalcev. Prenašalci in hkrati naravni rezervoarji virusa KME so klopi. Ličinke in nimfe se najpogosteje hranijo s krvjo malih sesalcev, ki so pomembni gostitelji virusa KME. S hranjenjem klopov na malih sesalcih se virus KME ohranja v naravnem okolju. Virus se prenese na klop med hranjenjem s krvjo viremične živali ali med sočasn timer hranjenjem okuženih in neokuženih klopov na neviremični živali. Na človeka se virus prenese z vbodom okuženega klopaa. V Sloveniji je veliko endemskih območij virusa KME. Na teh območjih se hkrati nahajajo virus KME, njegovi prenašalci ter gostitelji. Da bi proučili stopnjo okuženosti malih sesalcev v Sloveniji z virusom KME, smo pregledali vzorce serumov malih sesalcev, ki smo jih ujeli na različnih lokacijah po Sloveniji v letih od 1990 do 2008. V raziskavo smo vključili 1549 različnih vzorcev serumov. Protitelesa proti virusu KME smo z metodo posredne imunofluorescence dokazali v 88 (6%) vzorcih serumov. Rezultate smo razdelili glede na različne dejavnike, saj nas je zanimalo spreminjanje števila okužb z virusom KME med malimi sesalci v različnih časovnih obdobjih in na različnih lokacijah. Želeli smo tudi ugotoviti, ali je določena vrsta malih sesalcev bolj pomembna za ohranjanje virusa KME v naravi kot druge. Največji delež serumov, z dokazanimi protitelesi proti virusu KME smo ugotovili v Osrednjeslovenski regiji, natančneje v občini Medvode. Ugotovitev nakazuje, da je to področje v Sloveniji eno izmed endemskih območij virusa KME, kjer lahko v bodoče pričakujemo večje število ljudi, obolenih za klopni meningoencefalitisom. Protitelesa proti virusu KME smo največkrat dokazali pri gozdni voluharici, <i>Myodes glareolus</i>.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 578.7 : 599.322/.324 + 599.35/.38 : 616.831.9 - 002 (043) =163.6
CX	viruses/ flaviviruses/ tick-borne encephalitis virus/ tick-borne encephalitis/ small mammals/ rodents/ insectivores/ serology/ indirect immunofluorescent assay
AU	DOLINŠEK, Vesna
AA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor) / PETROVEC, Miroslav (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2010
TI	FREQUENCY OF THE TICK BORNE MENINGOENCEPHALITIS VIRUS INFECTION AMONG SMALL MAMMALS IN SLOVENIA
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIV, 70 p., 3 tab., 34 fig., 61 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Tick-borne encephalitis virus (TBE) is an important causative agent of the human meningoencephalitis disease. In nature, the TBE virus spreads from natural reservoirs to hosts by vectors. Ticks represent both the TBE virus natural reservoirs and the vectors. Most frequently, ticks feed on blood of small mammals, representing the most important host of the TBE virus. This blood-feeding process enables circulation of the TBE virus. The virus amplifies in the blood to a degree sufficient enough for further infection of the previously noninfected ticks. The virus is transferred to humans by bite of an infected tick. Slovenia is one of the areas comprising many natural foci of the TBE virus, characterised by a simultaneous presence of the virus, its vectors and hosts. In order to investigate the degree of the TBE virus infection of small mammals in Slovenia, we studied serum samples from small-mammals, captured at different locations during the period from 1990 to 2008. In total, 1549 serum samples were investigated. By employing the indirect immunofluorescent assay, we detected antibodies in 88 (6%) serum samples. The results were analyzed according to different factors, characterizing the variation of the TBE virus infection among small mammals in different time periods at different locations. Our aim was to establish whether a certain species of small mammals is preferential for the TBE virus infection and circulation in nature. The Medvode region in the central Slovenia was found to be the most active natural focus of the virus. Bank vole, <i>Myodes glareolus</i>, was the small-mammal species representing the highest frequency of the TBE virus antibody prevalence.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
SLOVARČEK.....	XIV
1 UVOD	15
1.1. NAMEN DELA	15
2 PREGLED OBJAV	17
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED.....	17
2.2 ZNAČILNOSTI VIRUSA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA	17
2.2.1 Zgradba virusa.....	17
2.2.2 Taksonomska razvrstitev virusa	18
2.2.2.1 Filogenetska razvrstitev	18
2.2.2.2 Podtipi virusa KME	19
2.2.3 Razmnoževanje virusa	20
2.2.4 Občutljivost in stabilnost virusa.....	21
2.3 KROŽENJE VIRUSA V NARAVI.....	21
2.3.1 Kroženje virusa KME v klopih	23
2.3.2 Kroženje virusa KME med malimi sesalci.....	24
2.3.2.1 Glodavci	25
2.3.2.2 Žužkojedi	31

2.3.3	Kroženje virusa KME med velikimi sesalci	33
2.4	EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z VIRUSOM KME	34
2.5	PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA	37
2.6	DIAGNOSTIKA KME.....	38
2.7	ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE	39
3	MATERIALI IN METODE	40
3.1	VZORCI	40
3.2	METODE DELA.....	40
3.2.1	Razmnoževanje virusa KME v celični kulturi in priprava virusnega antigena	40
3.2.1.1	Priprava celične linije	40
3.2.1.2	Inokulacija virusa in priprava virusnega antigena.....	41
3.2.2	Vezava virusnega antigena na stekelca.....	42
3.2.3	Metoda posredne imunofluorescence	43
4	REZULTATI	45
4.1	POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KME PRI MALIH SESALCIH GLEDE NA OBMOČJE ULOVA	47
4.2	POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KME PRI RAZLIČNIH VRSTAH MALIH SESALCEV	50
4.3	POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KME PRI MALIH SESALCIH NA ENDEMSKEM OBMOČJU	53
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	57
5.1	RAZPRAVA.....	57
5.1.1	Uvod.....	57
5.1.2	Analiza rezultatov.....	58
5.2	SKLEPI.....	62
6	POVZETEK.....	63
7	VIRI	64

ZAHVALA	71
----------------------	-----------

PRILOGE.....	72
---------------------	-----------

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci, ujetimi v posameznih regijah Republike Slovenije od leta 1990 do leta 2008.....	48
Preglednica 2: Pogostost okužbe z virusom KME med posameznimi vrstami malih sesalcev, ujetimi na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.	52
Preglednica 3: Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci, ujetimi v občini Medvode v letih 1995, 1997, 1999, 2006-2008.....	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba viriona virusa KME (Heinz, 2003)	18
Slika 2: Zemljepisna porazdelitev prenašalcev virusa KME(Lindquist in Vapalahti, 2008).	20
Slika 3: Kroženje virusa KME v naravi med prenašalci in gostitelji (Malovrh in Marc, 1997).....	22
Slika 4: <i>Apodemus flavicollis</i> (Bohdal, 2006)	25
Slika 5: <i>Apodemus sylvaticus</i> (Andera, 2010a)	26
Slika 6: <i>Apodemus agrarius</i> (Andera, 2010b).....	26
Slika 7: <i>Arvicola terrestris</i> (Andera, 2010c)	27
Slika 8: <i>Myoxus glis</i> (Andera, 2010d)	27
Slika 9: <i>Microtus agrestis</i> (Andera, 2010e)	28
Slika 10: <i>Microtus arvalis</i> (Andera, 2010f)	28
Slika 11: <i>Microtus nivalis</i> (Andera, 2010g)	29
Slika 12: <i>Microtus subterraneus</i> (Andera, 2010h)	29
Slika 13: <i>Mus musculus</i> (Andera, 2010i).....	30
Slika 14: <i>Myodes glareolus</i> (Andera, 2010j).....	30
Slika 15: <i>Neomys anomalus</i> (Andera, 2010k)	31
Slika 16: <i>Neomys fodiens</i> (Andera, 2010l)	31
Slika 17: <i>Sorex araneus</i> (Andera, 2010m).....	32
Slika 18: <i>Crocidura suaveolens</i> (Andera, 2010n)	32
Slika 19: <i>Crocidura leucodon</i> (Andera, 2010o)	33
Slika 20: Razširjenost virusa KME v Evropi (Baxter Corporation, 2007).....	34
Slika 21: Prijavljeni primeri okužb z virusom KME v Sloveniji pri ljudeh od leta 1993 do leta 2008 po mesecih (IVZ, 2009).....	35
Slika 22: Razširjenost okužbe z virusom KME pri ljudeh v Sloveniji v letih od 1998 do 2001 (IVZ, 2009).....	36
Slika 23: Število prijavljenih primerov okužb z virusom KME pri ljudeh po slovenskih regijah med letom 1997 in 2008 (IVZ, 2009).....	36
Slika 24: Mikroskopska slika sesalčjih celic, ki prikazuje pozitiven rezultat po izvedbi metode posredne imunofluorescence.....	45

Slika 25: Mikroskopska slika sesalčjih celic, ki prikazuje negativen rezultat po izvedbi metode posredne imunofluorescence.....	46
Slika 26: Mikroskopska slika sesalčjih celic, ki prikazuje nespecifičen rezultat po izvedbi metode posredne imunofluorescence.....	46
Slika 27: Območja ulova pregledanih malih sesalcev v Sloveniji od leta 1990 do leta 2008.	47
Slika 28: Število ujetih in pozitivnih vzorcev malih sesalcev razporejenih po regijah v Sloveniji od leta 1990 do leta 2008.	49
Slika 29: Različne vrste glodavcev, pri katerih smo iskali specifična protitelesa proti virusu KME, ujetih na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.	50
Slika 30: Različne vrste žužkojedov, pri katerih smo iskali specifična protitelesa proti virusu KME, ujetih na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.	51
Slika 33: Različne vrste malih sesalcev, ujetih v občini Medvode v letih 1995, 1997, 1999, 2006-2008 pregledane na protitelesa proti virusu KME.	55
Slika 34: Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci, ujetimi v občini Medvode v letih 1997, 1999, 2006-2008 v primerjavi s številom prijavljenih primerov okužb z virusom KME pri ljudeh v Osrednjeslovenski regiji od leta 1997 do leta 2008 (IVZ, 2009).	56

KAZALO PRILOG

Priloga A: Mali sesalci, pregledani na prisotnost protiteles proti virusu KME z metodo posredne imunofluorescence, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.	72
Priloga B: Število malih sesalcev, katerih serumi so vsebovali protitelesa proti virusu KME, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008, razdeljeni po vrstah.	74
Priloga C: Število malih sesalcev, katerih serumi so vsebovali protitelesa proti virusu KME, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008, razdeljeni po letih ulova.	76
Priloga D: Mali sesalci, pregledani na prisotnost protiteles proti virusu KME z metodo posredne imunofluorescence, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008, razdeljeni po vrstah.	78

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DMSO	dimetilsulfoksid
EIA	encimsko imunska metoda (angl. enzyme immuno assay)
FITC	fluorescein izotiocianat
FTS	fetalni telečji serum
IFA	metoda posredne imunofluorescence (angl. indirect immunofluorescent assay)
KME	klopni meningoencefalitis
MEM	minimalno esencialno gojišče (angl. minimal essential medium)
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina (angl. messenger RNA)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffer saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RNK	ribonukleinska kislina
TBE	klopni meningoencefalitis (angl. tick borne encephalitis)

SLOVARČEK

arbovirus	virus, ki ga prenašajo členonožci (angl. arthropod borne virus)
encefalitis	vnetje možganov
meningitis	vnetje možganskih ovojnic
meningoencefalitis	vnetje možganov in možganskih ovojnic
meningoencefalomyelitis	vnetje možganov, možganskih ovojnic in hrbtenjače
panotropnost	sposobnost virusa, da se razmnožuje v celicah vseh organov in tkiv
viremija	prisotnost virusa v krvi
virion	virusni delec

1 UVOD

Virus klopnega meningoencefalitisa (KME) sodi v družino *Flaviviridae* in je povzročitelj meningoencefalitisa, ki je najpomembnejša arbovirusna bolezen v Evropi (Kaiser, 2008). Arbovirusi (angl.: arthropode borne virus) so virusi, ki jih prenašajo členonožci. Virus klopnega meningoencefalitisa delimo na tri podtipe: centralno evropski, ruski pomladno-poletni in sibirski podtip, glede na genetske in antigenske lastnosti, vrsto prenašalca in zemljepisno zastopanost (Kaiser, 2008). V Sloveniji kroži centralno evropski podtip virusa KME, ki ga prenašajo klopi vrste *Ixodes ricinus*. Virus KME se v naravi ohranja na endemskih območjih. V Sloveniji vsako leto zbolijo 200 do 300 ljudi. Endemska območja v Sloveniji so različnih jakosti: od visoko aktivnih (Mozirje, Kranj), do nizko aktivnih (Škofja Loka, Ilirska Bistrica) ali celo latentnih, kjer okužba z virusom KME ni verjetna (Avšič-Županc in sod., 1995). Klopi predstavljajo naravni rezervoar virusa KME in so hkrati tudi njegovi prenašalci (Lindquist in Vapalahti, 2008). Klopi se okužijo z virusom pri hranjenju na viremičnih gostiteljih, preko kože okuženega gostitelja ali pri sočasnem hranjenju z okuženim klopom (angl.: co-feeding). Viremični gostitelji imajo pomembno vlogo pri razširjanju virusa, saj lahko pride pri hranjenju klopa na živali do prenosa virusa (Bakhvalova in sod., 2009). Neviremični gostitelji sicer ne omogočajo prenosa virusa iz krvi v klopa, lahko pa sodelujejo posredno kot gostitelji okuženega in neokuženega klopa sočasno (Richter in sod., 2002).

1.1. NAMEN DELA

Mali sesalci so najpomembnejši gostitelji klopov, predvsem nimf in ličink, odrasli klopi pa se pogosteje hranijo na divjadi (Grešikova in Calisher, 1989). Virus KME je v krvi malih sesalcev prisoten nekaj tednov po okužbi, nato specifična protitelesa virus nevtralizirajo (Labuda in sod., 1997). Okužbo z virusom KME lahko dokažemo posredno z dokazom protiteles proti virusu KME v serumu malih sesalcev. Posredni dokaz okužbe malih sesalcev z virusom KME omogoča prepoznavanje endemskih območij klopnega meningoencefalitisa. Prepoznavanje endemskih območij je pomembno s stališča varovanja zdravja, saj na področjih, kjer dokažemo razširjanje virusa med malimi sesalci obstaja možnost prenosa virusa na klope in posledično na ljudi.

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti pogostost okužbe z virusom klopnega meningoencefalitisa med malimi sesalci na različnih zemljepisnih lokacijah v Sloveniji. Prikazati smo želeli, kako je okužba porazdeljena med redoma glodavcev in žužkojedov in med posameznimi vrstami živali znotraj redov. Prav tako nas je zanimalo ali katera od preučevanih lokacij sodi med aktivna ali latentna endemska območja virusa klopnega meningoencefalitisa. V ta namen smo uporabili metodo posredne imunofluorescence, s katero smo pregledali vzorce serumov miši, voluharic, polhov in rovk.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Že v tridesetih letih prejšnjega stoletja so znanstveniki opisali simptome in etiologijo meningoencefalitisa, čeprav prvi zapisi, ki kažejo na klopni meningoencefalitis, izhajajo iz cerkvenih registrov iz 18. stoletja na Finskem. Leta 1927 je bolezen prvi opisal avstrijski zdravnik Scheneider, ki je v okolici Dunaja opazil večje število bolnikov s podobnimi simptomi in ugotovil, da se bolezen sicer pojavlja skozi vse leto, vendar je spomladi in zgodaj poleti bolnikov veliko več. Bolezen je sprva poimenoval "meningitis serosa epidemica", kasneje pa so jo preimenovali v "Schneiderjeva bolezen" (Gustafson, 1994). Ruski raziskovalec Silber je leta 1939 dokazal, da je povzročitelj te bolezni virus, ki se na človeka prenese z vbodom klopa (Kaiser, 2008). Istega leta so v vzhodni Sibiriji izolirali virus sočasno iz miši, klopa in bolnika ter prikazali prenos virusa s klopom vrste *Ixodes persulcatus* (Kunz, 2003). Vsa odkritja v tem času so vodila k ideji, da se virus zadržuje na endemskih območjih. Leta 1947 je Pavlovsky opisal endemska območja virusa ter njegovo kroženje med sesalci in klopi (Pavlovsky, 1947). V Evropi so virus KME prvič izolirali leta 1948 (Kunz, 1992). Leta 1951 so dokazali tudi možnost okužbe brez vboda klopa in sicer z zaužitjem okuženega kravjega mleka (Tsai, 2000).

Bolezen so poznali tudi v drugih državah, vendar pod različnimi imeni: "Kumlinge disease", "Taiga encephalitis", ruski pomladno poletni encefalitis, centralnoevropski encefalitis in dvofazna mlečna vročica (Kunz, 1992).

Klopni meningoencefalitis je danes prisoten v večini evropskih držav, razen v državah Beneluksa, na Portugalskem, v Veliki Britaniji, na Irskem ter Islandiji (Kaiser, 2008).

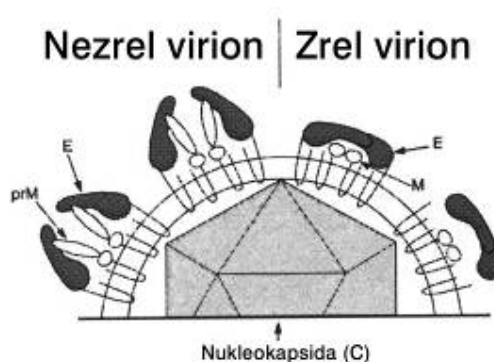
2.2 ZNAČILNOSTI VIRUSA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA

2.2.1 Zgradba virusa

Virus KME je sferične oblike in v premeru meri 50 nm (Kaiser, 2008). Sestavljen je iz 6 % ribonukleinskih kislin, 66 % beljakovin, 17 % lipidov ter 9 % ogljikovih hidratov (Schlesinger S in Schlesinger MJ, 1991). Virusni genom predstavlja pozitivno polarna

ribonukleinska kislina (RNK), dolga približno 11 kb. Zapis na RNK se prevede v eno samo polipeptidno molekulo, ki kodira 3414 aminokislin (Lindquist in Vapalahti, 2008).

Nukleokapsido sestavljata strukturna beljakovina C (angl.: Capsid) ter virusna RNK in je velika 30 nm. Pokriva jo lipidni dvosloj z dvema vrstama površinskih beljakovin: neglikozilirana membranska beljakovina M (angl.: Membrane), ki je v nezrelem virusnem delcu še v nerazcepljeni prekursorski obliki (prM), ter glikozilirana ovojnična beljakovina E (angl.: Envelope). Virus obdaja lipidna ovojnica, ki je gostiteljskega izvora in ščiti nukleokapsido pred celičnimi nukleazami (Monath in Heinz, 1996). Beljakovina E predstavlja najpomembnejši antigen (Lindquist in Vapalahti, 2008). Poleg treh strukturnih proteinov (C, E in M) je virus sestavljen še iz sedmih nestrukturnih beljakovin (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), ki sodelujejo pri razmnoževanju virusa.



Slika 1: Zgradba viriona virusa KME (Heinz, 2003)

2.2.2 Taksonomska razvrstitev virusa

2.2.2.1 Filogenetska razvrstitev

Virus KME spada v družino *Flaviviridae*. Družina je poimenovana po latinski besedi "flavus", ki v prevodu pomeni rumen, saj je bil prvi izoliran virus, ki spada v to družino, virus rumene mrzlice (Monath in Tsai, 1997).

V rod *Flavivirus* spada več kot 68 virusov. Večina potrebuje členonožce, kot so komarji in klopi, za uspešen prenos na gostitelje (vretenčarje) (Rice, 1996).

Flaviviruse, glede na njihove prenašalce, delimo na tri večje skupine (Kaiser, 2008):

- Virusi, ki se ne prenašajo s prenašalci.
- Virusi, ki jih prenašajo komarji.
- Virusi, ki jih prenašajo klopi.

Glede na njihove antigenske lastnosti skupino virusov, ki jih prenašajo klopi, delimo še na dve podskupini (Kaiser, 2008):

- Virusi TBE (angl.: Tick-Borne Encephalitis)
- Virus Tyuleni

V prvo podskupino spadajo vsi trije podtipi virusa KME ter še nekateri drugi: virus Louping-ill, virus Powassan, virus hemoragične mrzlice Omsk, virus bolezni gozda Kyasanur in virus Langat (Kaiser, 2008).

2.2.2.2 Podtipi virusa KME

Opisani so trije podtipi virusa KME: centralno evropski podtip, ruski pomladno-poletni podtip in sibirski podtip (Lindquist in Vapalahti, 2008).

Delitev virusa KME na različne podtipe temelji na različni zemljepisni razširjenosti, na različnih vrstah prenašalcev, ter na različnih genetskih in seroloških lastnostih posameznih podtipov. Centralno evropski podtip je razširjen predvsem v Evropi, kjer se v naravi ohranja s klopi vrste *Ixodes ricinus*, rusko pomladno-poletni in sibirski podtip pa sta razširjena v Aziji in ju prenašajo klopi vrste *Ixodes persulcatus* (Lindquist in Vapalahti, 2008). Posamezni virusi se med seboj razlikujejo v aminokislinski sestavi beljakovin. Znotraj podtipov se posamezne genetske linije virusa KME med seboj razlikujejo v 2,2 % aminokislin, medtem ko se podtipi med seboj razlikujejo v 5,6 % aminokislin (Lindquist in Vapalahti, 2008).



Slika 2: Zemljepisna porazdelitev prenašalcev virusa KME(Lindquist in Vapalahti, 2008).

Centralno evropski podtip virusa KME povzroča blažjo obliko bolezni ter nižjo smrtnost pri ljudeh kot rusko pomladno poletni ter sibirski podtip (Kaiser, 2008).

2.2.3 Razmnoževanje virusa

Virus vstopi v gostiteljevo celico z endocitozo po vezavi na receptor na membrani gostiteljske celice (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Po vezavi na receptor se virusna membrana zlije z membrano endocitotskega mešička, to pa omogoči sprostitve nukleokapside v citoplazmo gostiteljske celice. Virusna RNK deluje kot informacijska RNK (mRNK, angl.: messenger RNA) in prepíše celoten virusni genom v en poliprotein. S pomočjo virusnih in gostiteljevih proteaz se ta poliprotein cepi in iz njega nastanejo strukturne in nestrukturne beljakovine. Nastale nestrukturne beljakovine sodelujejo pri sintezi komplementarne verige RNK, ki kasneje služi kot matrica za sintezo novih kopij virusne RNK. Te kopije imajo lahko tri različne vloge: lahko se vgradijo v novo nastale viruse, lahko delujejo kot mRNK in sprožijo sintezo beljakovin ali služijo kot matrice za sintezo komplementarnih verig RNK (Rice, 1996).

Razmnoževanje virusa poteka v membranskih strukturah ob endoplazemskem retikulumu, v katerem kasneje virus zori. Ko virus dozori, potuje preko cistern trans-Golgijevega omrežja proti celični membrani in se z eksocitozo sprosti iz gostiteljske celice (Lindquist in Vapalahti, 2008).

2.2.4 Občutljivost in stabilnost virusa

Virus KME je v okolju precej nestabilen, vendar pa ostane v aerosolih pri sobni temperaturi infektiven vsaj 6 ur, kar predstavlja potencialno nevarnost za okužbo preko dihalnih poti (Gritsun in sod., 2003). Virus je občutljiv na toploto in UV svetlobo. Inaktiviramo ga lahko z ionskimi in neionskimi detergenti, tripsinom, γ -žarki, formaldehidom, β -propiolaktonom, etilenaminom in z večino razkužil, ki vsebujejo formaldehid, glutaraldehyd, vodikov peroksid, klor, jod, fenol in alkohol (Monath in Heinz, 1996; Tsai, 2000). Lipidna ovojnica omogoča, inaktivacijo z organskimi topili in detergenti (Rice, 1996). Za razliko od ostalih flavivirusov je virus KME odporen tudi na nizek pH in ohrani vsaj delno kužnost v pH območju od 1,42 do 9,19 z optimumom pri pH 7,4, kar pojasni možnost okužbe po oralni poti (Gritsun in sod., 2003; Telford in Foppa, 2000).

2.3 KROŽENJE VIRUSA V NARAVI

Virus KME v naravi kroži med prenašalci, njihovimi gostitelji ter naključnimi gostitelji, ki so slepa veja v razširjanju in ohranjanju virusa, saj viremija pri njih ni dovolj visoka in tako ne omogočajo nadaljnega prenosa virusa (Malovrh in Marc, 1997).

Virus se med klopi in malimi sesalci prenaša po horizontalni poti: klop se hrani z gostiteljevo krvjo v času viremije in virus se prenese od gostitelja na klopa preko krvi. Virus se nato razmnožuje v klopovih žlezah slinavkah ter se ob naslednjem hranjenju tako preko sline prenese na neokuženega gostitelja. Na ta način se virus ohranja v naravi in prenaša med klopom in gostiteljem v obe smeri (Bakhvalova in sod., 2009).

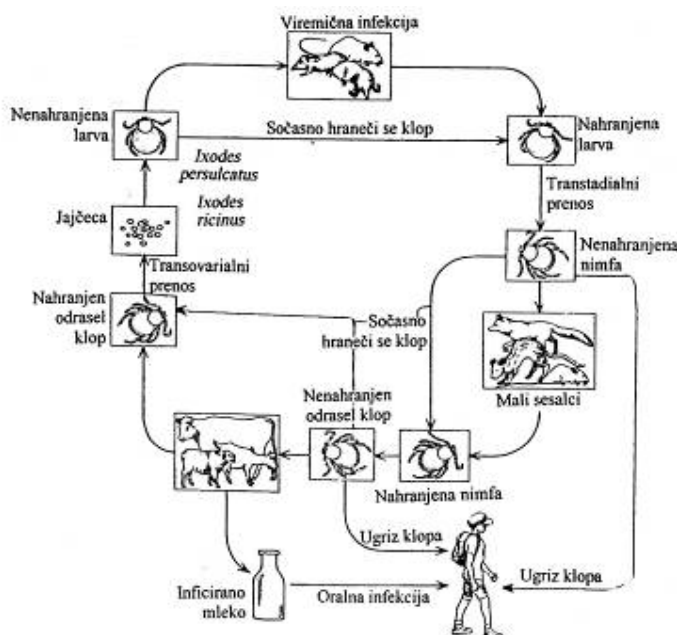
Prenos virusa lahko poteče tudi pri sočasnem hranjenju klopov na neviremičnem gostitelju. V naravi se okuženi in neokuženi klopi pogosto hranijo v neposredni bližini na isti živali. Večino klopov *Ixodes ricinus* bomo tako našli za ušesi malih sesalcev. Klop se na gostitelju hrani več dni (ličinke in nimfe) ali celo tednov (odrasle živali), kar poveča možnost sočasnega hranjenja večih klopov na živali. Klop ob vbodu izloča slino, v kateri so beljakovine, ki modificirajo mesto vboda klopa na tak način, da se virus lahko čim bolj razširi ter tako prenese do mesta ugriza klopov, ki se sočasno hranijo v neposredni bližini okuženega klopa (Randolph in sod., 1996). Pri sočasnem hranjenju je lahko največja razdalja med klopoma 1 do 2 cm, da pride do prenosa virusa z okuženega klopa na

neokuženega (Randolph in sod., 1996). Prenos s sočasnim hranjenjem omogoča okužbo klopov, ki se hranijo na kompetentnih in nekompetentnih gostiteljih (gostiteljih, ki ne razvijejo viremije ali pri gostiteljih, pri katerih virusno breme ni dovolj visoko za okužbo novih, neokuženih klopov) (Randolph in sod., 1996).

Med klopi se virus prenaša tudi vertikalno, med spolnim stikom samca in samice, transovarialno iz samice na jajčeca in transstadialno, med preobrazbo iz ličinke v nimfo ter iz nimfe v odraslo žival (Malovrh in Marc, 1997).

Prenos virusa med malimi sesalci lahko poteka vertikalno ali horizontalno. Vertikalni prenos je prenos virusa med materjo in potomci ter se lahko zgodi prenatalno ali ponatalno. Prenatalno se zarodki okužijo transplacentalno, ponatalno pa s sesanjem okuženega mleka. Horizontalni prenos poteka med živalmi v naravi med parjenjem (Bakhvalova in sod., 2009).

Tudi divjad in domače živali so lahko gostitelji virusa KME. Viremija pri teh živalih ni dovolj visoka za nadaljno okužbo klopov, ki bi omogočala nadaljno širjenje virusa. Kljub temu posredno omogočajo razširjanje virusa, saj s svojo krvjo omogočajo razmnoževanje klopov, ki vsebujejo virus. Pri domačih živalih (krave, koze, ovce) se med viremijo virus izloča tudi v okuženem mleku, zato se lahko človek okuži z virusom KME tudi posredno, z uživanjem nepasteriziranih mlečnih izdelkov (Süss, 2003).



Slika 3: Kroženje virusa KME v naravi med prenašalci in gostitelji (Malovrh in Marc, 1997).

2.3.1 Kroženje virusa KME v klopih

Pri razmnoževanju in ohranjanju virusa KME v naravi imajo klopi dvojno vlogo. Poleg prenosa virusa med različnimi gostitelji na katerih se hranijo, lahko virus v katerikoli razvojni stopnji klopa tudi prezimi (Ludwig in Iacono-Connors, 1993).

Virus KME prenašata predvsem dve vrsti klopov: centralno evropski podtip prenaša klop vrste *Ixodes ricinus*, rusko pomladno poletni podtip in sibirski podtip pa klop vrste *Ixodes persulcatus* (Lindquist in Vapalahti, 2008). Kot prenašalci lahko poleg teh dveh vrst klopov služijo tudi vrste: *Ixodes arboricola*, *Ixodes hexagonus*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus* (Gustafson, 1994; Süss, 2003).

Klop v svojem življenju zamenja tri razvojne oblike: ličinka, nimfa in odrasla žival. Na vsaki stopnji se klop hrani na gostitelju samo enkrat ter se nato preobrazi v naslednjo obliko (Kunz, 1992). Glavni gostitelji ličink in nimf so mali sesalci in ptice, medtem ko se odrasli klopi pogosteje hranijo na ježih, lisicah, srnjadi, govedu, ovcah, kozah, prašičih, psih, mačkah in ljudeh (Grešikova in Calisher, 1989). Klopi po okužbi ohranijo virus skozi vse razvojne faze. Virus se v klop razmnožuje v žlezah slinavkah in se ob vbodu klopa lahko s slino prenese na naslednjega gostitelja (Avšič-Županc in Petrovec, 1997).

V centralni Evropi je sezonska aktivnost klopov vrste *Ixodes ricinus* najvišja pozno spomladi od maja do junija, ter jeseni od septembra do oktobra (Korenberg, 2000). Aktivnost klopov je odvisna od večih okoljskih dejavnikov, med katerimi sta najpomembnejša vlaga in temperatura. Klopi za preživetje potrebujejo visoko stopnjo relativne vlage (nad 85 %) (Randolph, 2001). Drugi omejujoč dejavnik je temperatura. Klopi vrste *Ixodes ricinus* spomladi postanejo aktivni, ko najvišja dnevna temperatura preseže 5-7 °C, poleti pa visoka temperatura in nizka relativna vlažnost zmanjšata aktivnost klopov (Gray, 1991). Klope vrste *Ixodes ricinus* najdemo na obronkih travnikov, v mešanih in listnatih gozdovih z bogatim grmovjem, kjer jim okolje nudi dovolj zaščite pred podnebnimi dejavniki in je hkrati prisotnih dovolj primernih gostiteljev (Kunz, 1992).

2.3.2 Kroženje virusa KME med malimi sesalci

Pomembne gostitelje virusa KME predstavljajo tudi mali sesalci, predvsem žužkojedi in glodavci, saj živijo v podobnem življenjskem okolju kot klopi, ki so naravni rezervoar in tudi glavni prenašalci tega virusa. Klopi se hranijo s krvjo malih sesalcev in tako omogočajo kroženje virusa v naravi. Najpogosteje se na malih sesalcih hranijo ličinke in nimfe.

Mali sesalci imajo kratek generacijski čas in je tako virusu vedno na voljo veliko število mladih, za okužbo dovzetnih živali. Ko se žival okuži z virusom, po nekaj tednih razvije protitelesa, ki virus nevtralizirajo. Protitelesa proti virusu KME ostanejo prisotna v krvi živali do konca življenja (Labuda in sod., 1997). Znanstveniki še niso dognali ali taka žival predstavlja slepo vejo za razmnoževanje virusa ali se morda lahko okuži znova (Labuda in sod., 1997).

Številčnost populacije glodavcev se z leti spreminja in je odvisna od različnih dejavnikov. Eden od najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na številčnost populacije malih sesalcev, je zagotovo dostopnost hrane v okolju v katerem prebivajo. Slovenija spada med najbolj gozdnate države, gozdovi pa so večinoma bukovo-hrastovi (Zavod za gozdove Slovenije, 2005). Glavna hrana glodavcev sta žir in želod, ki sta plodova bukve in hrasta. Plodovi ne rastejo in zorijo vsako leto enako obilno, zato je od tega odvisna gostota populacije glodavcev. Le-ta se v letu obilnega zorenja plodov zelo poveča. Hrana predstavlja kritično točko zgodaj spomladi, ko se začne sezona razmnoževanja. Več hrane bo na razpolago zgodaj spomladi, prej se bodo glodavci začeli razmnoževati in posledično bo poleti in jeseni gostota njihove populacije večja (Pucek in sod., 1993). V času zorenja plodov pride v bližino dreves tudi veliko divjadi, ki so glavni gostitelji odraslih klopov (Randolph, 1998). Takrat je kroženje virusa KME v naravi najhitrejše, saj so na istem območju prisotni različni gostitelji ter klopi v vseh svojih razvojnih stadijih.

Zaradi večjega števila gostiteljev se poveča tudi število klopov, kar omogoča virusu hitrejše in bolj učinkovito kroženje. Razširjanje virusa v naravi je onemogočeno, če je gostota primernih gostiteljev prenizka. Hitro razširjanje virusa v naravi omejuje tudi prisotnost drugih živali, ki niso primerni gostitelji, saj s svojo prisotnostjo zmanjšujejo možnost stikov med pravimi gostitelji in klopi (Rosa in sod., 2007).

V letih, ko je dostopne hrane malo, se populacija glodavcev zmanjša, saj poleg pomanjkanja hrane nanje sedaj v večji meri vplivajo tudi vremenske razmere in število plenilcev (Pucek in sod., 1993).

Žužkojedi imajo v nasprotju z glodavci stabilnejšo populacijo, saj njihovo preživetje ni tako močno odvisno od časa zorenja drevesnih plodov, ker se večinoma prehranjujejo s hrano živalskega izvora (Pucek in sod., 1993).

Študija, ki je bila narejena na češkem, v gozdovih v okolici Prage, ki spada med endemska območja virusa KME, je pokazala, da sta napomembnejša gostitelja tega virusa rumenogrla miš (lat. *Apodemus flavicollis*) in gozdna voluharica (lat. *Myodes glareolus*) (Zeman, Januška, 1999).

2.3.2.1 Glodavci

Rumenogrla miš, lat. *Apodemus flavicollis*

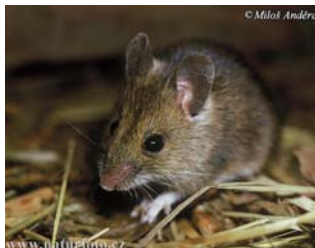
V Sloveniji je splošno razširjena; najdemo jo povsod razen v priobalnem pasu. Naseljuje listnate, mešane in včasih tudi iglaste gozdove ter spada med najpogostejše male sesalce. Živi na gozdnih tleh, zna pa tudi plezati. Je rjave barve z značilnim rumenim trakom, sklenjenim okoli grla. Žival je zelo hitra in aktivna predvsem ponoči. Hrani se s hrano rastlinskega izvora, zlasti s semeni in plodovi. V Sloveniji se razmnožuje med marcem in oktobrom. V naravi te živali živijo največ 18 mesecev (druge zime ne preživijo) (Kryštufek, 1991).



Slika 4: *Apodemus flavicollis* (Bohdal, 2006)

Navadna belonoga miš, lat. *Apodemus sylvaticus*

Razširjena je po celotni Evropi, v Sloveniji jo najdemo povsod do 1000 m nadmorske višine. Naseljuje odprta območja, najdemo pa jo tudi v gozdovih. Pojavlja se na obdelovalnih površinah, pogosto pa zaide tudi v stavbe. Na hrbtu prevladujejo rdečkasto sivi toni, trebuh pa je sivo bel. Spada med vsejede, največkrat se hrani s semeni ter nečlenarji (Kryštufek, 1991).



Slika 5: *Apodemus sylvaticus* (Andera, 2010a)

Dimasta miš, lat. *Apodemus agrarius*

Naseljuje srednjo ter jugovzhodno Evropo. V Sloveniji jo najdemo ob rekah Muri, Dravi, Savi ter Krki. Izolirana populacija živi v submediteranskem nižavju. Ta vrsta živi ob bregovih vodnih tokov, v gostem močvirskem rastlinju ter na robovih gozdov in poljih. Ima hrbet rdeče rjave barve s široko črno črto po sredini. Od ostalih dveh opisanih vrst rodu *Apodemus* se razlikuje po tem, da je njihova dlaka bolj ščetinasta, oči, uhlji, stopala in rep pa so veliko manjši. Spada med vsejede. Aktivna je preko celega dne, je slaba plezalka in ni zelo hitra (Kryštufek, 1991).



Slika 6: *Apodemus agrarius* (Andera, 2010b)

Veliki voluhar, lat. *Arvicola terrestris*

V Evropi je splošno razširjen, v Sloveniji ga najdemo na celinskem delu. Naseljuje odprta, vlažna okolja, pogosto ga najdemo tudi na obdelovalnih površinah. Prilagojen je življenju pod zemljo, kjer koplje rove, ter skladišči hrano za zimo. Njegov trup je robusten, glava

široka. Hrbet je rjave barve s sivimi in rdečkastimi toni, rep je dolg in temnorjav. Aktiven je ponoči. Hrani se z rastlinami (Kryštufek, 1991).



Slika 7: *Arvicola terrestris* (Andera, 2010c)

Navadni polh, lat. *Myoxus glis*

Razširjen je po celotni Evropi, v Sloveniji ga najdemo v gozdovih do višine zgornjega roba bukovih gozdov. Je srebrno sive barve, dlaka je kratka in gosta. Na repu se izražajo rjavi odtenki. Hrani se s plodovi in semeni, občasno tudi z glivami in živalsko hrano. Aktiven je ponoči, je izvrsten plezalec, večino časa preživi na drevju. Zimo prezimi v zemlji, pred tem si nabere zadostno količino podkožne tolšče. Njegova življenjska doba je 5 let (Kryštufek, 1991).



Slika 8: *Myoxus glis* (Andera, 2010d)

Travniška voluharica, lat. *Microtus agrestis*

Razširjena je po celi Evropi, v Sloveniji jo najdemo na celinskem delu. Naseljuje vlažne travnike in močvirja ter goste rastlinje ob bregovih počasi tekočih vod. Njen hrbet je rjav, trebuh siv, na repu pa sta obe barvi izraziti. Hrani se skoraj izključno z rastlinjem. Aktivna je cel dan. Ta vrsta velja za zelo agresivno, zato pride ob preveliki gostoti teh živali pogosto do pretepov. Živijo največ 18 mesecev (Kryštufek, 1991).



Slika 9: *Microtus agrestis* (Andera, 2010e)

Poljska voluharica, lat. *Microtus arvalis*

Razširjena je po celotni Evropi, v Sloveniji jo najdemo na celinskem delu do nadmorske višine 900 m. Živi predvsem na odprtih predelih, kot so travniki ter polja, gnezda pa ima v podzemnih rovih. Po izgledu in načinu razmnoževanja je zelo podobna travniški voluharici. Je rastlinojeda ter aktivna čez cel dan. Živi v kolonijah (Kryštufek, 1991).



Slika 10: *Microtus arvalis* (Andera, 2010f)

Snežna voluharica, lat. *Microtus nivalis*

Nahaja se predvsem v gorskih območjih Evrope, v Sloveniji jo najdemo v Julijskih Alpah, Karavankah, Kamniških in Savinjskih Alpah, Dinarskem gorovju ter na kraških območjih. Najdemo jo tudi ob vrhovih gora. Živi v razpokah med skalami. Je sivorjave barve ter ima dolgo in fino dlako. Ima najdaljše brke od vseh voluharic, ki se nahajajo v Sloveniji. Hrani se z rastlinami in plodovi. Aktivna je skozi cel dan, njena življenjska doba je 18 mesecev (Kryštufek, 1991).



Slika 11: *Microtus nivalis* (Andera, 2010g)

Vrtna voluharica, lat. *Microtus subterraneus*

Nahaja se po celotni Evropi, v Sloveniji je razširjena predvsem na vzhodnem in osrednjem delu države. Naseljuje travnike, pašnike ter vrtove, najdemo pa jo tudi v bližini voda. Je sivkasto rjave barve, ima drobne oči in dolgo dlako. Prehranjuje se z rastlinami. Aktivna je ponoči, živi tudi pod zemljo (Kryštufek, 1991).



Slika 12: *Microtus subterraneus* (Andera, 2010h)

Ilirska voluharica, lat. *Microtus liechtensteinii*

Ta vrsta se skoraj ne razlikuje od vrtna voluharice. Je le nekoliko večja in naseljuje predvsem gorski svet (Kryštufek, 1991).

Hišna miš, lat. *Mus musculus*

Naseljuje celotno Evropo, v Sloveniji je splošno razširjena, razširjenost je pogojena s prisotnostjo človeka. Najdemo jo v bližini človeka, pogosto se naseli v shrambe, hleve in človeška domovanja. Je sivo rjave barve. Spada med vsejede. Aktivna je ponoči, če jo človek ne vznemirja, pa tudi podnevi. Je dobra plezalka in plavalka (Kryštufek, 1991).



Slika 13: *Mus musculus* (Andera, 2010i)

Gozdna voluharica, lat. *Myodes glareolus*

Najdemo jo v celinski Sloveniji do višine 2000 m. Naseljuje listnate, mešane ter iglaste gozdove, ter gosto rastlinje ob vodah. Živi na gozdnih tleh, zna tudi plezati. Je rdečerrjave barve, rep je dvobarven, na koncu pa ima šop daljših dlak. Aktivna je skozi ves dan, vendar ponoči bolj kot podnevi. Je vsejeda, prehranjuje se tako z insekti kot tudi z gozdnimi sadeži, zelenim rastlinjem in glivami. V naravi je njena življenjska doba 18 mesecev, ker ne preživi druge zime (Kryštufek, 1991).



Slika 14: *Myodes glareolus* (Andera, 2010j)

2.3.2.2 Žužkojedi

Močvirska rovka, lat. *Neomys anomalus*

V Sloveniji je splošno razširjena, najdemo jo v močvirjih in ob bregovih vodnih tokov. Je črne barve s svetlim trebuhom, na repu pa ima plavalne ščetine. Hrani se z žuželkami. Aktivna je zgodaj zjutraj ter popoldan (Kryštufek, 1991).



Slika 15: *Neomys anomalus* (Andera, 2010k)

Povodna rovka, lat. *Neomys fodiens*

V Sloveniji jo najdemo v alpskem, predalpskem ter subpanonskem svetu. Živi ob obraščenih vodnih bregovih. Je največja med rovkami, poznanimi v Sloveniji. Po izgledu je podobna močvirski rovkici, od nje je le nekoliko večja ter ima bolj razvit greben plavalnih ščetin na repu. Hrani se z žuželkami ter vodnimi nevretenčarji. Aktivna je podnevi in ponoči. Plava po površini vode, lahko pa se tudi potaplja (Kryštufek, 1991).



Slika 16: *Neomys fodiens* (Andera, 2010l)

Gozdna rovka, lat. *Sorex araneus*

V Sloveniji je splošno razširjena, najdemo jo vse do 1900 m nadmorske višine. Živi v gozdovih, ruševju in grmičevju. Je srednje velikosti, temnorjave barve. Pozimi se zadržuje pod zemljo. Prehranjuje se z žuželkami, predvsem z deževniki in hrošči. Aktivna je podnevi in ponoči. Je dobra plavalca (Kryštufek, 1991).



Slika 17: *Sorex araneus* (Andera, 2010m)

Vrtna rovka, lat. *Crocidura suaveolens*

V Evropi je splošno razširjena. Najdemo jo povsod v Sloveniji. Naseljuje trstičevje, obvodna območja ter obdelovalne površine. Je sivorjave barve in majhne velikosti ter ima velike uhlje. Hrani se z žuželkami, polži, pleni pa tudi mladiče glodalcev. Aktivna je preko celega dne (Kryštufek, 1991).



Slika 18: *Crocidura suaveolens* (Andera, 2010n)

Poljska rovka, lat. *Crocidura leucodon*

Razširjena je po velikem delu srednje in vzhodne Evrope, v Sloveniji jo najdemo povsod do 1000 m nadmorske višine. Naseljuje različna okolja, kot so robovi polj, travniki ter obvodna območja. Po izgledu je podobna vrtni rovk, vendar je od nje nekoliko večja. Hrani se predvsem z žuželkami, včasih pa tudi z rastlinami (Kryštufek, 1991).



Slika 19: *Crocidura leucodon* (Andera, 2010o)

2.3.3 Kroženje virusa KME med velikimi sesalci

Veliki sesalci predstavljajo slepo vejo kroženja virusa v naravi. Klopi se hranijo z njihovo krvjo, kar omogoči razvoj klopa v naslednji stadij, vendar viremija ni dovolj visoka, da bi se lahko klop pri hranjenju okužil z virusom (Avšič-Županc in Petrovec, 1997).

Tudi domače živali, kot so govedo, koze in ovce se lahko okužijo z virusom KME in razvijejo viremijo, vendar kliničnih znakov bolezni nimajo. Takšna žival lahko virus izloča v mleko, ki je potem potencialni vir okužbe za ljudi (Monath in Tsai, 1997).

2.4 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z VIRUSOM KME

Endemsko območje je po teoriji Pavlovskega zemljepisno področje, kjer je evolucija vodila do posebnih odnosov med virusom, prenašalcem in gostiteljem. Prenašalec nudi virusu ugodno okolje, virus pa ne vpliva na razvoj, življenje in razmnoževanje prenašalca (Grešikova in Calisher, 1989). Prenašalec služi za prenos virusa od gostitelja dajalca do gostitelja prejemnika (Avšič-Županc in Petrovec, 1997). Vsa medsebojna razmerja v tem okolju so se vzpostavila pred prihodom človeka (Grešikova in Calisher, 1989).

Endemsko območje označimo za aktivno takrat, kadar so populacije klopov in njihovih gostiteljev velike in stabilne. Eden izmed pogojev za oznako aktivnega endemskega območja je vsaj 15 %-na prisotnost protiteles proti virusu KME pri ljudeh, ki živijo na tem področju (Grešikova in Calisher, 1989).

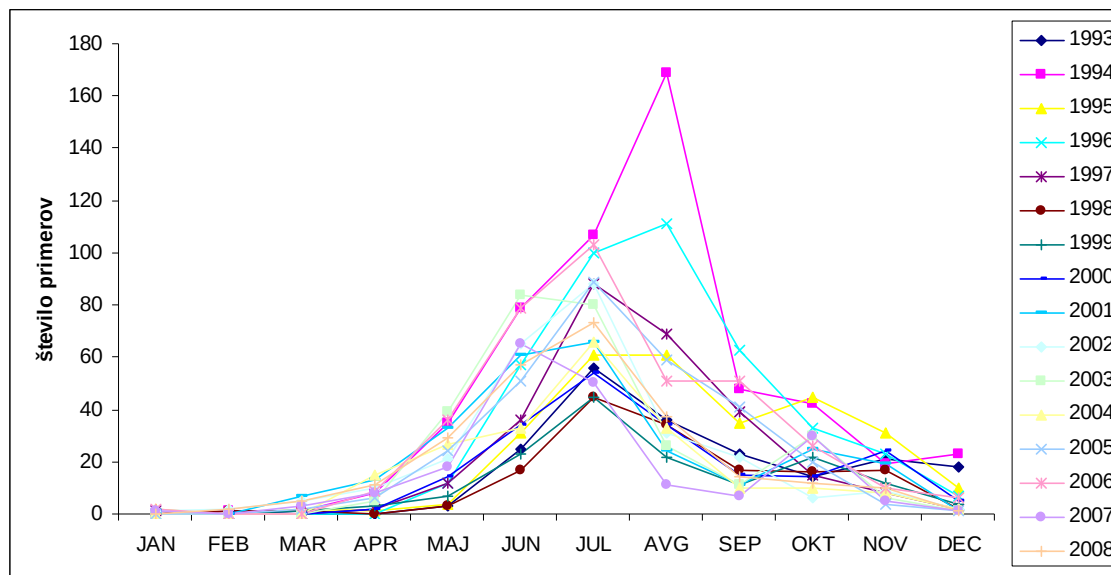
Če na določenem področju ugotovimo prisotnost virusa KME v gostiteljih, bolezen pa se pri tamkajšnjem prebivalstvu ne izraža, to področje označujemo kot latentno endemsko območje (Malovrh in Marc, 1997).



Slika 20: Razširjenost virusa KME v Evropi (Baxter Corporation, 2007).

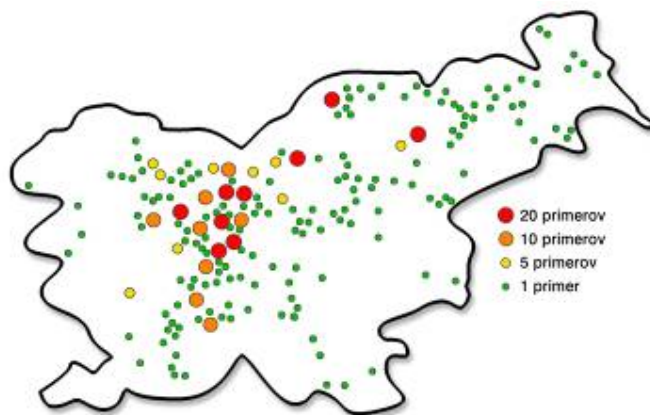
Virus KME je razširjen skoraj po celotni Evropi, v Rusiji in njenih sosednjih državah ter na Kitajskem in Japonskem. Na svetu je vsako leto prijavljenih 10.000 do 12.000 primerov KME, od tega 3000 v Evropi (Kunz, 2003). Litva, Latvija, Estonija, Nemčija, Avstrija, Slovenija, Madžarska, Poljska, Češka in Slovaška so države z najvišjo incidenco KME v Evropi (Süss, 2003). V Evropi je danes znanih več endemskih območij te bolezni. Endemsko območje se razprostira od Skandinavije čez Poljsko, Nemčijo, Češko, Slovaško, Avstrijo, Madžarsko, Slovenijo in Hrvaško (Süss, 2003). Trenutno so države Beneluksa, Velika Britanija, Irska, Islandija in države Iberskega polotoka edine evropske države, ki še niso poročale o primeru klopnega meningoencefalitisa (Süss, 2003).

V Sloveniji zabeležimo letno okoli 200-300 primerov bolezni (IVZ, 2009). Večinoma se okužijo ljudje, ki se zadržujejo na področju endemskih območij tega virusa. Med ljudi s povečanim tveganjem za okužbo z virusom KME sodijo gozdni delavci, delavci v lesni industriji, ljudje zaposleni v kmetijskih panogah ter gradbeništvu. Izpostavljeni pa so seveda tudi vsi rekreativci, ki veliko časa preživijo v naravi. Tveganje je enako za vse starostne skupine. Bolezen se pojavlja sezonsko, kar povezujemo z večjo aktivnostjo klopo in malih sesalcev v pomladnih in poletnih mesecih (IVZ, 2006).



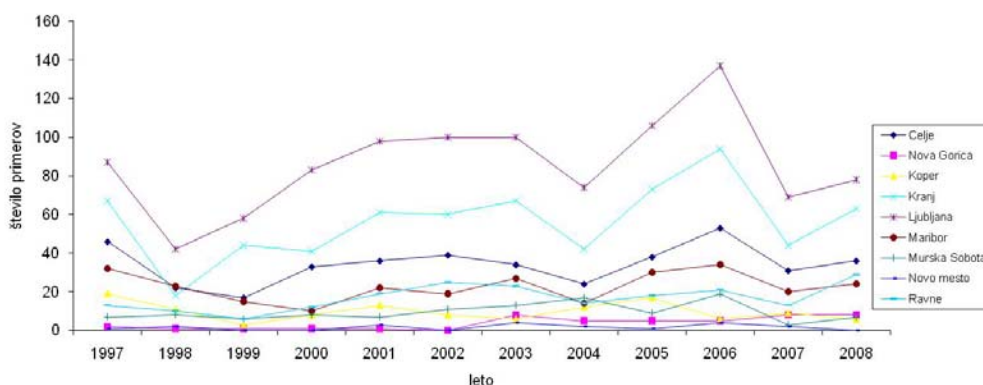
Slika 21: Prijavljeni primeri okužb z virusom KME v Sloveniji pri ljudeh od leta 1993 do leta 2008 po mesecih (IVZ, 2009).

V Sloveniji je pojav klopne meningoencefalitisa vezan na endemska območja. Njihova intenziteta je različna: od izredno aktivnih (območje Mozirja in Kranja), kjer je možnost okužbe in obolevanja velika, do manj aktivnih (območje Škofje Loke in Ilirske Bistrice) in celo latentnih območij, kjer okužba in obolenje nista verjetni. Najbolj aktivna območja so na področju alpskega in dinarskega pokrajinskega tipa (Avšič-Županc in sod., 1995; IVZ, 2006).



Slika 22: Razširjenost okužbe z virusom KME pri ljudeh v Sloveniji v letih od 1998 do 2001 (IVZ, 2009).

Število prijavljenih primerov okužb z virusom KME pri ljudeh je bilo od leta 1997 do leta 2008 najvišje v Ljubljanski regiji (1032), sledi ji Kranjska (674) ter Celjska (409) in Mariborska regija (270) (Slika 27).



Slika 23: Število prijavljenih primerov okužb z virusom KME pri ljudeh po slovenskih regijah med letom 1997 in 2008 (IVZ, 2009).

2.5 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA

Klopni meningoencefalitis je virusna okužba osrednjega živčevja. Najpogostejši način okužbe poteka z vbodom okuženega klopa, lahko pa se okužimo tudi s pitjem okuženega mleka (Avšič-Županc in sod., 1995).

Virus KME je pantropni virus, saj se lahko razmnožuje v celicah vseh organov in tkiv, predvsem pa v citoplazmi celic osrednjega živčevja. Po vboju klopa se virus prenese v Langerhansove celice kože. Nato preko lokalnih limfnih vozlov in limfatičnega sistema potuje v krvni obtok. S krvjo se premika po telesu in tako doseže različne organe. Glavna tarča virusa je retikulo-endotelijski sistem (jetra, vranica, kostni mozeg), kjer se virus razmnožuje in sprošča nazaj v krvni obtok. Takrat nastopi nekajdnevno obdobje viremije. V času viremije lahko virus s krvnim obtokom pride v možgane, kjer krvno možgansko bariero najverjetneje prestopi s pasivno difuzijo ali transcitozo (McMinn, 1997).

Pomembno vlogo pri virulenci virusa KME igra ovojnična beljakovina E, ki omogoča vstop virusa KME v gostiteljevo celico tako, da se kot ligand veže na receptor gostiteljeve celice in se lahko vanjo prenese z endocitozo. Ob znižanju pH v endosomu, se beljakovina E konformacijsko spremeni in tako povzroči sproščanje virusnega genoma v citoplazmo gostiteljeve celice (Lindquist in Vapalahti, 2008). Beljakovina E predstavlja tudi antigen, proti kateremu se v gostitelju tvorijo protitelesa (Kaiser, 2008). Mutacije v zapisu za to beljakovino so povezane z zmanjšanjem ali izgubo virulence (Heinz, 2003). Prekurzorska beljakovina prM deluje kot šaperon, ki omogoča pravilno zvijanje beljakovine E (Kaiser, 2008).

Večina okužb z virusom KME poteka asimptomatsko (Kaiser, 2008). Pri vsaj dveh tretjinah bolnikov, ki kažejo prizadetost osrednjega živčevja, pa je potek bolezni dvofazen. Prvo fazo bolezni bolnik razvije v prvih dveh tednih po okužbi z virusom. Simptomi prve faze trajajo približno en teden, so nespecifični in spominjajo na gripo: vročina, glavobol, slabo počutje, slabost, utrujenost in bolečine v trebuhu. Sledi interval brez simptomov, ki traja približno en teden, nato nenadno nastopi akutna faza bolezni s kliničnimi znaki meningitisa, meningoencefalitisa ali meningoencefalomielitisa. Značilni simptomi v tej fazi so: visoka vročina, močan glavobol, huda slabost, otrdelost vratu in bruhanje. Pojavi se lahko tudi tremor, motnje v spanju, razdražljivost, zmedenost, motje koncentracije in

spomina, delne ohromelosti ter ohlapne paralize udov. Akutna faza bolezni lahko traja tudi več tednov (Kunz, 1992).

Večina bolnikov si po preboleli bolezni popolnoma opomore, 10 do 20 % bolnikov pa ima dolgotrajne ali celo trajne posledice, kot so glavobol, motnje v zaznavanju, koncentraciji in spominu, depresija, motnje sluha, koordinacije in ravnotežja, trajne ohromelosti obraznih mišic in ohlapne paralize udov (Jereb in sod., 2002; Logar in sod., 2000; Kunz, 1992).

2.6 DIAGNOSTIKA KME

Okužbo z virusom KME je mogoče natančno potrditi le s pomočjo laboratorijskih metod, saj so klinična znamenja bolezni pogosto neznčilna in nezadostna za postavitev diagnoze. Osamitev virusa še vedno ostaja zlati standard pri dokazovanju okužbe. V obdobju viremije iz vzorca bolnika virus osamimo in ga opredelimo z uporabo monoklonskih protiteles. Poskus osamitve in nadaljnje opredelitve virusa je časovno zamuden, tehnično zahteven in nevaren postopek, zato za hitro diagnostiko okužb ni primeren (Avšič-Županc in Poljak, 1993).

Serološke metode temeljijo na dokazovanju protiteles proti virusu KME. V rutinski diagnostiki najpogosteje uporabljajo encimsko imunsko metodo (ELISA, angl.: enzyme linked immunosorbent assay) in imunofluorescenčno metodo (IFA, angl.: immunofluorescent assay), pri katerih dokazujemo specifična protitelesa v serumu ali likvorju bolnika. Poleg protiteles razreda IgG lahko hitro in zanesljivo dokažemo tudi protitelesa razreda IgM, ki se tvorijo ob sveži okužbi. Njune prednosti sta predvsem hitrost ter cenovna ugodnost. Slabosti teh metod sta navzkrižna reaktivnost z drugimi flavivirusi ter nezmožnost dokazovanja okužbe pred pojavom protiteles (Lindquist in Vapalahti, 2008).

V današnjem času so vedno bolj pomembne molekularne metode. Glavna med njimi je metoda verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT-PCR, angl.: real time polymerase chain reaction). S to metodo je namreč mogoče neposredno dokazati virus v kužnini bolnika kot tudi dokazati virus v njegovih prenašalcih ali gostiteljih (Saksida in sod., 2005).

2.7 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Zdravila za zdravljenje okužbe z virusom KME še ne poznamo. Zdravljenje je simptomatsko in podporno, odvisno od simptomov bolnika. Velikokrat je potrebna hospitalizacija (Kunz, 1992).

Izrednega pomena je poučenost ljudi o možnostih zaščite pred klopi. Največji pomen pri preprečevanju okužbe s tem virusom ima namreč preprečevanje stika klopa s kožo. To naredimo z uporabo repelentov, katerih vonj klope odganja in zaščitnimi oblačili, ki pokrivajo večino kože in so svetle barve, da klopa na njih takoj opazimo. Po vsaki dejavnosti v gozdu moramo opraviti še temeljit pregled celega telesa, da morebitnega klopa čim hitreje odstanimo (IVZ, 2006).

Teoretično bi širjenje okužb z virusom KME lahko preprečili s prekinitvijo virusnega cikla v naravi, tako da bi posegli med njegove gostitelje in rezervoarje, vretenčarje in členonožce. Uporaba insekticidov ter uporaba rodenticidov sta se izkazali za neuspešni. Insekticidov ne moremo uporabljati v večjih količinah zaradi njihovega slabega vpliva na okolje (toksičnost za ljudi, slaba biorazgradljivost). Uporaba rodenticidov ima na populacijo glodavcev ravno nasproten učinek od željenega. Ob uporabi rodenticidov se populacija glodavcev zmanjša, vendar se kasneje drastično poveča v odgovor prejšnjemu zmanjšanju (Grešikova in Calisher, 1989).

Najučinkovitejši način zaščite pred boleznijo je cepljenje. V Evropi se najpogosteje uporablja cepivo FSME-Immun® (Baxter GmbH, Dunaj, Avstrija). Cepivo vsebuje očiščen antigen virusa KME, ki je pripravljen na celični kulturi piščančjih fibroblastov in inaktiviran s formalinom (Gustafson, 1994). Za učinkovito zaščito so potrebni trije odmerki cepiva: prva dva v razmaku enega meseca ter tretji po 6 do 12 mesecih. Zaščito obnovljamo na 3 do 5 let s pozitivnim odmerkom cepiva (IVZ, 2006). V Sloveniji je cepljenje obvezno za vse ljudi, ki so pri svojem delu izpostavljeni virusu, ter priporočljivo za vse ljudi, ki bivajo oziroma se gibljejo na endemičnih območjih (IVZ, 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

V diplomski nalogi smo uporabili serume malih sesalcev, ki so bili ujeti na 53 lokacijah v 11 regijah Slovenije, v časovnem obdobju od leta 1990 do leta 2008.

Terensko delo je potekalo dvakrat letno v sodelovanju Laboratorija za diagnostiko zoonoz (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo) ter Prirodoslovnega muzeja Slovenije. Večinoma smo se na teren odpravili pozno spomladi in zgodaj jeseni, ko je pričakovana najvišja gostota populacije malih sesalcev. Živali smo lovili z živolovkami, ki smo jih napolnili z vato in vabo. Vata nudi ujetim živalim zavetje in zviša odstotek preživetja živali ter zniža stres. Za vabo smo uporabili mešanico ovsenih kosmičev in konzerviranih sardel, ki s svojim značilnim vonjem prekrijejo vonj pasti. Pasti smo postavili v bližino vode, ob podrta drevesa in na luknje v zemlji, da bi jih čim bolj približali naravnemu gibanju malih sesalcev. Pasti smo postavljali v poznih večernih urah, saj so živali aktivne predvsem v nočnem času, pobirali pa smo jih v zgodnjih jutranjih urah, da bi bile ujete živali čim krajši čas v pasti.

V laboratoriju smo živali najprej identificirali, nato smo jih izmerili, stehtali, jim odstranili morebitne zajedavce in odvzeli kri. Kri smo nato centrifugirali in ločili serum, ki smo ga shranili pri -20 °C.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Razmnoževanje virusa KME v celični kulturi in priprava virusnega antigena

3.2.1.1 Priprava celične linije

Za gojenje virusa KME smo uporabili trajno celično linijo celic VERO E6 (Vero 76, clone E6 ; ATCC-LGC, kat.št.: CRL 1586), ki izvirajo iz normalih opičjih ledvic.

Pred začetkom dela smo skrbno počistili varnostno komoro in opremo s 70 % etanolom, da smo zaščitili celično linijo pred okužbami. Za gojenje celic smo uporabili minimalno

esencialno gojišče (D-MEM; GIBCO, kat.št.: 21885108), ki smo mu dodali fetalni telečji serum do 10 % (FTS; GIBCO, kat.št.: 16415). Tako pripravljeno gojišče smo prefiltrirali skozi 0,22 μ m filtre in ga shranili pri 4 °C. Celice smo gojili v sterilnih steklenicah velikosti T25 (TPP, kat.št.: 90025).

Celična linija je bila shranjena v tekočem dušiku, zato smo jo postavili v posodico s toplo vodo (37 °C) in počakali približno 2 minuti, da so se celice odtalile. Suspenzijo celic smo nežno pretresli in zamašek epruvete razkužili s 70 % etanolom, da ne bi celic pri prestavljanju v steklenico okužili, saj bi bila potem linija neuporabna. Pripravljeno gojišče (10% MEM s FTS) smo segreli v inkubatorju na 37 °C in 8 ml prenesli v steklenico, ki smo jo označili z oznako celic, pasažo in datumom. S kapalko smo previdno prebrizgali suspenzijo celic v epruveti, jo posrkali in jo po kapljicah prenesli v steklenico s pripravljenim gojiščem. Steklenico smo nato previdno zaprli in jo položili v termostat na 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Po 24 urah smo zamenjali gojišče s svežim in opazovali rast. Za gojenje virusa in pripravo virusnih antigenov mora celična linija prerasti vsaj 80 % površine ustrezne steklenice.

3.2.1.2 Inokulacija virusa in priprava virusnega antigena

Za razmnoževanje smo uporabili 1 ml virusa KME (KME tv 7d/5p; 12/8-2008), ki je bil shranjen pri – 80 °C. Postavili smo ga v posodico s toplo vodo (37 °C) in počakali 2 minuti, da se je suspenzija odmrznila. Iz steklenice s celično linijo smo odlili gojišče za rast in inokulirali pripravljen virus. Z injekcijsko brizgo smo posrkali vsebino virusa iz epruvete in ga previdno prebrizgali v steklenico s celicami tako, da kapljice z virusom niso padale direktno na celice, ampak na dno steklenice. Nato smo tesno zaprli zamašek, nežno pretresli steklenico in inkubirali 1 uro v termostatu pri 37 °C z dodanim 5 % CO₂. V tem času se je virus iz suspenzije vezal na celične receptorje. Po 1 uri smo dodali gojišče za rast, MEM s 5 % FTS, in steklenice s celicami ponovno inkubirali v termostatu pri 37 °C z dodanim 5 % CO₂. Celice smo vsak dan opazovali pod invertnim svetlobnim mikroskopom in ugotavljali prisotnost citopatskih učinkov razmnoževanja virusa. Citopatski učinki so posledica znotrajceličnega razmnoževanja virusa in jih pod invertnim svetlobnim mikroskopom vidimo kot propad celic. Okuženo celično linijo smo vsak dan primerjali s kontrolno steklenico. Prvi znaki citopatskega učinka virusa KME na celice so se pojavili 7 dni po inokulaciji virusa, zato smo takrat postopek gojenja zaključili. Iz steklenice smo

odlili okuženo gojišče v posebno posodo ter smo dodali 8 ml filtrirane fiziološke raztopine z dodanim 5 % FTS in steklene kroglice. Z obračanjem steklenice smo s steklenimi kroglicami odstranili okužene celice s podlage. Z injekcijsko iglo smo prebrizgali suspenzijo celic in virusa ter jo prenesli v epruveto in centrifugirali 10 min na 2000 rpm pri 4 °C. Medtem smo gojišču za rast (MEM z 10 % FTS) dodali še 10 % dimetilsulfoksida (DMSO; ATCC, kat.št.: 4-x), ki deluje kot konzervirno sredstvo in varuje celico in virusne antigene pred poškodbami pri zamrzovanju. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in dodali 15 ml pripravljenega gojišča z DMSO. Z injekcijsko brizgo smo suspenzijo prebrizgali do homogene strukture in po 3 ml prenesli v sterilne epruvete. Te smo označili z vrsto virusa, pasažo, dnevi gojenja in datumom (KME DMSO 7d/6p; 19/8-2008) ter jih zamrznili pri – 80 °C.

Po končanem gojenju virusa KME na celični kulturi smo preverili prisotnost virusa v pripravku s kvantitativno metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času in z metodo posredne imunofluorescence.

3.2.2 Vezava virusnega antigena na stekelca

Pred izvedbo metode posredne imunofluoresce smo morali na predmetna stekelca vezati virusni antigen (KME DMSO 7d/6p; 19/8-2008), ki smo ga namnožili na celični kulturi in shranili pri -80 °C. Najprej smo odmrznili epruveto z antigenom tako, da smo jo postavili v posodo s toplo vodo (37 °C) za 2 minuti. Nato smo epruveto centrifugirali 5 minut na 1500 rpm pri 4 °C. S pipeto smo odstranili supernatant in usedlino raztopili v 1,5 ml fosfatnega pufra (PBS, iz angl.: Phosphate Buffer Saline) ter ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Enak postopek smo ponovili še 3 krat. Pri zadnjem centrifugiranju smo supernatant odstranili, usedlino pa raztopili v 3 ml fiziološke raztopine z dodanim 5 % FTS. Nato smo s 70 % etanolom očistili predmetna stekelca. Uporabili smo stekelca s 15 polji (Biomedicals, kat. št.: 096041505). Pripravljeno suspenzijo celic smo še enkrat dobro premešali in v varnostni komori na stekelca nakapljali po 7 µl suspenzije na polje. Stekelca smo v varnostni komori pustili čez noč, da se je antigen popolnoma posušil. Ko so se stekelca posušila smo jih zložili v banjico in jih prelili z ledeno hladnim acetonom (-20 °C) in inkubirali 15 min, da smo antigen pritrdili na polja. Po inkubaciji smo stekelca posušili na staničevini in jih do uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.3 Metoda posredne imunofluorescence

Z metodo posredne imunofluorescence dokazujemo protivirusna protitelesa v serumu. Protitelesa v serumu namreč prepoznajo antigene in se nanje vežejo. Specifičen antigen je predhodno vezan na predmetno stekelce. Nastalemu imunskemu kompleksu dodamo sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna protitelesa, vezana na antigen. Sekundarna protitelesa so označena s fluorokromom (v našem primeru smo uporabili FITC- fluorescein izotiocianat), ki se aktivirajo pod vplivom svetlobe določene valovne dolžine in oddajo svetlobo druge valovne dolžine v vidnem delu spektra. Zaradi te lastnosti lahko nastali imunski kompleks opazujemo s fluorescentno svetlobo. Metoda posredne imunofluorescence je visoko specifična in občutljiva ter sorazmerno hitra, vendar je ocena rezultatov subjektivna, zato je pomembno, da jo izvaja izkušena oseba (Avšič Županc, 2002).

V mikrotitracijski ploščici smo serume redčili s fosfatnim pufrom v razmerju 1:10 (5 µl vzorca in 45 µl PBS). Tako pripravljeno redčino seruma smo nanесли na predmetna stekelca. Predmetna stekelca so bila shranjena na -20 °C, zato smo jih morali najprej odmrzniti in posušiti. Na vsako polje smo nanесли 7 µl redčenega seruma. Pri vsaki seriji testa smo uporabili tudi pozitivno in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo uporabili predhodno potrjen pozitiven mišji serum v redčini 1:10, za negativno kontrolo pa pufer PBS. Predmetna stekelca z nanešenimi vzorci smo 30 min inkubirali v vlažni komori pri sobni temperaturi. V tem času so se protitelesa, ki so bila v serumu prisotna, vezala na virusne antigene, ki so bili pritrjeni na predmetno stekelce.

Predmetna stekelca smo po inkubaciji sprali s pufrom PBS v kadički za spiranje. V kadičko smo položili predmetna stekelca ter dodali pufer PBS. Inkubirali smo 5 min ter nato odlili pufer PBS. Postopek spiranja smo ponovili trikrat. Na koncu smo predmetna stekelca sprali še z destilirano vodo ter jih pustili na zraku, da so se posušila.

Na vsa polja smo nato dodali 7 µl sekundarnih protiteles (zajčja protitelesa proti mišjim protitelesom: anti mouse IgG, Sigma Immuno Chemicals, kat. št.: F7506), ki so bila označena z fluorescein izotiocianatom. Konjugatu smo dodali še pufer PBS ter Evansovo modrilo (5 %). Konjugat smo redčili v razmerju 1: 128 (5 µl sekundarnih protiteles, 35 µl Evansovega modrila ter 600 µl pufru PBS). Sledila je 30 min inkubacija v vlažni komori pri sobni temperaturi.

Po končani inkubaciji smo še enkrat ponovili postopek spiranja ter predmetna stekelca na zraku posušili.

Na predmetna stekelca smo dodali nekaj kapljic mounting medium, ki je služil kot stabilizator slike. Paziti smo morali tudi na to, da ob pokrivanju predmetnega stekelca s krovnim stekelcem ni prišlo do nastanka zračnih mehurčkov, ki bi ob mikroskopiranju zakrivali sliko.

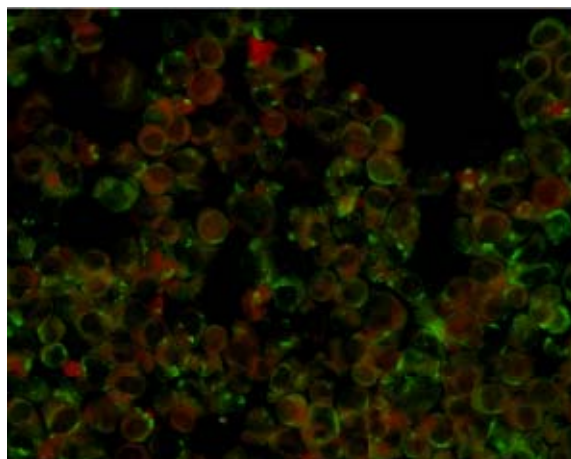
Mikroskopirali smo s fluorescentnim mikroskopom (Nikon Eclipse E80i), pri 400-kratni povečavi.

4 REZULTATI

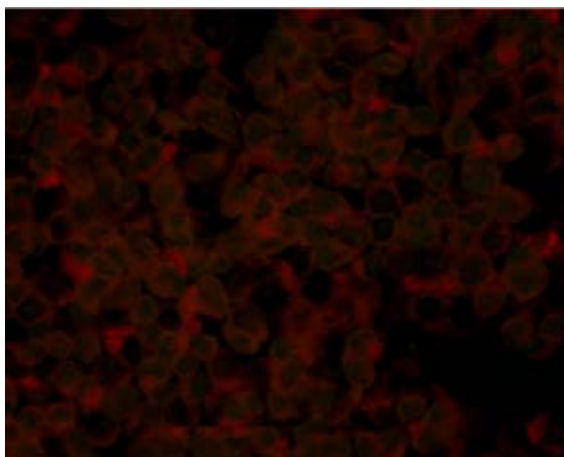
V časovnem obdobju od leta 1990 do leta 2008 je bilo v sodelovanju laboratorija za diagnostiko zoonoz (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo) in Prirodoslovnega muzeja Slovenije ujetih 2116 malih sesalcev. Ujeti so bili v 53 občinah znotraj 11 statističnih regij Republike Slovenije. V diplomski nalogi smo pregledali 1549 vzorcev, saj pri nekaterih vzorcih seruma ni bilo več na voljo.

V vzorcih smo z metodo posredne imunofluorescence določali protitelesa proti virusu KME.

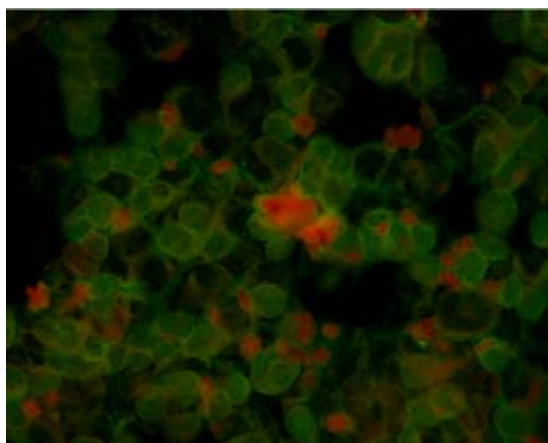
Pozitiven rezultat smo videli kot drobna zelena zrna v celicah (imunski kompleks z vezanim sekundarnim protitelesom, označenim s fluorokromom) (Slika 24). Pri negativnem rezultatu drobno zrnate fluorescence nismo videli (Slika 25), pri nespecifičnem rezultatu pa se je zelena obarvanost širila po celotni površini celic ter njihovi okolici (Slika 26). Serume z nespecifičnim rezultatom smo redčili (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 in 1:2560) ter jih ponovno pregledali z metodo posredne imunofluorescence. Pri nekaterih vzorcih je fluorescenca padala sorazmerno z redčitvami, zato smo te vzorce označili kot pozitivne. Na ta način smo 7 prvotno nespecifičnih vzorcev razvrstili v skupino pozitivnih rezultatov.



Slika 24: Mikroskopska slika sesalčjih celic, ki prikazuje pozitiven rezultat po izvedbi metode posredne imunofluorescence. Drobno zrnata fluorescenca v celicah predstavlja pozitiven rezultat.



Slika 25: Mikroskopska slika sesalčjih celic, ki prikazuje negativen rezultat po izvedbi metode posredne imunofluorescence. Odsotnost drobno zrnate fluorescence predstavlja negativen rezultat.

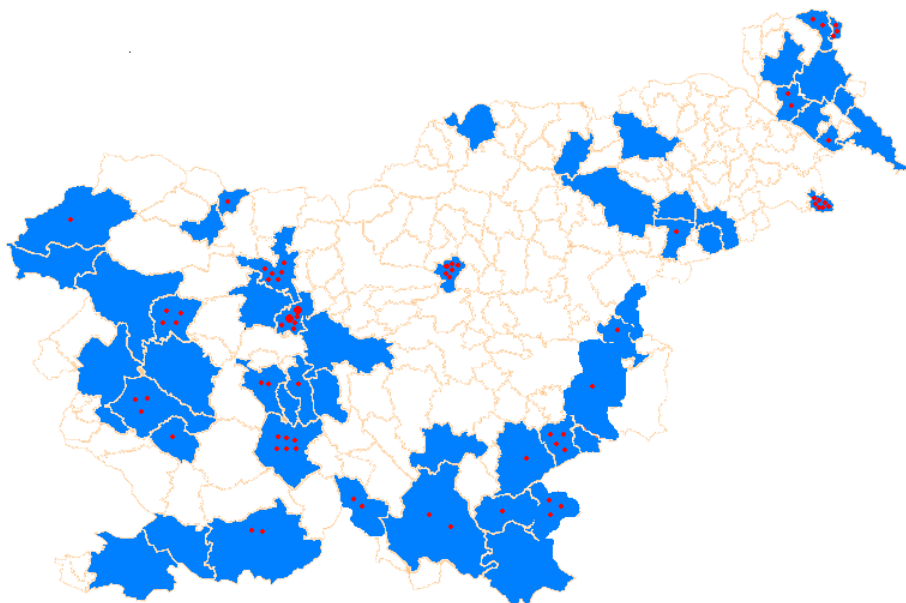


Slika 26: Mikroskopska slika sesalčjih celic, ki prikazuje nespecifičen rezultat po izvedbi metode posredne imunofluorescence. Zelena obarvanost celic, brez drobno zrnate fluorescence predstavlja nespecifičen rezultat.

Z metodo posredne imunofluorescence smo v serumih malih sesalcev določili specifična protitelesa proti virusu KME pri 88 vzorcih (6%). Nadalje smo rezultate opredelili glede na lokacijo ulova ter vrsto malih sesalcev (Priloga B, Priloga C).

4.1 POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KME PRI MALIH SESALCIH GLEDE NA OBMOČJE ULOVA

Mali sesalci so bili ujeti v 53 različnih občinah, v 11 statističnih regijah Republike Slovenije (Priloga A).



Slika 27: Območja ulova pregledanih malih sesalcev v Sloveniji od leta 1990 do leta 2008.

(Rdeče pike predstavljajo pozitivne vzorce. Majhna pika predstavlja 1 pozitiven vzorec, velika pika pa 10 pozitivnih vzorcev.)

Pregledali smo 286 vzorcev malih sesalcev ujetih v Osrednjeslovenski regiji, od tega 233 v občini Medvode. Iz Jugovzhodne regije smo pregledali 259 vzorcev in sicer največ, 80, iz občine Metlika. Po številu pregledanih vzorcev sledijo Goriška regija z 219 vzorci, Pomurska regija s 196 vzorci, Podravska s 174 vzorci, Gorenjska s 125 vzorci, Notranjsko-Kraška s 125 vzorci, Savinjska s 112 vzorci in Spodnjeposavska regija z 42 vzorci. Najmanj pregledanih malih sesalcev je bilo ujetih v Obalno- Kraški (10) in Koroški regiji (1).

Protitelesa proti virusu KME smo dokazali v 88 vzorcih seruma malih sesalcev, ki smo jih ujeli v 26 občinah, v 9 statističnih regijah Republike Slovenije (Slika 27).

Pri vzorcih iz Osrednjeslovenske regije smo protitelesa proti virusu KME dokazali v 27 primerih, od tega 24 iz občine Medvode. Večje število pozitivnih rezultatov smo dobili še pri vzorcih iz občin Središče ob Dravi, kjer je bilo pozitivnih 7 vzorcev ter Vransko, Kranj in Cerknica s po 6 pozitivnimi vzorci. Pozitivne rezultate smo dokazali v 13 vzorcih iz Jugovzhodne regije, vendar tu ne izstopa nobena posamezna občina, saj so bili pozitivni rezultati enakomerno porazdeljeni med občinami. V ostalih preiskovanih občinah je bilo manj pozitivnih rezultatov (Priloga A). Protiteles proti virusu KME nismo dokazali pri nobenem vzorcu iz občin Obalno-Kraške in Koroške regije.

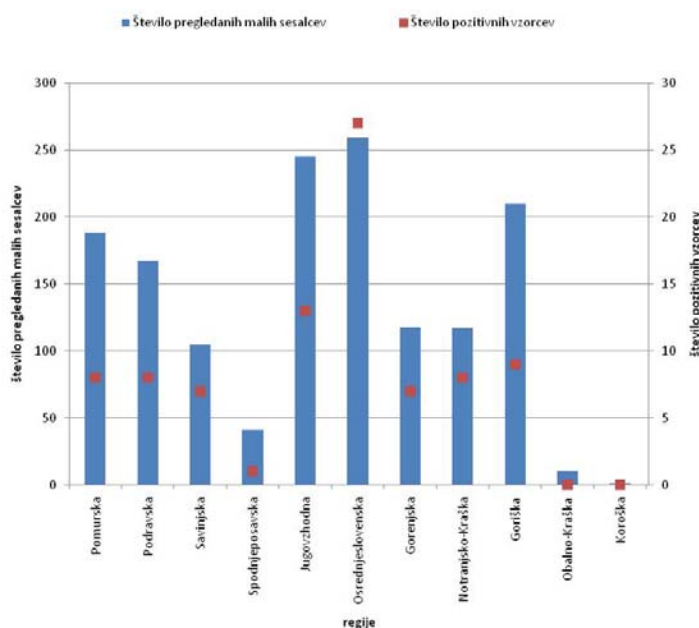
Izračunali smo pogostost okužbe z virusom KME med posameznimi preiskovanimi populacijami malih sesalcev.

$$\text{Pogostost okužbe z virusom KME} = \frac{\text{število seropozitivnih živali}}{\text{število pregledanih živali}} \quad \dots (1)$$

Preglednica 1: Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci, ujetimi v posameznih regijah Republike Slovenije od leta 1990 do leta 2008.

Regija ulova	Št. pozitivnih / Št. ujetih živali	Pogostost okužbe (%)
Pomurska	8/196	4,1
Podravska	8/174	4,6
Savinjska	7/112	6,3
Spodnjeposavska	1/42	2,4
Jugovzhodna	13/258	5,1
Osrednjeslovenska	27/286	9,4
Gorenjska	7/125	5,6
Notranjsko-Kraška	8/125	6,4
Goriška	9/219	4,1
Obalno-Kraška	0/10	0
Koroška	0/1	0

Med malimi sesalci je bila okužba z virusom KME najpogostejša v Osrednjeslovenski regiji in sicer 9,4%. Veliko število okužb z virusom KME smo ugotovili tudi pri malih sesalcih ujetih v Notranjsko-Kraški regiji- 6,4 %, v Savinjski regiji- 6,3 %, v Gorenjski regiji- 5,6 % ter v Jugovzhodni regiji- 5,1 %. V Goriški, Podravski in Pomurski regiji se je pogostost okužb med malimi sesalci gibala okrog 4 % in sicer je v Podravski regiji znašala 4,6 %, v Pomurski in Goriški regiji pa 4,1 %. Najmanjkrat se je okužba pojavila med vzorci iz Spodnjeposavske regije in sicer v 2,4 %.



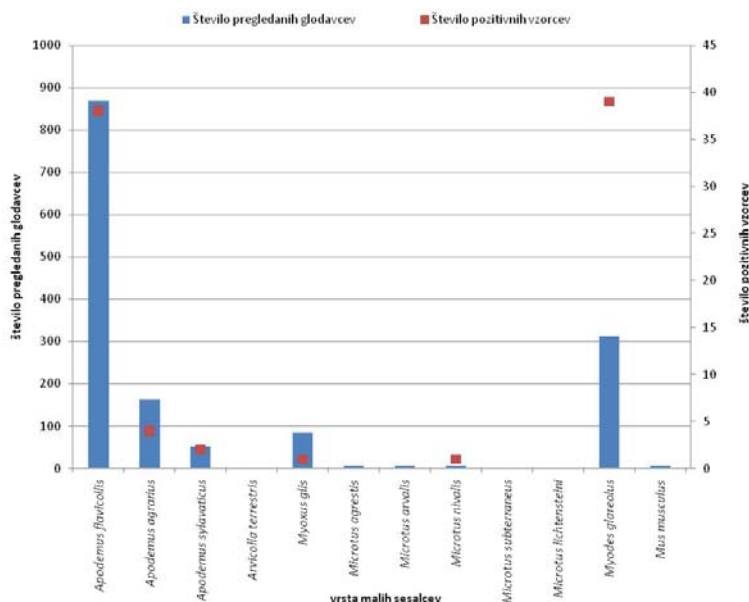
Slika 28: Število ujetih in pozitivnih vzorcev malih sesalcev razporejenih po regijah v Sloveniji od leta 1990 do leta 2008.

4.2 POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KME PRI RAZLIČNIH VRSTAH MALIH SESALCEV

Male sesalce smo identificirali in jih razvrstili po redih, na glodavce in žužkojede, ter na posamzne vrste.

Skupno smo ujeli 1510 glodavcev (lat. *Rodentia*) in 39 žužkojedov (lat. *Insectivora*). Pri pregledu vzorcev smo protitelesa proti virusu KME dokazali v 85 serumih glodavcev in 3 serumih žužkojedov. Izračunana pogostost okužbe z virusom KME je pri glodavcih 5,6 %, pri žužkojedih pa 7,7 %.

Med ujetimi glodavci smo ujeli 1084 miši iz rodu *Apodemus* sp. in sicer 868 rumenogrlih miši (lat. *Apodemus flavicollis*), 164 dimastih miši (lat. *Apodemus agrarius*) in 52 navadnih belonogih miši (lat. *Apodemus sylvaticus*). Pogosto smo ujeli tudi gozdne voluharice (lat. *Myodes glareolus*) (312) ter navadne polhe (lat. *Myoxus glis*) (84). Poleg naštetih živali smo ujeli še 6 travniških voluharic (lat. *Microtus agrestis*), 6 poljskih voluharic (lat. *Microtus arvalis*), 6 snežnih voluharic (lat. *Microtus nivalis*), vrtno voluharico (lat. *Microtus subterraneus*), 2 ilirski voluharici (lat. *Microtus lichtensteini*), 2 vodni voluharici (lat. *Arvicolla terrestris*) in 7 hišnih miši (lat. *Mus musculus*) (Slika 29).

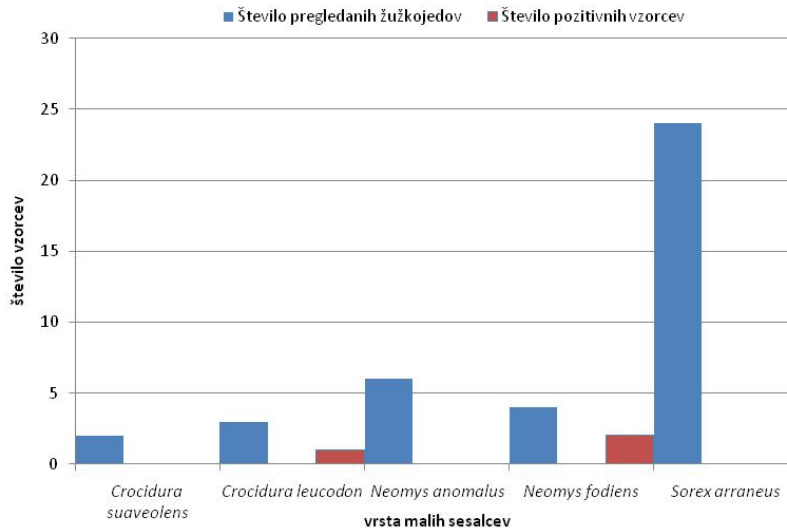


Slika 29: Različne vrste glodavcev, pri katerih smo iskali specifična protitelesa proti virusu KME, ujetih na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.

Protitelesa proti virusu KME smo najpogosteje dokazali pri gozdnih voluharicah: 39 pozitivnih od 312 pregledanih vzorcev. Pri rumenogrlih miših smo protitelesa dokazali pri 38 vzorcih, čeprav smo jih pregledali kar 868, kar je veliko več od ostalih vrst. Protitelesa proti virusu KME smo dokazali še pri dimasti (4) in belonogi miši (2), navadnemu polhu (1) ter snežni voluharici (1) (Priloga D).

Med glodavci smo okužbo največkrat dokazali pri gozdnih voluharicah, in sicer v 12,5 %. Pri rumenogrlih miših smo jo dokazali v 4,4 %. Pri ostalih vrstah je bila pogostost okužbe manjša od 4 % in sicer 2,4 % pri dimastih miših, 3,8 % pri belonogih miših ter 1,2 % pri navadnih polhih. Izjema so snežne voluharice (lat. *Microtus nivalis*), kjer smo pregledali 6 vzorcev in dokazali protitelesa le v 1 vzorcu, kar znaša 16,7 % (Preglednica 2).

V študijo smo vključili tudi 39 vzorcev žužkojedov. Največ vzorcev smo odvzeli gozdnim rovkam (lat. *Sorex araneus*) (24), vendar v nobenem nismo dokazali specifičnih protiteles proti virusu KME. Poleg gozdnih rovk smo ujeli tudi 6 močvirskih rovk (lat. *Neomys anomalus*), 2 vrtni rovk (lat. *Crocidura suaveolens*), 4 povodne rovk (lat. *Neomys fodiens*) in 3 poljske rovk (lat. *Crocidura leucodon*) (Slika 30).



Slika 30: Različne vrste žužkojedov, pri katerih smo iskali specifična protitelesa proti virusu KME, ujetih na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.

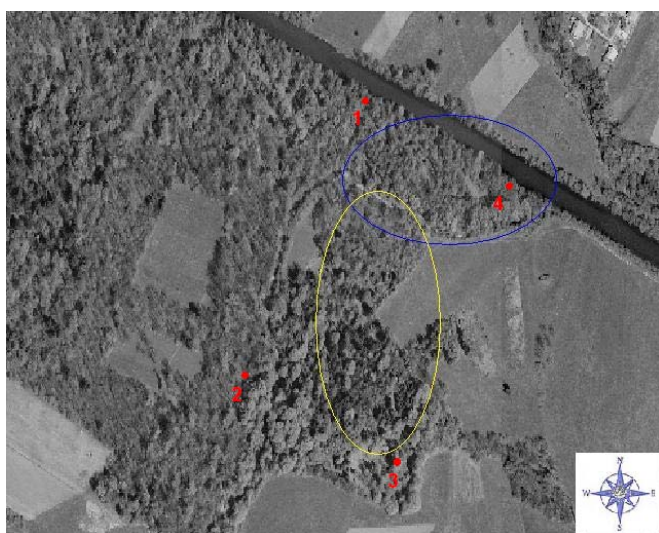
Pri žužkojedih smo specifična protitelesa proti virusu KME dokazali samo pri povodni (2/4) in poljski rovk (1/3).

Preglednica 2: Pogostost okužbe z virusom KME med posameznimi vrstami malih sesalcev, ujetimi na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.

Vrsta	Št. pozitivnih / Št. ujetih živali	Pogostost okužbe (%)
<i>Neomys fodiens</i>	2/4	50,0
<i>Crocidura leucodon</i>	1/3	33,3
<i>Myodes glareolus</i>	39/312	12,5
<i>Microtus nivalis</i>	1/6	16,7
<i>Myoxus glis</i>	1/84	1,2
<i>Apodemus flavicollis</i>	38/868	4,4
<i>Apodemus sylvaticus</i>	2/52	3,8
<i>Apodemus agrarius</i>	4/164	2,4

4.3 POGOSTOST OKUŽBE Z VIRUSOM KME PRI MALIH SESALCIH NA ENDEMSKEM OBMOČJU

Za spremljanje pogostosti okužbe z virusom KME pri malih sesalcih smo izbrali lokacijo Rakovnik v občini Medvode. Občina Medvode leži v Osrednjeslovenski regiji, ki spada med endemska območja z visoko aktivnostjo virusa KME v Sloveniji. Male sesalce smo lovili na obronku gozda ob vasi Rakovnik ter na obrežju reke Sore.



Podatki o lokaciji:

Zemljepisna širina: 4°22'56.65"

Zemljepisna dolžina: 46°8'50.99"

Nadmorska višina: 322m

Slika 31: Satelitska slika lovišča Rakovnik.

Lokacija Rakovnik je najbolj primerna za tovrstno študijo tudi zato, ker je zaradi raznolike pokrajine in gozda naseljena z velikim številom različnih vrst malih sesalcev. Lovišče je pokrito z mešanim gozdom, ki se stika z kmetijskimi površinami na eni strani in reko Soro na drugi strani. Lovišče ob reki je pokrito z listnatim gozdom in visoko podrastjo (Slika 32, levo) medtem, ko je gozd ob kmetijski površini predvsem iglast in praktično brez podrasti (Slika 32, desno).

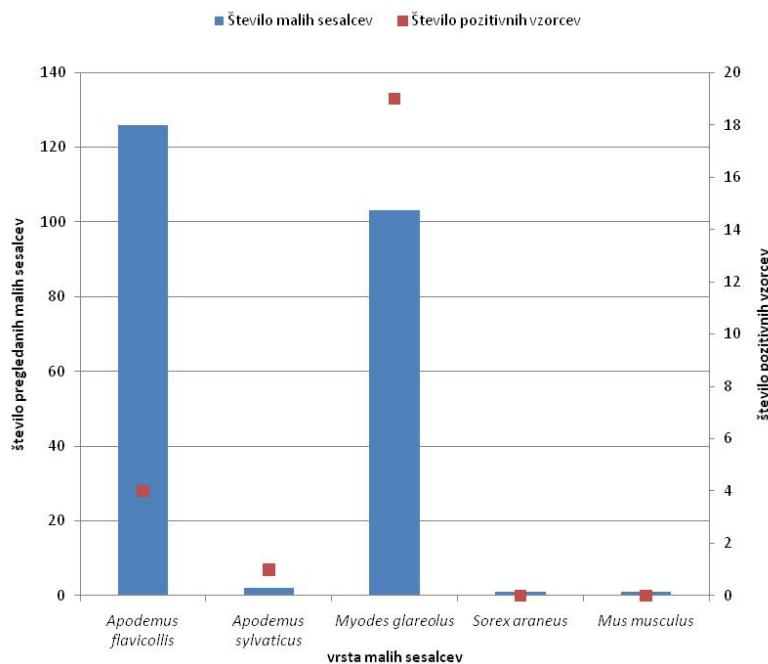


Slika 32: Slika lovišča ob reki Sori (levo) in na obronku gozda, ki se dotika kmetijske površine (desno).

Lovljenje malih sesalcev na tem območju je v času te raziskave potekalo šestkrat in sicer leta 1995, 1997, 1999, 2006, 2007 in 2008.

Med 9 pregledanimi malimi sesalci, ki so bili ujeti leta 1995, smo dokazali protitelesa proti virusu KME v 1 vzorcu. Med vzorci iz leta 1997 smo protitelesa dokazali v 4 vzorcih od 30, med vzorci iz leta 1999 pa v 2 vzorcih od 21. Med vzorci iz leta 2006 smo protitelesa dokazali v 3 od 25 vzorcev, med vzorci iz leta 2007 v 12 od 105 ter med vzorci iz leta 2008 v 2 od 43.

Skupno smo ujeli 126 rumenogrlih miši, poleg tega smo ujeli tudi 103 gozdne voluharice, 2 navadni belonogi miši, gozdno rovko in hišno miš. Med gozdnimi voluharicami smo dokazali protitelesa proti virusu KME v 19 vzorcih, pri rumenogrlih miših v 4 vzorcih ter pri eni navadni belonogi miši (Slika 33).



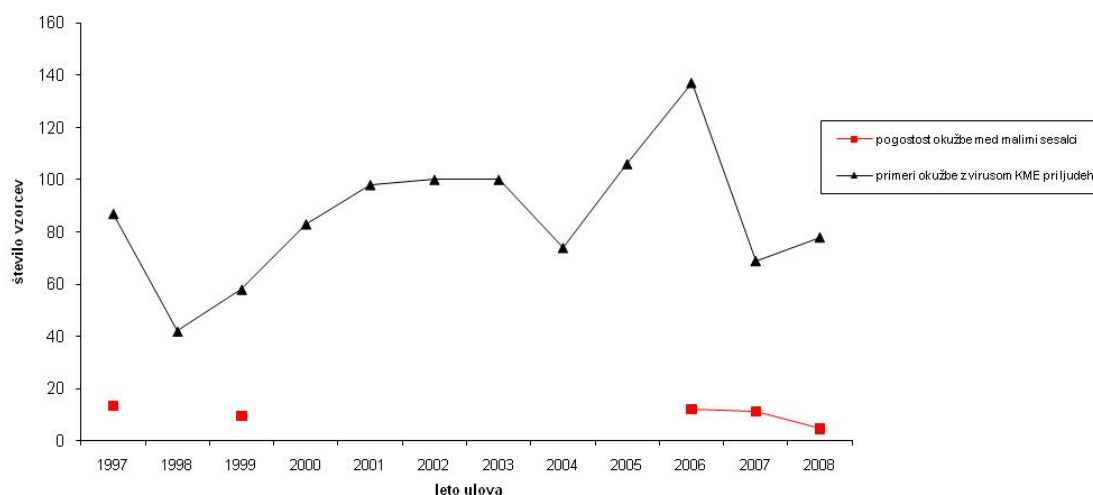
Slika 33: Različne vrste malih sesalcev, ujetih v občini Medvode v letih 1995, 1997, 1999, 2006-2008 pregledane na protitelesa proti virusu KME.

Pogostost okužbe z virusom KME med pregledanimi živalmi na lovišču Rakovnik je med leti 1995 in 2007 nihala med 9,5 in 13,3 % (Preglednica 3). Najnižja je bila leta 2008 (4,7 %) najvišja pa leta 1997 (13,3 %).

Preglednica 3: Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci, ujetimi v občini Medvode v letih 1995, 1997, 1999, 2006-2008.

Leto ulova	Št. pozitivnih / Št. ujetih živali	Pogostost okužbe (%)
1995	1/9	11,11
1997	4/30	13,3
1999	2/21	9,5
2006	3/25	12
2007	12/105	11,4
2008	2/43	4,65

Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci smo primerjali z objavljenimi podatki Inštituta za varovanje zdravja, ki vsako leto spremlja število bolnikov po vsej Sloveniji (Slika 34). Podatki so na voljo od leta 1997 naprej. Število okužb se je skozi leta gibalo med 42 in 137 prijavljenimi primeri. V letu 1997 je bilo v Osrednjeslovenski regiji 87 prijavljenih primerov. Od leta 1998 do leta 2003 je število okužb naraščalo in v letu 2006 doseglo vrh (137). V letu 2007 je število okužb upadlo (69), v letu 2008 pa se je zopet dvignilo na 78 primerov bolezni. Pri malih sesalcih je bila pogostost okužbe z virusom KME v letu 1997 najvišja (13,3 %), v letu 1999 pa je rahlo padla (9,5 %). V letu 2006 je bila pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci zelo visoka (12 %), v naslednjem letu pa malo manjša (11,4 %). V letu 2008 je bila pogostost okužbe z virusom KME najnižja (4,65 %).



Slika 34: Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci, ujetimi v občini Medvode v letih 1997, 1999, 2006-2008 v primerjavi s številom prijavljenih primerov okužb z virusom KME pri ljudeh v Osrednjeslovenski regiji od leta 1997 do leta 2008 (IVZ, 2009).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Uvod

Mali sesalci imajo v naravi pomembno vlogo pri kroženju virusa KME, saj sodelujejo kot gostitelji virusa in tudi kot gostitelji klopov, ki se na njih hranijo. Mali sesalci pri kroženju virusa KME lahko sodelujejo neposredno, kjer se klopi okužijo pri hranjenju na viremičnem gostitelju, ali pa posredno, kjer se klopi okužijo z virusom preko sočasnega hranjenja na neviremičnih gostiteljih. Klopi so naravni rezervoar tega virusa, saj se virus v njih ohranja in razmnožuje, hkrati pa so tudi njegovi glavni prenašalci (Kaiser, 2008).

Virus se z vbodom okuženega klopa lahko prenese tudi na človeka. Človek predstavlja za razširjanje virusa slepo vejo, saj se virus v krvi ne namnoži dovolj, da bi se lahko širil naprej (Süss, 2003). Klopni meningoencefalitis ima lahko za človeka hude posledice in je zato proučevanje naravnih gostiteljev virusa zelo pomembno. Potrebno je, da prepoznamo čim več endemskih območij virusa, da opazujemo spreminjanje števila okužb med ljudmi in živalmi, ter da ugotovimo katere živalske vrste pomembno sodelujejo pri ohranjanju in razširjanju virusa v naravi.

Mali sesalci so pomembni gostitelji klopov, predvsem nimf in ličink (Grešikova in Calisher, 1989). Prepoznavanje okuženih malih sesalcev lahko služi kot vodilo za prepoznavanje različnih oblik endemskih območij virusa. Prav zato smo z diplomsko nalogo zajeli male sesalce po celotni Sloveniji, ter s serološkimi metodami skušali v vzorcih seruma dokazati protitelesa proti virusu KME. Na ta način smo namreč dobili informacijo o pogostosti okužbe z virusom KME pri različnih vrstah malih sesalcev, na različnih lokacijah.

5.1.2 Analiza rezultatov

Z diplomsko nalogo smo želeli prikazati čim realnejšo sliko o razširjenosti virusa KME med malimi sesalci v Sloveniji. Na podlagi primerjave podatkov o razširjenosti okužbe z virusom KME pri malih sesalcih in ljudeh na določenih lokacijah, smo želeli določiti endemska območja virusa KME v Sloveniji. Endemsko območje je lokacija, kjer se nahajajo velike in stabilne populacije gostiteljev virusa in kjer vsaj 15 % prebivalstva vsebuje protitelesa proti temu virusu (Grešikova in Calisher, 1989).

Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci v Osrednjeslovenski regiji znaša 9,4 %, kar je največ v celotni Sloveniji. V tej regiji je bilo po podatkih Inštituta za varovanje zdravja od leta 1997 do leta 2008 kar 1032 ljudi s potrjeno okužbo z virusom KME. Glede na te rezultate sodi območje osrednje Slovenije med endemska območja z visoko aktivnostjo virusa KME. Poleg občine Medvode, ki leži v Osrednjeslovenski regiji, v kateri smo dokazali največ pozitivnih vzorcev (10,3 %), smo za endemska območja virusa KME prepoznali tudi občine drugih statističnih regij. V občini Kranj, ki spada v Gorenjsko regijo, je okužba z virusom KME med malimi sesalci prav tako zelo pogosta (8,3 %), hkrati pa na Inštitutu za varovanje zdravja beležijo tudi veliko število primerov okužbe med ljudmi, ki prihajajo iz tega območja (674). V Notranjsko-Kraški regiji smo največ okužb z virusom KME med malimi sesalci dokazali v občini Cerknica (14,6 %), v Podravske regiji v občini Središče ob Dravi (10,7 %) in v Savinjski regiji v občini Vransko (12,2 %). V vseh teh regijah je bilo prijavljenih veliko število primerov okužb pri ljudeh, kar pomeni, da je na teh območjih večja verjetnost okužbe z virusom KME.

V diplomski nalogi smo pregledali serume malih sesalcev iz reda glodavcev (*Rodentia*) in žužkojedov (*Insectivora*). Pregledali smo 1510 serumov glodavcev in 39 serumov žužkojedov. Okužbo z virusom KME smo pri glodavcih dokazali v 5,6 %, pri žužkojedih pa v 7,7 %. Ujeli smo veliko večje število glodavcev kot žužkojedov, zato podatkov ne moremo primerjati. Iz rezultatov lahko povzamemo to, da so lahko tudi živali iz reda žužkojedov gostitelji virusa KME.

Okužbo z virusom KME smo največkrat dokazali pri gozdnih voluharicah (lat. *Myodes glareolus*) in rumenogrlih miših (lat. *Apodemus flavicollis*). Pregledali smo tudi veliko vzorcev navadnega polha (lat. *Myoxus glis*) ter navadne belonoge (lat. *Apodemus sylvaticus*) in dimaste miši (lat. *Apodemus agrarius*), vendar je bila pogostost okužbe z virusom KME med njimi precej nizka in sicer nižja od 4 %. Ostalih ujetih malih sesalcev smo pregledali premalo, da bi lahko primerjali rezultate. Največkrat smo okužbo z virusom KME dokazali pri gozdnih voluharicah (12,5 %). V primerjavi z rumenogrlimi mišmi, kjer smo pregledali skoraj dvakrat več serumov in okužbo ugotovili v 4,4 %, so gozdne voluharice verjetno boljši gostitelji virusa KME in zato morda bolj pomembne za kroženje in ohranjanje virusa v naravi.

Poleg prepoznavanja endemskih območij virusa KME in določitve pogostosti okužbe z virusom KME med različnimi vrstami malih sesalcev, nas je zanimalo tudi spreminjanje števila okužb z virusom KME na določenem področju v več letnem obdobju. Za tovrstno proučevanje smo izbrali občino Medvode, saj smo tam ujeli največ malih sesalcev v različnih letih, kar nam je omogočalo spremljanje števila okužb med malimi sesalci v obdobju več let.

V občini Medvode smo lovili male sesalce v letih 1995, 1997, 1999 ter 2006, 2007 in 2008. Ugotovili smo, da je populacija malih sesalcev na tem območju stabilna, saj smo v vsakem letu lova dobili zadostno število vzorcev, med katerimi smo vedno dokazali tudi pozitivne vzorce. Največ pregledanih vzorcev iz te občine je pripadalo rumenogrlim mišim in gozdnim voluharicam. Okužbo z virusom KME smo tudi tukaj največkrat dokazali med gozdnimi voluharicami in sicer v 18,4 %. Zadostno število gostiteljev je torej virusu KME omogočalo stalno kroženje v naravnem okolju. Pogostost okužbe z virusom KME se je gibala med 10 in 13 %, razen v letu 2008, ko je padla na 4,6 %. Padec bi lahko bil posledica padca gostote malih sesalcev, kar je lahko posledica pomanjkanja hrane oziroma pojava novega plenilca. Število prijavljenih primerov okužb z virusom KME pri ljudeh se skozi leta ni bistveno spreminjalo (IVZ, 2009) in je nihalo podobno kot število okužb pri malih sesalcih. Z diplomsko nalogo smo ugotovili, da je na območjih z velikim številom okužb z virusom KME med malimi sesalci tudi večje število okužb z virusom KME med ljudmi. Razlogi za to so lahko povezani z gostoto in stabilnostjo populacije gostiteljev

virusa ali z večjo prisotnostjo ljudi v življenjskem okolju okuženih gostiteljev in prenašalcev virusa.

Rezultati diplomske naloge so omogočili prepoznanje območij v Sloveniji, kjer je virus KME v malih sesalcih sicer prisoten, pri ljudeh pa je okužba redka. To so endemska območja z nizko aktivnostjo virusa KME (Malovrh in Marc, 1997). Glede na našo raziskavo bi lahko kot endemska območja z nizko aktivnostjo virusa KME označili občine Šentjernej, Murska Sobota in Ajdovščina. Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci je v vseh občinah visoka: 10,3 % v Šentjerneju, 11,1 % v Murski Soboti in 13 % v Ajdovščini. Kljub temu pa je prijavljenih primerov okužb z virusom KME pri ljudeh, ki prebivajo v teh občinah, malo (IVZ, 2009). Iz tega sklepamo, da se virus na teh območjih verjetno ni prenašal na ljudi v taki meri, kot na ostalih opazovanih območjih. Razlog za to je lahko povezan s počasnejšim kroženjem virusa KME med prenašalci ali pa z manjšo prisotnostjo človeka v naravi na teh območjih.

Latentnih endemskih območij, kjer je virus KME v malih sesalcih sicer prisoten, pri ljudeh pa ne beležimo nobene okužbe, v naši raziskavi nismo prepoznali. Inštitut za varovanje zdravja namreč beleži primere okužb z virusom KME pri ljudeh na vseh področjih, ki jih je obravnavala naša raziskava.

V diplomski nalogi smo preiskovali 1549 serumov malih sesalcev, ujetih na različnih lokacijah po Sloveniji od leta 1990 do leta 2008. Negativnih vzorcev je bilo 1461, kar predstavlja 94 % od celotne pregledane populacije, pozitivnih pa 88, kar predstavlja 6 % od celotne pregledane populacije. Pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci v Sloveniji je bila večinoma med 5 in 10 %, kar ustreza podatkom o pogostosti okužbe z virusom KME med malimi sesalci na Slovaškem (Kozuch in sod., 1990).

Z diplomsko nalogo smo želeli prikazati pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci na področju Slovenije. Osrednjeslovensko regijo smo prepoznali za endemsko območje z visoko aktivnostjo virusa KME v Sloveniji. Okužba je v veliki meri prisotna tako pri malih sesalcih kot pri ljudeh. Podobno stanje je tudi na področju Gorenjske regije, predvsem na območju občine Kranj, ter v nekaterih občinah Podravske, Notranjsko-Kraške ter Savinjske regije. Med endemska območja z nizko aktivnostjo virusa KME smo uvrstili nekatere občine v Jugovzhodni, Pomurski in Goriški regiji. Ta področja bi bilo potrebno

zaradi možnosti večjega prenosa okužbe na ljudi v prihodnosti epidemiološko spremljati. Raziskava bi se morala nadaljevati v smeri sistematičnega jemanja vzorcev na celotnem področju Slovenije, vsako leto na istih lokacijah. Tako bi lahko spremljali tudi populacijsko dinamiko malih sesalcev in vpliv različnih dejavnikov na stanje njihove populacije. S tem bi lažje predvideli na katerih območjih v Sloveniji ima virus večjo možnost razširjanja. V stabilnih populacijah malih sesalcev virus namreč kroži hitreje, kar pomeni, da je prisotnih tudi več okuženih prenašalcev in posledično obstaja večja možnost okužbe človeka. Podatke o prekuženosti malih sesalcev in ljudi bi morali primerjati s podatki o prekuženosti klopov, kot glavnih gostiteljev in prenašalcev tega virusa, da bi razširjanje virusa med gostitelji in prenašalci v naravi lahko spremljali še natančneje.

5.2 SKLEPI

- Metoda posredne imunofluorescence je primerna za ugotavljanje protiteles proti virusu KME v serumih malih sesalcev.
- Pogostost okužbe z virusom KME pri malih sesalcih je v Sloveniji 6 %.
- Najpogosteje smo protitelesa proti virusu KME dokazali pri gozdni voluharici (12,5 %), ki je razširjena na področju celotne Slovenije.
- Gozdna voluharica je verjetno najbolj primerna za ohranjanje virusa v naravnem okolju.
- Na območjih Slovenije, kjer je število okužb z virusom KME pri ljudeh visoko, je tudi prekuženost malih sesalcev z virusom KME višja kot drugje po Sloveniji.
- Dokaz specifičnih protiteles proti virusu KME v serumu malih sesalcev je pomemben pokazatelj razširjenosti virusa KME v naravi. Menimo, da so mali sesalci primerni biološki pokazatelji za spremljanje in nadzorovanje virusa KME v naravi.

6 POVZETEK

Virus klopnega meningoencefalitisa sodi v družino *Flaviviridae*. Virus KME kroži v naravi med različnimi gostitelji in prenašalci. Naravne rezervoarje in prenašalce predstavljajo klopi, ki se hranijo s krvjo malih sesalcev, ki so najpomembnejši naravni gostitelji virusa KME (Kaiser, 2008). Klopi se z virusom KME lahko okužijo s hranjenjem na viremični živali ali pa s sočasn timer hranjenjem na neviremični živali (Bakhvalova in sod., 2009). Prenos virusa KME med njimi je način kroženja in ohranjanja virusa v naravi. Na to pot nemalokrat zaide tudi človek, pri katerem okužba lahko povzroči hudo obolenje osrednjega živčevja.

Z diplomsko nalogo smo želeli prikazati endemska območja z visoko in nizko aktivnostjo virusa KME ter latentna endemska območja. Primerjali smo število malih sesalcev, ki so prišli v stik z virusom KME s številom prijavljenih okužb z virusom KME pri ljudeh na različnih območjih Slovenije. Želeli smo tudi ugotoviti katera vrsta je najbolj zastopana med okuženimi malimi sesalci.

V ta namen smo zajeli vzorce serumov različnih vrst miši, polhov, voluharic in rovk, ki smo jih ujeli na različnih lokacijah v Sloveniji. V serumih smo z metodo posredne imunofluorescence dokazovali protitelesa proti virusu KME.

Rezultati so pokazali, da je pogostost okužbe z virusom KME med malimi sesalci v Sloveniji 6%. Kot endemska območja z visoko aktivnostjo virusa KME smo označili nekatere občine Osrednjeslovenske, Gorenjske, Notranjsko-Kraške, Savinjske in Podravske regije, kjer je bilo število okuženih malih sesalcev in število prijavljenih primerov okužb z virusom KME pri ljudeh veliko. Kot endemska območja z nizko aktivnostjo smo označili nekatere občine Jugovzhodne, Goriške in Pomurske regije. Latentnih endemskih območij nismo dokazali. Potrdili smo domnevo, da je na endemskih območjih z visoko aktivnostjo virusa KME prevalenca virusa med malimi sesalci večja, kot na drugih območjih. Okužbo z virusom KME smo največkrat dokazali pri gozdnih voluharicah s čimer smo ugotovili, da je ta vrsta živali verjetno najbolj primerna za ohranjanje virusa v naravnem okolju.

7 VIRI

Andera M. 2010a. *Apodemus sylvaticus*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/apodemus-sylvaticus-picture-2978.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010b. *Apodemus agrarius*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/apodemus-agrarius-picture-2976.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010c. *Arvicola terrestris*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/arvicola-terrestris-picture-3145.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010d. *Myoxus glis*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/glis-glis-picture-2985.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010e. *Microtus agrestis*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/microtus-agrestis-picture-2973.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010f. *Microtus arvalis*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/microtus-arvalis-picture-2972.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010g. *Microtus nivalis*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/chionomys-nivalis-picture-5662.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010h. *Microtus subterraneus*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/microtus-subterraneus-picture-2974.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010i. *Mus musculus*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.eu/mus-musculus-picture-2980.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010j. *Myodes glareolus*. Czech Republic, Naturfoto.

<http://www.naturephoto-cz.eu/clethrionomys-glareolus-picture-3105.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010k. *Neomys anomalus*. Czech Republic, Naturfoto.

<http://www.naturephoto-cz.eu/neomys-anomalus-picture-3010.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010l. *Neomys fodiens*. Czech Republic, Naturfoto.

<http://www.naturephoto-cz.eu/neomys-fodiens-picture-3009.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010m. *Sorex araneus*. Czech Republic, Naturfoto.

<http://www.naturephoto-cz.eu/sorex-araneus-picture-3005.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010n. *Crocidura suaveolens*. Czech Republic, Naturfoto.

<http://www.naturephoto-cz.eu/crocidura-suaveolens-picture-3011.html> (marec, 2010): 1 str.

Andera M. 2010o. *Crocidura leucodon*. Czech Republic, Naturfoto.

<http://www.naturephoto-cz.eu/crocidura-leucodon-picture-3004.html> (marec, 2010): 1 str.

Avšič-Županc T., Petrovec M., Jelovšek M., Strle F. 1995. Medicinsko pomembni arbovirusi v Sloveniji. Zdravniški vestnik, 64, Suppl. 3: S15-S19.

Avšič-Županc T., Petrovec M. 1997. Epidemiology of tick-borne encephalitis. V: Factors in the emergence of arbovirus diseases: Emergency diseases. Saluzzo J.F., Dodet B. (eds.). Paris, Elsevier: 215-222.

Avšič-Županc T., Poljak M. 1993. Uporaba metod molekularne virologije pri raziskovanju etiologije klopnega meningoencefalitisa. V: Klopni meningoencefalitis. Bedjaničev simpozij, Zdravilišče Dobrna, 25. sept. 1993. Celje, Infektološka sekcija SZD in Infekcijski oddelek bolnišnice Celje: 61-66.

Avšič-Županc T. 2002. Posredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 125-126.

Bakhvalova V.N., Potapova O.F., Panov V.V., Morozova O.V. 2009. Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents. *Virus Research*, 140: 172-178.

Bohdal J. 2006. *Apodemus flavicollis*. Czech Republic, Naturfoto.
<http://www.naturephoto-cz.com/yellow-necked-field-mouse:apodemus-flavicollis-photo-2604.html> (marec, 2010): 1 str.

Tick borne encephalitis facts. 2005. Canada, Baxter Corporation.
<http://www.tbefacts.com/about-tick-borne-encephalitis.html> (marec, 2010): 1 str.

IVZ. 2006. Cepljenje proti klopnemu meningoencefalitisu. Ljubljana, IVZ - Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije.
<http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=1268> (marec, 2010): 1 str.

IVZ. 2009. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji - letna poročila. Ljubljana, IVZ - Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije.
<http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=798> (marec, 2010): 12 str.

Gray J. 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Review of Medical and Veterinary Entomology*, 79: 323-333.

Grešikova M., Calisher C.H. 1989. Tick-borne encephalitis. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, 4: 177-202.

Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57: 129-146.

Gustafson R. 1994. Epidemiological studies on Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Suppl. 92: S1-S63.

Haglund M., Günther G. 2003. Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*, 21, Suppl. 1: S11-S18.

Heinz F.X. 2003. Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine*, 21: 3-10.

Holzmann H. 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 21, Suppl. 1: S36-S40.

Jereb M., Muzlovič I., Avšič-Županc T., Karner P. 2002. Severe tick-borne encephalitis in Slovenia: Epidemiological, clinical and laboratory findings. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114: 623-626.

Kaiser R. 2008. Tick-borne encephalitis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22: 561-575.

Korenberg E. 2000. Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick borne encephalitis virus. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 665-681.

Kozuch O., Labuda M., Lysy J., Weismann P., Krippel E. 1990. Longitudinal study of natural foci of Central European encephalitis virus in West Slovakia. *Acta Virologica*, 34, 537-544.

Kryštufek B. 1991. Sesalci Slovenije. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 294 str.

Kunz C. 1992. Tick-borne encephalitis in Europe. *Acta Leidensia*, 60, 2: 1-14.

Kunz C. 2003. Tick borne encephalitis. *Vaccine*, 21, Suppl. 1: S1-S2.

Labuda M., Austyn J. M., Zuffova E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysy J., Nuttall P. A. 1996. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology*, 219: 357-366.

Labuda M., Kozuch O., Zuffova E., Eleckova E., Hails R.S., Nuttall P.A. 1997. Tick-borne encephalitis transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent host. *Virology*, 235: 138-143.

Lindquist L., Vapalahti O. 2008. Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 371: 1861-1871.

Ludwig G.V., Iacono-Conners C. 1993. Insect-transmitted vertebrate viruses: *Flaviviridae*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology*, 29A: 296-309.

Malovrh T., Marc M. 1997. Proučevanje naravnih gostiteljev virusa klopnega meningoencefalitisa v aktivnih in latentnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Medicinski razgledi*, 36: 465-478.

McMinn P.C. 1997. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *Journal of General Virology*, 78: 2711-2722.

Monath T.P., Heinz F.X. 1996. Flaviviruses. V: *Fields virology*. 3rd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott – Raven Publishers: 961-1034.

Monath T.P., Tsai T.F. 1997. Flaviviruses. V: *Clinical virology*. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (eds.). New York, Churchill Livingstone Inc.: 1133-1185.

Pavlovsky E. 1947. Ticks and tick-borne encephalitis (in Russian). *Parazitologia Dalnego Vostoka Leningrad*, 5: 212-264.

Pucek Z., Jedrzejewski W., Jedrzejewska B., Pucek M. 1993. Rodent population dynamics in a primeval deciduous forest (Bialowieza National Park) in relation to weather, seed crop and predation. *Acta Theriologica*, 38, 2: 199-232.

Randolph S.E. 2001. Tick-borne encephalitis in Europe. *Lancet*, 358: 1731-1731.

Randolph S.E. 1998. Mighty theories from little acorns grow: Is Lyme disease risk predictable from mast-seeding by oak trees? *TREE*, 13, 8: 301-303.

Randolph S.E., Gern L., Nuttall P.A. 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, 12, 12: 472-479.

Rice C.M. 1996. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. V: *Fields virology*. 3rd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott – Raven Publisher. 931-960.

Richter D., Allgover R., Matuschka R. F. 2002. Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 12: 1421-1425.

Rosa R., Pugliese A. 2007. Effects of tick population dynamics and host densities on the persistence of tick-borne infections. *Mathematical Biosciences*, 208: 216-240.

Saksida A., Duh D., Lotrič-Furlan S., Strle F., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2005. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *Journal of Clinical Virology*, 33, 4: 331-335.

Schlesinger S., Schlesinger M.J. 1991. Replication of *Togaviridae* and *Flaviviridae*. V: *Fundamental virology*. 2nd ed. Fields B.N., Knipe D.N., Chanock R.M., Hirsch M.S., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B. (eds.). New York, Raven Press, Ltd.: 453-467.

Süss J. 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, 21, Suppl. 1: S19-S35.

Telford S.R. 3, Foppa I.M. 2000. Tickborne encephalitides. V: Tickborne infectious diseases: Diagnosis and management. Cunha B.A. (ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 193-213.

Tsai T.F. 2000. Flaviviruses. V: Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.). Philadelphia, Churchill Livingstone: 1714-1736.

Zavod za gozdove Slovenije. 2005. Splošni podatki in dejstva o gozdovih v Sloveniji. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije.

<http://www.zgs.gov.si/slo/gozdovi-slovenije/index.html> (marec 2010): 1 str.

Zeman P., Januška J. 1999. Epizootiologic background of dissimilar distribution of human cases of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a joint endemic area. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 22: 247-260.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Tatjani Avšič Županc, ki mi je omogočila izdelavo diplomske naloge na področju, ki me zanima in za vse strokovne nasvete pri pisanju.

Zahvaljujem se doc. dr. Miroslavu Petrovcu za hitro, natančno in strokovno recenzijo diplomske naloge.

Najlepša hvala Miši Korva in Nataši Knap za trud, koristne nasvete in potrpežljivost tako pri mojih prvih korakih v laboratoriju kot pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in WHO laboratoriju za vso pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se vsem sošolcem in prijateljem, ki so študentska leta spremenili v najlepša leta v mojem življenju.

Iskreno se zahvaljujem moji družini, očetu Janezu, mami Zdenki in sestri Tanji, ki mi vedno stojijo ob strani, verjamejo vame, se z menoj smejejo in jočejo in so najboljša družina kar jo človek lahko ima.

Zahvaljujem se Davidu, ki me je spremljal skozi vsa študijska leta, me spodbujal in mi stal ob strani pri vseh mojih podvigih.

Nazadnje se zahvaljujem tudi Simonu za vso tehnično pomoč, ko sem sama že skoraj obupala.

PRILOGE

Priloga A: Mali sesalci, pregledani na prisotnost protiteles proti virusu KME z metodo posredne imunofluorescence, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.

REGIJE	OBČINE	poz	neg	Σ
Pomurska	Beltinci		22	22
	Črešnovci	1	8	9
	Lendava		9	9
	Moravske toplice		2	2
	Puconci		33	33
	Murska Sobota	2	16	18
	Dobrovnik		4	4
	Hodoš	3	49	52
	Šalovci	2	45	47
Podravska	Slovenska Bistrica		8	8
	Lovrenc na Pohorju		24	24
	Središče ob Dravi	7	58	65
	Majšperk	1	22	23
	Kidričevo		6	6
	Maribor		2	2
	Podlehnik		11	11
	Videm		35	35
Koroška	Dravograd		1	1
Savinjska	Vransko	6	43	49
	Kozje	1	56	57
	Podčetrtek		6	6
Spodnjeposavska	Krško	1	36	37
	Kostanjevica na Krki		5	5
Jugovzhodna	Žužemberk		5	5
	Metlika	3	77	80
	Šentjernej	4	35	39
	Novo mesto	1	34	35
	Semič	1	16	17
	Črnomelj		6	6
	Kočevje	2	40	42

se nadaljuje

nadaljevanje **priloge A: Mali sesalci, pregledani na prisotnost protiteles proti virusu KME z metodo posredne imuno fluorescenca, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008.**

REGIJE	OBČINE	poz	neg	Σ
	Loški potok	2	33	35
Osrednjeslovenska	Ljubljana		7	7
	Vrhnika	2	22	24
	Brezovica	1	5	6
	Medvode	24	209	233
	Ig		14	14
	Borovnica		2	2
Gorenjska	Kranj	6	66	72
	Škofja Loka		7	7
	Žirovnica	1	25	26
	Bled		20	20
Notranjsko-Kraška	Cerknica	6	35	41
	Ilirska Bistrica	2	82	84
Goriška	Idrija		39	39
	Bovec	1	9	10
	Kobarid		9	9
	Tolmin		3	3
	Vipava	1	62	63
	Nova Gorica		14	14
	Cerkno	4	54	58
	Ajdovščina	3	20	23
Obalno-Kraška	Hrpolje-Kozina		3	3
	Koper		7	7
Σ		88	1461	1549

Priloga B: Število malih sesalcev, katerih serumi so vsebovali protitelesa proti virusu KME, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008, razdeljeni po vrstah.

REGIJE	OBČINE	<i>Apodemus flavicollis</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Crocidura leucodon</i>	<i>Myoxus glis</i>	<i>Microtus nivalis</i>	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Neomys fodiens</i>	Σ
Pomurska	Beltinci									
	Črešnovci	1								1
	Lendava									
	Moravske toplice									
	Puconci									
	Murska Sobota			1				1		2
	Dobrovnik									
	Hodoš	1						2		3
	Šalovci	1						1		2
Podravska	Slovenska Bistrica									
	Lovrenc na Pohorju							6		6
	Središče ob Dravi			1						1
	Majšperk	1								1
	Kidričevo									
	Maribor									
	Podlehnik									
	Videm									
	Dravograd									
Savinjska	Vransko	4						2		6
	Kozje				1					1
	Podčetrtek									
Spodnjeposavska	Krško	1								1
	Kostanjevica na Krki									
Jugovzhodna	Žužemberk									
	Metlika	3								3
	Šentjernej			1				1	2	4
	Novo mesto	1								1
	Semič	1								1
	Črnomelj									
	Kočevje	2								2
	Loški potok	2								2

se nadaljuje

nadaljevanje **priloge B: Število malih sesalcev, katerih serumi so vsebovali protitelesa proti virusu**

KME. ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008, razdeljeni po vrstah.

REGIJE	OBLČINE	<i>Apodemus flavicollis</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Crocidura leucodon</i>	<i>Myoxus glis</i>	<i>Microtus nivalis</i>	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Neomys fodiens</i>	
Osrednjeslo- venska	Ljubljana									
	Vrhnika							2		2
	Brezovica							1		1
	Medvode	4	1					19		24
	Ig									
Gorenjska	Borovnica									
	Kranj	3	1					2		6
	Škofja Loka									
	Žirovnica	1								1
	Bled									
Notranjsko- Kraška	Cerknica	5						1		6
	Ilirska Bistrica					1		1		2
Goriška	Idrija									
	Bovec						1			1
	Kobarid									
	Tolmin									
	Vipava			1						1
	Nova Gorica									
	Cerkno	4								4
	Ajdovščina	3								3
Obalno- Kraška	Hrpelje- Kozina									
	Koper									
Σ		38	2	4	1	1	1	39	2	88

Priloga C: Število malih sesalcev, katerih serumi so vsebovali protitelesa proti virusu KME, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008, razdeljeni po letih ulova.

REGIJE	OBČINE	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00	01	02	03	04	05	06	07	08	Σ
Pomurska	Beltinci																				
	Črešnovci							1													1
	Lendava																				
	Moravske toplice																				
	Puconci																				
	Murska Sobota									2											2
	Dobrovnik																				
	Hodoš											3									3
Podravska	Šalovci										2										2
	Slovenska Bistrica																				
	Lovrenc na Pohorju																				
	Središče ob Dravi								7												7
	Majšperk													1							1
	Kidričevo																				
	Maribor																				
	Podlehnik																				
Savinjska	Videm																				
	Dravograd																				
	Vransko																	6			6
	Kozje						1														1
	Podčetrtek																				
	Krško			1																	1
	Kostanjevica na Krki																				
	Zužemberk																				
Jugovzhodna	Metlika												3								3
	Šentjernej						4														4
	Novo mesto						1														1
	Semič												1								1
	Črnomelj																				
	Kočevo													2							2
	Loški potok																		2		2
	Ljubljana																				
Osrednjeslovenska	Vrhnika								1	1											2
	Brezovica						1														1
	Medvode						1		4		2							3	12	2	24

se nadaljuje

nadaljevanje **priloge C: Število malih sesalcev, katerih serumi so vsebovali protitelesa proti virusu KME, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008, razdeljeni po letih ulova.**

REGIJE	OBČINE	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00	01	02	03	04	05	06	07	08	Σ
	Ig																				
	Borovnica																				
Gorenjska	Kranj						1												4	1	6
	Škofja Loka																				
	Žirovnica													1							1
	Bled																				
Notranjsko-Kraška	Cerknica																	6			6
	Ilirska Bistrica						1	1													2
Goriška	Idrija																				
	Bovec						1														1
	Kobarid																				
	Tolmin																				
	Vipava									1											1
	Nova Gorica																				
	Cerkno											4									4
	Ajdovščina						3														3
Obalno-Kraška	Hrpelje-Kozina																				
	Koper																				
Σ				1			14	2	12	4	7	4	4	3	1			9	22	5	88

Priloga D: Mali sesalci, pregledani na prisotnost protiteles proti virusu KME z metodo posredne imunofluorescence, ujeti na področju celotne Slovenije od leta 1990 do leta 2008, razdeljeni po vrstah.

Vrsta malih sesalcev	Pregledani vzorci	Pozitivni vzorci
<i>Apodemus flavicollis</i>	868	38
<i>Apodemus agrarius</i>	164	4
<i>Apodemus sylvaticus</i>	52	2
<i>Arvicola terrestris</i>	2	
<i>Myoxus glis</i>	84	1
<i>Microtus agrestis</i>	6	
<i>Microtus arvalis</i>	6	
<i>Microtus nivalis</i>	6	1
<i>Microtus subterraneus</i>	1	
<i>Microtus lichtensteini</i>	2	
<i>Myodes glareolus</i>	312	39
<i>Mus musculus</i>	7	
<i>Crocidura suaveolens</i>	2	
<i>Crocidura leucodon</i>	3	1
<i>Neomys anomalus</i>	6	
<i>Neomys fodiens</i>	4	2
<i>Sorex araneus</i>	24	
Σ	1549	88