

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Emina DURMIŠI

**NAVADNI GOZDNI KLOP *Ixodes ricinus* KOT PRENAŠALEC VIRUSA
KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EUROPEAN SHEEP TICK *Ixodes ricinus* AS A VECTOR OF TICK-
BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko arbovirusov in rikecij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc
Somentorica: dr. Darja Duh
Recenzent: prof. dr. Mario Poljak

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Članica: dr. Darja Duh
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Član: prof. dr. Mario Poljak
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 20. 09. 2006

Delo je rezultat lastenga raziskovalnega dela.

Emina Durmiši

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7 + 595.2: 616.832 (043) = 863
- KG flavivirusi/virus klopnega meningoencefalitisa/klopni
meningoencefalitis/meningitis/*Ixodes ricinus*/klopi/verižna reakcija s
polimerazo/PCR/RT-PCR/nested PCR/RT-PCR v realnem času
- AV DURMIŠI, Emina
- SA AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (mentorica)/DUH, Darja (somentorica)/POLJAK, Mario
(recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2006
- IN NAVADNI GOZDNI KLOP *Ixodes ricinus* KOT PRENAŠALEC VIRUSA
KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA V SLOVENIJI
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 58 str., 5 pregl., 10 sl., 62 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Navadni gozdni klop vrste *Ixodes ricinus* je najpomembnejši pri razširjanju zahodnega podtipa virusa klopnega meningoencefalitisa (KME). Njegov življenjski krog zajema tri stadije: ličinko, nimfo in odraslo žival. Virus KME se v klopih prenaša vertikalno – transovarialno in transstadialno. Z diplomsko nalogo želimo ugotoviti pogostost okuženih klopov vrste *I. ricinus* z virusom KME v Sloveniji. Z metodo zastave smo nabirali klope mesečno od aprila do novembra 2005 na 8 lokacijah. Klope smo uredili v skupine in iz teh skupin smo osamili celokupno klopno RNA. Z metodo RT-PCR v realnem času smo preverili prisotnost virusne RNA. Virusno RNA smo pomnožili tudi z metodo RT-nested PCR in z določanjem nukleotidnega zaporedja potrdili verodostojnost pridelkov. Ugotovili smo, da imajo klopi v Sloveniji dvojno sezonsko aktivnost (pozno pomladi in jeseni). Za prenos virusa KME so odgovorni prav tako odrasli klopi kot nimfe. Na osnovi rezultatov smo dokazali, da je prekuženost klopov z virusom KME 0,6 %. Ugotovili smo tudi, da je virus KME v klopih genetsko soroden virusu KME v bolnikih. Le-ti so najbolj podobni izolatomu Neudoerfl in TBE263.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 578.7 + 595.2: 616.832 (043) = 863
- CX flaviviruses/tick-borne encephalitis virus/tick-borne encephalitis/meningitis/*Ixodes ricinus*/ticks/polymerase chain reaction/PCR/RT-PCR/nested PCR/real time PCR
- AU DURMIŠI, Emina
- AA AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (supervisor)/DUH, Darja (co-advisor)/ POLJAK, Mario (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2006
- TI EUROPEAN SHEEP TICK *Ixodes ricinus* AS A VECTOR OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN SLOVENIA
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 58 p., 5 tab., 10 fig., 62 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB European sheep tick *Ixodes ricinus* is the principal vector of the Central European virus subtype. The TBE virus is transmitted transovarially and transtadially, from egg to larva, nymph, and adult. The aim of our study was to establish the prevalence of TBEV infection in *I. ricinus* tick in Slovenia. Ticks were collected monthly between April and November 2005 by flagging at 8 locations. Collected ticks were pooled into groups and tick's RNA was isolated. With the real time RT-PCR we detected viral RNA. RT-nested PCR was used for the amplification of viral RNA and preparation of amplicons for sequencing. Dual activity of ticks was shown, peaking in May-July with a secondary rise in September. We demonstrated that nymphs are mostly responsible for transmission of pathogens. Based on the results, we calculated the 0,6 % overall prevalence of TBEV infection in ticks in Slovenia. With the sequencing we confirmed that TBEV in ticks is related to TBEV in patients, and both of them cluster together with Neudoerfl and TBE263 isolates.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Slovarček	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED	3
2.2 KLOPI	4
2.2.1 <i>Ixodes ricinus</i>	4
2.2.1.1 Anatomija klopov	5
2.2.1.2 Življenjski krog in ekologija	5
2.2.1.3 Iskanje gostitelja	6
2.2.1.4 Pritrjanje in hranjenje	7
2.2.1.5 Razmnoževanje	7
2.2.2 <i>Ixodes ricinus</i> v Sloveniji	9
2.3 VIRUS KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA	9
2.3.1 Značilnosti virusa KME	9
2.3.1.1 Zgradba virusa	9
2.3.1.2 Virusne beljakovine	10
2.3.1.3 Razmnoževanje virusa	11
2.3.1.4 Patogeneza virusne okužbe	11
2.3.1.5 Občutljivost in stabilnost virusa	12
2.3.2 Taksonomija virusa KME	12
2.3.2.1 Podtipa virusa KME	12

2.3.3	Prenos virusa v naravi	13
2.3.3.1	Klopi	13
2.3.3.2	Mali sesalci	13
2.3.3.3	Veliki sesalci in človek	15
2.3.4	Potek bolezni	15
2.3.5	Diagnostika KME	16
2.3.5.1	Serološke metode	16
2.3.5.2	Neposredno dokazovanje virusa	16
2.3.6	Verižna reakcija s polimerazo	17
2.3.6.1	Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo	17
2.3.6.2	Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR)	18
2.3.6.3	Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo v realnem času	18
2.3.7	Zdravljenje in preprečevanje	19
2.3.8	Epidemiologija okužb z virusom KME	20
3	MATERIAL IN METODE	21
3.1	MATERIAL	21
3.1.1	Vzorci klopov	21
3.1.2	Izbor lokacij	21
3.1.3	Metoda zastave	22
3.1.4	Razkuževanje klopov	23
3.1.5	Štetje in organiziranje vzorcev	23
3.2	METODE	23
3.2.1	Osamitev celokupne RNA iz klopov	23
3.2.1.1	Izbira začetnih oligonukleotidov	25
3.2.1.2	Preverjanje uspešnosti osamitve klopne RNA	26
3.2.1.3	Preverjanje RNA virusa KME z RT-PCR v realnem času	27
3.2.1.4	RT-PCR	27
3.2.1.5	PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi	28

3.2.2	Elektroforeza pridelkov PCR v agaroznem gelu	29
3.2.3	Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR	30
3.2.3.1	Čiščenje pridelkov PCR	30
3.2.3.2	Določanje koncentracije očiščene DNA	31
3.2.3.3	Izbira sekvenčnih nukleotidov za sekvenčno reakcijo	31
3.2.3.4	Sekvenčna reakcija	32
3.2.3.5	Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije	33
3.2.4	Analiza nukleotidnih zaporedij	34
4	REZULTATI	35
4.1	KLOPI	35
4.2	DOKAZ VIRUSA KME Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU	41
4.3	DOKAZ VIRUSA KME Z METODO PCR Z ZUNANJIMI IN NOTRANJIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI	42
4.4	DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ Z AVTOMATSKIM SEKVENIRANJEM	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1	UVOD	44
5.2	ANALIZA REZULTATOV	45
5.3	SKLEPI	48
6	POVZETEK	49
7	VIRI	51
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Podatki o izbranih lokacijah: endemičnost naravnega žarišča KME, občina in ime kraja, zemljepisna širina in dolžina ter nadmorska višina lokacije	str. 20
Pregl. 2: Število klopov <i>I. ricinus</i> po posameznih stadijih, eno-mesečno od aprila do novembra 2005 na 8-ih lokacijah v Sloveniji	36
Pregl. 3: Število skupin klopov nabranih na različnih lokacijah v Sloveniji v letu 2005	37
Pregl. 4: Prikaz izmerjenih temperatur (°C) in vlažnosti (%) po mesecih na lokacijah v Sloveniji v letu 2005	38
Pregl. 5: Vzorci klopov <i>I. ricinus</i> nabranih v Sloveniji v letu 2005 v katerih je dokazana virusna RNA z metodo RT-PCR v realnem času	41

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Razvojne stopnje klopa <i>I. ricinus</i>	7
Sl. 2: Samica klopa <i>I. ricinus</i> pri izleganju jajčec	7
Sl. 3: Zgradba viriona virusa KME	9
Sl. 4: Kroženje virusa KME v naravi med vektorji in gostitelji	13
Sl. 5: Geografska karta Slovenije z označenimi lokacijami nabiranja klopov	19
Sl. 6: Število klopov <i>I. ricinus</i> v letu 2005 v Sloveniji	39
Sl. 7: Število odraslih klopov <i>I. ricinus</i> v letu 2005 v Sloveniji	39
Sl. 8: Število nimf klopov <i>I. ricinus</i> v letu 2005 v Sloveniji	40
Sl. 9: Število ličink klopov <i>I. ricinus</i> v letu 2005 v Sloveniji	40
Sl.10: Filogenetsko drevo sorodnosti izolatov virusa KME iz klopov iz bolnikov in izolatov referenčnih sevov virusa KME	43

SLOVARČEK

cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
CEE	centralnoevropski encefalitis
DNA	deoksiribonukleinska kislina
KME	klopni meningoencefalitis
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RNA	ribonukleinska kislina
RSSE	ruski pomladno poletni encefalitis
RT-PCR	PCR z reverzno transkriptazo
RT-PCR v realnem času	PCR v realnem času z reverzno transkriptazo

1 UVOD

Virus klopnega meningoencefalitisa (KME) uvrščamo v družino *Flaviviridae*. Okužba z virusom KME povzroča pri človeku bolezen osrednjega živčevja – klopni meningoencefalitis. Znana sta dva podtipa virusa KME: zahodni podtip, ki je endemičen v osrednji in vzhodni Evropi in daljno vzhodni podtip, pogost predvsem v azijskem delu nekdanje Sovjetske zveze. Bolezen je značilna naravno žariščna okužba. Virus KME se v naravi ohranja s kroženjem med gostitelji kot so mali sesalci in divjad, ter klopi, ki so glavni prenašalci virusa. Navadni gozdni klop vrste *Ixodes ricinus* je najpomembnejši pri razširjanju zahodnega podtipa virusa KME. Življenjski krog navadnega gozdnega klopa zajema tri stadije: ličinko, nimfo in odraslo žival. Za prehod v naslednjo obliko se mora klop v vsakem stadiju hraniti na vretenčarju. Po hranjenju na viremičnem gostitelju postanejo klopi doživljenjsko kužni. Virus KME se v klopah prenaša vertikalno – transovarialno in transstadialno. Sezonska aktivnost klopa *I. ricinus* ima dva vrhova (pozno pomladi in jeseni), s čimer je povezana tudi pojavnost KME pri ljudeh v endemskih žariščih. V naravnih žariščih Evrope je stopnja okuženosti klopov od 0,1 % do 5 % in niha glede na endemsko področje. V Sloveniji ni natančnih podatkov o deležu okuženih klopov z virusom KME.

Z diplomsko nalogo želimo ugotoviti pogostost okuženih klopov vrste *I. ricinus* z virusom KME v Sloveniji. Pri pozitivnih vzorcih bomo molekularno genetsko opredelili tudi podtip virusa KME.

Z metodo zastave bomo nabirali klope in jih urejali v skupine za nadaljno obdelavo. Iz teh skupin bomo osamili celokupno RNA. Z metodo RT-PCR v realnem času bomo preverili prisotnost virusne RNA. Virusno RNA bomo dokazovali z metodo RT-PCR, kjer bomo virusno RNA najprej prepisali v cDNA in nadeljevali s postopkom PCR z zunanji in notranji začetnimi oligonukleotidi. Verodostojnost pridelkov bomo potrdili z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja s sekvenčno reakcijo.

Znatno višjo stopnjo okuženih klopov pričakujemo v visoko endemičnih območjih KME.

Menimo da bomo v klopah dokazali enake genetske različice virusa KME kot jih poznamo pri slovenskih bolnikih.

1.1 NAMEN DELA

Klopi so eni izmed najpomembnejših prenašalcev bolezni, ki prizadenejo ljudi in živali. Klop *I. ricinus* je v Evropi prenašalec evropskega podtipa virusa KME. V Sloveniji, kjer je KME endemičen, je *I. ricinus* poglavitni prenašalec virusa. Kljub temu, da poznamo bolezen že pol stoletja, ni objavljenih podatkov, ki bi natančno in sistematsko prikazali prekuženost klopov glede na endemska ali neendemska območja v Sloveniji.

Z diplomsko nalogo želimo ugotoviti pogostost okuženih klopov vrste *I. ricinus* z virusom KME v različnih predelih Slovenije. Klope bomo nabirali sistematsko in sicer mesečno na enakih, predhodno določenih, lokacijah med letom 2005. Zanima nas tudi ali/in kako je pogostost okuženih klopov z virusom KME povezana z razvojno stopnjo klopov. Zato bomo med letom nabirali ličinke, nimfe in odrasle klope. Želimo tudi potrditi ali so genetske različice virusa KME v klopih enake tistim, ki jih poznamo pri slovenskih bolnikih. Zato bomo za analizo uporabili molekularno biološke metode, kot so RT-PCR in določanje nukleotidnega zaporedja s sekveniranjem.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Klopi so že tisočletja znani kot človeški paraziti in so jih opisali že antični grški pisatelji kot sta Homer in Aristotel (Sonenshine, 1991). Aristotel je že v četrtem stoletju pred našim štetjem opisal klope kot "ogabne parazitske živali" (Gustafson, 1994). Klasifikacija klopov ima korenine v publikaciji Fauna Suecica iz leta 1746, ki jo je napisal Carl von Linné (Linnaeus) (Gustafson, 1994). Čeprav so klope preučevali dolgo časa, sta šele konec 19. stoletja Smith in Kilbourne prva pokazala, da lahko klopi prenašajo infekcijske bolezni. Ugotovila sta, da klop *Boophilus annulatus* prenaša parazita *Babesia bigemina* (Smith in Kilbourne, 1893). Od začetka dvajsetega stoletja dalje smatrajo klope za prenašalce bakterijskih povzročiteljev bolezni. Klopi niso le prenašalci različnih mikroorganizmov, temveč tudi njihovi rezervoarji (Parola in Raoult, 2001).

Klopni meningoencefalitis (KME) je ena najpomembnejših virusnih okužb osrednjega živčevja in je endemična v številnih evropskih državah ter večih državah nekdanje Sovjetske Zveze (Grešikova in Calisher, 1989).

Prve zapise, ki kažejo na klopni meningoencefalitis, so našli v cerkvenih registrih iz 18. stoletja na Olandskih otokih na Finskem (Gustafson, 1994). Avstrijski zdravnik Schneider je leta 1931 prvi klinično opisal to bolezen (Dumpis in sod., 1999). Na podlagi kliničnih in epidemioloških opazanj je bolezen poimenoval "meningitis serosa epidemica" neznane etiologije in kasneje Schneiderjeva bolezen (Gustafson, 1994). Etiologija bolezni je ostala nepojasnjena vse do leta 1937. Takrat je ekipi ruskih znanstvenikov pod vodstvom Zilberja na vzhodu Sibirije uspelo dokazati, da bolezen povzroča virus. Iz humanih vzorcev, miši in klopov vrste *Ixodes persulcatus* so izolirali virus in na podlagi tega sklepali, da povzročitelja bolezni prenaša klop (Kunz, 2003). Pavlovsky je glede na predhodna odkritja leta 1939 opisal osnovni način prenosa virusa v naravi ter postavil teorijo o naravnih žariščih (Grešikova in Calisher, 1989; Gustafson, 1994). Leta 1948, med epidemijo v tedanji Češkoslovaški, je virus prvi v Evropi osamil Gallia (Kunz, 1992). Po epidemiji na Češkoslovaškem leta 1951 so

dokazali možnost okužbe po oralni poti. Takrat je 660 ljudi zbolelo zaradi zaužitja surovega mleka okužene živine (Tsai, 2000).

Zaradi postopnega odkrivanja KME na različnih geografskih območjih se v literaturi še danes pojavlja mnogo sinonimov za to bolezen: "Kumlunge disease", "Taiga encephalitis", ruski pomladno poletni encefalitis, centralnoevropski encefalitis, dvofazna mlečna vročica (Kunz, 1992).

2.2 KLOPI

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

Največ klopov najdemo na vlažnih mestih mešanih gozdov, posebno na nizkem rastlinju ob gozdnih obronkih (Logar, 1999).

2.2.1 *Ixodes ricinus*

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

Klop *I. ricinus* je prenašalec številnih medicinsko pomembnih mikroorganizmov: borelij, babezij, erlihij in virusa klopnega meningoencefalitisa (Dumpis in sod., 1999). Razširjen je po vsej Evropi, od Irske, Velike Britanije, skandinavskih držav, preko srednje Evrope do Sredozemskega morja. Čeprav je njegov osnovni življenjski prostor gozd, ga najdemo tudi na travnikih (Sonenshine, 1993).

Vsaka razvojna stopnja teh kloпов se samo enkrat nahrani na gostitelju. Zatem se po daljšem ali krajšem času spusti na tla, prelevi in napade novega gostitelja (Logar, 1999).

2.2.1.1 Anatomija kloпов

Za vse klope so značilne štiri razvojne stopnje: oplojeno jajčece, larva ali ličinka, nimfa in odrasel klop. Ženski in moški spol ločimo samo pri odraslem klopju. Odrasli klopi in nimfe imajo štiri pare, larve pa tri pare nog. Pri samcih skutum prekrije celotno hrbtno stran telesa. Pri samičkah kot pri larvah in nimfah skutum prekrije samo sprednjo polovico hrbtne površine telesa (Sonenshine, 1991). Na sprednjem delu klopa so ustni deli, par palp in rostrum. Klopi vbadajo z rostrumom. Ta ima hipostom in par helicer. Hipostom je oborožen z zobci, ki so na proksimalnem delu večji kot na distalnem. Brez krvnega obroka razvojne oblike niso zmožne za levitev, odraslim samicom pa ne dozoriyo jajčeca (Logar, 1999).

Klopi imajo cirkulacijski sistem in vsi organi in tkiva so oblitni s cirkulirajočo tekočino hemolimfo (Sonenshine, 1991). Večina kloпов nima oči, ampak imajo različne periferne čutilne organe, kot so lasem podobne strukture na površini telesa, nog in na ustnem delu in čutilni organ na hrbtni površini prvih nog, Hallerjev organ. Hallerjev organ je prisoten pri vseh vrstah v vseh razvojnih stopnjah. Ti čutilni organi so zelo pomembni za klope, saj jim omogočajo, da poiščejo gostitelja in da komunicirajo z ostalimi klopi (Sonenshine, 2005).

2.2.1.2 Življenjski krog in ekologija

Vse razvojne stopnje klopa *I. ricinus* prezimijo v zgornji plasti zemlje ali pod odpadlim listjem. Aktivni postanejo, ko se temperatura zemlje dvigne na 5 do 7 °C. Vsaka razvojna stopnja išče gostitelja, se pritrdi, in se na njem hrani nekaj dni. Ko se klopi nasitijo, se spustijo in padejo z gostitelja, nato poiščejo mesto za počitek, kjer v miru prebavijo svoj obrok in se levijo v naslednjo razvojno stopnjo. Za klope je značilna diapavza, ki je hormonsko voden proces z nizko stopnjo metabolne aktivnosti. Vedenjska diapavza omogoča klopom, da dalj časa preživijo v ekstremnih okoliščinah brez hrane. Morfogenetska diapavza pa jim omogoča, da se preobrazijo iz ene razvojne stopnje v novo. Preobrazba iz ene razvojne stopnje v drugo ponavadi traja eno leto, življenjski krog klopa je torej dopolnjen v treh letih (Sonenshine,

1993). Klopi so relativno občutljivi na sušenje in se običajno nahajajo v travi in grmičevju. *I. ricinus* se najraje zadržuje v gozdovih, kjer je visoka relativna vlažnost in ni suhih mest.

Ličinka, nimfa in odrasel klop so aktivne razvojne stopnje klopov, ki se hranijo s krvjo gostitelja. Čeprav lahko vse tri prenašajo mikroorganizme, so dokazali, da so predvsem nimfe odgovorne za prenos patogenih mikroorganizmov na človeka (Sonenshine, 1993) .

2.2.1.3 Iskanje gostitelja

I. ricinus večino svojega časa preživi na zemlji med vegetacijo. Ko aktivno išče gostitelja, se hitro odzove na različne dražljaje, kot so CO₂, NH₃, vibracije v zraku in telesno temperaturo. Prav zaradi tega jih lahko zbiramo z metodo zastave, na katero se takoj pritrldijo, saj v začetku ne razlikujejo zastave od živega gostitelja (Sonenshine, 2005).

Strategije iskanja gostitelja se razlikujejo. Te vključujejo plezanje po grmičevju in travnih bilkah ali čakanje mimoidočih gostiteljev v zasedi. Slednja ustreza klopu *I. ricinus*. Višina, na katero klop spleza, je odvisna od razvojne stopnje. V večini primerov ličinke splezajo na nizko rastlinje blizu tal, kjer je najbolj verjetno, da bodo srečale majhne sesalce, ptiče, ki se hranijo na zemlji, in ostale gostitelje. Odrasli klopi splezajo na višje rastline, kjer je večja verjetnost, da bodo naleteli na večje živali kot so jeleni, različni mesojedci in človek. Klopi čakajo na spodnji strani lista lahko tudi več ur, vse dokler se ne začnejo izsuševati. Takrat se spustijo na tla, ki so hladnejša in vlažnejša. Tam pridobijo vodo z direktno absorbcijo atmosferske vlage. Potem splezajo nazaj na rastlino in čakajo gostitelja (Sonenshine, 2005).

V drugi strategiji so klopi lovci, ki so skriti v tleh, ko začutijo gostitelja pridejo na površje in hitro tečejo po zemlji ter napadejo gostitelja, ki je lahko 2 do 3 metre oddaljen (Sonenshine, 2005).

Klopi so glede na odnos do gostitelja prav tako razdeljeni v dve skupini. Obstajajo namreč klopi, ki so specifični za enega gostitelja in klopi, ki niso izbirčni in parazitirajo na vseh živalih, ki jim prekrizajo pot: sesalcih, ptičih in celo plazilcih. *I. ricinus* se običajno hrani na različnih gostiteljih, zlasti na velikih sesalcih, pa tudi na majhnih sesalcih in ptičih (Sonenshine, 1991).

2.2.1.4 Pritrjanje in hranjenje

Preden se začne hraniti, klop nekaj ur pleza po gostitelju. Klop išče na telesu zavetišče, kjer bo zaščiten. Pritrjanje se začne, ko klop vbode rilček v kožo. Najprej se zarijejo njegove helicere, ki razširijo ranico za hipostom. Zobci na hipostomu so obrnjeni nazaj, kar trdno pritrdi parazita v kožo (Logar, 1999). Temu sledi tvorba lepila, ki prepoji rano in se razširi ven na kožo v področje okoli ust. Lepilo je material iz proteinov, ki ga izločajo žleze slinavke. Hitro strjanje lepila pritrdi klopa na rano. Izločanje lepila traja 2 do 3 dni. Dokler se lepilo popolnoma ne strdi, se pritrjeni klopi lažje izpulijo iz kože. Po tem dolgotrajnem pritrjanju sledi sesanje krvi. Žleze slinavke izločajo različne snovi kot so antikoagulansi, antihistaminiki, lokalne anestetike, toksine in ostale encime, ki olajšajo sesanje krvi. Zaradi lokalnih anestetikov ne čutimo, ko klop vbode rilček v kožo.

Po pritrditvi morajo klopi najprej ustvariti novo kutikulo, da pripravijo dovolj prostora za veliko količino krvi, ki jo bodo izsesali. Zaradi tega klop ostane tako dolgo pritrjen (2 do 3 dni, pa vse do 13 dni za samice). Da bi skoncentriral svoj obrok krvi, mora klop odstraniti čim več odvečne vode. Zaradi tega se skupina celic v žlezah slinavkah med hranjenjem diferencira za izločanje vode. Čas slinjenja se izmenjuje s časom hranjenjem. Klop raste postopoma med časom hranjenja. Po končanem hranjenju se masa klopa poveča za ličinke in nimfe okoli 10 do 20 krat, za odrasle samice pa lahko tudi od 100 do 120 krat (Sonenshine, 2005).

2.2.1.5 Razmnoževanje

Pomembno vlogo pri obnašanju klopov imajo feromoni, ki so pomembni tudi pri iskanju gostiteljev in partnerjev za parjenje. Parjenje se večinoma odvija na gostitelju, običajno pred začetkom sesanja krvi, čeprav se *I. ricinus* lahko pari tudi na rastlinah. Po parjenju na gostitelju se samica spusti in pade na tla. Tam išče primerno razpoko ali odpadlo listje v gozdu in prebavi svoj obrok. Potem v tem zaklonišču izleže jajčeca, od 400 do več kot 20,000. Na vsako jajčece samica nanese vosek (Sonenshine, 1991). Jajčeca so ovalne oblike in komaj vidna s prostim očesom. Polaganje jajčec lahko traja več tednov nakar izčrpana samica umre. Inkubacijski čas jajčec traja od par tednov do nekaj mesecev glede na temperaturo. Po izvalitvi

iz jajčec so ličinke velike od 0,5 do 1,0 mm. Sledi njihov prvi obrok krvi in potem levitev v razvojno stopnjo nimfe. Temu sledi drugi obrok krvi in dozorevanje v odraslega klopa. Odrasla samica je velika 3 do 4 mm, samec 2,5 mm. Samec lahko oplodi več samic in potem umre (Gustafson, 1994).



Slika 1: Razvojne stopnje klopa *I. ricinus*. a) Nimfa; b) Odrasel samec; c) Odrasla samica d) Samica napita s krvjo gostitelja (Foto: Trilar, 2002)



Slika 2: Samica klopa *I. ricinus* pri izleganju jajčec. (Foto: Trilar, 2002)

2.2.2 *Ixodes ricinus* v Sloveniji

V Sloveniji je klop *I. ricinus* najpogostejša in najpomembnejša vrsta za kroženje mikroorganizmov v naravi. Naseljuje vse primerne niše od morske obale do nadmorske višine 1000 m. Preživetje klopa je odvisno predvsem od temperature in vlage v okolju. Temperaturno območje primerno za normalno aktivnost klopa je od 14 °C do 24 °C, najugodnejša vlažnost za klopa pa je med 92 % in 95 %. Klop *I. ricinus* ima številne gostitelje: plazilce, ptiče in sesalce. Razvojni krog od oplojenega jajčeca do odraslega klopa traja približno dve leti. Za klopa je značilna dvojna sezonska aktivnost z vrhoma spomladi in jeseni. Klop *I. ricinus* je v Sloveniji prenašalec številnih patogenih mikroorganizmov: erlihij, borelij, virusa klopnega meningoencefalitisa, rikecij in babezij (Duh, 2002).

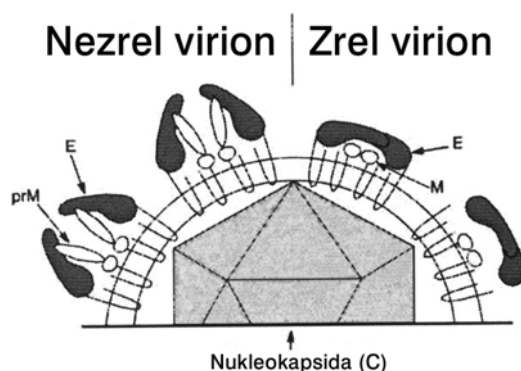
2.3 VIRUS KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA

2.3.1 Značilnosti virusa KME

2.3.1.1 Zgradba virusa

Virus KME je po zgradbi enak ostalim virusom družine *Flaviviridae*. Virusni delec sferične oblike meri v premeru od 40 do 60 nm (Rice, 1996). Virus je zgrajen iz: 6% ribonukleinskih kislin (RNA), 66 % beljakovin, 17 % lipidov in 9 % ogljikovih hidratov (Schlesinger S in Schlesinger MJ, 1991). Nukleokapsido, ki v premeru meri približno 30 nm, obdaja lipidna ovojnica (Rice, 1996). Nukleokapsida ščiti genom virusa pred celičnimi nukleazami in je gostiteljskega izvora (Monath in Heinz, 1996). Genom virusa predstavlja enovijačna pozitivno polarna RNA, ki je dolga približno 11.000 nukleotidov. Kratki nekodirajoči regiji na 5' koncu sledi en sam odprt bralni okvir dolg več kot 10.000 nukleotidov, ki mu sledi še kratka nekodirajoča regija na 3' koncu (Monath in Tsai, 1997). Genomska RNA je kužna in je edina virusna informacijska mRNA prisotna v okuženih celicah (Rice, 1996). Genom kodira tri strukturne beljakovine in sedem nestrukturnih beljakovin, ki sodelujejo pri razmnoževanju virusa (Ludwig in Iacono-Connors, 1993).

Genomska RNA je z eno vrsto kapsidnih proteinov povezana v kapsidno jedro. Kapsidni polipeptid, imenujemo ga tudi beljakovina C (iz angl.: capsid), je majhna močno bazična beljakovina, ki je med predstavniki rodu *Flavivirus* najmanj ohranjena. Nukleokapsido obdaja lipidni dvosloj z dvema vrstama virusnih beljakovin: neglikozilirana membranska beljakovina M (iz angl.: membrane), ki je v nezrelem virionu še v necepljeni prekurzorski obliki prM, in ovojnična beljakovina E (iz angl.: envelope), ki je glikozilirana (Ludwig in Iacono-Connors, 1993; Schlesinger S in Schlesinger MJ, 1991).



Slika 3: Zgradba viriona virusa KME (Heinz, 2003: 2)

Kratice: E, prM in C so strukturne beljakovine viriona.

2.3.1.2 Virusne beljakovine

RNA se prevede v eno samo polipeptidno molekulo. Primarni produkt translacije je nato kotranslacijsko in posttranslacijsko cepljen na specifičnih mestih z gostiteljskimi in virusnimi proteazami, da nastanejo posamezne strukturne in nestrukturne komponente, potrebne pri razmnoževanju virusa (Rice, 1996).

Po prevajanju in procesiranju virusnega genoma nastane 10 različnih beljakovin, od tega 3 strukturne (C, prM in E) in 7 nestrukturnih (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5).

Strukturne beljakovine so gradbeni elementi viriona. Beljakovina C je majhna, močno bazična beljakovina, ki tvori strukturno komponento nukleokapside. Beljakovina prM je glikoziliran prekurzor strukturne beljakovine M (Rice, 1996).

Beljakovina E je glavna ovojnična beljakovina virusa in je zato tudi glavna tarča nevtralizirajočih protiteles, mutacije v zapisu za to beljakovino imajo velik vpliv na patogenezo virusne okužbe.

Nestrukturne beljakovine najverjetneje sodelujejo pri razmnoževanju virusa.

2.3.1.3 Razmnoževanje virusa

Virus vstopi v celice gostitelja z receptorsko posredovano endocitozo (Ludwig in Iacono-Connors, 1993).

Po vstopu virusa pride do zlitja virusne membrane z membrano endocitotskega vezikla, kar je pogojeno z nizkim pH v veziklu. Nukleokapsida se sprostí v citoplazmo celice. Pozitivno polarna RNA služi direktno kot mRNA in celoten genom je prepisan v en sam poliprotein, ki vsebuje tako strukturne kot nestrukturne beljakovine. Posamezne beljakovine nastanejo s kotranslacijskim in posttranslacijskim cepljenjem z virusnimi in celičnimi proteazami (Telford in Foppa, 2000).

Zorenje virusov poteka na membranah endoplazmatskega retikuluma. Virusni delci nato potujejo proti celični membrani po cisternah trans-Golgijevega omrežja in se z eksocitozo sprostijo iz celice (Heinz, 2003).

2.3.1.4 Patogeneza virusne okužbe

Virus KME je pantropen, kar pomeni, da se razmnožuje v celicah vseh organov in tkiv, predvsem pa v celični citoplazmi celic osrednjega živčevja (Jung, 1992).

Po ugrizu klopa so virus dokazali v Langerhansovih celicah kože. Od tam se virus preko lokalnih limfnih vozlov in limfatičnega sistema preseli v krvni obtok. Po krvi doseže različne organe, predvsem retikulo-endotelijski sistem (vranica, jetra in kostni mozeg). Virus se v organih namnoži in sprošča nazaj v krvni obtok, kar omogoča nekaj dnevno trajanje viremije. V času viremije pride tudi do vstopa virusa v možgane (McMinn, 1997).

Sposobnost virusa, da povzroči citopatsko okužbo centralnega živčevja in razvoj encefalitisa, imenujemo nevrovirulenca (McMinn, 1997).

2.3.1.5 Občutljivost in stabilnost virusa

Zaradi lipidne ovojnice se flavivirusi enostavno (hitro) inaktivirajo z organskimi topili in detergenti (Rice, 1996). Virusi so optimalno obstojni pri temperaturah pod $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ propadejo v 30 minutah. Flavivirusi so optimalno obstojni pri pH 8,4 do 8,8 in pri nizkem pH hitro propadejo. Virus KME se v tem razlikuje od ostalih flavivirusov, saj je relativno odporen 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).

2.3.2 Taksonomija virusa KME

Flaviviridae je družina strukturno enotnih virusov s pozitivno polarno enoverižno RNA, ki jo delimo na rodove *Flavivirus*, *Pestivirus* in *Hepacivirus* (Virus taxonomy..., 2000). Družina je dobila ime po bolezni rumena mrzlica – rumena iz lat.: flavus, saj je bil povzročitelj te bolezni prvi virus, izoliran iz te družine (Monath in Tsai, 1997).

V rod *Flavivirus* uvrščamo več kot 68 virusov, katerih večino prenašajo na vretenčarje kronično okuženi komarji in klopi (Rice, 1996). Na podlagi antigenskih determinant beljakovine E lahko s serološkimi testi (test navzkrižne reaktivnosti in nevtralizacijski test) razdelimo flaviviruse v 8 serokompleksov (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Velik serokompleks predstavljajo flavivirusi, ki jih prenašajo klopi – serokompleks TBE (iz angl.: tick-borne encephalitis). V ta serokompleks uvrščamo 14 antigeno zelo sorodnih virusov, od katerih jih 8 povzroča bolezni pri ljudeh. Najpomembnejši med njimi je virus KME (Monath in Heinz, 1996).

2.3.2.1 Podtipa virusa KME

Poznamo dva podtipa virusa KME: virus centralnoevropskega encefalitisa (CEE), ki ga predstavlja prototip Neudorfl, in virus ruskega pomladno poletnega encefalitisa (RSSE), katerega prototip je virus Sofjin (Pletnev in sod., 1990).

Podtipa se razlikujeta v svojih prenašalcih: *I. ricinus* prenaša virus CEE in *I. persulcatus* RSSE; in v poteku bolezni pri ljudeh. Evropska oblika KME je običajno blažja od RSSE. CEE

ima navadno dvofazen potek, medtem ko ima RSSE eno samo fazo (Avšič-Županc in Petrovec, 1997). Tudi smrtnost je pri CEE mnogo nižja (1%) od smrtnosti pri RSSE (20%).

2.3.3 Prenos virusa v naravi

2.3.3.1 Klopi

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

Glavni prenašalec zahodnega podtipa virusa KME v Evropi je klop *Ixodes ricinus*, medtem ko je klop *I. persulcatus* glavni prenašalec daljnovzhodnega podtipa virusa v azijskem delu nekdanje Sovjetske Zveze (Avšič-Županc in sod., 1995). Kot vektorji lahko služijo tudi druge vrste klopov, te vrste so še: *I. arboricola*, *I. hexagonus*, *Haemaphysalis punctata*, *H. concinna*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus* (Gustafson, 1994; Süss, 2003).

Po hranjenju na viremičnem gostitelju postanejo klopi doživljenjsko kužni (Kunz, 1992). Virus se v klopu razmnožuje v različnih organih, tudi žlezah slinavkah, in se prenaša s slino ob vbodu klopa (Avšič-Županc in Petrovec, 1997). Virus KME se v klopih prenaša vertikalno. Vertikalni prenos vključuje spolni (iz okuženega samca na samico), transovarialni (iz samice na jajčeca) in transstadialni (iz ličinke na nimfo, iz nje na odraslo žival) prenos (Malovrh in Marc, 1997). Za dolgotrajni obstoj pa je zaradi izgub virusa pri prehodih v nove stadije (le 1% jajčec okužene samice prejme virus; le 10% odraslih klopov, ki se razvijejo iz okuženih ličink, in 30% iz okuženih nimf, je okuženih) nujno potreben še horizontalni prenos, ki vključuje stik med klopi in sesalci (Malovrh in Marc, 1997).

2.3.3.2 Mali sesalci

Znanih je vsaj 10 vrst glodalcev, ki lahko služijo kot gostitelj virusa. Pomembni rezervoar virusa so tudi žužkojedi (rovke, krti, ježi), katerih populacije so v nasprotju z glodalci precej stabilne. V teh živalih je viremija dovolj visoka, da se klopi ob hranjenju lahko okužijo. Okužba gostiteljev poteka po do sedaj znanih podatkih brez simptomov. Glavni gostitelji so

2.3.3.3 Veliki sesalci in človek

Velike živali ne razvijejo viremije do te mere, da bi lahko prišlo do okužbe klopov, zato predstavljajo slepo vejo za nadaljnji prenos virusa. Vendar pa te živali omogočajo razmnoževanje klopov in na ta način posredno pripomorejo k ohranjanju virusa v naravi (Avšič-Županc in Petrovec, 1997).

Dokazano je tudi, da lahko okužen klop ob sočasnem hranjenju na istem gostitelju prenese virus na neokuženega klopa, kljub odsotnosti viremije gostitelja (Randolph in sod., 1996).

Na človeka lahko prenesejo virus vse razvojne oblike klopa. Ogroženi so predvsem ljudje, ki živijo, delajo ali se zadržujejo v naravnih žariščih virusa KME (Malovrh in Marc, 1997).

2.3.4 Potek bolezni

Klopni meningoencefalitis je virusno obolenje osrednjega živčnega sistema. Večina okužb z virusom KME poteka asimptomatsko – brez bolezenskih simptomov in znakov. Upravičenost tega sklepa potrjuje velika prekuženost prebivalstva endemičnih področij. Pri vsaj dveh tretjinah bolnikov, ki kažejo prizadetost osrednjega živčevja, pa je potek bolezni dvofazen (Lotrič-Furlan in sod., 2002).

Prva, viremična faza bolezni, nastopi običajno 7-14 dni po okužbi in traja do enega tedna. Zanj so značilni nespecifični, gripi podobni simptomi – vročina, glavobol, slabo počutje, utrujenost in včasih bolečine v trebuhu (Logar in sod., 2000). Prvi fazi bolezni sledi asimptomatski interval, ki traja približno en teden, nato pa nenadno nastopi druga, akutna faza bolezni z znaki meningitisa, meningoencefalitisa ali meningoencefalomielitisa. Praviloma to fazo spremlja močan glavobol, slabost, bruhanje, otrdelost vratu in vročina (Kunz, 1992). Akutna faza bolezni lahko traja tudi več tednov. Večina bolnikov si po preboleli bolezni popolnoma opomore (Jereb in sod., 2002; Logar in sod., 2000). 10 do 20 % bolnikov pa čuti dolgotrajne ali celo trajne posledice, kot so glavobol, motnje v zaznavanju, koncentraciji in spominu, depresija, motnje sluha, koordinacije in ravnotežja, trajne pareze obraznih mišic in ohlapne paralize udov (Kunz, 1992).

Praviloma je potek bolezni pri otrocih blažji kot pri odraslih. Resnost bolezni narašča s starostjo in je najvišja pri ljudeh starejših od 60 let. Smrtnost KME je nizka: okoli 1% (Jereb in sod., 2002; Logar in sod., 2000).

Tudi potek bolezni po zaužitju okuženega mleka je dvofazen, podoben omenjenemu poteku po ugrizu klopa (Gritsun in sod., 2003).

2.3.5 Diagnostika KME

2.3.5.1 Serološke metode

Za hitro diagnostiko KME so danes najprimernejše različne serološke metode, ki temeljijo na dokazovanju specifičnih protiteles.

Edina pomanjkljivost seroloških metod je, da le posredno dokazujejo okužbo z virusom KME (Avšič-Županc in Poljak, 1993).

2.3.5.2 Neposredno dokazovanje virusa

Za neposredni dokaz okužbe je še vedno "zlata" metoda poskus osamitve virusa iz kužnin bolnika.

V novejšem času se vse bolj uveljavljajo metode molekularne virologije, ki so visoko občutljive, specifične in hitre (Avšič-Županc in sod., 1995). Največji diagnostični in raziskovalni pomen ima verižna reakcija s polimerazo (PCR, iz angl.: polymerase chain reaction). S to metodo je namreč mogoče neposredno dokazati virus v kužnini bolnikov, brez predhodne osamitve, kot tudi dokazati virus v njegovih prenašalcih ali gostiteljih (Avšič-Županc in Poljak, 1993). Prednost te metode je tudi, da je okužbo z virusom mogoče dokazati še pred pojavom protiteles (Holzmann, 2003).

Metoda PCR se je v primeru virusa KME izkazala za zelo uporabno pri dokazovanju virusa v klopah in s tem za proučevanje naravnih žarišč (Puchhammer-Stöckl in sod., 1995; Ramelow in sod., 1993; Schrader in Süß, 1999; Süß in sod., 1997).

Razvili so kvantitativno metodo RT-PCR v realnem času za preverjanje prisotnosti virusne RNA v klopih. Metoda je zelo občutljiva, saj zazna tudi manj kot deset kopij RNA molekul virusa (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

Primerna metoda za dokazovanje virusa KME v vzorcih krvi in seruma odvzetih v zgodnji fazi bolezni, še pred pojavom protiteles je metoda PCR. Zato ima uporaba te metode lahko velik pomen predvsem v diferencialni diagnostiki, za dokazovanje okužbe z virusom KME pri bolnikih z nepojasnjanim vročinskim stanjem, kjer znaki meningitisa še niso izraženi (Saksida in sod., 2005).

2.3.6 Verižna reakcija s polimerazo

2.3.6.1 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, iz angl.: polymerase chain reaction) je metoda sinteze nukleinskih kislin *in vitro*, s katero lahko z uporabo temperaturno obstojne polimeraze DNA v kratkem času pomnožimo določeni odsek DNA v velikem številu kopij (Poljak in sod., 1994). Zaradi tega za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca, kar pomeni bistveno prednost PCR pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije, kjer analiziramo nepomnoženo DNA oziroma RNA in potrebujemo večje količine celic ali tkiv (Coleman in Tsongalis, 1997; Albert in sod., 1994).

Dokazovanje virusov s PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju za določen virus specifičnega, majhnega odseka njegovega dednega materiala. Metoda PCR je uspešna, če reakcijska mešanica vsebuje naslednje sestavine; tarčno dvojno vijačno DNA, dva začetna oligonukleotida z znanim zaporedjem, encim DNA- polimerazo, deoksinukleotidtrifosfati (dNTP) vseh štirih baz v enakih koncentracijah in pufer z optimalnim pH in ionsko jakostjo, kjer je najbolj pomembna koncentracija Mg^{2+} ionov, saj vpliva na encimsko aktivnost in natančnost (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en temperaturni cikel PCR. Pri prvi temperaturi (navadno 95 °C), v procesu denaturacije, dvovijačna molekula vzorca preide v dve enovijačni molekuli. Pri drugi temperaturi (navadno

med 45 °C in 75 °C) se začetni oligonukleotidi pripenjajo na komplementarna dela vzorčne DNA. Pri tretji temperaturi (navadno 72 °C) poteka podaljševanje začetnih oligonukleotidov oz. sinteza nove komplementarne molekule DNA v smeri od 5' konca proti 3' koncu. Novi molekuli DNA sta med seboj komplementarni in v novem ciklu PCR sposobni vezati enake začetne oligonukleotide. Število pomnoženih molekul DNA s vsakim ciklom eksponentno narašča.

PCR poteka v računalniško vodeni inkubacijski aparaturi (Poljak in sod., 1994).

2.3.6.2 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR)

Verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR) je različica metode PCR. Ker s PCR lahko pomnožujemo le molekule DNA, je za dokazovanje virusov z RNA genomom potrebno pred izvajanjem PCR izolirano virusno RNA prepisati v komplementarno virusno DNA (cDNA, iz angl., complementary DNA). Za ta namen uporabljamo encim reverzno transkriptazo, osamljeno iz virusa ptičje mieloblastoze (AMV, iz angl.: Avian Myeloblastosis Virus).

Prepis RNA v cDNA poteka v štirih stopnjah:

- veriga DNA se najprej sintetizira na molekuli RNA z encimom reverzna transkriptaza, nastane hibridna dvovijačna RNA/DNA;
- encim reverzna transkriptaza ima aktivnost RNase H, ki razgradi RNA verigo;
- komplementarna veriga DNA se nato sintetizira na predhodni molekuli DNA, nastane
- dvovijačna cDNA (dsDNA, iz angl., double stranded DNA);
- nastala dsDNA, ki je kopija RNA molekule je nato pomnožena z metodo PCR. (Singleton in Sainsbury, 2001).

2.3.6.3 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo v realnem času

Pri običajnem PCR postopku poteka prepoznavanje produktov ponavadi na agaroznem gelu, medtem ko poteka dokazovanje produktov pri PCR v realnem času med pomnoževanjem produktov. Metoda omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo.

Dokaz produktov temelji na merjenju fluorescence. Poznamo več načinov za odkrivanje produktov s PCR v realnem času in sicer specifične in nespecifične načine odkrivanja (Mackay in sod., 2002; Bel in Ranford-Cartwright, 2002).

Za nespecifično odkrivanje uporabljamo fluorescentna barvila. Ta se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNA. Primer je barvilo SYBR Green I. Ta je nadomestil etidijev bromid, ki se danes skoraj ne uporablja več.

Za specifično odkrivanje nastalih produktov uporabljamo oligonukleotide – sonde. Te so označene s fluorofori. Najpogosteje uporabljamo *TaqMan* sondo (Cockerill, 2003).

PCR v realnem času poteka v zaprtem sistemu, to odpravlja potrebo po dodatnih post-PCR stopnjah, kar skrajša čas analize in zmanjša možnost kontaminacije (Klein, 2002).

2.3.7 Zdravljenje in preprečevanje

Trenutno ni specifičnega zdravila za zdravljenje KME. Zdravljenje bolnikov s KME je navadno simptomatsko in podporno ter je odvisno od izraženih simptomov pri posameznem bolniku (Telford in Foppa, 2000). Zaradi tega imajo toliko večji pomen preventivni ukrepi preprečevanja okužbe.

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, pripravljenega na celični kulturi piščančjih fibroblastov, inaktiviranega s formalinom (Gustafson, 1994). Za popolno cepljenje so potrebni trije odmerki cepiva. Običajno dajemo prva dva odmerka v presledku enega meseca in tretjega 6-12 mesecev po drugem odmerku. Da dosežemo ustrezno zaščito še preden postanejo klopi aktivni, je najboljši čas za začetek cepljenja v zimskih mesecih. Zaščito obnavljamo vsakih 3 do 5 let s pozitivnim odmerkom cepiva (Zavod za zdravstveno varstvo Ljubljana, 2001).

Obstaja tudi možnost pasivne imunizacije s specifičnimi IgG protitelesi proti virusu KME (FSME-Bulin®, Baxter GmbH, Dunaj, Avstrija), kot način profilakse pred ali po izpostavitvi virusu KME (Gustafson, 1994)

2.3.8 Epidemiologija okužb z virusom KME

Naravo žarišče je po teoriji Pavlovskega geografsko območje, kjer je evolucija vodila do posebnih odnosov med virusom, prenašalcem in gostiteljem. Virus in prenašalec sta lahko v simbiotskem odnosu. Vektor nudi virusu ugodno okolje, virus pa ne vpliva na razvoj, življenje in razmnoževanje prenašalca (Grešikova in Calisher, 1989).

Nastanek in obstoj naravnih žarišč je odvisen od več dejavnikov: klimatskih razmer, gostote in stabilnosti populacije klopov in gostiteljev, dovzetnosti gostiteljev, trajanja viremije v gostiteljih, deleža imunih gostiteljev, lastnosti biotopa (Avšič-Županc in Petrovec, 1997; Gustafson, 1994).

Naravno žarišče je aktivno, kjer so velike in stabilne populacije klopov, malih sesalcev in žužkojedov. Eden izmed pogojev za oznako aktivnega žarišča je vsaj 15 % prisotnost protiteles proti virusu KME pri zdravih ljudeh s tega področja (Grešikova in Calisher, 1989).

Na svetu je vsako leto prijavljenih 10.000 do 12.000 primerov KME, od tega 3000 v Evropi (Kunz, 2003). Avstrija, Slovenija, Madžarska, Češka in Slovaška so države z najvišjo incidenco KME v Evropi. V azijskem delu bivše Sovjetske Zveze pa je incidenca najvišja na območju zahodne Sibirije (Monath in Heinz, 1996).

Slovenija je del velikega srednjeevropskega endemskega območja klopnega meningoencefalitisa. Tudi v Sloveniji je pojavljanje te bolezni vezano na naravna žarišča, ki se v zadnjih letih niso bistveno spremenila. 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 žarišč, kjer okužba in obolenje nista verjetni. Najbolj aktivna žarišča so na območju alpskega in dinarskega pokrajinskega tipa (Avšič-Županc in sod., 1995; Kraigher in sod., 2002). V Sloveniji zabeležimo letno okoli 200-300 primerov bolezni (Jereb in sod., 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci klopov

Klope smo z metodo zastave nabirali na osmih določenih lokacijah. Nabirali smo jih mesečno na nizkem rastlinju in grmičevju v času aktivnosti klopov od aprila do novembra leta 2005.

3.1.2 Izbor lokacij

Lokacije smo določili glede na stopnjo endemičnosti naravnega žarišča KME. Izbrali smo osem lokacij. Občino lokacije, ime, zemljepisno širino in dolžino, nadmorsko višino in komentar o endemičnosti naravnega žarišča prikazuje preglednica 1.

Lokacije smo zaradi preglednosti označili z različnimi barvami: Črni kal – RDEČA, Sodražica – ROZA, Rakovnik – ZELENA, Osolnik – VIJOLIČNA, Murska šuma – ORANŽNA, Mozirje – RUMENA, Kamniška bistrica – BELA, Štefanja gora – MODRA.



Slika 5: Geografska karta Slovenije z označenimi lokacijami nabiranja klopov

Preglednica 1: Podatki o izbranih lokacijah: endemičnost naravnega žarišča KME, občina in ime kraja, zemljepisna širina in dolžina ter nadmorska višina lokacije

Občina	Ime lokacije	Zemljepisna širina	Zemljepisna dolžina	Nadmorska višina	Razlog izbire
1. Koper	Stepani, Črni kal	13°51'29.93"	45°32'57.83"	154 m	V preteklosti nizka prevalenca- nizka danes: ni sprememb
2. Sodražica	Zamostec, Sodražica	14°39'14.48"	45°45'24.01"	534 m	V preteklosti nizka prevalenca- visoka danes: povečanje
3. Lendava	Murska šuma	16°31'47.59"	46°29'35.51"	153 m	V preteklosti nizka prevalenca- nizka danes: ni sprememb
4. Medvode	Rakovnik, Sora	4°22'56.65"	46°8'50.99"	322 m	Srednja prevalenca v preteklosti- srednja danes: ni sprememb
5. Mozirje	Mozirje	14°57'17.12"	46°8'50.99"	389 m	V preteklosti visoka prevalenca- visoka danes: ni sprememb
6. Kamnik	Kamniška bistrica	14°35'16.74"	46°19'34.14"	590 m	V preteklosti visoka prevalenca- visoka danes: ni sprememb
7. Cerklje na Gorenjskem	Štefanja gora	14°28'33.82"	46°17'12.7"	685 m	Enako kot regija 6. (Kamniška bistrica) – višja nadmorska višina
8. Medvode	Osolnik	14°20'27.43"	46°8'6.08"	817 m	Enako kot regija 4. (Rakovnik) – višja nadmorska višina

3.1.3 Metoda zastave

Metoda zastave je najpogosteje uporabljena metoda za nabiranje kloпов iz vegetacije (Sonenshine, 1993). Zastavo smo naredili tako, da smo na leseno palico pritrdili belo bombažno tkanino velikosti 1 m². Klopi so se pritrdili na zastavo dokler smo jo vlekli po rastlinju in grmičevju. Uporabljali smo obe strani zastave (Gray in Lohan, 1982). S sesalno napravo, ki smo jo prav tako sami naredili, smo pobrali klope z zastave. Klope smo do obdelave hranili pri +4 °C v posodicah v katere smo dodali vlažen list. Tako hranjeni lahko klopi preživijo od dva do tri tedne.

3.1.4 Razkuževanje klopov

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

3.1.5 Štetje in organiziranje vzorcev

Ker se je med vzorčenjem nabralo veliko število klopov, jih je bilo potrebno smiselno organizirati. Očiščene klope smo iz destilirane vode prenesli v sterilne posodice. Odrasle klope smo vzorčili po pet skupaj. Ločeno samice in ločeno samce. Ker so nimfe mnogo manjše kot odrasli klopi, smo jih združili po deset skupaj v en vzorec. Larve smo združevali po 30 larv v en vzorec. Posodice smo označili z barvo, ki ustreza barvam lokacij. V škatlah z vzorci smo posodice nato označili z zaporedno številko in črko A (nimfe, larve) ali B (odrasle samice in samci). Če smo poleg oznake dodali še zvezdico, vzorec ni popoln, kar pomeni, da je v vzorcu manj kot 10 nimf ali manj kot 30 larv. Posodice smo označili na vrhu in ob strani (ob strani smo dodali tudi oznako barve lokacije, npr. Vi- vijolična). Škatle z vzorci smo shranili pri -20 °C do obdelave.

3.2 METODE

3.2.1 Osamitev celokupne RNA iz klopov

Za osamitev celokupne RNA iz klopov smo uporabili izboljšano metodo Chomczynskega in Sacchija (Chomczynski in Sacchi, 1987), ki jo pri uporabi reagenta TRIZOL[®] LS priporoča podjetje Invitrogen Life Technologies[™] (Carlsbad, Kalifornija, ZDA). TRIZOL Reagent med homogenizacijo ali lizo vzorca ohranja integriteto RNA. Izolirana RNA ne vsebuje proteinov in DNA.

Delali smo v biološki komori za varno delo II. stopnje (laminarij). Pred delom smo komoro ustrezno pripravili. Vsaj 10 minut smo obsevali z UV svetlobo in tako sterilizirali. Pred delom smo komoro razkužili z razkužilom RNase Erase (Qbiogene Inc., Kalifornija, ZDA). Uporabljali smo avtoklavirane pripomočke (skalpel, pestilčke, posodice, pipetni nastavki s filtri). Med delom smo pogosto menjali rokavice.

Vzorci klopov shranjenih pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo najprej pripravili za homogenizacijo. Klope smo prenesli na objektno stekelce, katerega smo predhodno obrisali z absolutnim etanolom. Odrasle klope smo s sterilnim skalpelom prerezali na polovico. Eno polovico smo shranili v sterilno posodico in jo oštevilčili. Tako pripravljene polovice smo shranili za potrebe nadaljnjih raziskav, kot so izolacija mikroorganizmov. Ostalih 5 polovic odraslih klopov smo združili, razrezali s skalpelom in še dodatno mehansko homogenizirali s pestilom v $300\text{ }\mu\text{l}$ filtriranega fosfatnega pufra (PBS, angl. Phosphate Buffer Saline). Nimfe smo prenesli na objektno stekelce, jih razrezali na čim manjše koščke in jih obravnavali kot en vzorec. Potem smo jih še dodatno mehansko homogenizirali s pestilom v $300\text{ }\mu\text{l}$ filtriranega fosfatnega pufra. Ličinke smo prenesli neposredno v posodico in jih s pestilom mehansko homogenizirali v $300\text{ }\mu\text{l}$ filtriranega fosfatnega pufra. V vseh primerih smo $100\mu\text{l}$ homogenata uporabili za osamitev RNA, preostalih $200\text{ }\mu\text{l}$ smo shranili za nadaljnje raziskave.

V epruvetko s $100\text{ }\mu\text{l}$ homogenata smo dodali $300\text{ }\mu\text{l}$ reagenta TRIZOL[®]LS (raztopina gvanidin izotiocianata in fenola). Premešali smo s sunkovitim obračanjem in kratkim vorteksiranjem. Vzorec smo inkubirali pri sobni temperaturi 5 minut. S tem smo lizirali celice in nukleoproteinski kompleksi so razpadli. Vzorcju smo potem dodali $60\text{ }\mu\text{l}$ kloroforma. Sunkovito smo premešali in kratko vorteksirali. Inkubirali smo 10 minut pri sobni temperaturi (po petih minutah inkubacije smo ga še enkrat sunkovito premešali in vorteksirali). Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 15.000 obratih/minuto.

Po centrifugiranju smo v epruvetki dobili tri plasti: spodnja fenol - kloroformna plast z raztopljen DNA in preostalimi nečistočami, srednja plast, v kateri so beljakovine in lipidi, ter zgornjo vodno plast z raztopljen RNA. Vodno plast smo previdno prenesli v novo epruvetko, preostanek smo zavrgli. Vodni fazi smo dodali $150\text{ }\mu\text{l}$ izopropanola, ohlajenega na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in

dobro premešali s sunkovitim obračanjem epruvetke. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 4 °C in 15.000 obratih/minuto.

Po centrifugiranju RNA precipitira na dnu in stenah epruvetke. Odstranili smo supernatant in pazili da se pri tem nismo dotaknili sten epruvetke. Dodali smo 300 µl 75 % etanola, ohlajenega na -20 °C. Dobro smo premešali na vorteksu, približno eno minuto in centrifugirali sedem minut pri 4 °C in 15.000 obratih/minuto.

Potem smo previdno odstranili supernatant. RNA smo sušili v odprtih epruvetkah v komori ob toku zraka približno 45 minut. Pazili smo da se RNA ni presušila. Osušeno RNA smo raztopili v 30 – 35 µl RNase-free vode (avtoklavirana, deionizirana, ultrafiltrirana, Rnaz prosta destilirana voda).

Raztopljeno RNA smo shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe. Po končanem delu smo komoro razkužili s 5% natrijevim hipokloridom in še vsaj 10 minut sterilizirali z UV svetlobo.

3.2.1.1 Izbira začetnih oligonukleotidov

Najbolj pomemben korak optimizacije PCR in PCR v realnem času je pravilen izbor začetnih oligonukleotidov in sonde. Ti izbirajo odsek virusnega genoma, ki bo v reakciji pomnožen (Poljak in sod., 1994). Začetna oligonukleotida se spajata z nasproti ležečima vijačnicama tarčnega odseka virusne DNA in sta usmerjena tako, da sinteza nove DNA poteka v prostoru med njima. Od njihove medsebojne razdalje je odvisna velikost novo nastalih delcev DNA.

PCR v realnem času so razvili kot nadgradnjo metode PCR. Poenostavili in izboljšali so kvantifikacijo nukleinskih kislin (Klein, 2002). Osnova metode je povsem enaka kot pri PCR, razlikuje se v odkrivanju nastalih produktov, ki se pri tej metodi dokazujejo med pomnoževanjem produktov. Dokaz produktov temelji na merjenju fluorescence. Za to smo uporabili *TaqMan* sondo. To je oligonukleotid, ki ima na 5`- koncu vezan reporterski fluorofor (npr.: barvilo FAM), na 3`- koncu pa dušilec (npr.: TAMRA). Intaktna sonda ne fluorescira, ker sta reporterski fluorofor in dušilec preblizu. V stopnji prileganja se sonda veže na enoverižne produkte reakcije za začetnim oligonukleotidom. Ob podaljševanju začetnega oligonukleotida z encimom *Taq* DNA polimeraza, ki ima 5`- eksonukleazno aktivnost, pride do hidrolize sonde in na ta način se reporterski fluorofor odcepi. Razdalja med dušilcem in

reporterskim fluoroforom se poveča in zato začne fluorofor oddajati fluorescenco (Wilhelm in Pingoud, 2003).

Za preverjanje klopne RNA smo uporabili začetna oligonukleotida F-16sIxodes (nukleotidno zaporedje 5'-AAAAAATACTCTAGGGATAACAGCGTAA-3') in R-16sIxodes (nukleotidno zaporedje 5'-ACCAAAAAGAATCCTAATCCAACA-3'), ki v genomu klopa *I. ricinus* nalegata na gen za 16S rRNA (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

Za preverjanje RNA virusa KME z RT-PCR v realnem času smo uporabili začetna oligonukleotida F-TBE1 (nukleotidno zaporedje 5'-GGGCGGTTCTTGTCTCC-3') in R-TBE1 (nukleotidno zaporedje 5'-ACACATCACCTCCTTGTCAGACT-3') ter sondo TaqMan označeno TBE-Probe-WT (nukleotidno zaporedje 5'-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-3'). Na 5' koncu sonde je vezano barvilo FAM, na 3' koncu pa dušilec TAMRA. Oligonukleotida in sonda nalegajo na 3' ne kodirajočo regijo genoma virusa KME (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

Za dokazovanje virusa KME smo izbrali začetne oligonukleotide, ki so homologni regiji NS5 genoma virusa KME: FSM1, FSM2, FSM3 in FSM4.

S parom zunanjih začetnih oligonukleotidov FSM1 (nukleotidno zaporedje 5'-GAGGCTGAACAACACTGCACGA-3') in FSM2 (nukleotidno zaporedje: 5'-GAACACGTCCATTCTGATCT-3') smo pomnoževali 357 baznih parov dolg tarčni odsek. FSM3 (nukleotidno zaporedje: 5'-ACGGAACGTGACAAGGCTAG-3') in FSM4 (nukleotidno zaporedje: 5'-GCTTGTTACCATCTTTGGAG-3') oligonukleotida pa se pripenjata znotraj tarčnega dela FSM1 in FSM2 začetnih oligonukleotidov. FSM3 in FSM4 pomnožujeta 252 baznih parov dolg odsek DNA. S slednjim parom smo pomnoževali del pridelka PCR, ki smo ga dobili po uporabi prvega para oligonukleotidov (FSM1 in FSM2). S tem smo povečali občutljivost in specifičnost reakcije PCR.

3.2.1.2 Preverjanje uspešnosti osamitve klopne RNA

Po osamitvi RNA smo z metodo PCR preverili, če smo uspešno osamili RNA. Pripravili smo reakcijsko mešanico. V posodice smo dodali AMV/Tfl 5x reakcijski pufer, MgSO₄, mešanico

dNTP-jev, dva oligonukleotidna začetnika (F-16sIxodes in R-16sIxodes), AMV reverzno transkriptazo, Tfl DNA polimerazo, ddH₂O in RNA osamljeno iz klopov.

PCR je potekala v aparaturi Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA).

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

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 40 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 45 sekund pri 68 °C

na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

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

3.2.1.3 Preverjanje RNA virusa KME z RT-PCR v realnem času

Po izolaciji celokupne RNA smo preverili ali so testirani vzorci pozitivni oz. Ali je bil v zbranih klopih virus KME. Pripravili smo reakcijske mešanice za RT-PCR v realnem času za vsak vzorec svojo mešanico. V mini epruvetke smo dodali 5 µl osamljene RNA, dva različna oligonukleotidna začetnika (F-TBE1 in R-TBE1), sondo _{FAM}-TBE-probe-WT-_{TAMRA}, SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (mešanico encimov transkriptaze in polimeraze) in ddH₂O (Schwaiger in Cassinotti, 2003). Mini epruvetke z reakcijskimi mešanicami smo vstavili v računalniško vodeno inkubacijsko aparaturo za izvajanje RT-PCR-a v realnem času (kjer pomnoževanje in dokazovanje produktov potekata sočasno) Rotor Gene (Corbett Research, Sidney, Avstralija, 2004). Dokaz pridelkov temelji na merjenju fluorescence. Pozitivne vzorce smo uporabili za nadaljne raziskave.

3.2.1.4 RT-PCR

Vzorci celokupne RNA, ki so bili pozitivni pri preverjanju prisotnosti RNA virusa KME z RT-PCR v realnem času, smo uporabili za namnoževanje virusne RNA. Za to smo uporabili

RT-PCR. Uporabili smo komplet reagentov Access RT-PCR System (Promega Corporation, Madison, ZDA).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 μ l reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 10 μ l 5-krat koncentriranega reakcijskega pufra
- 4 μ l 25 mM MgSO₄
- 4 μ l 10 mM dNTP mešanice
- 1 μ l začetnega oligonukleotida FSM1 (50 pmol/ μ l)
- 1 μ l začetnega oligonukleotida FSM2 (50 pmol/ μ l)
- 1 μ l encima AMV reverzne transkriptaze (5 enot/ μ l)
- 1 μ l encima Tfl DNA polimeraze (5 enot/ μ l)
- 23 μ l sterilne deionizirane vode
- 5 μ l vzorca RNA

RT-PCR je potekala v aparaturi Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA).

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

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 40 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 45 sekund pri 68 °C

na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

Pridelke PCR smo shranili pri 4 °C.

3.2.1.5 PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi

Pri PCR z notranjimi začetnimi nukleotidi (angl. nested PCR) se vezavna mesta začetnih oligonukleotidov nahajajo znotraj vezavnih mest prvega para začetnih oligonukleotidov. Daljši fragment, ki je nastal v prvi reakciji, služi kot DNA matrika za "nested" PCR. Pri pomnoževanju pridelka smo uporabili par začetnih oligonukleotidov FSM3, FSM4. Z uporabo "nested" metode PCR se občutljivost in specifičnost pomnoževanja DNA poveča. Slaba stran

te metode je večja možnost lažno pozitivnih rezultatov, zaradi tega je pri izvajanju potrebna še posebna pazljivost (Newton in Graham, 1994).

Uporabili smo mešanico reagentov ABgene® PCR Master Mix (ABgene®, Velika Britanija).

Za vsak vzorec smo uporabili 50 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 45 µl 1,1-krat koncentriranega PCR Master Mix
- 1 µl začetnega oligonukleotida FSM3 (50 pmol/ µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida FSM4 (50 pmol/ µl)
- 1 µl sterilne deionizirane vode
- 2 µl pridelka PCR, pridobljenega s FSM1, FSM2 parom začetnih oligonukleotidov

Reakcija je potekala v aparaturi Primus 96 plus (MWB Biotech Inc., ZDA)

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

- denaturacija DNA: 20 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 56 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 72 °C

na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

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

3.2.2 Elektroforeza pridelkov PCR v agaroznem gelu

Pridelke PCR smo dokazovali z vodoravno elektroforezo v 2 % agaroznem gelu (agaroza NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA). Agarozni gel smo pripravili v 50 ml 1x koncentriranega TAE pufra (Tris acetat EDTA puffer; vsebuje Tris bazo, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH je 8,3) in ga do vrelišča segrevali v mikrovalovni pečici. Raztopljen gel smo ohladili (na približno 60 °C) in barvali z 5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml, Promega, Madison, ZDA). Potem smo ga nalili v plastični nosilec, pazili smo da odstranimo morebitne zračne mehurčke in počakali da se strdi. Strjeni gel smo na nosilcu postavili v elektroforezno kadičko. Napolnili smo jo z 1x koncentriranim TAE pufrom tako, da je bil celoten gel prekrit s pufrom, ki omogoča tok elektronov od katode na anodo.

Velikosti pridelkov PCR smo primerjali z molekularnim ozačevalcem lestvice DNA 100 bp (1 µg/ µl, Gibco BRL, Life Technologies, New York, ZDA), ki smo ga nanegli v prvo vdolbinico. V ostale vdolbinice gela smo nanegli 10 µl pridelka PCR in 2 µl raztopine 15 % Ficol 400 (0,35 % brom-fenol modrilo).

Elektroforeza je potekala približno 30-40 minut pri napetosti 80 V pri sobni temperaturi.

Agarozni gel smo pregledali na ultravijoličnem presvetljevalniku in slikali s polaroidno kamero.

3.2.3 Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR

Pridelkom PCR, ki smo jih pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov FSM1 in FSM2 ter FSM3 in FSM4, smo z avtomatskim sekveniranjem določili nukleotidno zaporedje na obeh verigah vijačnice DNA.

3.2.3.1 Čiščenje pridelkov PCR

Pred začetkom sekveniranja je potrebno pridelke PCR očistiti ostankov encima polimeraze DNA, začetnih oligonukleotidov in deoksiribonukleotidov. Uporabili smo vakumsko metodo čiščenja WIZARD[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, ZDA).

Princip čiščenja temelji na vezavi pomnožene DNA na delce silicijevega dioksida v membrani posebne kolone, ki jo pritrdimo na vakumsko črpalko. S spiranjem s posebnimi pufrji odstranimo vse preostale reagente PCR in DNA eluiramo s 50 µl vode (Molecular Biology Grade, Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija).

Za čiščenje smo pripravili ustrezno število 1,5 ml mikrocentrifugirk, minikolumen in brizgalk. Vsako minikolumno smo privili na telo brizgalke in oboje previdno na vakuumsko posodo. Preverili smo da so vsa tesnila na vakuumski posodi zaprta in potem smo vakuumsko posodo priključili na vakuumsko črpalko. V mikrocentrifugirke smo dodali po 100 µl pufru za neposredno čiščenje in ves PCR pridelek (približno 40 µl). S pipetiranjem smo premešali mešanice in dodali po 1 ml raztopine Resina, ki smo jo pred vsakim dodajanjem dobro premešali. Tako pripravljene mešanice smo v roku ene minute še 3-krat na kratko premešali in potem prenesli v brizgalke. Da bi v vakuumski posodi ustvarili šibek vakuum smo za kratek

čas vključili vakuumsko črpalko. Ko je mešanica v brizgalki pričela teči čez minikolumno, smo previdno drug za drugim odpirali tesnila pod minikolumnami. Takoj, ko se je katera brizgalka izpraznila smo tesnilo ponovno zaprli, da se DNA ni sušila na vakuumu. V brizgalke smo nato dodali po 2 ml 80 % izopropanola in ponovili postopek z vakuumom. Tokrat smo tesnila pustili odprta še 30 sekund po izpraznitvi brizgalk. Minikolumne s posušeno DNA smo prenesli na nove mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 2 minuti pri 10000 obratih/ minuto. S tem smo odstranili ostanke izopropanola. Minikolumne smo prenesli na nove centrifugirke in dodali po 50 μ l deionizirane vode. Po 1 minuti inkubacije smo mikrocentrifugirke centrifugirali 20 sekund pri 10000 obratih/ minuto, da se je DNA izprala v mikrocentrifugirke. Mikrocentrifugirke z očiščenimi pridelki PCR smo označili in shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.3.2 Določanje koncentracije očiščene DNA

Pripravili smo 50 ml 1,6 % agaroznega gela (NuSieve). Ko se je ohladil na približno 60 °C smo dodali 5 μ l etidijevega bromida. Na gel smo nanašali 3 μ l očiščene DNA, raztopljene v 7 μ l deionizirane vode, ter 2 μ l brom-fenol modrila. Po končani elektroforezi smo glede na jakost fragmenta "semi-kvantitativno" ocenili koncentracijo DNA. Z oceno od 1 do 5 smo ovrednotili jakost fragmenta (ocena 1 je pomenila najmočnejšo jakost) in temu primerno določili količino DNA, ki smo jo uporabili za sekvenčno reakcijo. Pri oceni 1 je bila količina DNA v sekvenčni reakciji 1 μ l, pri oceni 5 pa 5 μ l.

3.2.3.3 Izbira sekvenčnih nukleotidov za sekvenčno reakcijo

Ker je za sekvenčno reakcijo potrebno izbrati najbolj optimalne začetne oligonukleotide, ki so lahko enaki tistim, ki jih uporabljamo v reakciji PCR smo izbrali par začetnih oligonukleotidov FSM3 in FSM4. Oligonukleotidna začetnika sta primerna za določanje nukleotidnega zaporedja odseka gena, ki nosi zapis za nestrukturno beljakovino NS5. Ta del genoma je poleg dela, ki kodira beljakovino E, najbolj ohranjen med flavivirusi.

3.2.3.4 Sekvenčna reakcija

Uporabili smo komercialni komplet reagentov »BigDye[®] terminator cycle sequencing ready reaction kit« (ABI Prism, PE Applied Biosystems, Foster City, California, ZDA). Princip reagentov temelji na Sangerjevi metodi sekveniranja.

Pri Sangerjevi ali terminacijski metodi se pri *in vitro* sintezi DNA uporabljajo radioaktivno označeni nukleotidi in specifični terminatorji. Terminatorji so spremenjeni nukleotidi (dideoksinukleozid trifosfat ali ddNTP), ki imajo na mestu 3' –H namesto –OH skupine. Polimeraza za podaljšanje nukleinske verige potrebuje –OH skupino zato se pri ddNTP podaljšanje ustavi. V reakcijski mešanici je razmerje NTP : ddNTP običajno 100:1, tako da po sekvenčni reakciji dobimo mešanico različno dolgih odsekov, ki se končajo na vsakem mestu vezave terminatorja. V sekvenčni reakciji uporabljamo posebne polimeraze DNA, ki morajo biti temperaturno obstojne in manj občutljive na ddNTP (Sanger in sod., 1977). Sangerjeva metoda je prilagojena računalniški tehnologiji in je komercialno dostopna v avtomatiziranih sistemih. Na trgu je več sistemov, ki temeljijo na fluorescentno označenih ddNTP-jih. Sekvenčno reakcijo lahko izvajamo ločeno za vsak terminator (4 reakcije) ali v eni epruvetki, kjer je vsak terminator označen s svojim barvilom. Odseke DNA avtomatizirano ločujemo s kapilarno gelsko elektroforezo. Laserski čitalec zazna terminalne nukleotide na osnovi značilnega fluorescentnega spektra. V nadaljevanju z ustreznim računalniškim programom dobljene sekvence dodatno obdelamo in analiziramo (Voet D in Voet JG, 1995).

Za vsak pridelek reakcije "nested" PCR smo naredili dve ločeni sekvenčni reakciji, po eno za vsako verigo v dvojni vijačnici. V vsaki sekvenčni reakciji smo uporabili po en začetni oligonukleotid. Uporabili smo reakcijsko mešanico v kateri so fluorescentno označeni dideoksiterminatorji, mešanica dNTP-jev in polimeraza FS (različica polimeraze Taq).

20 µl reakcijske mešanice je vsebovalo:

- 1-5 µl DNA (glede na kvantitativno oceno iz agaroznega gela)
- 1,3 µl začetnega oligonukleotida (50 pmol/ µl)
- 4 µl mastermix reakcijske mešanice
- 2 µl reakcijskega pufra

- deionizirano vodo do skupnega volumna 20 μ l

Sekvenčna reakcija je potekala v aparaturi Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA).

Reakcija je potekala v 25 ciklih:

- denaturacija DNA: 10 sekund pri 96 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 5 sekund pri 50 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 4 minute pri 60 °C

na koncu pa še ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

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

3.2.3.5 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije

Pred avtomatskim sekveniranjem smo morali prečistiti in odstraniti neuporabljene dideoksi terminatorje, začetne oligonukleotide in polimerazo FS. Za čiščenje smo uporabili komercialni komplet Centri-Sep[®] (Princeton Separations, Adelphia, New Jersey, ZDA), ki temelji na gelski filtraciji.

Komercialni komplet vsebuje dehidrirane kolumne, ki smo jih rehidrirali z dodatkom 0,8 ml deionizirane vode. Z vorteksiranjem smo raztopili gel v prahu, pazili smo da rehidriramo celoten gel in da se ne naredijo zračni mehurčki. Hidrirali smo 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo odstranili najprej vrhnje pokrovčke in nato še tiste z dna kolumn. Kolumne smo prestavili v 2 ml zbiralne mikrocentrifugirke in pustili, da je iz kolumn odtekla odvečna voda. Nato smo mikrocentrifugirke s kolumnami centrifugirali 2 minuti pri 3000 obratih/ minuto, da smo odstranili še preostanek odvečne vode. Mikrocentrifugirke v katere se je zbrala vsa odvečna voda smo zavrgli, hidrirane kolumne smo prestavili v nove 1,5 ml zbiralne mikrocentrifugirke. Takoj po tem smo tik nad površino gela prenesli 20 μ l sekvenčne mešanice. Pazili smo da nam mešanica ne steče mimo gela in da se ne dotaknemo površine gela. Ponovno smo centrifugirali 2 minuti pri 3000 obratih/ minuto. Na ta način se je očiščena DNA izprala v zbiralno mikrocentrifugirko. Kolumno smo zavrgli in posušili DNA v vakuumski centrifugi. Sušenje je trajalo približno 20 minut.

Posušene vzorce smo raztopili v 25 μ l reagenta TSR (iz angl.: Template Supression Reagent) in jih prenesli v analizne posodice ter zaprli z gumijastimi pokrovčki. Vzorce smo denaturirali

2 minuti pri 95 °C in smo jih takoj postavili v ledeni blok za 2 minuti. Tako obdelani vzorci so bili pripravljene za avtomatsko sekveniranje.

Pridelke sekvenčne reakcije smo analizirali z avtomatskim sekvenatorjem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, ZDA), ki ločuje pomnožene odseke v kapilari s polimerom (POP6) z laserskim čitalcem na osnovi značilnega fluorescentnega spektra.

3.2.4 Analiza nukleotidnih zaporedij

Računalniško obdelavo zaporedij smo izvedli s programskim paketom LaserGene (DnaStar, Wisconsis, ZDA), izdanim leta 1999. Paket vsebuje programe za sestavljanje zaporedij (SeqMan), urejanje zaporedij (EditSeq) ter primerjavo zaporedij in prikaz sorodnosti v obliki fenogramov (MegAlign).

V programu SeqMan smo najprej sestavili nukleotidni zaporedji obeh verig DNA iz enega vzorca, ki smo jih dobili s sekvenčno reakcijo. Izrezali smo neberljiv začetek in konec in zaporedje začetnih oligonukleotidov in preverili kvaliteto sekvenčne analize posameznih baz nukleotidnega zaporedja. Poravnano in sestavljeno zaporedje smo preverili vzdolž verige zaradi morebitnih neujemanj. Vse datoteke z zapisi nukleotidnih zaporedij (angl. contig) smo priklicali v program EditSeq. Nazadnje smo izvedli avtomatično sestavljanje in izpis končnega soglasnega zaporedja.

Nukleotidna zaporedja (orientacijo in podobnost) smo primerjali z zaporedji v genski banki preko medmrežnega servisa BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA), ki je dostopen na spletni strani <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query> (Blast, 2001).

S programom MegAlign smo zaporedja vseh analiziranih vzorcev poravnali, uredili, analizirali medsebojno sorodnost in izrisali fenograme. Filogenetsko drevo smo narisali z računalniškim paketom TREECON (TREECON for windows version 1.3b, Copyright 1994-2001, Yves Van der Peer). Uporabili smo distančno metodo, model KIMURA 1980 in Neighbor-joining evaluacijo drevesa z 1000 replikati.

4 REZULTATI

Klope smo nabirali enkrat mesečno od aprila do novembra 2005 na osmih lokacijah. Na lokacijah smo merili temperaturo zraka v senci in na soncu, temperaturo tal in vlažnost. Vzorce smo uredili tako, da en vzorec vsebuje 5 odraslih samic, ali 5 samcev, ali 10 nimf ali 30 ličink. Po urejanju smo dobili 254 vzorcev. Iz vseh vzorcev razen iz tistih, kjer je bilo manj kot 5 nimf ali manj kot 10 larv, smo izolirali celokupno klopno RNA. Nato smo preverili prisotnost RNA virusa KME s RT-PCR v realnem času. Dobili smo 8 pozitivnih vzorcev, v katerih smo dokazali virusno RNA. Iz teh vzorcev smo z metodo RT-PCR RNA prepisali v cDNA in s parom zunanjih začetnih oligonukleotidov FSM1, FSM2 pomnožili 357 baznih parov dolg odsek genoma virusa KME. Pri vseh pridelkih reakcije RT-PCR smo uporabili še različico metode PCR s parom notranjih začetnih oligonukleotidov FSM3 in FSM4 («nested» PCR). S tem smo pomnožili 252 baznih parov dolg odsek genoma virusa. Iz pridelkov smo ugotavljali nukleotidno zaporedje s sekvenčno reakcijo.

4.1 KLOPI

Klope smo z metodo zastave nabirali na osmih lokacijah enkrat mesečno od aprila do novembra 2005. Število nabranih klopov *I. ricinus* mesečno po lokacijah prikazuje Preglednica 2. Število skupin klopov zbranih na različnih lokacijah kaže Preglednica 3.

Na lokacijah smo merili temperaturo zraka na soncu v senci in temperaturo tal. V oktobru in novembru smo začeli tudi z merjenjem vlažnosti zraka. Vse meritve na lokacijah prikazuje Preglednica 4.

Rezultate smo podali tudi v slikah. Slika 6. prikazuje število klopov po mesecih, slika 7. prikazuje število odraslih klopov po mesecih, slika 8. število nimf po mesecih in slika 9. število ličink po mesecih

Preglednica 2: Število kloпов *I. ricinus* po posameznih stadijih, eno-mesečno od aprila do novembra 2005 na 8-ih lokacijah v Sloveniji

Leto 2005	Črni kal, Stepani	Sodražica, Zamostec	Murska šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška bistrica	Štefanja gora	Osolnik	skupaj
April	86	56	14	44	49	34	29		312
M	5	5	2	6	5	0	4		27
F	1	4	2	5	6	4	4		26
Ny	80	47	10	33	38	30	21		259
La	0	0	0	0	0	0	0		0
Maj	57	55	7	42	80	40	47	34	362
M	2	4	5	17	9	1	6	4	48
F	1	1	2	11	7	1	5	1	29
Ny	30	48	0	14	45	38	35	28	238
La	24	2	0	0	19	0	1	1	47
Junij	2	25	4	36	73	86	60	15	301
M	0	5	1	7	15	4	8	3	43
F	0	3	3	6	8	3	5	0	28
Ny	2	15	0	22	50	47	47	12	195
La	0	2	0	1	0	32	0	0	35
Julij	11	16	1	14	37	38	54	25	196
M	0	2	1	3	3	2	6	0	17
F	0	3	0	2	4	2	4	2	17
Ny	0	11	0	9	30	23	38	23	134
La	11	0	0	0	0	11	6	0	28
Avg.	23	1		35	29	35		25	148
M	0	1		0	3	3		6	13
F	0	0		2	3	1		3	9
Ny	0	0		10	20	17		16	63
La	23	0		23	3	14		0	63
Sept.	0	11	0	46	43	151	96	24	371
M	0	0	0	4	2	11	4	4	25
F	0	0	0	2	0	5	4	3	14
Ny	0	8	0	26	20	22	66	5	147
La	0	3	0	14	21	113	22	12	185
Okt.	3	3	0	34	34	78	72	8	232
M	0	0	0	4	2	6	4	0	16
F	0	0	0	3	0	3	3	0	9
Ny	3	3	0	27	23	26	49	8	139
La	0	0	0	0	9	43	16	0	68
Nov.				2					2
M				1				0	
F				0				0	
Ny				1				0	
La				0				0	
skupaj	182	167	26	253	345	462	358	131	1924

Legenda: M-samci; F-samice; Ny-nimfe; La-ličinke; Avg.-avgust; Sept.-september; Okt.-oktober; Nov.-november; število v okencu je število kloпов.

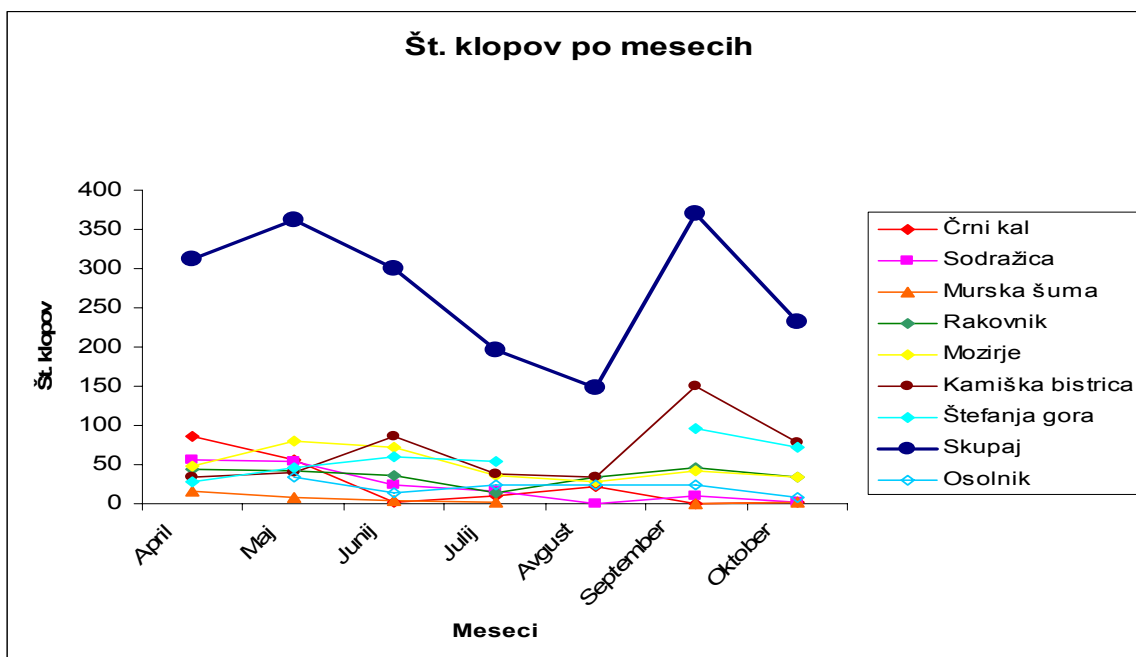
Preglednica 3: Število skupin klopov zbranih na različnih lokacijah v Sloveniji v letu 2005

Lokacija	Ličinke	Nimfe	Samci	Samice	
Črni Kal	3	13	2	2	20
Sodražica	1	16	5	4	26
Murska Šuma	0	2	4	7	13
Rakovnik	2	15	12	10	39
Mozirje	2	23	10	8	43
Kamniška Bistrica	9	22	9	7	47
Štefanja gora	4	27	9	6	46
Osolnik	1	10	5	4	20
Skupaj	22	128	56	48	254

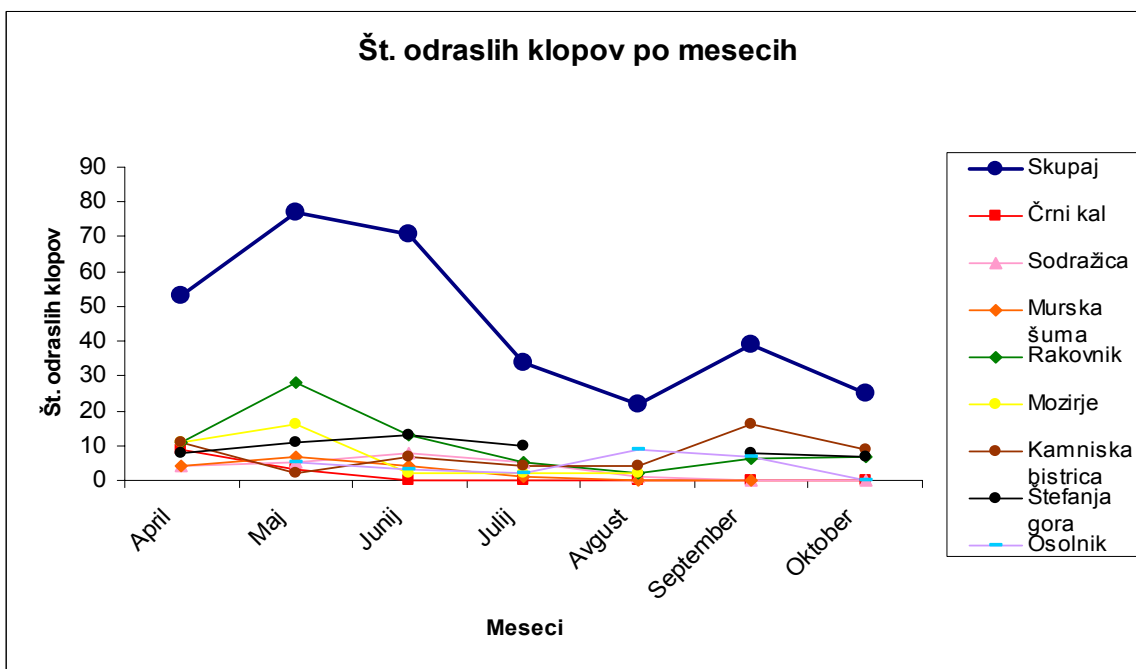
Preglednica 4: Prikaz izmerjenih temperatur (°C) in vlažnosti (%) po mesecih na lokacijah v Sloveniji v letu 2005

	Črni kal, Stepani	Sodražica, Zamostec	Murska šuma	Rakovnik	Mozirje	Kamniška bistrica	Štefanja gora	Osolnik
April								
T _{sonce}	18,5	24,0	22,7	16,5	29,5			
T _{senca}	17,3	16,8	19,3		19,5	15,8	18,8	
T _{tal}	12,5	8,0	9,7		10,5	9,4	10,5	
Maj								
T _{sonce}	24,2	16,8	22,5	28,9	28,9	27,7	27,2	21,8
T _{senca}	24,2	16,8	22,5	28,6	20,7	21,7	21,4	20,9
T _{tal}	16,2	13,7	11,7	17,6	12,6	11,6	15,7	12,5
Junij								
T _{sonce}	33,6	31,2		29,6	28,7	34,4	30,3	29,1
T _{senca}	28,3	21,1		27,0	22,5	20,9	23,8	24,1
T _{tal}	19,6	15,7		18,4	16,7	15,8	17,7	15,4
Julij								
T _{sonce}	32,7	28,5	30,5	28,0	30,6	24,0	24,3	23,0
T _{senca}	25,8	20,6	25,3	22,7	21,1	21,4	23,0	19,4
T _{tal}	19,7	15,5	17,0	20,7	16,9	16,1	19,7	16,2
Avg.								
T _{sonce}	33,6	20,9		24,7	25,2	35,0		
T _{senca}	26,4	20,6		19,3	18,1	20,9		17,3
T _{tal}	19,5	16,3		18,6	16,4	15,1		16,4
Sept.								
T _{sonce}	24,0	19,7		22,0	26,8	18,8	22,1	20,5
T _{senca}	20,5	14,1	22,8	20,0	18,7	16,4	15,8	16,0
T _{tal}	18,0	12,2	15,3	14,6	13,7	13,8	15,1	13,7
Okt.								
T _{sonce}	21,1	17,4		16,4				14,1
T _{senca}	16,8	14,3	10,0	12,6	14,9	14,4	13,5	9,6
T _{tal}	11,4	7,6	9,7	10,4	11,5	11,6	12,0	9,0
vlažnost					82,7 %	82,0 %	81,7 %	
Nov.								
T _{sonce}				5,8				
T _{senca}				5,5				
T _{tal}				6,6				
vlažnost				62,4 %				

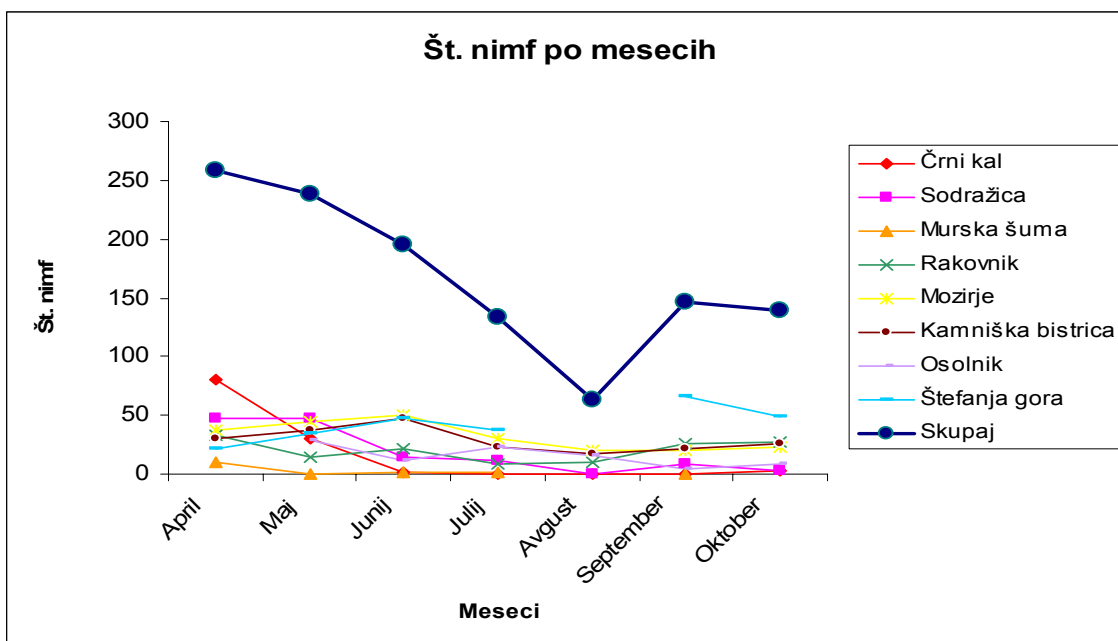
Legenda: T_{sonce} –temperatura zraka na soncu; T_{senca} –temperatura zraka v senci; T_{tal} –temperatura tal; Avg.- avgust; Sept.-september; Okt.-oktober; Nov.-november.



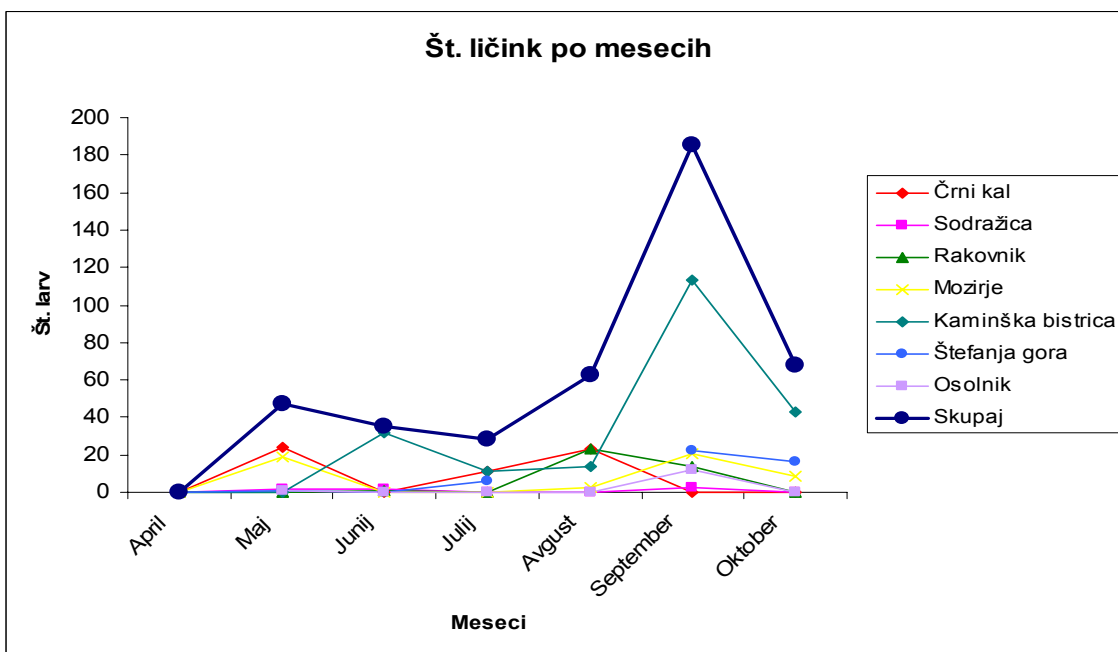
Slika 6: Število kloпов *I. ricinus* v letu 2005 v Sloveniji



Slika 7: Število odraslih kloпов *I. ricinus* v letu 2005 v Sloveniji



Slika 8: Število nimf klopov *I. ricinus* v letu 2005 v Sloveniji



Slika 9: Število ličink klopov *I. ricinus* v letu 2005 v Sloveniji

4.2 DOKAZ VIRUSA KME Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU

Iz 254 vzorcev, ki so bili primerni (več kot 5 nimf in več kot 10 ličink), smo osamili RNA in z metodo RT-PCR v realnem času preverili, če je v vzorcu prisotna virusna RNA. Dobili smo 8 pozitivnih vzorcev.

Preglednica 5: Vzorci klopov *I. ricinus* nabranih v Sloveniji v letu 2005 v katerih je dokazana virusna RNA z metodo RT-PCR v realnem času

Zapor. št. vzorca	Mesec pobiranja	Lokacija	Razvojna stopnja
EU14	April	Sodražica, Zamostec	Ny
EU17	April	Sodražica, Zamostec	M
EU83	Maj	Štefanja gora	Ny
EU84	Maj	Štefanja gora	Ny
EU85	Maj	Štefanja gora	Ny
EU87	Maj	Štefanja gora	F
EU88	Maj	Štefanja gora	M
EU182	September	Sodražica, Zamostec	Ny

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

5.2.1. IZRAČUN PREKUŽENOSTI KLOPOV Z VIRUSOM KME

Ker smo celokupno RNA iz klopov osamili iz skupin po deset nimf in pet odraslih klopov, smo izračunali verjetnost okuženosti posamezne nimfe, samca in samice po formuli, ki temelji na binomalni distribuciji (Norval in sod., 1990):

$$p = 1 - ((n - x)/n)^{1/k}$$

Neznanke v enačbi imajo naslednji pomen: p – verjetnost okužbe klop; n – število testiranih skupin; x – število pozitivnih skupin; k – število klopov v skupini.

Izračunali smo, da so bile nimfe okužene z virusom KME v 0.4 %, samci v 0.8 % in samice v 0.5 %. Celokupna prekuženost klopov torej znaša 0,6 %.

4.3 DOKAZ VIRUSA KME Z METODO PCR Z ZUNANJIMI IN NOTRANJIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI

Za nadaljnje raziskave smo uporabljali vzorce pri katerih smo predhodno dokazali virusno RNA. Pri 8 vzorcih smo z metodo RT-PCR najprej prepisali virusno RNA v cDNA in nadaljevali s postopkom PCR z zunanji in notranji začetni oligonukleotidi. Pravilnost poteka reakcije smo spremljali s pozitivno in negativno kontrolo. Kot pozitiven rezultat smo opredelili vzorce, pri katerih smo z metodo »nested« PCR dobili pridelke dolžine 252 baznih parov. Genom virusa KME smo dokazali v vseh 8 vzorcih.

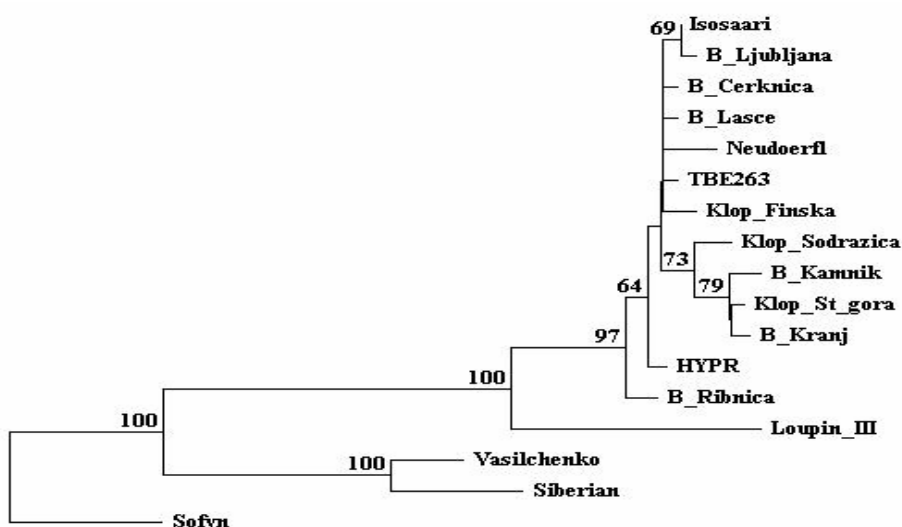
4.4 DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ Z AVTOMATSKIM SEKVENIRANJEM

Z avtomatskim sekveniranjem smo potrdili verodostojnost pridelkov PCR. Vsem 8 vzorcem smo določili nukleotidno zaporedje, ker so vsi po pomnoževanju z metodo »nested« PCR vsebovali 252 bp dolg odsek, značilen za virus KME. Dobljena zaporedja smo sestavili in uredili, nato pa smo jih primerjali z zaporedji v genski banki preko medmrežnega servisa BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA), ki je dostopen na spletni strani <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query> (Blast, 2001). Vsa zaporedja so bila homologna zaporedjem, ki kodirajo beljakovino NS5.

Izračunali smo tudi medsebojno sorodnost naših vzorcev in jih primerjali s kliničnimi vzorci bolnikov ter narisali filogenetsko drevo (Slika 10). Ugotovili smo, da so virusi izolirani iz klopov, ki smo jih nabrali na določeni lokaciji, identični. Zato smo pri risanju filogenetskega drevesa uporabili po enega predstavnika iz vsake lokacije. Med lokacijami se je nukleotidno zaporedje virusov razlikovalo. Nukleotidna razlika iznaša 2,4 %, oziroma je podobnost med virusoma 97,6 %.

Nukleotidno zaporedje virusa KME, ki smo ga določili pri klopih, se je ujemalo z zaporedjem virusa KME, ugotovljenega pri slovenskih bolnikih s KME. Virus osamljen iz klopov iz

lokacije Sodražica je z virusom iz bolnikov podoben od 96,2 do 97,6 %. Virus osamljen iz klopov iz lokacije Štefanja gora je z virusom bolnikov podoben od 95,8 do 99,1 %. Slovenski izolati virusa KME iz klopov in iz bolnikov so najbolj podobni izolatom virusa KME Neudoerfl in TBE263.



Slika 10. Filogenetsko drevo sorodnosti izolatov virusa KME iz klopov, iz bolnikov in izolatov referenčnih sevov virusa KME

Legenda: Klop St gora- virus izoliran iz klopov s lokacije Štefanja gora; Klop Sodrazica-virus izoliran iz klopov s lokacije Zamostec, Sodražica; B_Ljubljana, B_Cerknica, B_Lasce, B_Kamnik, B_Kranj, B_Ribnica- virusi izolirani iz kliničnih vzorcev bolnikov s teh področji; Isosari-finski izolat izoliran iz klopov (AJ298323); Neudoerfl-prototip virusa CEE (U27495); TBE263-finski izolat virusa KME (U27491); Klop_Finska-finski klop KumlingeA52 (AJ298321); HYPR-slovaški izolat virusa KME (U39292); Loupin_III-izolat virusa Louping iII (Y07863); Vasilchenko-siberijski in britanski izolat virusa KME (L40361); Siberian-siberijski izolat virusa KME (AF527415); Sofyn-prototip virusa RSSE (AB062064).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 UVOD

Klop *I. ricinus* je prenašalec številnih medicinsko pomembnih mikroorganizmov: borelij, babezij, erlihij in virusa klopnega meningoencefalitisa (Dumpis in sod., 1999). Razširjen je po vsej Evropi, od Irske, Velike Britanije, skandinavskih držav, preko srednje Evrope do Sredozemskega morja (Sonenshine, 1993).

Najpogostejša in najpomembnejša vrsta klopa v Sloveniji je klop *I. ricinus*. Najdemo ga na območju od obale do nadmorske višine 1000 m kjer naseljuje vse primerne niše. Največ kloпов najdemo na vlažnih mestih mešanih gozdov, posebno na nizkem rastlinstvu ob gozdnih obronkih (Logar, 1999). Pri nas je za klope značilna dvojna sezonska aktivnost. Najbolj so aktivni pozno spomladi in zgodaj poleti ter ponovno zgodaj jeseni.

Za vse klope so značilne štiri razvojne stopnje: oplojeno jajčece, ličinka, nimfa in odrasel klop. Vsaka razvojna stopnja kloпов se samo enkrat nahrani na gostitelju. Potem se po daljšem ali krajšem času spusti na tla, prelevi in napade novega gostitelja (Logar, 1999).

Klopi aktivno iščejo gostitelja in se hitro odzovejo na različne dražljaje, kot so CO₂, NH₃, vibracije v zraku in telesna temperatura. To njihovo lasnost izkoriščamo pri nabiranju kloпов z metodo zastave, ker se klopi hitro pritrdijo in v začetku ne razlikujejo zastavo od živega gostitelja (Sonenshine, 2005). Čeprav lahko vse tri razvojne oblike klopa prenašajo mikroorganizme, so dokazali, da so predvsem nimfe odgovorne za prenos patogenih mikroorganizmov na človeka (Sonenshine, 1993).

Z virusom klopnega meningoencefalitisa se ljudje okužimo z vbodom okuženega klopa. Virus KME je arbovirus iz družine *Flaviviridae*. Poznamo dva podtipa virusa KME. Zahodni podtip (virus CEE), ki je endemičen v Srednji in Vzhodni Evropi in daljnovzhodni podtip (virus RSSE), ki je pogost v azijskem delu bivše Sovjetske Zveze. Bolezen je pri človeku značilna naravno žariščna okužba (Avšič-Županc in sod., 1995).

Virus KME se v naravi ohranja v svojih naravnih gostiteljih (mali glodalci, srnjad, ptiči) in prenašalcih – klopih. Človek s svojim vstopom v življenjski krog virusa KME predstavlja le naključnega gostitelja (Gustafson, 1994).

5.2 ANALIZA REZULTATOV

V naši raziskavi smo na določenih lokacijah enkrat mesečno od aprila do novembra leta 2005 nabirali klope. Klope smo nabirali z metodo zastave. Na zastavo pritrjene klope smo pobrali s sesalno napravo, ki smo jo naredili sami. V laboratoriju smo klope očistili, določali vrsto, razvojno stopnjo, spol in jih prešteli.

V omenjenem obdobju smo nabrali 1924 klopov. Kot je razvidno iz Preglednice 2, smo največ klopov nabrali v Kamniški Bistrici (462), najmanj pa v Murski šumi (26). Iz Preglednice in Slike 1, ki kaže število klopov po mesecih na določenem kraju, vidimo dvojno sezonsko aktivnost klopov. Največ smo jih nabrali v mesecu maju (362), potem se je število zniževalo, in se septembra postopoma zvišalo (371).

Sezonsko pojavljanje in aktivnost klopov lahko razložimo iz rezultatov prikazanih na slikah. Dobljeni rezultati se ujemajo s splošnim znanjem o klopu *I. ricinus*. In sicer na Sliki 2, ki kaže število odraslih klopov po mesecih na določenem kraju. Vidimo to dvojno sezonsko aktivnost klopov. Odraslih klopov je več v maju in juniju kot v septembru. Prav nasprotno je pri ličinkah, kar vidimo na Sliki 4. Ličink je veliko več v septembru kot v maju. Namreč samica, ki je aktivna v maju po hranjenju izleže jajčeca. Ta dozori v ličinko prav v septembru. Razložimo lahko tudi Sliko 3, ki kaže število nimf po mesecih na določenem kraju. Na tej sliki vidimo da je aprila in maja veliko več nimf kot septembra. To je zaradi tega, ker so se ličinke, ki so bile aktivne v septembru in so sesale kri iz svojega prvega gostitelja, potem levile in prišle v diapavzo. Hibernirale so do pomladi kot nimfe. Pomladi nimfe aktivno iščejo svojega drugega gostitelja. Zakaj je odraslih klopov več v maju in juniju kot v septembru lahko razložimo s tem da samci potem, ko oplodijo več samic, poginejo. Poginejo tudi samice nekaj dni zatem ko izležejo jajčeca. Iz naših rezultatov zbiranja vzorcev lahko povzamemo, da imajo v Sloveniji klopi *I. ricinus* dvojno sezonsko aktivnost, in da so najbolj aktivni pozno pomladi in zgodaj poleti ter ponovno zgodaj jeseni.

RNA smo osamili po postopku Chomczynskega in Sacchija iz skupkov po 5 odraslih klopov, 10 nimf in 30 larv. Pripravili smo 254 takšnih skupkov, ki so postali naši vzorci za nadaljno raziskavo. Iz vseh vzorcev, razen iz tistih kjer je bilo manj kot 5 nimf ali manj kot 10 ličink,

smo osamili celokupno RNA. Preverili smo ali je bila osamitev RNA uspešna in nato z RT-PCR v realnem času dokazovali RNA virusa KME. Dobili smo 8 pozitivnih vzorcev (podani so v Preglednici 3). Trije vzorci so iz lokacije Sodražica, Zamostec; 5 jih je iz lokacije Štefanja gora. Vsi razen enega so bili nabrani v prvem vrhu aktivnosti tj. aprila in maja. Med osmimi pozitivnimi vzorci je bilo pet vzorcev nimf, dva vzorca samcev in en vzorec samic. Glede na dobljene rezultate smo z izbrano formulo izračunali pogostost okuženih klopov *I. ricinus* v Sloveniji, ki znaša 0,6 %. Iz rezultatov lahko tudi povzamemo, da so odrasli klopi, prav tako kot nimfe, odgovorni za prenos virusa KME.

Z virusom KME okužene klope smo ugotovili le na dveh (Sodražica in Štefanja gora) od petih izbranih lokacijah z visoko endemičnostjo KME. Zakaj pri ostalih treh lokacijah z visoko endemičnostjo (Osolnik, Mozirje in Kamniška bistrica) nismo uspeli dokazati virusa KME, lahko le predvidevamo. Možen razlog je, ker smo klope nabirali na vegetaciji. Klopi iz vegetacije so nenapiti in nestrpno čakajo gostitelja. Dokazali so namreč, da se virusna RNA začne pomnoževati v klopu šele po tem, ko se klop napije krvi (Süss in sod., 2004).

Iz slovstva je znano, da je prekuženost klopov *I. ricinus* v Evropi približno 1 % (Monath in Heinz, 1996; Tsai, 2000; Süss, 2003; Kunz, 2003). Kar pomeni, da bi v 100 nabranih klopih imel virusno RNA en klop. Pri vsakem nabiranju nismo na posameznih lokacijah nabrali tako velikega števila klopov zato obstaja verjetnost, da zaradi tega nismo uspeli najti klopa okuženega z virusom KME.

Zadnja razlaga je sledeča: razvojni krog klopa *I. ricinus* je vezan na male sesalce in divjad. Leti imajo določen življenjski prostor in zato je tudi klop vezan na ozko območje, tako imenovano mikronišo, s katero je povezano kroženje virusa KME. Obstaja možnost, da smo znotraj izbranih lokacij klope nabirali na takih območjih, kjer ni mikroniš in zato v teh lokacijah nismo dokazali virusa KME v klopih.

Iz 8 pozitivnih vzorcev smo RNA z metodo RT-PCR prepisali v cDNA. S parom zunanjih začetnih oligonukleotidov FSM1, FSM2 smo pomnožili 357 baznih parov dolg odsek genoma virusa KME. Različico metode PCR s parom notranjih začetnih oligonukleotidov FSM3 in

FSM4 («nested» PCR) smo uporabili na vseh pridelkih reakcije RT-PCR. S tem smo pomnožili 252 baznih parov dolg odsek genoma virusa. S sekvenčno reakcijo smo ugotavljali nukleotidno zaporedje. Ugotovili smo, da so znotraj posameznih lokacij sekvence virusa KME med seboj popolnoma enake. Med različnimi lokacijami se je nukleotidno zaporedje virusov razlikovalo. Nukleotidna razlika med virusom KME iz Sodražice in Štefanje gore je 2,4 %, oziroma virusa iz teh dveh lokacij sta si podobna v 97,6 %. Virus KME je RNA virus, za katere je značilna genetska raznolikost znotraj podtipov. Zato je bil tak rezultat pričakovan. Ugotovili smo tudi, da se virus KME v klopih genetsko ujema z virusi KME v bolnikih. Izolati virusa KME so najbolj podobni izolatoma Neudoerfl in TBE263.

Z diplomsko nalogo smo odprli vprašanje, zakaj se prekuženost klopov z virusom KME ne ujema nujno z incidenco te bolezni pri bolnikih. V diplomski nalogi smo poskušali na osnovi rezultatov in pregledane literature na vprašanje odgovoriti. Vendar bo naše predvidevanje potrebno potrditi z novimi, nadaljnimi raziskavami.

5.3 SKLEPI

- V Sloveniji smo na 8 lokacijah, od aprila do novembra 2005, nabrali 1924 klopov vrste *I. ricinus*.
- V Sloveniji imajo klopi *I. ricinus* dvojno sezonsko aktivnost. Najbolj aktivni so pozno pomladi in zgodaj poleti ter ponovno zgodaj jeseni.
- Dokazali smo, da so tako odrasli klopi kot nimfe odgovorni za prenos virusa KME.
- Dokazali smo 0,6 % pogostost okuženih klopov *I. ricinus* z virusom KME v Sloveniji.
- Prevalenca okuženosti klopov z virusom KME na visoko endemičnih lokacijah se ne ujema nujno z incidenco bolezni v teh krajih.
- Virus KME v klopih je genetsko soroden virusu KME v bolnikih. Slovenski izolati virusa KME so najbolj podobni izolatoma Neudoerfl in TBE263.

6 POVZETEK

Klop *I. ricinus* je v Sloveniji najpogostejša in najpomembnejša vrsta za kroženje mikroorganizmov v naravi. Življenjski krog navadnega gozdnega klopa zajema tri razvojne stopnje: ličinko, nimfo in odraslo žival. Preživetje klopa je odvisno predvsem od temperature in vlage v okolju. Naseljuje pa vse primerne niše od obale do nadmorske višine 1000 m.

Virus klopnega meningoencefalitisa uvrščamo v družino *Flaviviridae*. V naravi se virus vzdržuje s kroženjem med gostitelji kot so mali sesalci in divjad, ter klopi, ki so glavni prenašalci virusa. Človek se z virusom navadno okuži ob vbodu okuženega klopa. Okužba z virusom KME povzroča pri človeku klopni meningoencefalitis- bolezen, ki prizadene predvsem osrednji živčni sistem.

V naši raziskavi smo se osredotočili na 8 različnih lokacij glede na stopnjo endemičnosti naravnega žarišča KME. Na teh lokacijah smo v eno-mesečnih presledkih v času aktivnosti kloпов (od aprila do novembra leta 2005) nabirali klope. Klope smo z metodo zastave nabirali na grmičevju in nizkem rastlinju. Nabrali smo 1924 kloпов vrste *I. ricinus*.

V laboratoriju smo klope primerno obdelali s 70 % etanolom in ddH₂O, da smo odstranili morebitne inhibitorje. Razkužene klope smo združili v skupine po 5 odraslih osebkov, 10 nimf in 30 larv. RNA smo osamili po postopku Chomczynskega in Sacchija iz omenjenih skupin. Z metodo RT-PCR v realnem času smo iz velikega števila vzorcev ugotovili 8 pozitivnih vzorcev z virusno RNA. Pri teh vzorcih smo za dokazovanje virusne RNA uporabili tudi metodo verižne reakcije s polimerazo z zunanjimi in notranjimi začetnimi oligonukleotidi, ki pomnožuje del genoma virusa, na katerem se nahaja zapis za beljakovino NS5. Verodostojnost pridelkov PCR smo potrdili z avtomatskim sekveniranjem.

Rezultati so pokazali dvojno sezonsko aktivnost kloпов v Sloveniji. Ugotovili smo, da so klopi najbolj aktivni pozno pomladi in zgodaj poleti ter ponovno zgodaj jeseni. Prikazali smo tudi, da so odrasli klopi, kot tudi nimfe, odgovorni za prenos virusa KME v Sloveniji. Pogostost okuženih kloпов *I. ricinus* z virusom KME je v Sloveniji 0,6 %. Ne glede na lokacije in skupno endemičnost KME smo pokazali, da le-ta ne sovпада nujno s prekuženostjo kloпов s KME na teh območjih. Virus, ki smo ga dokazali v klopih je genetsko zelo soroden

virusu KME iz bolnikov. Slovenski izolati virusa KME so najbolj podobni virusnim izolatom Neudoerfl in TBE263.

7 VIRI

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1994. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York, Garland Publishing, inc. : 1294 str.
- 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., Petrovec M., Jelovšek M., Strle F. 1995. Medicinsko pomembni arbovirusi v Sloveniji. Zdravniški vestnik, 64, Supplement III: 15-19.
- 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.
- Bel A.S., Ranford-Catwright L. C. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. Trends in Parasitology, 18: 337-342.
- Blast. 2001. Bethesda, National Center for Biotechnology Information (29. jan. 2001). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (25. avgust 2006): 4 str.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 162: 156-159.
- Cockerill F. R. 2003. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. Archiv of Pathologic

Laboratory Medicine, 127: 1112-1120.

Coleman W.B., Tsongalis G. J. 1997. Molecular diagnostics for the clinical laboratorian.
Totova, Humana Press, 110-210.

Duh D. 2002. Gozdni klop (*Ixodes ricinus*) kot prenašalec babezij v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 62 str.

Dumpis U., Crook D., Oksi J. 1999. Tick-borne encephalitis. Clinical Infectious Diseases, 28: 882-890.

Gray JS, Lohan G. 1982. The development of a sampling method fro the tick *Ixodes ricinus* and its use in a redwater fever area. Annals of Applied Biology 101: 421-427.

Grešikova M., Calisher C.H. 1989. Tick-borne encephalitis. 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, Supplementum 92: 1-63.

Heinz F.X. 2003. Molecular aspects of TBE virus research. Vaccine, 3673: 1-8.

Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije-teoretični del. Ljubljana, Študentska založba: 59-64.

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.
- Jung M. 1992. O virusu in diagnostiki klopnega meningoencefalitisa. V: Lešničar J. Klopni meningoencefalitis. Strle F. Lymska borelijoza. Celje, Cetus: 22-26.
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: application and limitation. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260.
- Klopni meningoencefalitis. 2001. Ljubljana, Zavod za zdravstveno varstvo Ljubljana (2001). http://www.zzv-lj.si/c-epi/ambulanta/epidemiološka/meningitis/klopni_m.html (9. jun. 2006): 3 str.
- Kraigher A., Hočevar-Grom A., Klavs I., Sočan M., Grgič-Vitek M., Pahor L., Kastelic Z. 2002. Transmisivne nalezljive bolezni. V: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2001. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 35-40.
- 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.
- Logar L. 1999. Parazitologija v medicini. 1. izd. Ljubljana, DZS: 217 str.
- Logar M., Arnež M., Kolbl J., Avšič-Županc T., Strle F. 2000. Comparison of the epidemiological and clinical features of tick-borne encephalitis in children and adults. *Infection*, 28: 74-77.

Lotrič-Furlan S., Avšič-Županc T., Strle F. 2002. An abortive form of tick-borne encephalitis (TBE) – A rare clinical manifestation of infection with TBE virus. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114: 627-629.

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

Mackay I.M., Arden K. E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. Oxford, University Press : 1292-1305.

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.

Norval R.A., Andrew H.R., Yunker C.E. 1990. Infection rates with *Cowdria ruminantium* of nymphs and adults of the bont tick *Amblyomma hebraeum* collected in the field in Zimbabwe. *Veterinary Parasitology*, 36: 277-283.

Parola P., Raoult D. 2001. Tick and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases* 32: 897-928.

- Pletnev G.A., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. 1990. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 174: 250-263.
- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400.
- Puchhammer-Stöckl E., Kunz C., Mandl C.W., Heinz F.X. 1995. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clinical and Diagnostic Virology*, 4: 321-326.
- Ramelow C., Süß J., Berndt D., Roggendorf M., Schreier E. 1993. Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 45: 115-119.
- 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.
- 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.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 12: 5463-5467.

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

Schrader C., Süß J. 1999. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. Zentralblatt für Bakteriologie, 289: 319-328.

Schwaiger M., Cassinotti P. 2003. Development of a Quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. Journal of Clinical Virology, 27: 136-145.

Singleton P., Sainsbury D. 2001. Dictionary of microbiology and molecular biology. 3rd ed. Chichester, Wiley, USA : 460-460.

Salmon D.E., Smith T., Kilborne F.L. 1893. Investigation into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. Bulletin No. 1. Washington D.C., Washington, U. S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry: 269 str.

Solomon T., Mallewa M. 2001. Dengue and other emerging flaviviruses. Journal of Infection, 42: 104-115.

Sonenshine DE. 1991. Biology of ticks. Vol 1. New York: Oxford University Press: 346 str.

Sonenshine DE. 1993. Biology of ticks. Vol 2. Oxford, Oxford University Press: 488 str.

Sonenshine DE. 2005. The biology of tick vectors of human disease. V: Tick-borne diseases of humans. Goodman J.L. (ed.). Washington, D.C., ASM Press: 12-36.

Sparagano OA, Allsopp MT, Mank RA, Rijpkema SG, Figueroa JV, Jongejan F. 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. *Experimental and Applied Acarology*, 23, 12: 929-960.

Süss J., Beziat P., Ramelow C., Kahl O. 1997. Tick-borne encephalitis virus (TBEV)-specific RT-PCR for characterization of natural foci of TBE and for other applications. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 286: 125-138.

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

Süss J., Schrader C., Falk U., Wohanka N. 2004. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany- Epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. *International Journal of Medical Microbiology*, 293, 37: 69-79.

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

Trilar T. 2002. Razvojne stopnje klopov. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 2 sl.

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.

Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International committee on taxonomy of viruses. 2002. van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop

D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (eds.). San Diego, Academic Press: 1162 str.

Voet D., Voet J.G. 1995. Biochemistry. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 882-896.

Wilhelm J., Pingoud A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. ChemBioChem: a European Journal of Chemical Biology, 4: 1120-1128.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tatjani Avšič-Županc, univ. dipl. biol., za pomoč in strokovno vodenje pri izdelavi diplomske naloge.

Iskrena hvala delovni mentorci dr. Darji Duh za vse nasvete glede dela in pisanja diplomske naloge. Hvala za čas in dobro voljo, ki mi jo je posvetila.

Zahvala gre tudi Nataši Knap in Ani Saksida za trud pri zbiranju vzorcev in za vso pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala Katji Strašek in vsem ostalim zaposlenim v laboratoriju za vso prijaznost in koristne nasvete.

Najlepša hvala moji družini, mami Regini, tati Ekremu in bratu Mateju, ker mi stojijo ob strani, vedno me brezpogojno spodbujajo in verjamejo vame. Hvala vam!

Na koncu se zahvaljujem tudi Mihaelu za prijaznost, potrpežljivost, pomoč in nasvete.