

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina ENGELMAN

**UGOTAVLJANJE FLEBOVIRUSOV PRI BOLNIKIH  
Z MENINGITISOM ALI  
MENINGOENCEFALITISOM V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina ENGELMAN

**UGOTAVLJANJE FLEBOVIRUSOV PRI BOLNIKIH Z  
MENINGITISOM ALI MENINGOENCEFALITISOM V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETECTION OF PHLEBOVIRUSES IN PATIENTS WITH  
MENINGITIS OR MENINGOENCEPHALITIS IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Engelman K. Ugotavljanje flebovirusov pri bolnikih z meningitisom ali meningoencefalitisom v Sloveniji.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2011

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

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Tatjano Avšič Županc, za somentorico dr. Darjo Duh in za recenzenta doc. dr. Miroslava Petrovca.

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

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

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

Komisija za oceno in zagovor: Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol. Univerza v Ljubljani,

Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

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

Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Laboratorij za klinično molekularno diagnostiko

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

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

Datum zagovora: 19.5.2011

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katarina Engelman

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.7 + 578.34 : 616 – 079 (043) = 163.6
KG	virusi/ flebovirusi/ okužbe z virusi/ meningitis/ meningoencefalitis/ diagnostične metode/ encimskoimunske metode/ ELISA/ metoda posredne imunofluorescence/ IFA/ RT-PCR v realnem času
AV	ENGELMAN, Katarina
SA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentorica) / DUH, Darja (somentorica) / PETROVEC, Miroslav (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	UGOTAVLJANJE FLEBOVIRUSOV PRI BOLNIKIH Z MENINGITISOM ALI MENINGOENCEFALITISOM V SLOVENIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 62 str., 7 pregl., 10 sl., 1 pril., 46 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Rod <i>Phlebovirus</i> pripada družini <i>Bunyaviridae</i> . Vretenčarji se s flebovirusi okužijo z vbodom samice peščene muhe iz rodu <i>Phlebotomus</i> , zato sodijo med arboviruse. V Evropi so pomembni trije tipi flebovirusov: tip Sicilian (SFSV), tip Naples (SFNV) in virus Toscana (TOSV). SFSV in SFNV povzročata blago, gripi podobno bolezen, okužba s TOSV pa se lahko razvije v aseptični meningitis oziroma meningoencefalitis. Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti prisotnost in pogostost pojavljanja okužb s flebovirusi pri bolnikih z meningitisom ali meningoencefalitisom, ter s tem pridobiti prve podatke o morebitnih okužbah bolnikov s flebovirusi v Sloveniji. Predvidevali smo, da bomo okužbo dokazali, saj je prenašalec v Sloveniji prisoten. Glede na klinično sliko bolnikov smo pričakovali, da bomo dokazali flebovirus Toscan. V ta namen smo pregledali vzorce 204 bolnikov z znaki meningitisa oziroma meningoencefalitisa iz dinarskega in submediteranskega zoogeografskega območja, ki smo jih zbrali v obdobju od leta 2006 do 2008. V vzorcih serumov smo z encimskoimunsko metodo in metodo posredne imunofluorescence dokazovali protitelesa proti vsem trem tipom flebovirusov, v vzorcih likvorjev ter akutnih serumih pa smo z metodo RT-PCR v realnem času želeli dokazati flebovirusno RNK. Z diplomsko nalogo smo v Sloveniji prvič dokazali okužbo s flebovirusi in sicer smo dokazali okužbi s TOSV in SFNV. Okužbo s TOSV smo dokazali pri 3 bolnikih, okužbo s SFNV pa pri 1 bolniku. Okužbe s SFSV nismo dokazali.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 578.7 + 578.34 : 616 – 079 (043) = 163.6
CX	viruses/ phleboviruses/ viral infections/ meningitis/ meningoencephalitis/ diagnostics/ enzyme immunoassay/ ELISA/ indirect immunofluorescent assay/ IFA/ real time RT-PCR
AU	ENGELMAN, Katarina
AA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor) / DUH, Darja (co-advisor) / PETROVEC, Miroslav (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2011
TI	DETECTION OF PHLEBOVIRUSES IN PATIENTS WITH MENINGITIS OR MENINGOENCEPHALITIS IN SLOVENIA
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIII, 62 p., 7 tab., 10 fig., 1 ann., 46 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Genus <i>Phlebovirus</i> is a member of the <i>Bunyaviridae</i> family. Transmission of the phleboviruses to vertebrates results from the bite of phlebotomine sandflies, thus phleboviruses are arthropode borne. Three <i>Phlebovirus</i> serotypes are of importance in Europe: type Sicilian (SFSV), type Naples (SFNV) and Toscana virus (TOSV). While the first two cause an influenza-like febrile illness, TOSV infection can be manifested with clinical characteristics of meningitis or meningoencephalitis. The aim of the study was to determine the presence of phlebovirus infections in patients with meningitis or meningoencephalitis. According to the clinical picture of the patients and because the virus vector is present in Slovenia we assumed to detect phlebovirus Toscana. To this end we examined 204 patients with meningitis or meningoencephalitis of unknown etiology, which came from dinaric and submediterranean regions. To detect specific antibodies in sera we employed enzyme immunoassay (EIA/ELISA) and indirect immunofluorescent assay (IFA). Detection of viral RNA in CSF and acute sera was conducted with real-time RT-PCR. We were able to confirm phlebovirus infections with TOSV in 3 patients and in 1 patient with SFNV for the first time in Slovenia. Infection with SFSV was not confirmed.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>IV</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>X</b>
<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>XI</b>
<b>KRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>XIII</b>
<b>SLOVARČEK</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 NAMEN DELA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED	3
2.2 ZNAČILNOSTI FLEBOVIRUSOV	4
2.2.1 <b>Taksonomija in filogenetske analize</b>	4
2.2.2 <b>Zgradba virusa</b>	4
2.2.3 <b>Razmnoževanje virusa</b>	6
2.3 NARAVNI GOSTITELJI FLEBOVIRUSOV	7
2.3.1 <b>Taksonomija flebotomov</b>	7
2.3.2 <b>Zemljepisna razporeditev flebotomov</b>	8
2.3.3 <b>Flebotomi v Sloveniji</b>	9
2.3.4 <b>Anatomija, ekologija in življenski krog flebotomov</b>	10
2.4 EPIDEMIOLOGIJA BOLEZNI, KI JIH POVZROČAJO FLEBOVIRUSI	13
2.4.1 <b>Okužbe s flebovirusi na območju Slovenije</b>	14
2.5 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA	15
2.5.1 <b>Okužba nevretenčarskega gostitelja</b>	15
2.5.2 <b>Okužba vretenčarskega gostitelja</b>	15
2.5.3 <b>Potek bolezni</b>	16
2.6 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA	18

<b>2.6.1</b>	<b>Neposredno dokazovanje</b>	18
<b>2.6.2</b>	<b>Posredno dokazovanje</b>	18
<b>2.7</b>	<b>ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE</b>	20
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	21
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL</b>	21
<b>3.1.1</b>	<b>Vzorci bolnikov</b>	21
<b>3.2</b>	<b>METODE</b>	21
<b>3.2.1</b>	<b>Encimskoimunska metoda (ELISA)</b>	21
<b>3.2.1.1</b>	Teoretične osnove encimskoimunske metode	21
<b>3.2.1.2</b>	Izvedba encimskoimunske metode ELISA IgG-Capture	22
<b>3.2.1.3</b>	Izvedba encimskoimunske metode ELISA IgG	23
<b>3.2.2</b>	<b>Metoda posredne imunofluorescence (IFA)</b>	24
<b>3.2.2.1</b>	Teoretične osnove posredne imunofluorescence	24
<b>3.2.2.2</b>	Izvedba metode posredne imunofluorescence	24
<b>3.2.3</b>	<b>Izolacija RNK</b>	25
<b>3.2.3.1</b>	Izvedba izolacije RNK iz likvorja in serumskih vzorcev	25
<b>3.2.4</b>	<b>Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</b>	27
<b>3.2.4.1</b>	Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo in reverzno transkriptazo v realnem času (RT-PCR v realnem času)	27
<b>3.2.4.2</b>	Izvedba verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkriptazo v realnem času za dokaz TOSV	30
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	32
<b>4.1</b>	<b>VZORCI</b>	32
<b>4.2</b>	<b>REZULTATI ENCIMSKOIMUNSKE METODE</b>	33
<b>4.2.1</b>	<b>Rezultati prvega (presejalnega) testiranja z metodo ELISA</b>	34
<b>4.2.2</b>	<b>Rezultati drugega testiranja z metodo ELISA</b>	35
<b>4.3</b>	<b>REZULTATI METODE POSREDNE IMUNOFLUORESCENCE</b>	37
<b>4.3.1</b>	<b>Rezultati testiranja z metodo IFA</b>	37
<b>4.4</b>	<b>PRIMERJAVA REZULTATOV METODE ELISA IN METODE IFA</b>	39
<b>4.5</b>	<b>REZULTATI METODE RT-PCR V REALNEM ČASU ZA DOKAZ TOSV</b>	43
<b>4.6</b>	<b>PORAZDELJENOST OKUŽB S FLEBOVIRUSI NA OBMOČJU SLOVENIJE</b>	44

---

<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>45</b>
5.1	UVOD	45
5.2	ANALIZA REZULTATOV	46
5.3	SKLEPI	54
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>57</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Taksonomska razvrstitev flebotomov (Fauna Europaea, 2004)	8
<b>Preglednica 2:</b> Rezultati dokazovanja protiteles razreda IgG proti TOSV, SFNV in SFSV z metodo ELISA	34
<b>Preglednica 3:</b> Rezultati prvega in drugega dokazovanja protiteles proti flebovirusom z metodo ELISA	36
<b>Preglednica 4:</b> Rezultati dokazovanja protiteles razreda IgG in IgM proti TOSV, SFNV in SFSV z metodo IFA	38
<b>Preglednica 5:</b> Rezultati primerjave seroloških testov za TOSV	40
<b>Preglednica 6:</b> Rezultati primerjave seroloških testov za SFNV	41
<b>Preglednica 7:</b> Rezultati primerjave seroloških testov za SFSV	42

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zgradba viriona (SIB, 2009)	5
<b>Slika 2:</b> Struktura genoma flebovirusov (SIB, 2009)	6
<b>Slika 3:</b> Evropske države, kjer so uradno zabeležili prisotnost flebotomov (Fauna Europaea, 2004)	9
<b>Slika 4:</b> Območja Slovenije primerna za bivanje flebotomov	10
<b>Slika 5:</b> <i>Phlebotomus</i> sp. (CDC, 2005)	11
<b>Slika 6:</b> Samec in samica flebotoma (Sabin in sod., 1944)	11
<b>Slika 7:</b> Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (Klein, 2002)	28
<b>Slika 8:</b> Princip delovanja TaqMan sonde (Wilhelm in Pingoud, 2003)	30
<b>Slika 9:</b> Obravnavani bolniki z meningitisom ali meningoencefalitisom po slovenskih regijah v obdobju 2006 – 2008	33
<b>Slika 10:</b> Področja, kjer so prisotni flebotomi z označenimi regijami in kraji, iz katerih prihajajo bolniki pri katerih smo dokazali specifična protitelesa	44

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Rezultati prvega presejalnega testiranja z metodo ELISA

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABTS	2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]
cDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl. complementary DNA)
EIA	encimskoimunska metoda (angl. enzyme immunoassay)
ELISA	encimskoimunska metoda (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
IFA	posredna imunofluorescenčna metoda (angl. indirect immunofluorescent assay)
KMEV	virus klopnega meningoencefalitisa
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina (angl. messenger RNA)
OD	optična gostota (angl. optical density)
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RNK	ribonukleinska kislina
SFNV	virus Sandfly Naples (angl. Sandfly Fever Naples Virus)
SFSV	virus Sandfly Sicilian (angl. Sandfly Fever Sicilian Virus)
TOSV	virus Toscana (angl. Toscana Virus)

## SLOVARČEK

arbovirus	virus, ki ga prenašajo členonožci (angl. arthropod borne virus)
arthropod	členonožec
bipolarna	
nukleinska kislina	nukleinska kislina, ki se prevaja iz obeh koncev
diapavza	obdobje inaktivnosti in zastanka rasti pri žuželkah, ki jo spremlja zelo zmanjšan metabolizem
encefalitis	vnetje možganov
flebotom	peščena muha
hematofagen	tisti, ki se prehranjuje s krvjo
meningitis	vnetje možganskih ovojnici
meningoencefalitis	vnetje možganov in možganskih ovojnici
palearktičen	tisti, ki prebiva v največji ekoconi na svetu, kamor spada tudi Evropa
rezervoar	mesto nahajanja virusa v naravi
viremija	prisotnost virusa v krvi
virion	virusni delec

## 1 UVOD

Rod *Phlebovirus* pripada družini *Bunyaviridae*. Flebovirusi sodijo med arboviruse, torej virusе, ki jih na ljudi ali živali prenašajo členonožci (Dionisio in sod., 2003). V rod Phlebovirus, ki ga delimo na dve antigenski skupini, uvrščamo 37 virusov, oziroma 68 virusnih serotipov, od katerih jih 8 povezujemo z boleznimi pri ljudeh (Dionisio in sod., 2003; Sonderegger in sod., 2009; Weidmann in sod., 2008; ICTVdB, 2006).

Vretenčarji se s flebovirusi okužijo z vbodom samice peščene muhe iz rodu *Phlebotomus*, lahko pa jih prenašajo tudi nekatere vrste komarjev. O naravnem rezervoarju virusa je malo znanega, najverjetneje prenos in ohranjanje virusa v naravi zagotavlja prenašalec v katerem se virus prenaša transovarialno, redkeje pa tudi med spolnim odnosom peščenih muh (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003).

Flebovirusi so razširjeni v topnih predelih sveta, tudi v Evropi, predvsem v sredozemskem prostoru. Med virusi v antigenski skupini Sandfly, so v Evropi pomembni trije virusi: virus Sandfly Sicilian (SFSV, angl. Sandfly Fever Sicilian Virus), virus Sandfly Naples (SFNV, angl. Sandfly Fever Naples Virus) in virus Toscana (TOSV, angl. Toscana Virus) (Dionisio in sod., 2003; Sonderegger in sod., 2009). SFSV in SFNV sta zemljepisno najbolj razširjena in povzročata mrzlico papatači. Okužba s TOSV je lahko brez simptoma, lahko pa je potek bolezni tudi zelo težak in se po okužbi osrednjega živčnega sistema razvije aseptični meningitis oziroma meningoencefalitis (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003; Weidmann in sod., 2008).

Večina okužb je v poletnih mesecih, ko so muhe najbolj aktivne. Ocenjujejo, da je v Italiji v poletnih mesecih 81 % aseptičnih meningitisov posledica okužbe s TOSV (Dionisio in sod., 2003; Sonderegger in sod., 2009), zato ima TOSV vse bolj prepoznavno vlogo pri okužbah osrednjega živčnega sistema ne samo v Italiji, ampak v celotnem Sredozemlju. Po svetu in v Sloveniji je malo zdravnikov pozornih na ta virus

kot vzrok meningoencefalitisa ali meningitisa, zato verjetno veliko okužb s flebovirusi ostaja neodkritih (Charrel in sod., 2005; Weidman in sod., 2008).

Okužbo s flebovirusi lahko dokažemo posredno z dokazom specifičnih protiteles, ki se po okužbi pojavijo v serumu in likvorju bolnika. Fleboviruse lahko, pred pojavom specifičnih protiteles, dokažemo v krvi in likvorju tudi neposredno, z izolacijo virusnega genoma in pomnoževanjem tarčnega odseka genoma z verižno reakcijo s polimerazo in reverzno transkriptazo v realnem času (Charrel in sod., 2005).

### 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti prisotnost in pogostost pojavljanja okužb s flebovirusi pri bolnikih z meningitisom ali meningoencefalitisom, ter s tem pridobiti prve podatke o morebitnih okužbah bolnikov s flebovirusi v Sloveniji. V študiji smo uporabili klinične vzorce (serum in likvor) bolnikov z etiološko nepojasnjениm meningitisom ali meningoencefalitosom iz dinarskega in sredozemskega zoogeografskega območja Slovenije. Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije je v Sloveniji letno okoli 260 prijav virusnega meningitisa oziroma meningoencefalitisa, ki niso posledica okužbe z virusom klopnega meningoencefalitisa. Za približno 90 % teh okužb ne poznamo vzroka (IVZ, 2011).

Na nekaterih območjih Slovenije je peščena muha, ki je prenašalec flebovirusov, prisotna (Semenza in Menne, 2009), saj se podnebje na teh območjih bistveno ne razlikuje od nekaterih predelov sosednje Italije, kjer so prisotne tako peščene muhe kot flebovirusi (Charrel in sod. 2005).

Zaradi velikega števila nepojasnjenih primerov aseptičnega meningitisa oziroma meningoencefalitisa v Sloveniji in dejstva, da so peščene muhe prisotne na območju Slovenije smo predvidevali, da bomo v izbranih vzorcih dokazali fleboviruse. Glede na klinično sliko bolnikov, katerih vzorce smo vključili v diplomsko nalogu, smo se osredotočili predvsem na flebovirus Toscana.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Opisi mrzličnih bolezni na področju Sredozemlja, ki spominjajo na okužbo s flebovirusi, so se začeli pojavljati na začetku 19. stoletja. Leta 1905 so na osnovi epidemioloških raziskav prvič opisali peščeno muho *Phlebotomus papatasi* kot verjetnega prenašalca bolezni. Leta 1909 so s poskusi na prostovoljcih dokazali, da bolezen povzroča virus. Odkrili so, da je v krvi bolnika prisoten v prvih dneh bolezni in da se prenaša z vbodom samice *P. papatasi*, ki se je predhodno hranila s krvjo bolnika (Horsfall in Tamm, 1970). Zanimanje za fleboviruse se je še povečalo med drugo svetovno vojno, ko je med zavezniškimi četami v Italiji izbruhnila epidemija bolezni (Dionisio in sod., 2003). Sabin je leta 1951 z intracerebralno inokulacijo akutnega seruma v albino sesajoče miši dokazal dve antigenski različici virusa in ju poimenoval Siciljanski in Neapeljski virus mrzlice papatači (Sabin, 1951).

Virus Toscana (TOSV) so prvič izolirali v osrednji Italiji, v pokrajini Toskana leta 1971, iz peščene muhe *Phlebotomus perniciosus* (Verani in sod., 1984). Kasneje so ga izolirali tudi iz muhe *Phlebotomus perfiliewi*, raziskave pa so pokazale, da virus ni razširjen le v Toskani, ampak tudi drugod v Sredozemlju (Cusi in sod., 2005; Sonderreger in sod., 2009). Leta 1983 so TOSV prvič izolirali iz likvorja bolnice z meningitisom, s čimer so potrdili sum, da je virus nevrovirulenten. Dokončno so potrdili tudi vlogo peščenih muh iz rodu *Phlebotomus* pri prenosu bolezni (Braito in sod., 1998).

Taksonomsko so viruse antigenske skupine Sandfly uvrstili v družino *Bunyaviridae*, v rod *Phlebovirus* in jih leta 1980 prijavili v Mednarodni katalog arbovirusov (Braito in sod., 1998).

## 2.2 ZNAČILNOSTI FLEBOVIRUSOV

### 2.2.1 Taksonomija in filogenetske analize

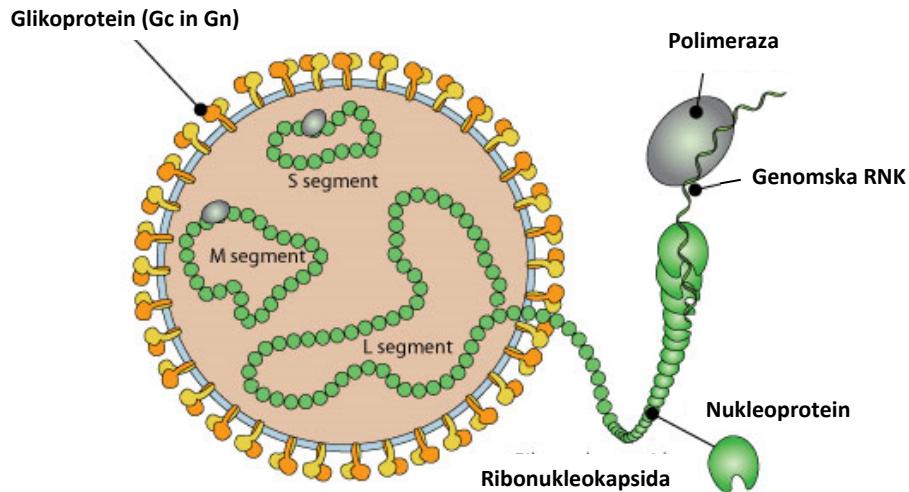
Med arbovirusi, s katerimi se lahko okuži človek, pet rodov pripada družini *Bunyaviridae*: *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* in *Tospovirus* (Dionisio in sod., 2003). V rod *Phlebovirus*, ki ga delimo v dve antigenski skupini, uvrščamo 37 virusov, oziroma 68 virusnih serotipov, od katerih jih 8 povezujemo z boleznimi pri ljudeh: virus Alenquer, virus Candiru, virus Chagres, virus Punta Toro, virus mrzlice doline Rift, SFNV, SFSV in TOSV (Dionisio in sod., 2003; Liu in sod., 2003; Sonderegger in sod., 2009; Weidmann in sod., 2008; ICTVdB, 2006).

Sprva so viruse skupine Sandfly antigensko razvrščali s serološkimi metodami. Zaradi navzkrižne reaktivnosti med posameznimi serotipi so boljši vpogled v genetsko raznolikost in filogenetske odnose med serotipi omogočile šele novejše molekularne metode, ki temeljijo na analizi posameznih odsekov genoma. Kljub temu je bilo opravljenih sorazmeroma malo filogenetskih analiz (Charrel in sod., 2005; Xu in sod., 2007). Do sedaj zbrani podatki nakazujejo, da v sredozemlju krožita vsaj dve različni genetski liniji virusa Toscana: italijanska in španska (Venturi in sod., 2007). TOSV in SFNV sta si filogenetsko zelo sorodna, zato je zanju značilna navzkrižna reaktivnost pri seroloških testih, medtem ko je SFSV filogenetsko nekoliko bolj oddaljen. Kljub navzkrižni reaktivnosti protiteles, pa okužba z enim virusom ne nudi nujno tudi zaščite pred okužbo z drugima virusoma iz iste antigenske skupine (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003).

### 2.2.2 Zgradba virusa

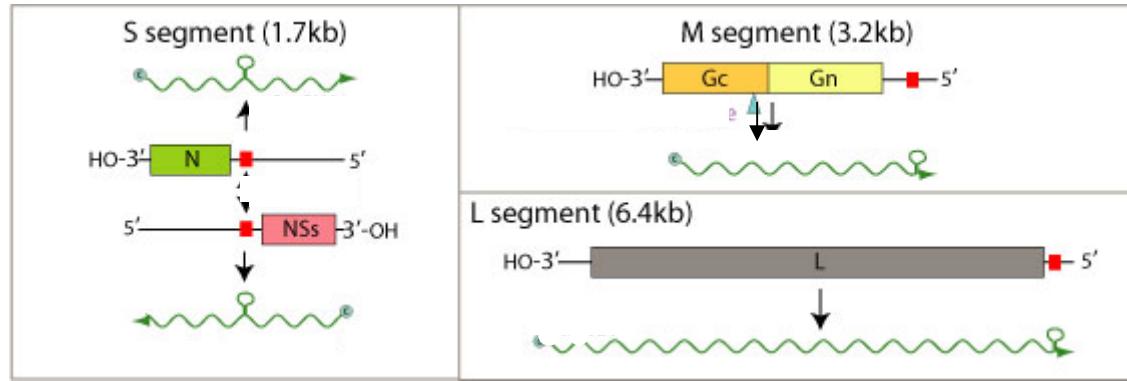
Flebovirusi so po zgradbi zelo podobni ostalim virusom iz družine *Bunyaviridae* (Slika 1). Virusni delec je viačen, kroglaste do pleomorfne oblike, ki v premeru meri od 80 do 120 nm. Sestavljen je iz približno 1 do 2 % ribonukleinskih kislin (RNK, angl. ribonuleic acid), 50 % beljakovin, 30 % lipidov in 2 do 7 % ogljikovih hidratov (Nathanson in González-Scarano, 1999). Podolgovato nukleokapsido, ki je sestavljena iz treh nitastih

vijačnih ribonukleokapsid, obdaja 5 nm debela lipidna ovojnica. Iz lipidne ovojnice enakomerno izraščajo 10 nm dolgi glikoproteinski peplomeri. Lipidna ovojnica je gostiteljskega izvora, vsebuje fosfolipide, sterole, maščobne kisline in glikolipide, ter ni nujno potrebna za infektivnost (ICTVdB, 2006).



Slika 1: Zgradba viriona (SIB, 2009)

Genom virusa predstavlja negativno polarna in bipolarna enovijačna segmentirana RNK, ki je dolga približno 13 000 nukleotidov. Sestavljajo jo trije deli (Slika 2): velik (L, angl. large), srednji (M, angl. medium) in mali (S, angl. small). Segment L je dolg približno 6400 nukleotidov in nosi zapis za virusno od RNK odvisno RNK polimerazo (transkriptazo), ki prevaja virusni genom. Segment M je dolg približno 3200 nukleotidov in nosi zapis za poliprotein iz katerega po proteolitski cepitvi med translacijo nastaneta ovojnična glikoproteina Gc in Gn ter nestrukturna beljakovina NSm. Segment S je dolg približno 1700 nukleotidov in nosi zapisa za nukleoprotein N in nestrukturno beljakovino NSs (Baldelli in sod., 2004; ICTVdB, 2006). Flebovirusni segment S predstavlja posebnost med S segmenti v družini *Bunyaviridae*, ker je bipolaren in se prevaja iz obeh koncev (angl. ambisense coding) (Dionisio in sod., 2003; Nathanson in González-Scarano, 1999).



Slika 2: Struktura genoma flebovirusov (SIB, 2009)

Genom ima na 3' in 5' koncih močno ohranjena zaporedja, ki so komplementarna in tvorijo strukture pomembne za razmnoževanje virusa, ter dajejo viden učinek krožne molekule. Vsak virion ima eno kopijo genoma (Dionisio in sod., 2003; ICTVdB, 2006).

### 2.2.3 Razmnoževanje virusa

Virus vstopi v gostiteljsko celico z endocitozo, po vezavi na specifičen receptor. Po vstopu virusa pride do zlitja virusne membrane z membrano endocitotskega vezikla, ribonukleokapsida se sprosti v citoplazmo celice (Elliot, 1999). Po odstranjevanju plašča, virusna nukleinska kislina preusmeri celično presnovo v izgradnjo sestavin za nove virusa, začne se prepisovanje virusnih RNK molekul. Pozitivni del genoma se neposredno prevede v beljakovine, negativni del pa virusna transkriptaza najprej prepiše v komplementarno mRNA (angl. messenger ribonucleic acid) (Koren in Marin, 2005). Ta se na ribosomih gostitelja prevede v strukturne in nestruktурne beljakovine. Kasneje poteče tudi pomnoževanje virusnega genoma, proteolitska cepitev poliproteinov in sestavljanje ribonukleokapsid. Virusni delci nato potujejo po cisternah Golgijevega aparata, kjer z brstenjem pridobijo lipidno ovojnico ter se nato z eksocitozo sprostijo iz celice (Elliot, 1999).

## 2.3 NARAVNI GOSTITELJI FLEBOVIRUSOV

Prenašalec flebovirusov je najpogosteje samica peščene muhe iz rodu *Phlebotomus*. Do sedaj so fleboviruse izolirali iz vrst *P. perniciosus* in *P. perfiliewi*, SFSV in SFNV tudi iz *P. papatasi*. (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003). Poleg peščenih muh (flebotomov) lahko fleboviruse prenašajo tudi nekatere vrste mušic iz rodu *Culicoides* in komarjev (Xu in sod., 2007). Kljub temu je zelo malo znanega o naravnem rezervoarju virusa. V naravi se virusi ohranjanjajo v naravnih gostiteljih flebotomih, ki virus prenašajo spolno (iz okuženega samca na neokuženo samico) in transovarialno (iz okužene samice na jajčeca). Raziskave nakazujejo tudi na pomembno vlogo skakačev in netopirjev, vendar pa je vloga vretenčarskega rezervoarja vseeno manj pomembna (Dionisio in sod., 2005). Prav tako tudi vloga človeka v življenjskem krogu virusa ni znana (Charrel in sod., 2005).

### 2.3.1 Taksonomija flebotomov

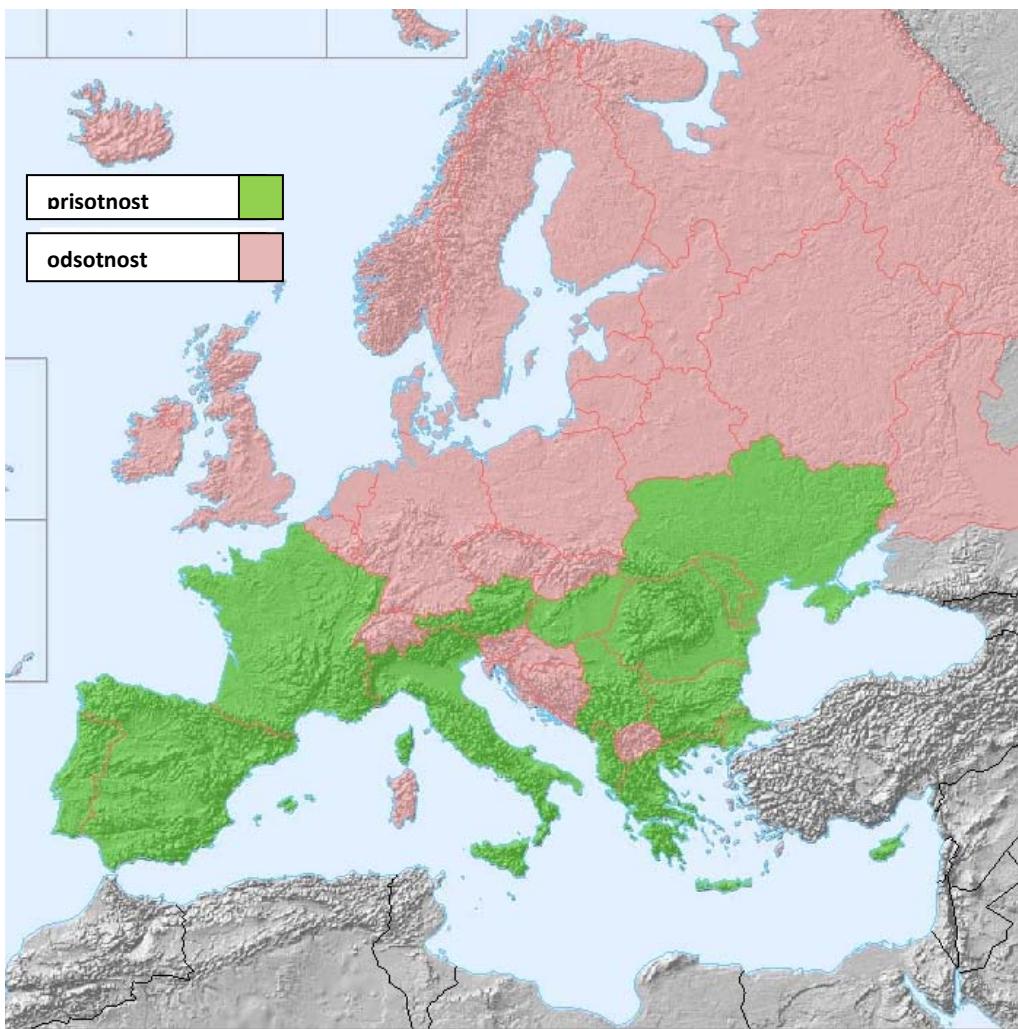
Flebotome taksonomsko uvrščamo v (Preglednica 1): razred *Insecta* (žuželke), podrazred *Pterygota* (krilate žuželke), red *Diptera* (dvokrilci), podred *Nematocera* (komarji in mušice), družino *Psychodidae*, poddružino *Phlebotominae*, rod *Phlebotomus* (Killick-Kendrick, 1999). V rod *Phlebotomus* uvrščamo 21 vrst muh, od katerih vsaj tri vrste prenašajo fleboviruse (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003, Fauna Europaea, 2004).

**Preglednica 1:** Taksonomska razvrstitev flebotomov (Fauna Europaea, 2004)

Razvrstitev	Ime
Kraljestvo	Živali ( <i>Animalia</i> )
Deblo	Členonožci ( <i>Arthropoda</i> )
Poddeblo	Šesteronožni členonožci ( <i>Hexapoda</i> )
Razred	Žuželke ( <i>Insecta</i> )
Podrazred	Krilate žuželke ( <i>Pterygota</i> )
Red	Dvokrilci ( <i>Diptera</i> )
Podred	Komarji in mušice ( <i>Nematocera</i> )
Nižji red	<i>Psychodomorpha</i>
Naddružina	<i>Psychodoidea</i>
Družina	<i>Psychodidae</i>
Poddružina	<i>Phlebotominae</i>
Rod	<i>Phlebotomus</i>

### 2.3.2 Zemljepisna razporeditev flebotomov

Flebotomi so razširjeni v toplih predelih sveta, najdemo jih v Centralni Aziji, Afriki, Avstraliji, Centralni in Južni Ameriki ter v Južni Evropi (Killick-Kendrick, 1999). V Evropi se je področje, kjer so se nahajali flebotomi razprostiralo do 45. vzporednika zemljepisne širine. V zadnjem času se njihovo življenjsko okolje iz sredozemlja širi vse bolj proti severu, tako da se zdaj to območje razprostira že do 46. vzporednika zemljepisne širine. O posameznih primerih pojava flebotomov poročajo celo iz Nemčije. Nadmorska višina, kjer bivajo, ne presega 800 m (Semenza in Menne, 2009).

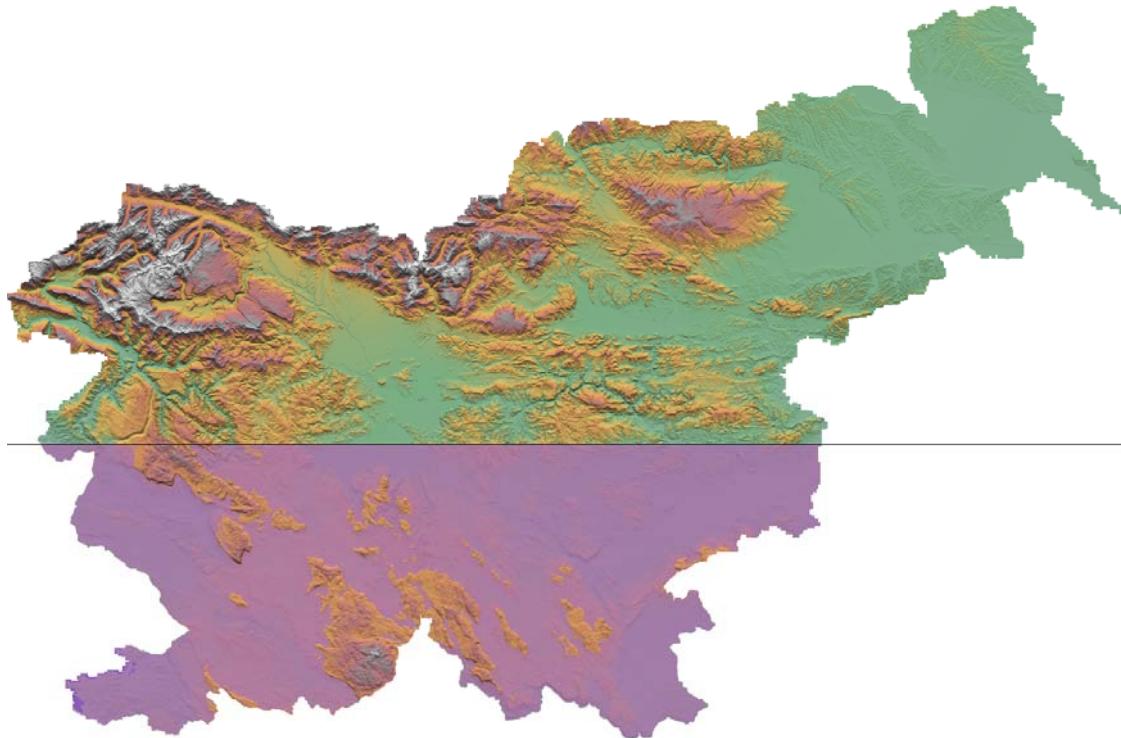


Slika 3: Evropske države, kjer so uradno zabeležili prisotnost flebotomov. (Fauna Europaea, 2004)

### 2.3.3 Flebotomi v Sloveniji

Slovenija zaenkrat uradno še ne spada v območja kjer so prisotni flebotomi (Fauna Europaea, 2004), vendar poteka 46. vzporednik zemljepisne širine, ki predstavlja mejo do katere se razprostira življenjsko okolje flebotomov, ravno čez naše območje (Ingolič, 1987).

Po podatkih iz leta 1990 so na območju nekdanje Jugoslavije, kamor je spadala tudi Slovenija, prisotne naslednje vrste flebotomov: *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi*, *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti*, *Phlebotomus (Larroussius) major neglectus*, *Phlebotomus (Larroussius) mascitti*, *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi*, *Phlebotomus (Larroussius) tobbi*, *Phlebotomus (Alderius) balcanicus*, *Phlebotomus (Alderius) simici* (Soos in Papp, 1990).



**Slika 4:** Območja Slovenije primerna za bivanje flebotomov. Črta označuje 46. vzporednik zemljepisne širine, vijolična območja pod njo so pod mejo nadmorske višine 800 m.

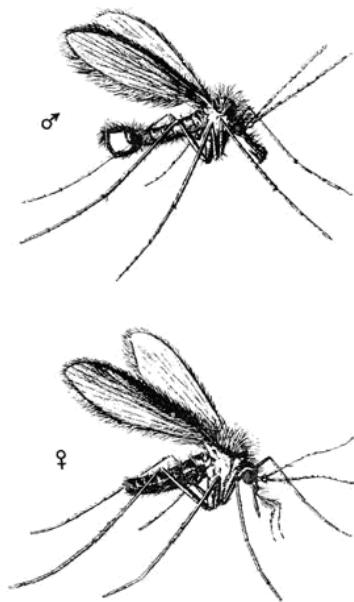
#### 2.3.4 Anatomija, ekologija in življenski krog flebotomov

Flebotomi so majhni, dolžina trupa odrasle žuželke redko preseže 3 mm. Barva trupa se spreminja od bele do črne, največkrat so rumenkaste barve (Killick-Kendrick, 1999). Iz grbastega trupa na spodnji strani izraščajo trije pari dolgih, vitkih okončin (Mehlhorn, 2001). Krila so ovalna, na koncih koničasta, postavljena pokončno na trup, vidne so številne vzporedne vene (Killick-Kendrick, 1999; Mehlhorn, 2001). Kljub krilom so flebotomi slabi letalci, njihovo gibanje je bolj kot letu podobno zaporedju skokov, zato

niso sposobni večjih razdalj. Celo telo, vključno s krili, je prekrito z dolgimi luskami, kar flebotomom daje dlakov izgled. Glava je podolgovata, na njej so dobro razvite oči in antene. Obustni aparat je kompleksno zgrajen. Samce od samic ločimo po podolgovatem zunanjem spolovilu, ki izrašča iz zadka (Sliki 5, 6) (Mehlhorn, 2001).



Slika 5: *Phlebotomus* sp. (CDC, 2005)



Slika 6: Samec in samica flebotoma (Sabin in sod., 1944)

Flebotomi se hranijo z naravnimi viri sladkorja, kot so rastlinski sokovi in tkiva ter medena rosa uši. Odrasla samica je hematofagna, zato se mora za zorenje jajčnih celic enkrat ali večkrat hraniti s kryjo vretenčarja. Prisotnosti flebotoma ponavadi ne zaznamo, saj se premika neslišno. Vbod je neboleč. Ob vbodu samica iz žlez slinavk v kožo gostitelja vbrizga slino v kateri so molekule, ki povečajo pretok krvi na mestu vboda in s tem skrajšajo čas hranjenja. Pri občutljivih posameznikih lahko slina flebotomov povzroči zapoznelo preobčutljivostno reakcijo (Killick-Kendrick, 1999; McDowell, 2009). Aktivnost flebotomov je največja v mraku in ponoči. Podnevi se zatečejo na hladna in vlažna mesta kot so kamnite razpoke, živalski brlogi in kleti (Killick-Kendrick, 1999).

Flebotomi imajo popolno preobrazbo. Časovno je razvojne stadije težko opredeliti, saj je dolžina posameznega stadija zelo odvisna od okoljskih dejavnikov. Potrebni sta zmerna temperatura (22-27 °C) in sorazmerno visoka vlažnost (45-70 %). Običajno celoten cikel (od jajčeca do jajčeca) traja 3 do 4 tedne (Killick-Kendrick, 1999; McDowell, 2009).

Po parjenju in hranjenju v samici zorijo jajčeca. Čas zorenja se razlikuje od vrste do vrste, hitrosti prebavljanja krvnega obroka in okoljske temperature. V laboratoriju jajčeca dozorijo v 4 do 8 dneh. Zrela jajčeca samice odlagajo v skladu s potrebami ličinke. Raziskave so pokazale, da se samice za kraj odlaganja jajčec odločijo na podlagi vonja. Največkrat jih odložijo v temne in vlažne razpoke ter brloge in izločke živali, odlagališča morajo biti bogata z organskimi snovmi (Killick-Kendrick, 1999). Naenkrat lahko samica izleže od 30 do 70 jajčec (Mehlhorn, 2001).

Po 7 do 10 dneh se iz majhnih, ovalnih, rjavkastih jajčec izležejo ličinke (L1). Ličinke so majhne in bele barve. Iz zadnjega konca izrašča par ščetin, ki je zanje značilen. Ličinkam L1 sledijo še trije stadiji ličink (L2 do L4). Vsi stadiji so kopenski in za svoj razvoj ne potrebujejo vode. Po približno 3 tednih se iz L4 ličinke razvije buba (pupa). Palearktične vrste flebotomov zimo prezimijo z diapavzo v stadiju L4. Iz bube se po 10 dneh začnejo izlegati odrasle živali (imago) in sicer se v prvih dneh izlegajo večinoma samci, nato še samice. Življenska doba odraslega flebotoma je okoli 30 dni (Killick-Kendrick, 1999;

McDowell, 2009). Populacija flebotomov je največja poleti, vrh doseže avgusta (Sonderreger in sod., 2009).

#### 2.4 EPIDEMIOLOGIJA BOLEZNI, KI JIH POVZROČAJO FLEBOVIRUSI

Flebovirusi so razširjeni v Afriki, Južni in Severni Ameriki, Centralni Aziji ter v Evropi, predvsem v sredozemskem prostoru. V Evropi so pomembni trije virusi: virus Sicilian (SFSV), virus Naples (SFNV) in virus Toscana (TOSV) (Dionisio in sod., 2003; Sonderreger in sod., 2009). SFSV in SFNV sta zemljepisno najbolj razširjena, prav tako tudi njun prenašalec *P. papatasi* (Charrel in sod., 2005).

Največ okužb beležijo avgusta, sledita mu julij in september ter junij in oktober (Charrel in sod., 2005). Obolenje tako prebivalci endemičnih področij kot turisti (Dionisio in sod., 2003). Najbolj ogrožene skupine so prebivalci na podeželju in ljudje, ki se zaradi poklica veliko gibljejo v naravi (Charrel in sod., 2005).

V Italiji sta najbolj zastopani vrsti flebotomov *P. perfiliewi* in *P. perniciosus*, ki prenašata TOSV, zato je okužba s tem virusom na območjih Italije zelo pogosta. Ocenjujejo, da je poleti TOSV odgovoren za 81 % primerov aseptičnega meningitisa (Charrel in sod., 2005). Protitelesa razreda IgG proti TOSV ima 20 % prebivalstva osrednje Italije (Sonderreger in sod., 2009). Pri gozdarjih beležijo kar 77,2 % prekuženost (Charrel in sod., 2005).

V zadnjih letih so na podlagi obširnih seroloških raziskav ugotovili, da je TOSV zelo pomemben povzročitelj meningitisa tudi v Španiji, saj naj bi bil odgovoren za vsako tretje obolenje s kliničnimi znaki meningitisa ali meningoencefalitisa (Charrel in sod., 2005). Prekuženost prebivalstva s TOSV na jugu Španije je 25 % (Sonderreger in sod., 2009).

Okužbe s flebovirusi so potrdili tudi na Portugalskem in v Franciji. V obeh primerih so prvo okužbo potrdili pri tujih državljanih, ki so po bivanju v omenjenih državah zboleli z

meningitisom. Kasneje so okužbo večkrat potrdili tudi pri avtohtonem prebivalstvu. Na Cipru so s serološkimi raziskavami dokazali protitelesa pri prebvalcih, prekuženost prebivalstva s TOSV je 20 % (Charrel in sod., 2005). Prav tako so protitelesa dokazali pri prebivalcih Grčije, na določenih območjih ima protitelesa 60 % prebivalcev, kljub temu okužbe s TOSV beležijo redko (Anagnostou in sod., 2010).

#### **2.4.1 Okužbe s flebovirusi na območju Slovenije**

Zaradi globalnega segrevanja prihaja do podnebnih sprememb, ki omogočajo širitev življenskega okolja določenim organizmom, s tem pa tudi patogenom, ki jih ti organizmi prenašajo (Zell in sod., 2008). S širjenjem življenskega okolja flebotomov se je tako razširilo tudi področje prisotnosti flebovirusov, ki zdaj poleg zgoraj naštetih vključuje še nekatere druge sredozemske države, med drugim tudi Slovenijo (Charrel in sod., 2005).

Rezultati raziskave, s katero so ugotavljali pogostost pretekle okužbe z različnimi arbovirusi pri gozdnih delavcih, ki so poklicno izpostavljeni tovrstnim okužbam kažejo, da ima v Sloveniji v povprečju 1,16 % gozdnih delavcev protitelesa proti SFSV in 1,40 % proti SFNV. Najvišjo prevalenco protiteles proti SFSV so ugotovili na področju Slovenj Gradca (7,28 %) proti SFNV pa na področju Sežane (10,78 %) (Avšič-Županc in sod., 1995). Protitelesa proti TOSV so ugotovili pri 2,5 % gozdnih delavcev. Najvišjo prevalenco protiteles so zasledili na področjih Sežane (6,7 %), Postojne (5,2 %) in Ilirske bistrice (4,9 %) (Avšič-Županc in sod., 1995). Kljub temu pa akutne okužbe s flebovirusi pri bolnikih v Sloveniji še niso dokazali.

## 2.5 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA

### 2.5.1 Okužba nevretenčarskega gostitelja

Do okužbe flebotomov navadno pride med sesanjem krvi vretenčarja z viremijo, takrat ko je koncentracija virusa v krvi največja (Avšič-Županc in sod., 1995). Flebotom mora zaužiti večje količine virusa, da se okuži (Charrel in sod., 2005). Flebovirusi se razmnožujejo tudi v prenašalcih.

Virus najprej okuži celice prebavil, od koder nato preko hemocela potuje v različne organske sisteme, med drugim tudi v živčno in razmnoževalno tkivo ter žleze slinavke. Razmnoževanju virusa v žlezah slinavkah sledi izločanje velikega števila virionov v lumen žleze. Po nekajdnevnom presledku, ki ga imenujemo zunanja inkubacija lahko prenašalec z vbodom prenese povzročitelja bolezni na novega občutljivega gostitelja (Nathanson in González-Scarano, 1999; Avšič-Županc in sod., 1995).

Okužba jajčnikov in jajčnih celic omogoča transovarialni prenos virusa iz samice na zarod, kadar se iz okuženega jajčeca izvali samec pa tudi kasnejši spolni prenos na neokuženo samico. Oba mehanizma sta zelo pomembna za ohranjanje in širitev virusa v naravi. Kolikor je znano, flebovirusi ne povzročajo bolezni v prenašalcu, prav tako v tkivih okuženih členonožcev niso našli okvar. Okužba členonožca je doživljenska (Nathanson in Gonzales-Scarano, 1999).

### 2.5.2 Okužba vretenčarskega gostitelja

Vretenčarji se okužijo z vbodom prenašalca, ki virus vbrizga v kožo ali pod kožo. Od tam virus potuje po limfnem sistemu v kri, ki ga poneše v periferna tkiva kjer se lahko razmnožuje. Najpogosteje je to progasto mišičevje. Iz perifernega tkiva se virus v velikih količinah sprošča nazaj v kri, kar privede do aktivne viremije. Viremija traja relativno kratek čas. V obdobju viremije virus pripotuje do tarčnih organov, kjer njegovo

razmnoževanje vodi do pojava bolezni. Imunski odziv gostitelja je ponavadi hiter, tvorijo se nevtralizirajoča protitelesa, ki virus odstranijo iz krvi in tkiv, ter najverjetneje omogočijo doživljenjsko imunost (Dionisio in sod., 2003; Nathanson in González-Scarano, 1999).

### 2.5.3 Potek bolezni

SFSV in SFNV povzročata mrzlico papatači. To je vročinska bolezen, ki spominja na gripo, traja tri do štiri dni, dihala niso prizadeta. Značilno rdečico obraza, vratu in prsi včasih spremljajo tudi vnetje očesne veznice, splošna slabost in bolečine v križu in spodnjih udih (Avšič-Županc in sod., 1995). Inkubacijska doba traja od 3 do 6 dni (Sonderreger in sod., 2009). Bolezen ni nikdar smrtna. Po kliničnih znakih bolezni, ki jo povzročata, ju ne moremo razlikovati med seboj (Avšič-Županc in sod., 1995).

TOSV je za razliko od SFSV in SFNV nevrotropen, kar so dokazali s poskusi na živalih in z rezultati obsežnih seroloških raziskav pri bolnikih s prizadetostjo osrednjega živčnega sistema (Avšič-Županc in sod., 1995). Inkubacijska doba TOSV traja tako kot pri SFSV in SFNV od 3 do 6 dni. Klinična slika okužbe s TOSV je zelo raznolika (Sonderreger in sod., 2009). Bolezen lahko poteka povsem brez simptomov ali pa so simptomi tako blagi, da bolniki ponavadi ne iščejo zdravniške pomoči (Charrel in sod., 2005). Serološke raziskave kažejo, da je asimptomatska okužba relativno pogosta, vendar pa zaradi zgoraj navedenega razloga zelo veliko okužb s TOSV ostaja neprepoznanih (Sonderredder in sod., 2009).

Potek bolezni je lahko tudi zelo težak, ko se po okužbi osrednjega živčnega sistema razvije meningitis oziroma menigoencefalitis. Opisali so tudi nekaj primerov, kjer je bil prisoten zgolj encefalitis brez meningitisa (Sonderreger in sod., 2009).

Meningitis definiramo kot vnetje možganskih ovojnici. Kadar vnetje zajame samo možganovino govorimo o encefalitisu, o meningoencefalitisu pa, ko se vnetje iz možganovine razširi tudi na možganske ovojnice. Glede na trajanje delimo vnetja na

akutna in kronična. Akutne meningitise in meningoencefalitise delimo na gnojne in serozne, vzroki so lahko infekcijski in neinfekcijski. Infekcijske meningitise povzročajo bakterije, virusi, glive, praživali in helminti. Pri bolniku, pri katerem sumimo na meningitis, izvedemo lumbalno punkcijo. Diagnozo potrdimo s pomočjo natančne anamneze, klinične slike, z laboratorijskimi preiskavami krvi in možganske tekočine ter s slikovnimi tehnikami za osrednji živčni sistem. Le redko si pomagamo s histološkim pregledom možganovine (Čižman in Mueller-Premru, 1999; Kolbl in sod., 1999).

Meningitisi in encefalitisi, ki so posledica okužbe z virusi so serozni. V krvni sliki ni značilnih sprememb, možganska tekočina pa je običajno bistra. Ugotavljamo pleocitozo s prevladovanjem enojedrnih celic (limfociti, monociti), redkeje prevladujejo nevtrofilni levkociti (predvsem v zgornji fazi bolezni). Koncentracija beljakovin je normalna ali zvišana, koncentracija sladkorja je normalna, izjemoma rahlo znižana. V kolikor je izvid patološki, moramo ugotoviti njegov vzrok. Povzročitelje bolezni dokažemo z neposrednimi in/ali s posrednimi mikrobiološkimi metodami (Čižman in Mueller-Premru, 1999; Kolbl in sod., 1999).

Po okužbi s TOSV, ki ne poteka asimptomatsko, je izbruh bolezni v 70 % zelo nenaden. Pri vseh bolnikih je prisoten glavobol, ki traja od 18 ur do 5 dni, v 76 do 97 % se pojavi visoka, tako imenovana 3-dnevna vročina, ki traja med 6 in 74 ur. Prisotni so lahko tudi slabost in bruhanje, izguba apetita, driska ali zaprtje, bolečine v mišicah in križu, fotofobija. Fizični pregled pokaže otrdelost vratu, opazimo lahko tudi slab nivo zavesti, tresavico, ohromelost, bolniki tožijo o krčevitih bolečinah v očeh. Nivo sladkorja in proteinov v likvorju je normalen. Vzorci krvi lahko kažejo levkocitozo ali levkopenijo. Bolezen v povprečju traja 7 dni in čeprav je lahko okrevanje dolgotrajno, ne pušča trajnih posledic (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003).

## 2.6 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

### 2.6.1 Neposredno dokazovanje

Fleboviruse lahko neposredno dokažemo z verižno reakcijo s polimerazo in reverzno transkriptazo (RT-PCR, angl. polymerase chain reaction with reverse transcription), v kateri z encimom pomnožimo tarčni odsek virusnega genoma. Virusno RNK lahko zaznamo v krvi in likvorju bolnika, kljub temu, da je ponavadi le-ta v zelo nizkih koncentracijah. V zadnjem času za dokazovanje flebovirusov uporabljajo metodo RT-PCR v realnem času. Le-ta omogoča zaznavanje pridelkov PCR z označeno oligonukleotidno sondijo med pomnoževanjem. Metoda je hitra, enostavna za uporabo ter bolj občutljiva in specifična od seroloških metod. Diagnostika je bolj usmerjena v odkrivanje TOSV, ker povzroča hujšo obliko bolezni. Zaenkrat je glavna pomankljivost metode ta, da ne moremo zaznati vseh različic virusa, ki so v obtoku (Charrel in sod., 2005).

Virus lahko dokažemo tudi tako, da ga osamimo iz kliničnih vzorcev in namnožimo v celični kulturi. Vsi trije tipi se dobro razmnožujejo v celicah Vero, TOSV pa tudi v celicah BHK-21, CV-1 in SW13. V celični kulturi opazujemo citopatski učinek in tvorjenje plakov. Metoda izolacije s celičnimi kulturami ni najbolj primerna, saj je nizko občutljiva in dolgotrajna. V povprečju je v kuturi pozitivnih 14 % vzorcev, ki so PCR pozitivni. (Charrel in sod., 2005).

### 2.6.2 Posredno dokazovanje

Fleboviruse lahko posredno dokažemo z ugotavljanjem specifičnih protiteles, ki se po okužbi pojavijo v serumu in likvorju bolnika (Charrel in sod., 2005). Najprej se tvorijo protitelesa razreda IgM in nato protitelesa razreda IgG. Protitelesa razreda IgM so prisotna le nekaj mesecev, protitelesa razreda IgG pa se ohranijo v serumu zelo dolgo,

tudi vse življenje. Za posredno dokazovanje nedavne ali sveže okužbe je zato zelo pomembno, kdaj je bil odvzet serum, ki ga preiskujemo (Avšič-Županc, 2005).

Največkrat za dokazovanje specifičnih protiteles uporabljamo encimsko imunske metodo (ELISA oziroma EIA, angl. enzyme-linked immunosorbent assay oziroma enzyme immunoassay) (Avšič-Županc, 2005). Glavna prednost encimsko imunske metode je, da lahko v kratkem času testiramo veliko število vzorcev, zato je primerna za presejalno testiranje. Pri vrednotenju rezultatov moramo upoštevati navzkrižno reaktivnost med različnimi flebovirusi, kot jo na primer izkazujeta TOSV in SFNV (Charrel in sod., 2005). Uporabna alternativa za dokazovanje specifičnih protiteles je posredna imunofluorescenčna metoda (IFA, angl. immunofluorescent assay) (Dionisio in sod., 2003).

## 2.7 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Trenutno ni zdravila za zdravljenje okužb s flebovirusi. Zdravljenje je navadno simptomatsko in podporno ter je odvisno od simptomov izraženih pri posameznem bolniku. V splošnem so bunjavirusi občutljivi na ribavirin. Dobre rezultate so s poskusi na živalih dosegli tudi z interferoni ter še z nekaterimi drugimi protivirusnimi sredstvi v in vitro raziskavah s SFSV. Kljub pomanjkanju dobrih randomiziranih raziskav na ljudeh, se v primeru hudih obolenj priporoča zdravljenje s kombinacijo ribavirina in interferona  $\alpha$ . Učinkovita cepiva, ki bi preprečevala okužbo s flebovirusi so zaenkrat še v fazi raziskovanja (Dionisio in sod., 2005).

Večji pomen pri preprečevanju okužb s flebovirusi imajo preventivni ukrepi. Fleboviruse lahko inaktiviramo z lipidnimi topili, detergenti ali betapropiolaktonom, občutljivi so na temperaturo višjo od 56°C in nizek pH, vendar se zaradi načina prenosa okužbe največ posvečamo uničevanju prenašalca (Dionisio in sod., 2003; Nathanson in González-Scarano, 1999). Uporaba insekticida DDT proti prenašalcu malarije po letu 1940 je znatno zmanjšala tudi populacijo flebotomov na teh območjih, vzporedno s tem pa tudi pogostost okužb s flebovirusi. To potrjujejo tudi serološke raziskave. Poleg uporabe insekticidov lahko populacijo flebotomov uspešno nadzorujemo z uničevanjem njihovega naravnega okolja (izsuševanje), učinkoviti so tudi repellenti za osebno uporabo in mreže proti komarjem (Dionisio in sod., 2003; Killick-Kendrick, 1999).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Vzorci bolnikov

V diplomsko nalogu smo vključili bolnike z znaki menigitisa oziroma meningoencefalitisa, ki so prihajali iz dinarskega in submediteranskega zoogeografskega območja. Uporabili smo klinične vzorce bolnikov (serum in likvor), ki so jih zbrali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v obdobju od leta 2006 do 2008. Vzorci bolnikov so bili v laboratorij poslani za ugotavljenje okužbe z virusom klopnega meningoencefalitisa (KMEV). Vsi vzorci so bili negativni na KMEV. Do našega testiranja so bili shranjeni pri temperaturi -20 °C.

#### 3.2 METODE

##### 3.2.1 Encimskoimunska metoda (ELISA)

###### 3.2.1.1 Teoretične osnove encimskoimunske metode

Encimskoimunska metoda je visoko specifična in občutljiva raziskovalna in diagnostična metoda, primerna za analizo večjega števila vzorcev hkrati. S to metodo na podlagi specifične vezave antigena in protitelesa določamo prisotnost molekul v vzorcu. Metoda je lahko kvalitativna ali kvantitativna. Običajno jo izvajamo tako, da na trden nosilec vežemo željene molekule. Kot trden nosilec najpogosteje uporabljam polistirensko mikrotitracijsko ploščico z vdolbinicami. Poznamo številne različice encimskoimunske metode. Pri vseh različicah potrebujemo protitelesa, ki so konjugirana z encimom (konjugat). Encim katalizira pretvorbo kromogenega substrata, pri čemer pride v vdolbinicah, kjer je potekla uspešna vezava v vseh stopnjah, do barvne reakcije, ki jo izmerimo spektrofotometrično. Izmerjene vrednosti odražajo koncentracijo molekul, ki jih določamo (Avšič-Županc, 2005).

### 3.2.1.2 Izvedba encimskoimunske metode ELISA IgG-Capture

Metodo smo uporabili za dokazovanje protitetes proti SFSV in SFNV. Za nosilec smo uporabili mikrotitracijske ploščice Nunc Maxisorp, na katere smo vezali protitelesa anti-SFS HAMF (angl. Hyperimmune mouse ascitic fluid) z oznako R 144 ali protitelesa anti-SFN HAMF z oznako R 448 redčena v pufru PBS (angl. Phosphate Buffered Saline) 1:4000. To smo naredili tako, da smo v vse vdolbinice nakapljali 100 µl protiteles anti-HAMF, ploščice inkubirali preko noči pri 4 °C in jih nato 3-krat sprali s pufrom za spiranje (PBS s Tween-20, 0,1 %).

Na pripravljene plošče z vezanimi protitelesi anti-SFS ali anti-SFN HAMF smo nakapljali v prvo vrsto 100 µl pripravljene razredčine antiga in v drugo vrsto 100 µl pripravljene razredčine kontrolnega antiga. Za dokazovanje SFSV smo uporabili antigen z oznako R 204 in kontrolni antigen z oznako R 203 v titru 1:50, za dokazovanje SFNV pa antigen z oznako R 205 in kontrolni antigen z oznako R201 v titru 1:40. Antigene smo redčili v pufru za redčenje serumov SD (5 % posnetega mleka v prahu v pufru za spiranje). Pokrite plošče smo inkubirali 60 minut v termostatu pri 37 °C ter jih po končani inkubaciji 3-krat sprali s pufrom za spiranje.

V vdolbinice smo nato dodali 100 µl redčenih serumov in pozitivno ter negativno kontrolo po protokolu. Serume in kontrole smo redčili 1:100 v pufru za redčenje serumov SD. Pokrite plošče smo inkubirali 60 minut v termostatu pri 37 °C, temu je sledilo 3-kratno spiranje s pufrom za spiranje.

Po končanem spiranju smo v vdolbinice dodali 100 µl konjugata anti-Human IgG (HRP Mouse X Human IgG FC) v titru 1:8000. Konjugat smo redčili v pufru SD. Pokrite plošče smo nato ponovno inkubirali 60 minut v termostatu pri 37 °C in 3-krat sprali s pufrom za spiranje.

V vdolbinice smo nato dodali 100 µl sveže pripravljenega substrata. Substrat smo pripravili tako, da smo zmešali ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v razmerju 1:1. Sledili sta inkubacija nepokritih plošč v temi (30 minut pri 37°C) in spektrofotometrično merjenje rezultatov z napravo Tecan (405/492 nm), Program Magellan, HMRS.

### 3.2.1.3 Izvedba encimskoimunske metode ELISA IgG

Metodo smo uporabili za dokazovanje TOSV. Za nosilec smo uporabili mikrotitracijske ploščice Nunc Polysorp na katere smo v prvo vrsto dodali 100 µl antiga z oznako R 1825, v drugo vrsto pa kontrolni antigen z oznako R 556, oba v titru 1:4000. Antigene smo redčili v pufru PBS. Pokrite plošče smo preko noči shranili v hladilniku pri 4°C. Zjutraj smo plošče 3-krat sprali s pufrom za spiranje (PBS s Tween-20, 0,1 %).

V vdolbinice smo nato dodali 100 µl redčenih serumov in kontrol po protokolu. Serume in kontrole smo redčili 1:100 v pufru za redčenje serumov SD. Pokrite plošče smo inkubirali 60 minut pri 37 °C, sledilo je 3-kratno spiranje s pufrom za spiranje.

Po končanem spiranju smo v vse vdolbinice dodali 100 µl konjugata anti-Humani IgG (HRP Mouse X Human IgG FC) v titru 1:8000. Konjugat smo redčili v pufru SD. Pokrite plošče smo nato ponovno inkubirali 60 minut v termostatu pri 37 °C in 3-krat sprali s pufrom za spiranje.

V vdolbinice smo nato dodali 100 µl sveže pripravljenega substrata. Substrat smo pripravili tako, da smo zmešali ABTS in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v razmerju 1:1. Sledili sta inkubacija nepokritih plošč v temi (30 minut pri 37 °C) in spektrofotometrično merjenje rezultatov z napravo Tecan (405/492 nm), Program Magellan, HMRS.

### 3.2.2 Metoda posredne imunofluorescence (IFA)

#### 3.2.2.1 Teoretične osnove posredne imunofluorescence

Pri imunofluorescenčnih testih uporabljam fluorokrome (npr. fluorescein). Fluorokromi so snovi, ki se aktivirajo pod vplivom svetlobe krajše valovne dolžine in oddajajo svetlobo daljše valovne dolžine v vidnem delu spektra. Z metodo dokazujemo protivirusna protitelesa v serumu. Specifična protitelesa iz seruma se vežejo z virusnim antigenom, ki je pritrjen na predmetnik. Kompleksu dodamo s fluorokromom označena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna in tvorijo imunski kompleks, ki ga opazujemo pod mikroskopom. Rezultate testiranja izrazimo s titrom protiteles. Metodo odlikujejo precejšnja specifičnost in občutljivost ter sorazmerno hitra izvedba. Ocena rezultatov je subjektivna, zato jo mora izvajati izkušena in strokovno usposobljena oseba (Avšič-Županc, 2005).

#### 3.2.2.2 Izvedba metode posredne imunofluorescence

Za potrebe raziskovalne naloge smo uporabili testna kompleta Sandfly fever virus Mosaic IgG in Sandfly fever virus Mosaic IgM (Euroimmun, Lübeck, Nemčija). V mikrotitracijski ploščici smo pripravili razredčine serumov 1:10, 1:100 in 1:1000, redčili smo s pufrom za redčenje serumov iz testnega kompleta. Pri dokazovanju IgM protiteles moramo skupaj s pufrom za redčenje serumov uporabiti tudi RF adsorbens ki iz seruma odstrani protitelesa IgG in revmatoidni faktor z metodo imunoabsorbicije. Pri izvedbi metode moramo paziti, da so vsi reagenti in stekelca z antigenom ogreti na sobno temperaturo. V vsak test moramo vključiti tudi pozitivno in negativno kontrolo.

Pripravljene redčine serumata smo po protokolu nanesli na nosilec za reagente. Nanašali smo po 25 µl, nato smo na kapljice redčenih serumov položili stekelce z antigenom (BIOCHIP stekelci). Pri tem smo pazili, da so se kapljice ujemale z mestom nanešenega antiga in da se med seboj niso prelivale. Sledila je 30 minutna inkubacija pri sobni

temperaturi. V tem času se specifična protitelesa, če so prisotna, vežejo na antigene na stekelcu.

Po inkubaciji smo stekelce nežno oplaknili s pufrom PBS-Tween. Postavili smo ga v kadičko za spiranje IFA stekelc s pufrom PBS-Tween in v pufru pustili 5 minut. Nato smo na čist nosilec za reagente nanesli po 20 µl konjugata (kozja protitelesa razreda IgG ali IgM proti človeškim protitelesom označena s fluoresceinom). Iz kadičke smo vzeli stekelce, ga narahlo obrisali ob straneh in takoj postavili na kapljice konjugata na nosilcu reagentov. Sledila je 30-minutna inkubacija pri sobni temperaturi in spiranje pri katerem smo pufru za spiranje dodali 10 kapljic Evansovega modrila na 150 ml pufra.

Na krovno stekelce smo nato dodali 20 µl glicerola (embedding medium). BIOCHIP stekelce smo vzeli iz pufra in ga položili na krovno stekelce z glicerolom. Pripravljeno predmetno stekelce smo pregledali s fluorescentnim mikroskopom pod 40-kratno povečavo.

### 3.2.3 Izolacija RNK

#### 3.2.3.1 Izvedba izolacije RNK iz likvorja in serumskih vzorcev

Iz vzorcev likvorjev in serumov smo izolirali celokupno RNK po izboljšani metodi Chomczynskega in Sacchija (Chomczynski in Sacchi, 1987), ki jo pri uporabi reagenta TRIZOL®LS priporoča podjetje Invitrogen Life technologies™ (Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Reagent med homogenizacijo ali lizo vzorca ohranja integriteto RNK. Izolirana RNK ne vsebuje proteinov in DNK.

Delo smo opravili v biološki komori za varno delo II. stopnje (laminarij). Pri tem smo uporabljali avtoklavirane pripomočke (epruvetke, pipetni nastavki) in pogosto menjavali rokavice. Laminarij smo pred delom in po njem vsaj 10 minut sterilizirati z UV svetlobo. Delovno površino in pripomočke smo pred in po delu razkužili z 5 % natrijevim hipokloridom in RNase Free Solution (Qbiogene Inc., Kalifornija, ZDA).

V 1.5 ml epruvetko smo prenesli 200 µl vzorca in mu dodali 600 µl reagenta TRIZOL®LS (raztopina gvanidin izotiocianata in fenola). Premešali smo s sunkovitim obračanjem in kratkim vorteksiranjem. Vzorec smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, da smo omogočili dokončno lizo celic in razpad nukleoproteinskih kompleksov.

Vzorcu smo nato dodali 120 µl kloroforma ter zopet premešali s sunkovitim obračanjem in vorteksiranjem. Vzorec smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 4 °C in 15.000 obratih/minuto.

Po centrifugiranju dobimo v epruvetki tri faze: zgornjo vodno fazo z raztopljenou RNK, srednjo fazo v kateri so beljakovine in lipidi, ter spodnjo fenol-kloroformno fazo z raztopljenou DNK in preostalimi nečistočami. Vodno fazo smo previdno prenesli v novo epruvetko. Pri tem smo pazili, da se nismo dotikali stene epruvetke in beljakovin. Preostanek smo zavrgli. Vodni fazi smo dodali 300 µl izopropanola, ohlajenega na – 20 °C in premešali s sunkovitim obračanjem epruvetke. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 4 °C in 15.000 obratih/minuto.

Po centrifugiranju RNK precipitira na dnu in stenah epruvetke. Odstranili smo supernatant in pazili, da se pri tem nismo dotaknili sten epruvetke. RNK smo sprali s 600 µl etanola, ohlajenega na – 20 °C, dobro premešali na vorteksu (1 minuta) in centrifugirali 7 minut pri 4 °C in 12.000 obratih/minuto.

Previdno smo odstranili supernatant in RNK sušili 20 do 40 minut v laminariju ob toku zraka. Pazili smo, da se RNK ni presušila. Osušeno RNK smo resuspendirali v 30 – 50 µl RNase-free vode (avtoklavirana, deionizirana, ultrafiltrirana, RNaz prosta destilirana voda). Raztopljenou RNK smo shranili pri – 20 °C do nadaljne uporabe.

### 3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

#### 3.2.4.1 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo in reverzno transkriptazo v realnem času (RT-PCR v realnem času)

Dokazovanje virusov z metodo PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju specifičnega, majhnega odseka virusnega genetskega materiala (Herzog-Velikonja in sod., 2000). Verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo (RT-PCR) je različica metode PCR. Ker s PCR lahko pomnožujemo le molekule DNA, je za dokazovanje virusov z RNK genomom potrebno pred izvajanjem PCR, izolirano virusno RNK prepisati v komplementarno virusno DNK (cDNA, angl. complementary DNA). V ta namen uporabljamo encim reverzno transkriptazo, osamljeno iz virusa ptičje mieloblastoze (AMV, angl. Avian Mieloblastosis Virus).

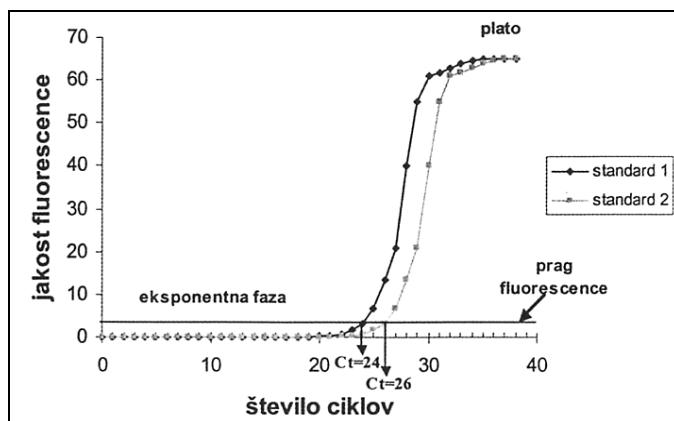
Prepis RNK v komplementarno DNK poteka v štirih stopnjah:

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

PCR se izvaja na naslednji način. PCR reakcijsko mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en temperaturni cikel PCR. Vsak temperaturni cikel podvoji količino tarčnega dela virusne DNK. Navadno PCR sestavlja od 25 do 40 zaporednih ponovitev temperaturnega cikla. Končni rezultat je eksponentno kopičenje značilnih tarčnih delov DNK. PCR poteka v računalniško vodeni inkubacijski aparaturi (Poljak in sod., 1994). Glavni predpogoji za uspešno pomnoževanje z metodo

PCR je predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela virusnega genoma. To nam omogoča pravilno izbiro začetnih nukleotidov, komplementarnih s tarčnim odsekom virusnega genoma, ki ga želimo pomnožiti (Herzog-Velikonja in sod., 2000).

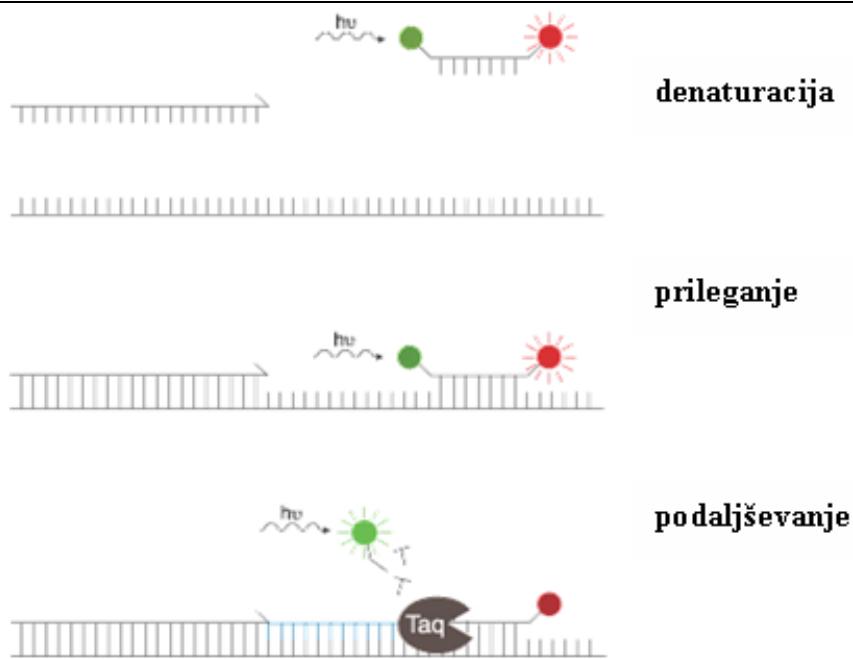
Pri običajnem PCR postopku poteka prepoznavanje produktov ponavadi na agaroznem gelu, medtem ko poteka dokazovanje produktov pri PCR v realnem času med pomnoževanjem produktov. Metoda omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu, med samo reakcijo. Dokaz produktov temelji na merjenju fluorescence. Na osnovi izmerjenih podatkov se izriše krivulja, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (Slika 7) (Klein , 2002; Nieters, 2001).



Slika 7: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (Klein, 2002)

Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko preseže ta prag ( $C_t$ ). Pri večjem začetnem številu kopij matrice, signal prej preseže ta prag in tako določimo nižji  $C_t$ . Kadar je razlika  $C_t$  med dvema vzorcema 1 pomeni, da je razlika v količini matrice 2-kratna. S primerjavo vrednosti  $C_t$  vzorcev z vrednostmi  $C_t$  standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu (Ginzinger, 2002; Klein, 2002).

Poznamo več načinov za dokazovanje produktov s PCR v realnem času in sicer specifične in nespecifične (Mackay in sod., 2002; Bel in Ranford-Catwright, 2002). Za nespecifično dokazovanje nastalih PCR pridelkov uporabljamo fluorescentna barvila. Ta se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNK. Primer je barvilo SYBR Green I. Ta je nadomestil etidijev bromid, ki se danes skoraj ne uporablja več. Za specifično odkrivanje nastalih produktov uporabljamo s fluorokromi označene oligonukleotide – sonde. Najpogosteje uporabljamo *TaqMan* sondu (Slika 8) (Cockerill, 2003). To je oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezan reporterski fluorofor, na 3' koncu pa dušilec. Intaktna sonda ne fluorescira, ker sta reporterski fluorofor in dušilec preblizu. V stopnji prileganja se sonda veže na enoverižne produkte reakcije za začetnim nukleotidom. Ob podaljševanju začetnega oligonukeotida z encimom *Taq* DNK polimeraza, ki ima 5' eksonuleazno 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 (Slika 8) (Wilhelm in Pingoud, 2003). PCR v realnem času poteka v zaprtem sistemu, to odpravlja potrebo po dodatnih stopnjah po končani reakciji PCR, kar skrajša čas analize in zmanjša možnost kontaminacije (Klein, 2002).



Slika 8: Princip delovanja TaqMan sonde (Wilhelm in Pingoud, 2003)

### 3.2.4.2 Izvedba verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkriptazo v realnem času za dokaz TOSV

Za dokazovanje TOSV z RT-PCR v realnem času smo uporabili začetna oligonukleotida in sondi, ki so homologni segmentu S in nalegajo na gen za ovojnični glikoprotein Gn. Uporabili smo začetna oligonukleotida z oznakama STOS-50F (nukleotidno zaporedje: 5'-TGCTTTCTTGATGAGTCTGCAG-3' in STOS-138R (nukleotidno zaporedje: 5'-CAATGCGCTYGGRTCAAA-3'). Uporabili smo *TaqMan* sondi z oznako STOS-84T FAM (nukleotidno zaporedje: 5' ATCAAATGCATGGGTRAATGAGTTGC TTACC-3'), ki ima na 5' koncu vezan fluorofor FAM, na 3' koncu pa ima vezan dušilec DABCYL (Pérez-Ruiz in sod., 2007). Uporabili smo komplet reagentov SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, ZDA). Reakcija je potekala v aparaturi Rotor Gene 6000 (Qiagene, Hilden, Nemčija).

Volumen reakcijske mešanice je bil 25 µl in je vseboval:

- 12,5 µl 2-krat koncentrirane reakcijske mešanice,
- 0,3 µl začetnega oligonukleotida STOS-50F (600 nM)
- 0,3 µl začetnega oligonukleotida STOS-138R (600 nM)
- 0,25 µl sonde STOS-84T-FAM (200 nM)
- 0,5 µl encima SSIII RT/Platinum Taq Mix
- 1µl MgSO<sub>4</sub> (2mM)
- 5,15 µl sterilizirane in deionizirane vode
- 5 µl virusne RNA.

Najprej je potekel reverzni prepis v cDNK in sicer 30 minut pri 42 °C. Nato je sledila inaktivacija reverzne transkriptaze ter aktivacija Platinum Taq polimeraze 4 minute pri 95 °C ter reakcija v 45 temperaturnih ciklih:

- denaturacija: 15 sekund pri 95 °C,
- pripenjanje začetnih oligonukletodov in sonde ter podaljševanje tarčnega odseka: 1 minuta pri 60 °C.

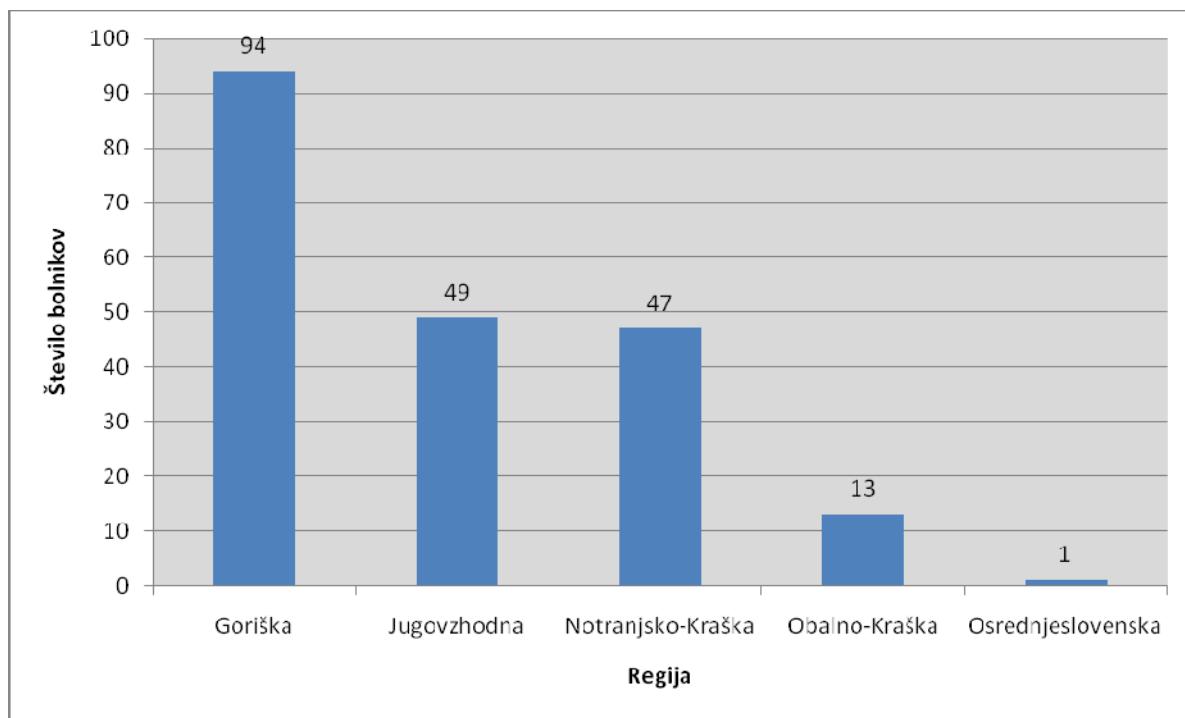
Po končani reakciji smo analizo opravili na računalniku, kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linijo fluorecsenčnega praga.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VZORCI

Uporabili smo 242 kliničnih vzorcev (serum in likvor), ki so pripadali 204 bolnikom z znaki meningitisa ali meningoencefalitisa in so jih zbrali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v obdobju od leta 2006 do 2008. Od 199 bolnikov smo imeli 229 vzorcev serumov. En bolnik je imel 4 zaporedne vzorce serumov, pet jih je imelo 3 zaporedne vzorce serumov, 17 pa 2 zaporedna vzorca serumov. Osem med njimi je bilo takih, ki so imeli poleg serumskih vzorcev tudi vzorec likvorja. Od petih bolnikov pa smo imeli na voljo samo vzorce likvorja. Skupno število vzorcev likvorja je bilo tako 13.

Največje število zbranih vzorcev je bilo odvzetih leta 2008, najmlajši preiskovanec je bil star 9 mesecev, najstarejši 86 let, povprečna starost je bila 39 let. Največ preiskovancev je prihajalo iz Goriške regije (Slika 9).



**Slika 9:** Obravnavani bolniki z meningitisom ali meningoencefalitisom po slovenskih regijah v obdobju 2006 – 2008

#### 4.2 REZULTATI ENCIMSKOIMUNSKE METODE

Z encimskoimunsko metodo smo ugotavljali specifična protitelesa razreda IgG proti TOSV, SFNV in SFSV. Prvotno smo pregledali 221 serumskih vzorcev, ki so pripadali 204 bolnikom (Priloga 1). S presejalnim testiranjem večjega števila vzorcev smo izločili pozitivne vzorce za nadaljnjo obravnavo. Pozitiven rezultat je pomenila zelena obarvanost in optična gostota (OD, angl. optical density) večja od 0,150. V primeru, da je bila OD vrednost manjša od 0,150, vendar še vedno statistično pomembna smo rezultat ocenili kot šibko pozitiven.

Vzorce, ki so bili s prvim presejalnim testiranjem pozitivni ali šibko pozitivni smo ponovno testirali z metodo ELISA. Z drugim testiranjem smo želeli potrditi pozitivne rezultate prvega testiranja in s tem zmanjšati možnost lažno pozitivnih rezultatov. Pri

bolnikih, ki so imeli specifična protitelesa proti kateremu koli flebovirusu smo v analizo vključili tudi dodatne serumske vzorce, ki so nam bili na voljo.

#### **4.2.1 Rezultati prvega (presejalnega) testiranja z metodo ELISA**

Od 221 vzorcev smo pri 5 vzorcih dokazali specifična protitelesa rezreda IgG proti TOSV, šibko pozitivni so bili 3 vzorci (Preglednica 2). Skupno smo torej dokazali protitelesa proti TOSV pri 8 vzorcih, ki so pripadali 6 bolnikom. Pri dveh bolnikih smo namreč testirali 2 zaporedna vzorca serumov.

Specifična protitelesa razreda IgG proti SFNV smo dokazali pri 7 vzorcih, šibko pozitivni so bili 3 vzorci (Preglednica 2). Skupno smo tako dokazali protitelesa proti SFNV pri 10 vzorcih, ki so pripadali 8 bolnikom. Tudi tu smo pri dveh bolnikih testirali 2 zaporedna vzorca serumov.

Specifičnih protiteles razreda IgG proti SFSV nismo dokazali (Preglednica 2).

**Preglednica 2:** Rezultati dokazovanja protiteles razreda IgG proti TOSV, SFNV in SFSV z metodo ELISA

Vzorci \ Test	ELISA IgG TOSV	ELISA IgG SFNV	ELISA IgG SFSV
Pozitivni	5	7	0
Šibko pozitivni	3	3	0
Negativni	213	211	221
Skupaj	221	221	221

#### **4.2.2 Rezultati drugega testiranja z metodo ELISA**

S presejalnim testiranjem z metodo ELISA, smo specifična protitelesa proti flebovirusom dokazali pri 8 bolnikih (10 vzorcev). Vzorce teh bolnikov smo ponovno testirali z metodo ELISA, da bi zmanjšali možnost lažno pozitivnih rezultatov. V testiranje smo vključili še dodatne zaporedne vzorce teh bolnikov, ki so nam bili na voljo. Takšnih vzorcev je bilo 8. Skupno smo tako testirali 18 vzorcev (Preglednica 3).

Specifična protitelesa razreda IgG proti TOSV smo dokazali pri 13 vzorcih. Specifična protitelesa razreda IgG proti SFNV smo dokazali pri 12 vzorcih, en vzorec pa je bil šibko pozitiven. Specifičnih protiteles razreda IgG proti SFSV ponovno nismo dokazali v nobenem vzorcu (Preglednica 3).

Z drugim testiranjem smo pri vseh 5 pozitivnih vzorcih prvega testiranja ponovno dokazali protitela proti TOSV. Dva šibko pozitivna vzorca, sta bila pri drugem testiranju negativna, en pa pozitiven. En negativen vzorec pri prvem testiranju, je bil pri drugem testiranju pozitiven. (Preglednica 3).

En vzorec pri katerem smo pri prvem testiranju dokazali protitelesa proti SFNV, je bil v drugem testiranju šibko pozitiven, en pa negativen. Dva šibko pozitivna vzorca sta bila pri drugem testiranju negativna, en šibko pozitiven vzorec pa je bil pri drugem testiranju pozitiven (Preglednica 3).

Z drugim testiranjem z metodo ELISA smo zaradi negativnih rezultatov iz nadaljne analize izločili 3 bolnike (bolniki 1, 5 in 8) (Preglednica 3).

**Preglednica 3:** Rezultati prvega in drugega dokazovanja protiteles proti flebovirusom z metodo ELISA. Bolnike smo označili s številkami od 1 do 8, ki jih bodo spremljale v nadalnjih analizah, prav tako smo vzorce označili s številkami od 1 do 18. Vijolična barva označuje vzorce, ki so se razlikovali pri prvem in drugem presejalnem testiranju za protitelesa proti TOSV, modra barva pa označuje vzorce, ki so se razlikovali pri testiranju za protitelesa proti SFNV. Oznaka / pomeni, da vzorca nismo imeli na voljo.

			Prvo presejalno testiranje			Drugo presejalno testiranje		
ŠTEVILKA BOLNIKA	ŠTEVILKA VZORCA	DATUM ODVZEMA	TOSV	SFNV	SFSV	TOSV	SFNV	SFSV
1	1	15.07.2006	šibko POZ (OD 0.072)	POZ (OD 0.492)	NEG	NEG	NEG	NEG
2	2	05.12.2005	/	/	/	POZ (OD 0.182)	POZ (OD 0.279)	NEG
	3	23.01.2006	NEG	šibko POZ (0.122)	NEG	POZ (OD 0.291)	POZ (OD 0.529)	NEG
3	4	29.04.2006	šibko POZ (OD 0.074)	POZ (OD 0.234)	NEG	POZ (OD 0.150)	šibko POZ (OD 0.129)	NEG
4	5	28.11.2007	POZ (OD 0.364)	POZ (OD 0.659)	NEG	POZ (OD 0.345)	POZ (OD 0.454)	NEG
	6	12.01.2008	/	/	/	POZ (OD 0.292)	POZ (OD 0.420)	NEG
	7	16.09.2008	/	/	/	POZ (OD 0.365)	POZ (OD 0.608)	NEG
5	8	27.11.2007	NEG	šibko POZ (0.082)	NEG	NEG	NEG	NEG
	9	07.10.2008	/	/	/	NEG	NEG	NEG
	10	23.02.2009	/	/	/	NEG	NEG	NEG
6	11	08.01.2007	POZ (OD 0.540)	POZ (OD 0.984)	NEG	POZ (OD 0.425)	POZ (OD 0.757)	NEG
	12	06.04.2007	POZ (OD 0.641)	POZ (OD 1.206)	NEG	POZ (OD 0.517)	POZ (OD 0.900)	NEG
	13	05.07.2007	/	/	/	POZ (OD 0.624)	POZ (OD 0.963)	NEG
7	14	28.01.2008	POZ (OD 0.483)	POZ (OD 0.876)	NEG	POZ (OD 0.970)	POZ (OD 1.119)	NEG
	15	30.01.2008	/	/	/	POZ (OD 1.104)	POZ (OD 1.300)	NEG
	16	11.02.2008	/	/	/	POZ (OD 1.254)	POZ (OD 1.467)	NEG
	17	12.03.2008	POZ (OD 0.649)	POZ (OD 1.032)	NEG	POZ (OD 1.130)	POZ (OD 1.277)	NEG
8	18	15.02.2008	šibko POZ (OD 0.106)	šibko POZ (OD 0.098)	NEG	NEG	NEG	NEG

#### 4.3 REZULTATI METODE POSREDNE IMUNOFLUORESCENCE

Vzorce, ki so bili z metodo ELISA pozitivni ali šibko pozitivni, smo testirali še z metodo posredne imunofluorescence (IFA, angl. Immunofluorescence assay). Določali smo protitelesa razreda IgG in IgM proti TOSV, SFNV in SFSV. S tem smo primerjali občutljivost in specifičnost encimskoimunske metode z metodo posredne imunofluorescence.

Najprej smo testirali vzorce 5 bolnikov, ki smo jih po testiranjih z metodo ELISA uvrstili v nadaljno obravnavo (bolniki 2, 3, 4, 6 in 7). Vzorce smo redčili 1:10, 1:100 in 1:1000.

Zaradi rezultatov, ki so nakazovali, da je IFA bolj občutljiva od metode ELISA, smo se odločili, da bomo naknadno testirali še vzorce bolnikov, ki smo jih po koncu presejalnih testov z metodo ELISA izločili (bolniki 1, 5, 8). Skupno smo tako testirali 8 bolnikov.

##### 4.3.1 Rezultati testiranja z metodo IFA

Od 8 testiranih bolnikov, smo pri 5 bolnikih (12 vzorcev) dokazali specifična protitelesa razreda IgG proti TOSV, pri 4 bolnikih (11 vzorcev) specifična protitelesa razreda IgG proti SFNV in pri 2 bolnikih specifična protitelesa razreda IgG proti SFSV (4 vzorci) (Preglednica 4).

Specifična protitelesa razreda IgM proti TOSV smo dokazali pri 4 bolnikih (11 vzorcev), prav tako smo pri 4 bolnikih dokazali specifična protitelesa razreda IgM proti SFNV (7 vzorcev) in SFSV (8 vzorcev) (Preglednica 4).

**Preglednica 4:** Rezultati dokazovanja protiteles razreda IgG in IgM proti TOSV, SFNV in SFSV z metodo IFA.

			IFA testiranje					
			Dokazovanje protiteles razreda IgG			Dokazovanje protiteles razreda IgM		
Številka bolnika	Številka vzorca	Datum odvzema	TOSV	SFNV	SFSV	TOSV	SFNV	SFSV
1	1	15.07.2006	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	2	05.12.2005	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	3	23.01.2006	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	4	29.04.2006	32	neg	neg	32	32	32
4	5	28.11.2007	1000	32	32	neg	neg	neg
	6	12.01.2008	1000	100	100	neg	neg	neg
	7	16.09.2008	320	100	32	neg	neg	neg
5	8	27.11.2007	neg	neg	neg	320	100	100
	9	07.10.2008	neg	neg	neg	320	320	320
	10	23.02.2009	neg	neg	neg	320	320	320
6	11	08.01.2007	320	32	neg	100	neg	32
	12	06.04.2007	320	100	32	100	32	32
	13	05.07.2007	320	100	neg	100	100	100
7	14	28.01.2008	1000	100	neg	32	10	10
	15	30.01.2008	320	320	neg	32	neg	neg
	16	11.02.2008	>10000	320	neg	32	neg	neg
	17	12.03.2008	>10000	320	neg	32	neg	neg
8	18	15.02.2008	320	>10000	neg	neg	neg	neg

#### 4.4 PRIMERJAVA REZULTATOV METODE ELISA IN METODE IFA

Rezultate obeh posrednih metod za dokazovanje okužbe s flebovirusi smo za vsak virus posebej združili v posebne preglednice. Tako smo dosegli boljšo preglednost rezultatov in možnost primerjave obeh seroloških metod. V vsaki preglednici smo za kasnejšo analizo bolnikom pripisali še regijo iz katere prihaja.

Pri 5 bolnikih smo specifična protitelesa proti TOSV dokazali z obema metodama. Od tega smo pri 3 bolnikih z metodo IFA poleg specifičnih protiteles razreda IgG, dokazali tudi specifična protitelesa razreda IgM proti TOSV (Preglednica 5).

Z obema metodama smo pri 6 bolnikih dokazali protitelesa proti SFNV, od tega pri 4 z metodo IFA tudi specifična protelesa IgM proti SFNV (Preglednica 6).

Z metodo IFA smo specifična protitelesa proti SFSV dokazali pri 4 bolnikih, z metodo ELISA pa so bili vsi vzorci negativni (Preglednica 7).

Engelman K. Ugotavljanje flebovirusov pri bolnikih z meningitisom ali meningoencefalitisom v Sloveniji.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2011

**Preglednica 5:** Rezultati primerjave seroloških testov za TOSV. Z rumeno barvo smo označili bolnike, pri katerih smo z obema metodama dokazali specifična protitelesa proti TOSV. Oznaka / pomeni, da vzorca nismo imeli na voljo.

				ELISA		IFA	
				Prvo (presejalno) testiranje IgG	Drugo testiranje IgG	IgG	IgM
Števila bolnika	Številka vzorca	Regija	Datum odvzema	TOSV			
1	1	Jugovzhodna	15.07.2006	šibko poz (OD 0.072)	neg	neg	neg
2	2	Goriška	05.12.2005	/	poz (OD 0.182)	neg	neg
	3		23.01.2006	neg	poz (OD 0.291)	neg	neg
3	4	Goriška	29.04.2006	šibko poz (OD 0.074)	poz (OD 0.150)	32	32
4	5	Goriška	28.11.2007	poz (OD 0.364)	poz (OD 0.345)	1000	neg
	6		12.01.2008	/	poz (OD 0.292)	1000	neg
	7		16.09.2008	/	poz (OD 0.365)	320	neg
5	8	Goriška	27.11.2007	neg	neg	neg	320
	9		07.10.2008	/	neg	neg	320
	10		23.02.2009	/	neg	neg	320
6	11	Goriška	08.01.2007	poz (OD 0.540)	poz (OD 0.425)	320	100
	12		06.04.2007	poz (OD 0.641)	poz (OD 0.517)	320	100
	13		05.07.2007	/	poz (OD 0.624)	320	100
7	14	Obalno-Kraška	28.01.2008	poz (OD 0.483)	poz (OD 0.970)	1000	32
	15		30.01.2008	/	poz (OD 1.104)	320	32
	16		11.02.2008	/	poz (OD 1.254)	>10000	32
	17		12.03.2008	poz (OD 0.649)	poz (OD 1.130)	>10000	32
8	18	Goriška	15.02.2008	šibko poz (OD 0.106)	neg	320	neg

Engelman K. Ugotavljanje flebovirusov pri bolnikih z meningitisom ali meningoencefalitisom v Sloveniji.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2011

**Preglednica 6:** Rezultati primerjave seroloških testov za SFNV. Z oranžno barvo smo označili bolnike, pri katerih smo z obema metodama dokazali specifična protitelesa proti SFNV. Oznaka / pomeni, da vzorca nismo imeli na voljo.

				ELISA		IFA			
Števila bolnika	Številka vzorca	Regija	Datum odvzema	Prvo (presejalno) testiranje IgG	Drugo testiranje IgG	IgG	IgM		
				SFNV					
1	1	Jugovzhodna	15.07.2006	poz (OD 0.492)	neg	neg	neg		
2	2	Goriška	05.12.2005	/	poz (OD 0.279)	neg	neg		
	3		23.01.2006	šibko poz (0.122)	poz (OD 0.529)	neg	neg		
3	4	Goriška	29.04.2006	poz (OD 0.234)	šibko poz (OD 0.129)	neg	32		
4	5	Goriška	28.11.2007	poz (OD 0.659)	poz (OD 0.454)	32	neg		
	6		12.01.2008	/	poz (OD 0.420)	100	neg		
	7		16.09.2008	/	poz (OD 0.608)	100	neg		
5	8	Goriška	27.11.2007	šibko poz (0.082)	neg	neg	100		
	9		07.10.2008	/	neg	neg	320		
	10		23.02.2009	/	poz	neg	320		
6	11	Goriška	08.01.2007	poz (OD 0.984)	poz (OD 0.757)	32	neg		
	12		06.04.2007	poz (OD 1.206)	poz (OD 0.900)	100	32		
	13		05.07.2007	/	poz (OD 0.963)	100	100		
7	14	Obalno-Kraška	28.01.2008	poz (OD 0.876)	poz (OD 1.119)	100	10		
	15		30.01.2008	/	poz (OD 1.300)	320	neg		
	16		11.02.2008	/	poz (OD 1.467)	320	neg		
	17		12.03.2008	poz (OD 1.032)	poz (OD 1.277)	320	neg		
8	18	Goriška	15.02.2008	šibko poz (OD 0.098)	neg	>10000	neg		

Engelman K. Ugotavljanje flebovirusov pri bolnikih z meningitisom ali meningoencefalitisom v Sloveniji.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2011

**Preglednica 7:** Rezultati primerjave seroloških testov za SFSV. Z zeleno barvo smo označili bolnike, pri katerih smo z metodo IFA dokazali specifična protitelesa proti SFSV. Oznaka / pomeni, da vzorca nismo imeli na voljo.

				ELISA		IFA	
Številka bolnika	Številka vzorca	Regija	Datum odvzema	Prvo (presejalno) testiranje IgG	Drugo testiranje IgG	IgG	IgM
				SFSV			
1	1	Jugovzhodna	15.07.2006	neg	neg	neg	neg
2	2	Goriška	05.12.2005	/	neg	neg	neg
	3		23.01.2006	neg	neg	neg	neg
3	4	Goriška	29.04.2006	neg	neg	neg	32
4	5	Goriška	28.11.2007	neg	neg	32	neg
	6		12.01.2008	/	neg	100	neg
	7		16.09.2008	/	neg	32	neg
5	8	Goriška	27.11.2007	neg	neg	neg	100
	9		07.10.2008	/	neg	neg	320
	10		23.02.2009	/	neg	neg	320
6	11	Goriška	08.01.2007	neg	neg	neg	32
	12		06.04.2007	neg	neg	32	32
	13		05.07.2007	/	neg	neg	100
7	14	Obalno-Kraška	28.01.2008	neg	neg	neg	10
	15		30.01.2008	/	neg	neg	neg
	16		11.02.2008	/	neg	neg	neg
	17		12.03.2008	neg	neg	neg	neg
8	18	Goriška	15.02.2008	neg	neg	neg	neg

#### 4.5 REZULTATI METODE RT-PCR V REALNEM ČASU ZA DOKAZ TOSV

Pri bolnikih, ki smo jih zaradi etiološko nepojasnjenega meningitisa ali meningoencefalitisa vključili v diplomsko nalogu smo z metodo RT-PCR v realnem času skušali dokazati akutno okužbo s TOSV. RNK smo izolirali iz vzorcev likvorja in prvih serumskih vzorcev (glede na datum odvzema, v primeru, da je imel bolnik več zaporedno odvzetih vzorcev). To so vzorci, ki so običajno odvzeti v akutni fazи bolezni, zato je verjetnost, da bo virus v njih prisoten največja.

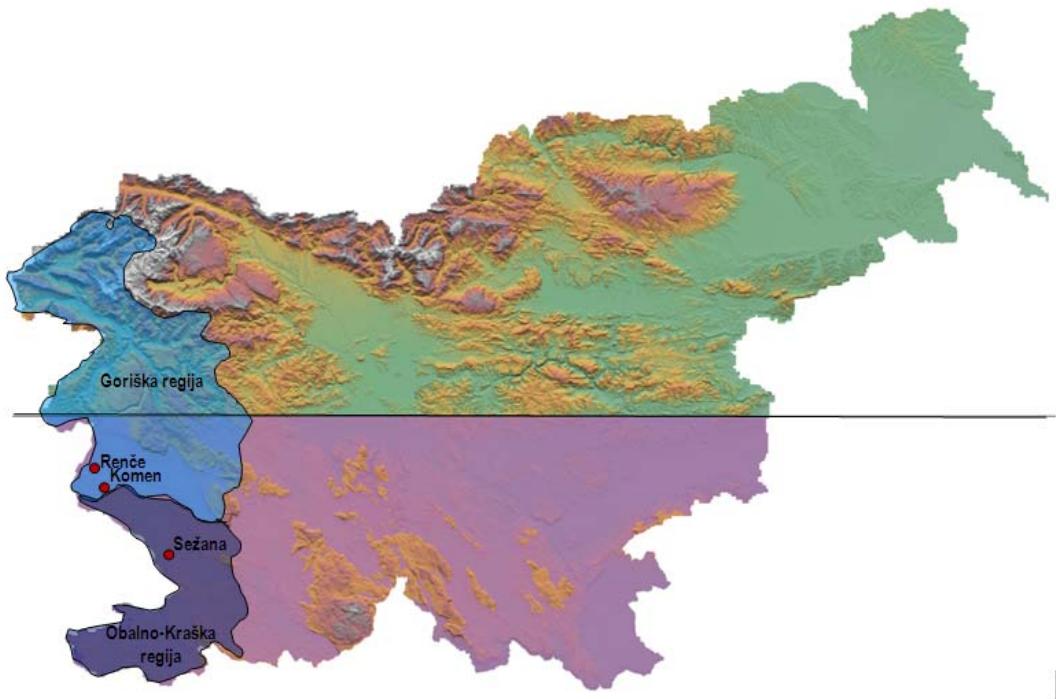
Od skupno 204 bolnikov smo imeli od 13 bolnikov vzorce likvorjev. Med njimi je bilo 5 takih pri katerih smo imeli na voljo samo vzorce likvorjev, od 8 pa smo imeli na voljo tudi vzorce serumov. Od tega sta imela dva bolnika v predhodnih seroloških testiranjih pozitivne rezultate. Ostalih 6 je imelo v predhodnih testiranjih negativne rezultate.

Poleg likvorjev smo imeli na voljo tudi 16 vzorcev serumov, ki so pripadali 14 bolnikom, saj sta imela 2 bolnika po 2 istočasno odvzeta prva vzorca zaporednih serumov. Od teh 14 bolnikov, so bili trije taki, ki so imeli v predhodnjih seroloških testiranjih pozitivne rezultate. Ostali so imeli v predhodnih testiranjih negativne rezultate.

Vsi vzorci, ki smo jih testirali z metodo RT-PCR v realnem času, kjer smo skušali dokazati akutno okužbo s TOSV so bili negativni.

#### 4.6 PORAZDELJENOST OKUŽB S FLEBOVIRUSI NA OBMOČJU SLOVENIJE

Eden izmed bolnikov, pri katerih smo dokazali okužbo s TOSV, prihaja iz Obalno-Kraške regije in sicer iz Sežane. Drugi prihaja iz Goriške regije iz kraja Renče in tretji iz kraja Komen, ki se prav tako nahaja v Goriški regiji. Bolnik pri katerem smo dokazali okužbo s SFNV prav tako prihaja iz Goriške regije in sicer ravno tako iz Komna (Slika 9).



**Slika 10:** Področja, kjer so prisotni flebotomi (deli Slovenije pod črto, ki označuje 46. vzporednik, označeni s svetlo vijolično) z označenimi regijami in kraji, iz katerih prihajajo bolniki pri katerih smo dokazali specifična protitelesa.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 UVOD

Flebovirusi so razširjeni v toplih predelih sveta. Vretenčarji se z njimi največkrat okužijo z vbodom samice peščene muhe iz rodu *Phlebotomus*. V Evropi so pomembni trije flebovirusi: SFSV, SFNV in TOSV (Dionisio in sod., 2003; Sonderegger in sod., 2009). SFSV in SFNV sta zemljepisno najbolj razširjena in povzročata akutno vročinsko bolezen z gripi podobnimi simptomi, po okužbi osrednjega živčevja s TOSV pa se lahko razvije aseptični meningitis oziroma meningoencefalitis. Največ okužb beležijo v poletnih in jesenskih mesecih, ko je aktivnost prenašalca virusa največja. (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003; Sonderegger in sod., 2009).

Podnebne spremembe so omogočile širitev življenjskega okolja flebotomov vse do 46. vzporednika zemljepisne širine, s tem pa so se širili tudi flebovirusi, ki so zdaj prisotni tudi na območju Slovenije (Charrel in sod., 2005; Semenza in Menne, 2009). Rezultati raziskave, ki je ugotavljala pogostost okužbe z arbovirusi pri gozdnih delavcih v Sloveniji, so pokazali prisotnost protiteles razreda IgG proti vsem trem tipom flebovirusov (Avšič-Županc in sod., 1995).

Akutne okužbe s flebovirusom v Sloveniji še niso dokazali, vendar pa smo na podlagi raziskav in dejstva, da so flebotomi v Sloveniji prisotni predvidevali, da bi v diplomski nalogi okužbo s flebovirusom lahko dokazali.

## 5.2 ANALIZA REZULTATOV

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti ali je v Sloveniji klinična slika meningitisa oziroma meningoencefalitisa lahko posledica okužbe s flebovirusi. Nadalje smo želeli ugotoviti pogostost pojavljanja teh okužb na dinarskem in sredozemskem zoogeografskem območju.

V ta namen smo zbrali klinične vzorce (serum in/ali likvor) 204 bolnikov z etiološko nepojasnjениm meningitisom ali meningoencefalitisom v obdobju od 2006 do 2008. Vsi bolniki so prihajali iz dinarskega ali submediteranskega zoogeografskega območja, kjer so flebotomi razširjeni. Skupno smo v diplomsko nalogu vključili 242 kliničnih vzorcev. Vsi pregledani klinični vzorci so bili negativni na KMEV. V vzorcih serumov smo želeli dokazati specifična protitelesa razredov IgG in IgM proti vsem trem flebovirusom, v likvorju pa flebovirusno RNK.

Na začetku raziskave smo se morali zaradi večjega števila vzorcev odločiti za hitro in občutljivo metodo s katero smo izločili negativne vzorce iz nadaljne obravnave. Izbrali smo encimskoimunske metodo s katero smo dokazovali protitelesa razreda IgG proti vsem trem tipom flebovirusov. V primeru okužbe s flebovirusom lahko pri bolniku v serumu namreč že zelo zgodaj dokažemo specifična protitelesa, zato so serološke tehnike primerne za diagnostiko flebovirusov (Charrel in sod., 2005).

Vzorce, kjer smo protitelesa zaznali, smo razdelili v dve skupini: tiste z močnim in tiste s šibkim protitelesnim odgovorom. Šibek protitelesni odgovor je za nas pomenila OD vrednost, ki je bila pod mejo, ki smo jo postavili za pozitiven rezultat, vendar je še vedno pokazala prisotnost protiteles razreda IgG. Razlogov za šibko pozitiven rezultat je več. S to metodo pogosto zaznamo prenizek titer protiteles, zato je priporočljivo, da se testiranje ponovi po 7. dnevu suma na okužbo, kar pa je bilo v našem primeru nemogoče, saj smo imeli na voljo le arhivske vzorce, odvzete od leta 2006 do 2008. Poleg tega hiperlipemični, hemolizirani ali kontaminirani vzorci lahko povzročijo napačne rezultate.

Prav tako se lahko beljakovine v serumu, ki niso specifična IgG protitelesa, nespecifično vežejo z virusnim antigenom. Po pregledu naših vzorcev smo ugotovili, da so bili nekateri vzorci sicer hemolizirani, vendar noben od njih ni bil pozitiven ali šibko pozitiven.

Pri presejalnem testiranju z metodo ELISA smo specifična protitelesa razreda IgG proti TOSV dokazali v vzorcih šestih bolnikov. Še posebej sta zanimiva dva bolnika, ki smo ju označili s številkami 6 in 7. Pri obeh smo testirali zaporedna vzorca odvzeta v razmaku nekaj mesecev in opazili porast nivoja protiteles razreda IgG, kar bi lahko pomenilo akutno okužbo, saj 4-kraten porast titra IgG protiteles v dveh do treh tednih pomeni dokaz nedavne okužbe (Avšič-Županc, 2005). Pri obeh bolnikih je nivo protiteles narastel, vendar porast ni bil značilen (Preglednica 3).

Rezultati presejalnega testiranja so nakazali na možnost akutne okužbe s TOSV, vendar smo za kakršnokoli sklepanje imeli premalo podatkov. Želeli smo imeti predvsem več zaporednih serumov, da bi lahko bolj natančno spremljali dinamiko vrednosti protiteles razreda IgG. Naknadno smo zbrali dodatne vzorce bolnikov, ki so bili na voljo. S tem smo želeli potrditi rezultate prvega testiranja in umestiti encimskoimunsko metodo v diagnostiko flebovirusov.

Pri drugem testiranju smo pri bolniku številka 6 opazili nekoliko višji porast vrednosti protiteles IgG, kot smo ga dokazali pri prvem testiranju (Preglednica 3). Pri bolniku številka 7 pa smo lahko opazovali nihanje vrednosti protiteles IgG (Preglednica 3). Pri bolniku številka 2 smo prav tako lahko opazovali manjši porast vrednosti protiteles IgG, pri bolniku številka 4 pa smo lahko opazovali nihanje nivoja protiteles IgG (Preglednica 3). Pri nobenem od bolnikov nismo opazili značilnega porasta vrednosti protiteles razreda IgG.

Specifična protitelesa razreda IgG proti SFNV smo pri presejalnem ELISA testiranju dokazali v vzorcih, ki so pripadali osmim bolnikom. Tudi tu sta najbolj zanimiva bolnika označena s številkama 6 in 7 (Preglednica 3). Pri obeh bolnikih se je vrednost protiteles

razreda IgG povečala. Pri drugem testiranju, kjer smo dokazovali protitelesa razreda IgG proti SFNV, smo dobili podobne rezultate kot pri drugem testiranju, ko smo dokazovali protitelesa proti TOSV. Pri omenjenih bolnikih smo tako opazovali manjše nihanje v vrednostih specifičnih protiteles razreda IgG (Preglednica 3).

Protiteles razreda IgG proti SFSV v vzorcih nismo dokazali ne pri prvem, ne pri drugem testiranju, kar je bilo glede na klinično sliko bolnikov pričakovano.

Kljud temu, da so rezultati presejalnega testiranja z metodo ELISA nakazovali na možnost sveže okužbe povzročene s flebovirusom, so šele rezultati drugega testiranja z metodo ELISA, kjer smo imeli več vzorcev, pokazali, da titer protiteles v serumu, dolgoročno ostaja približno enak. Z metodo ELISA smo tako pridobili le podatke, iz katerih smo lahko sklepali na prebolelo okužbo.

Namen diplomske naloge je bil dokazati okužbo s flebovirusom, zato smo uporabili tudi metodo posredne imunofluorescence, s katero smo dokazovali specifična protitelesa razreda IgG in razreda IgM proti vsem trem flebovirusom. Še posebej so nas zanimala protitelesa razreda IgM, saj njihov dokaz v serumu pomeni tudi dokaz sveže okužbe (Avšič-Županc, 2005). Protitelesa razreda IgG smo dokazovali, ker nas je zanimalo ali bodo rezultati obeh metod primerljivi.

Protitelesa razreda IgG proti enim ali več flebovirusom smo z metodo IFA dokazali pri petih bolnikih, protitelesa razreda IgM pa pri štirih bolnikih. Poleg specifičnih protiteles razreda IgG in IgM proti TOSV in SFNV, smo dokazali tudi specifična protitelesa proti SFSV, kar nam z metodo ELISA ni uspelo. Z dokazom protiteles razreda IgM smo se približali dejanskemu dokazu akutne okužbe s flebovirusom.

Z metodo IFA smo ugotovili, da se razen pri enem bolniku, titer protiteles razreda IgG proti TOSV v vzorcih ni spremenjal. Znano je, da štirikratni porast titra protiteles razreda IgG v dveh do treh tednih pomeni dokaz nedavne okužbe (Avšič Županc, 2005). Dokaz nespremenjenega titra protiteles razreda IgG kaže na okužbo v preteklosti. Večji porast

protiteles razreda IgG proti TOSV smo zasledili pri bolniku številka 7 (Preglednica 4). Ugotovili smo več kot štirikraten porast titra, kar pomeni dokaz sveže okužbe. Pri tem bolniku smo v serumu dokazali tudi protitelesa razreda IgM proti TOSV. Prav tako smo dokazali tudi protitelesa razreda IgG proti SFNV in protitelesa razreda IgM proti SFNV in SFSV, kar je zaradi navzkrižne reaktivnosti pričakovano. Kljub temu lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da je povzročitelj bolezni TOSV. Takšno sklepanje še dodatno potrjuje klinična slika bolnika.

Protitelesa razreda IgM proti TOSV smo dokazali tudi pri bolnikih številka 3 in 6 (Preglednica 4). Pri obeh smo istočasno dokazali tudi protitelesa razreda IgM proti SFNV in SFSV. Pri bolniku številka 6 je bil titer protiteles razreda IgM proti TOSV visok, prav tako je bil visok tudi titer protiteles razreda IgG. Čeprav smo dokazali prisotnost protiteles razreda IgM, bi na podlagi teh rezultatov težko z zagotovostjo trdili, da gre za svežo okužbo s flebovirusom Toskana. Zaključimo lahko, da je verjetno tudi pri teh dveh bolnikih bolezen povzročil TOSV, naši rezultati pa so posledica navzkrižne reaktivnosti med TOSV in SFNV.

Pri bolniku številka 5 smo z metodo IFA v vzorcih dokazali specifična protitelesa razreda IgM proti vsem trem flebovirusom, v visokih titrih (Preglednica 4). V istih vzorcih z metodo IFA nismo dokazali nobenih protiteles razreda IgG. Zato zgolj na podlagi rezultatov metode IFA težko z gotovostjo trdimo, da gre za svežo okužbo. Pri omenjenem bolniku smo v presejalnem testiranju z metodo ELISA dokazali protitelesa razreda IgG proti SFNV. Ti rezultati kljub klinični sliki bolnika nakazujejo na svežo okužbo s SFNV.

Specifična protitelesa razreda IgG proti TOSV smo dokazali tudi pri bolniku številka 8. Ker smo imeli na voljo le en vzorec, težko zaključimo, da je imel bolnik svežo okužbo. Sklepamo lahko samo na preteklo okužbo. Priistem bolniku smo dokazali tudi protitelesa razreda IgG proti SFNV v visokem titru (Preglednica 4). Tak rezultat je pričakovani, saj je navzkrižna reaktivnost protiteles razreda IgG med TOSV in SFNV največja.

Encimskoimunska metoda se je izkazala kot primerna metoda za dokazovanje okužb s flebovirusi, vendar z njo ne moremo ločiti med posameznimi flebovirusi. TOSV in SFNV sta si filogenetsko namreč zelo blizu, zaradi česar prihaja do navzkrižne reaktivnosti (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003). Iz naših rezultatov tako, tudi v primeru da bi okužbo zanesljivo dokazali, nismo mogli sklepati kateri virus jo je povzročil. Glede na klinično sliko bi z večjo verjetnostjo lahko trdili, da je povzročitelj okužbe flebovirus Toscana. Virusa bi med seboj lažje ločili z encimskoimunsko metodo, ki temelji na rekombinantnem nukleoproteinu (Charrel in sod., 2005). Slabost encimskoimunske metode je tudi, da lahko dokazujemo samo IgG protitelesa, kjer moramo za potrditev akutne okužbe dokazati značilen porast vrednosti protiteles razreda IgG, za kar potrebujemo primerno odvzete parne serume, kar z vidika zdravljenja bolezni ni najbolj ustrezno.

Metoda posredne imunofluorescence se je izkazala kot dobra podpora metoda za dokazovanje specifičnih protiteles, ki nastanejo po okužbi s flebovirusi. Metodo odlikuje možnost dokazovanja protiteles razreda IgM in velika skladnost rezultatov z metodo ELISA. Kljub temu smo opazili navzkrižno reaktivnosti ne le med TOSV in SFNV, ampak tudi s SFSV. Naši izsledki kažejo na to, da je metoda IFA, ki smo jo uporabili v naši raziskavi manj specifična za dokazovanje flebovirusov kot uporabljeni metoda ELISA. Zato smo težje določili pravega povzročitelja okužbe. Sklepali smo lahko le na podlagi klinične slike.

Z namenom, da bi pri bolnikih dokazali akutno okužbo s flebovirusi, smo uporabili tudi metodo RT-PCR v realnem času, ki je odlično dopolnilo serološkim metodam in zato pomembna v diagnostiki flebovirusov. Zaradi klinične slike bolnikov smo dokazovali le TOSV. Tako vzorci serumov kot likvorjev, kjer smo iskali flebovirusno RNK, so bili negativni.

Tak rezultat ne preseneča, saj je 13 od 16 vzorcev serumov pripadalo bolnikom, ki so imeli v predhodnih testiranjih negativne rezultate. Z metodo RT-PCR v realnem času so

bili negativni tudi trije serumski vzorci, ki so bili v predhodno narejenih testih pozitivni. Podobno je bilo pri likvorjih. Samo dva vzorca likvorjev sta pripadala bolnikoma, ki sta imela v predhodnjih testiranjih pozitivne rezultate serumov, ostali vzorci so bili ali samostojni vzorci likvorja ali pa so pripadali bolnikom, ki so imeli v predhodnih seroloških testiranjih negativne rezultate.

Čeprav virusne RNK v vzorcih nismo dokazali to ne izključuje sveže okužbe s flebovirusi. Kmalu po nastanku specifičnih protiteles virusa namreč ni več mogoče zaznati (Sonderegger in sod., 2009). Zato je zelo pomemben čas odvzema vzorca in način shranjevanja in prenosa v laboratorij. Naši vzorci najverjetneje niso bili najbolj primerni za dokazovanje flebovirusne RNK. V nalogi smo namreč uporabili vzorce, ki so jih v laboratoriju prvotno testirali za dokaz okužbe s KMEV. Vzorci so bili po prvotnem testiranju zamrznjeni, nato smo jih ponovno odtalili. Taki postopki lahko poškodujejo občutljivo molekulo RNK. Običajno flebovirusno RNK dokazujemo v likvorju. Mi smo imeli pri velikem številu bolnikov, katerih vzorce smo testirali z metodo RT-PCR v realnem času, na voljo samo vzorce seruma. Pri testiranju prav tako nismo imeli na voljo interne kontrole pomnoževanja s katero bi lahko dokazovali RNA v vzorcu, kar še dodatno vpliva na dejstvo, da rezultati morda niso najbolj zanesljivi.

Po pregledu vseh rezultatov naše raziskave smo potrdili prisotnost flebovirusov v Sloveniji pri izbrani populaciji, kjer smo namensko iskali bolnike, ki so morda prišli v stik s flebovirusi. Rezultati encimskoimunske metode so pokazali protiteesa razreda IgG proti TOSV pri šestih bolnikih (2,94 % preiskovanih bolnikov), rezultati posredne imunofluorescence pa pri petih bolnikih (2,45 % preiskovanih). Protiteesa razreda IgG proti SFNV smo z encimskoimunsko metodo dokazali pri osmih bolnikih (3,92 % preiskovanih), s posredno imunofluoresenco pa pri štirih bolnikih (1,96 % preiskovanih). Protiteesa razreda IgG proti SFSV smo dokazali le z metodo posredne imunofluorescence in sicer pri dveh bolnikih (0,98 % preiskovanih). Primerjava dobljenih rezultatov z raziskavo, ki je ugotavljala prisotnost protiteles proti flebovirusom pri gozdnih delavcih v Sloveniji kaže, da je odstotek gozdnih delavcev pri katerih so dokazali protiteesa razreda IgG proti flebovirusom nekoliko višji kot pri bolnikih.

Ugotovitev je pričakovana, saj gozdn delavci predstavljajo rizično skupino ljudi, ki ima zaradi narave dela večjo verjetnost stika s prenašalcem (Avšič-Županc in sod., 1995). Protitelesa razreda IgM smo proti vsem trem flebovirusom z metodo IFA dokazali pri štirih bolnikih (1,96 % preiskovanih). Vse tri tipe IgM protiteles smo hkrati dokazali pri istih bolnikih, kar ne preseneča, saj zaradi filogenetske bližine med flebovirusi prihaja do navzkrižne reaktivnosti.

Glede na klinično sliko in po pregledu rezultatov vseh opravljenih testov lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da smo pri enem bolniku dokazali svežo okužbo s TOSV. V serumu bolnika smo poleg protiteles razreda IgM zaznali tudi več kot štirikraten porast titra protiteles razreda IgG, kar je dokaz akutne okužbe. Z nekoliko manjšo verjetnostjo lahko trdimo, da smo akutno okužbo s TOSV dokazali še pri dveh drugih bolnikih, kjer smo dokazali tako protitelesa razreda IgM, kot protitelesa razreda IgG, ki pa niso naraščala. Skupno smo svežo okužbo s TOSV dokazali pri 3 bolnikih (označeni s številkami 3, 6 in 7) (Preglednica 5). Zanimivi so rezultati testiranj bolnika (številka 5), ki kljub klinični sliki meningitisa oziroma meningoencefalitisa, nakazujejo na svežo okužbo s SFNV. (Preglednica 6). Dokaz protiteles razreda IgM proti SFSV, je v našem primeru najverjetnejše posledica navzkrižne reaktivnosti in ne pomeni sveže okužbe oziroma imamo za takšno sklepanje premalo podatkov (Preglednica 7).

Naše rezultate še dodatno potrjuje dejstvo, da vsi bolniki pri katerih smo dokazali okužbo s TOSV ali SFNV prihajajo iz krajev, ki ležijo na področju, kjer so prisotni flebotomi (Slika 10).

Tako smo v Sloveniji prvič dokazali prisotnost okužbe s flebovirusi in sicer smo dokazali okužbo s TOSV in SFNV. Okužbo s TOSV smo potrdili pri 1,47 % izbrane populacije, okužbo s SFNV pa pri 0,49 %. Okužbe s SFSV nismo dokazali.

Raziskavo bi lahko nadaljevali v smeri nadaljnega zbiranja vzorcev bolnikov z neopredeljenim etiološkim vzrokoma meningitisa oziroma meningoencefalitisa, pri katerih bi z metodo RT-PCR v realnem času neposredno dokazovali fleboviruse. Kot serološko

metodo bi lahko preizkusili encimskoimunske metodo, ki temelji na rekombinantnem virusnem nukleoproteinu, s katero bi okužbe s flebovirusi lažje ločili med seboj. Zanimivo bi bilo izvesti tudi raziskavo, ki bi temeljila na dokazovanju flebovirusov pri prenašalcih. Šele z vsemi zgoraj naštetimi raziskavami bi pridobili podatke, ki bi pokazali bolj celostno sliko okužb s flebovirusi v Sloveniji. To je pomembno, saj podatki pridobljeni z raziskavami po svetu nakazujejo, da imajo okužbe s flebovirusi, še posebno s flebovirusom Toscana, v medicini vedno večjo vlogo.

### 5.3 SKLEPI

- Okužbe s TOSV in SFNV so v Sloveniji prisotne.
- Okužbe s SFSV nismo dokazali.
- Flebovirus Toscana je povzročitelj 1,47 % okužb bolnikov, s klinično sliko menigitisa oziroma meningoencefalitisa vključenih v študijo.
- Encimskoimunska metoda in metoda posredne imunofluorescence sta primerni metodi za dokazovanje okužb s flebovirusi in se med seboj dopolnjujeta.
- Z metodo RT-PCR v realnem času nismo dokazali nobene okužbe, verjetno zaradi neoptimalnih vzorcev.

## 6 POVZETEK

Rod *Phlebovirus* pripada družini *Bunyaviridae*. Vretenčarji se s flebovirusi okužijo z vbodom samice peščene muhe iz rodu *Phlebotomus*, zato sodijo med arboviruse (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003). V Evropi so pomembni trije tipi flebovirusov: tip Sicilian (SFSV), tip Naples (SFNV) in virus Toscana (TOSV) (Dionisio in sod., 2003; Sonderegger in sod., 2009). SFSV in SFNV sta zemljepisno najbolj razširjena in povzročata akutno vročinsko bolezen z gripi podobnimi simptomi, ki je običajno blaga in traja nekaj dni. Po okužbi osrednjega živčevja s TOSV se lahko razvije aseptični meningitis oziroma meningoencefalitis, ki težje prizadene bolnika (Charrel in sod., 2005; Dionisio in sod., 2003; Weidmann in sod., 2008).

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti prisotnost in pogostost pojavljanja okužb s flebovirusi pri bolnikih z meningitisom ali meningoencefalitisom, ter s tem pridobiti prve podatke o morebitnih okužbah bolnikov s flebovirusi v Sloveniji. Predvidevali smo, da bomo okužbo dokazali, saj je prenašalec v Sloveniji prisoten. Glede na klinično sliko bolnikov smo pričakovali, da bomo dokazali flebovirus Toscana. V ta namen smo pregledali vzorce serumov in likvorjev bolnikov z znaki meningitisa oziroma meningoencefalitisa iz dinarskega in submediteranskega zoogeografskega območja, ki smo jih zbrali v obdobju od leta 2006 do 2008. V vzorcih serumov smo z encimskoimunske metodo in metodo posredne imunofluorescence dokazovali protitelesa proti vsem trem tipom flebovirusov, v vzorcih likvorjev ter akutnih serumih pa smo z metodo RT-PCR v realnem času želeli dokazati flebovirusno RNK. Encimskoimunska metoda in metoda posredne imunofluorescence sta primerni metodi za dokazovanje okužb s flebovirusi. Pomankljivost uporabljenih metod je manjša specifičnost, saj ne dovoljujejo dovolj natančne ločljivosti med posameznimi flebovirusi.

Kljub temu smo z našo raziskovalno nalogo v Sloveniji prvič dokazali prisotnost okužbe s flebovirusi in sicer smo dokazali okužbo s TOSV in SFNV. Okužbo s TOSV smo potrdili pri 3 bolnikih, okužbo s SFNV pa pri 1 bolniku. Okužbe s SFSV nismo dokazali. Tako smo potrdili naše domneve, da so okužbe s flebovirusi v Sloveniji prisotne in da med flebovirusnimi okužbami pri bolnikih z meningitisom oziroma meningoencefalitisom prevladuje okužba s flebovirusom Toscana.

## 7 VIRI

Anagnostou V., Sdouga M., Volakli H., Violaki A., Papa A. 2010. Phlebovirus meningoencephalitis complicated by *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: a case report. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, in press, doi: 10.1089/vbz. 2010.0041: 10 str.

Avšič-Županc T. 2005. Posredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 119-128

Avšič-Županc T., Petrovec M., Jelovšek M., Strle F. 1995. Medicinsko pomembni arbovirusi v Sloveniji. Zdravniški vestnik, 64, Suppl. 3: III-9-III-15

Baldelli F., Ciufolini M.G., Francisci D., Marchi A., Venturi G., Fiorentini C., Luchetta M.L., Bruto L., Pauluzzi S. 2004. Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. Clinical Infectious Diseases, 38: 515-520

Bel A.S., Ranford-Catwright L.C. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. Trends in Parasitology, 18: 337-342

Braito A., Corbisiero R., Corradini S., Fiorentini C., Ciufolini M.G. 1998. Toscana virus infections of the central nervous system in children: A report of 14 cases. Journal of Pediatrics, 132, 1: 144-148

CDC. 2005. *Phlebotomus* sp. Geneva, World Health Organization: 1 str.  
<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp> (julij 2009)

Charrel R.N., Gallian P., Navarro-Mari J.M., Nicoletti L., Papa A., Sanchez-Seco MP. 2005. Emergence of Toscana virus in Europe. Emerging Infectious Diseases, 11, 11: 1657-1663

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. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 127: 1112-1120

Cusi M.G., Gori Savellini G., Terrosi C., Di Genova G., Valassina M., Valentini M., Bartolommei S., Miracco C. 2005. Developement of a mouse model for the study of Toscana virus pathogenesis. *Virology*, 333: 66-73

Čižman M., Mueller-Premru M. 1999. Mikrobiološka analiza likvorja pri gnojnem meningitisu in mižne napake. V: Zbornik strokovnega srečanja Mikrobiološka analiza kužnin, Nova Gorica, 22. in 23. oktober 1999. Dragaš A.Z., Fišer J., Prinčič D. (ur.). Nova Gorica, Zavod za zdravstveno varstvo: 225-234

Dionisio D., Esperti F., Vivarelli A., Valassina M. 2003. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16, 5: 383-388.

Elliot R.M. 1999. *Bunyaviridae*: replication. V: *Encyclopedia of virology*. Vol. 1. Granoff A., Webster R.G. (eds.). Burlington, Academic Press: 212-216

SIB. 2009. Expasy: Viralzone: *Bunyaviridae*. Lausanne, SIB - Swiss Institute of Bioinformatics: 1 str.

[http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/82.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/82.html) (julij 2009)

Fauna Europaea. 2004. *Phlebotomus*. Amsterdam, Fauna Europaea: 2 str.  
<http://www.faunaeur.org> (julij 2009)

Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512

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

Horsfall F.L., Tamm I. 1970. Virusne i rikecijske infekcije čoveka. Beograd, Vuk Karadžić: 1083 str.

ICTVdB. 2006. Phlebovirus. V: ICTVdB - The Universal Virus Database. Büchen-Osmond C. (ed.). New York, International Committee in Taxonomy of Viruses: 1 str.  
<http://www.ictvdb.org> (junij 2009)

Ingolič B. 1987. Atlas sveta. Ljubljana, Mladinska knjiga: 10-11

IVZ. 2011. Zdravstveni statistični letopis 2009. Ljubljana, IVZ – Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 13 str.  
<http://www.ivz.si/?nn=publikacije> (januar 2011)

Killick-Kendrick R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinics in Dermatology, 17: 279-289

Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. Trends in Molecular Medicine, 8: 257-260

Kolbl J., Rakar R., Avšič-Županc T. 1999. Serozni meningitisi in meningoencefalitisi. V: Zbornik strokovnega srečanja Mikrobiološka analiza kužnin, Nova Gorica, 22. in 23. oktober 1999. Dragaš A.Z., Fišer J., Prinčič D. (ur.). Nova Gorica, Zavod za zdravstveno varstvo: 235-249

Koren S., Marin J. 2005. Razmnoževanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 23-36

Liu D.Y., Tesh R.B., Travassos da Rosa A.P.A., Peters C.J., Yang Z., Guzman H., Xiao S.Y. 2003. Phylogenetic relationship among members of the genus *Phlebovirus*

(*Bunyaviridae*) based on partial M segment sequence analyses. Journal of General Virology, 84:456-473

Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research, 30: 1292-1305

McDowell M.A. 2009. *Phlebotomus papatasi*. Washington, The Genome Institute: 1 str.

[http://genome.wustl.edu/genomes/view/phlebotomus\\_papatasi](http://genome.wustl.edu/genomes/view/phlebotomus_papatasi) (avgust 2009)

Mehlhorn H. (ed.). 2001. Phlebotomus. V: Encyclopedic reference of parasitology. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin, Springer: 563-565

Nathanson N., Gonzales-Scarano F. 1999. *Bunyaviridae*: general features. V: Encyclopedia of virology. Vol. 1. Granoff A., Webster R.G. (eds.). Burlington, Academic Press: 204-212

Niesters H.G.M. 2001. Quantitation of viral load using real-time amplification technics. Methods, 25: 419-429

Pérez-Ruiz M., Collao X., Navarro-Marí J.M., Tenorio A. 2007. Reversetranscription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. Journal of Clinical Virology, 39: 276–281

Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. Medicinski razgledi, 33: 379-400

Sabin A.B. 1951. Experimental studies on *Phlebotomus* (papatasi, sandfly) fever during World War II. Archiv für die Gesamte Virusforschung, 4: 367 – 410

Sabin A.B., Philip C.C.B., Paul J.R. 1944. *Phlebotomus* (pappataci or sandfly) fever. Journal of the American Medical Association, 125, 9: 603-606

Semenza J.C., Menne B. 2009. Climate change and infectious diseases in Europe.  
*Lancet Infectious Diseases*, 9, 6: 65-75

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

Sonderegger B., Hachler H., Dobler G., Frei M. 2009. Imported aseptic meningitis due to Toscana virus acquired on the island of Elba, Italy, August 2008. *Euro Surveillance*, 14, 1: 187-188

Soos A., Papp L. (eds.). 1990. Catalogue of Palaearctic diptera. Vol. 2: *Psychodidae-Chironomidae*. Budapest, Academiai Kiado: 500 str.

Weidmann M., Sanchez-Seco M.P., Sall A.A., Ly P.O., Thiongane Y., Lô M.M. 2008. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *Journal of Clinical Virology*, 41: 138-142

Venturi G., Ciccozzi M., Montieri S., Bartoloni A., Francisci D., Nicoletti L., Fortuna C., Marongiu L., Rezza G., Ciufolini M.G. 2007. Genetic variability of the M genome segment of clinical and environmental Toscana virus strains. *Journal of General Virology*, 88:1288-1294

Verani P., Nicoletti L., Ciufolini M.G. 1984. Antigenic and biological characterization of Toscana virus, a new *Phlebotomus* fever group virus isolated in Italy. *Acta Virologica*, 28: 39-47

Wilhelm J., Pingoud A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*, 4: 1120-1128

Xu F., Chen H., Travassos da Rosa A.P.A., Tesh R.B., Xiao S.Y. 2007. Phylogenetic relationship among fever group viruses *Phlebovirus: Bunyaviridae* based on the small genome segment. *Journal of General Virology*, 88: 2312-2319

Engelman K. Ugotavljanje flebovirusov pri bolnikih z meningocefalitisom ali meningoencefalitisom v Sloveniji.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študijsa mikrobiologije, 2011

---

Zell R., Krumbholz A., Wutzler P. 2008. Impact of global warming on viral diseases:  
What is the evidence? Current Opinion in Biotechnology, 19: 653-660

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Tatjani Avšič Županc, ki mi je omogočila opravljanje diplomske naloge v njenem laboratoriju na področju, ki me zanima in za vse strokovne nasvete pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se somentorici dr. Darji Duh za vse nasvete, usmerjanje in prilagodljivost tekom nastajanja diplomske naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Miroslavu Petrovcu za natančno in stokovno recenzijo diplomske naloge.

Najlepša hvala Miši Korva in Mateji Jelovšek za trud in potrežljivost pri mojih prvih korakih v laboratoriju, Miši tudi za nesebično pomoč pri pisanju diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in WHO laboratoriju ter Laboratoriju za diagnostiko borelioze in leptospiroze, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi diplomskega dela.

Vsa zahvala gre tudi moji družini, ki mi je bila vsa leta študija v oporo in me spodbujala po najboljših močeh na moji študijski poti. Hvala, ker ste verjeli vame ves ta čas!

Hvala tudi vsem mojim prijateljem in sošolcem za vso pomoč in iskreno prijateljstvo, zaradi vas je vse v življenju lažje!

## PRILOGE

### PRILOGA A: Rezultati prvega presejalnega testiranja z metodo ELISA

Z rumeno barvo so označeni zaporedno odvzeti serumi posameznih bolnikov, z oranžno barvo pa pozitivni ali šibko pozitivni vzorci.

ŠTEVILKA VZORCA	VZOREC	REZULTAT (TOSV)	REZULTAT (SFNV)	REZULTAT (SFSV)
1	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
2	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
3	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
4	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
5	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
6	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
7	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
8	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
9	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
10	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
11	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
12	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
13	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
14	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
15	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
16	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
17	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
18	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
19	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
20	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
21	Kri (za serološke preiskave)	NEG/POZ (OD 0.072)	POZ (OD 0.492)	NEG
22	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
23	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
24	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
25	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
26	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
27	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
28	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
29	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

**PRILOGA A:** Rezultati prvega presejalnega testiranja z metodo ELISA

ŠTEVILKA VZORCA	VZOREC	REZULTAT (TOSV)	REZULTAT (SFNV)	REZULTAT (SFSV)
30	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
31	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
32	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
33	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
34	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
35	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
36	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
38	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
37	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
39	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
40	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
41	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
42	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
43	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
44	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG/POZ (0.122)	NEG
45	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
46	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
47	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
48	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
49	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
50	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
51	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
52	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
53	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
54	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
55	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
56	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
57	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
58	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
59	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
60	Kri (za serološke preiskave)	NEG/POZ (OD 0.074)	POZ (OD 0.234)	NEG
61	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
62	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
63	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
64	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
65	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

**PRILOGA A:** Rezultati prvega presejalnega testiranja z metodo ELISA

ŠTEVILKA VZORCA	VZOREC	REZULTAT (TOSV)	REZULTAT (SFNV)	REZULTAT (SFSV)
66	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
67	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
68	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
69	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
70	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
71	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
72	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
73	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
74	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
75	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
76	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
77	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
78	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
79	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
80	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
81	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
82	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
83	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
84	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
85	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
86	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
87	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
88	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
89	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
90	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
91	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
92	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
93	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
94	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
95	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
96	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
97	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
98	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
99	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
100	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
101	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

**PRILOGA A:** Rezultati prvega presejalnega testiranja z metodo ELISA

ŠTEVILKA VZORCA	VZOREC	REZULTAT (TOSV)	REZULTAT (SFNV)	REZULTAT (SFSV)
102	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
103	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
104	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
105	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
106	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
107	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
108	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
109	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
110	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
111	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
112	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
113	Kri (za serološke preiskave)	POZ (OD 0.364)	POZ (OD 0.659)	NEG
114	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
115	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
116	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
117	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
118	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
119	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
120	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
121	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
122	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
123	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
124	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
125	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
126	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
127	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
128	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
129	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG/POZ (0.082)	NEG
130	Kri (za serološke preiskave)	POZ (OD 0.540)	POZ (OD 0.984)	NEG
131	Kri (za serološke preiskave)	POZ (OD 0.641)	POZ (OD 1.206)	NEG
132	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
133	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
134	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
135	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
136	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
137	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

**PRILOGA A:** Rezultati prvega presejalnega testiranja z metodo ELISA

ŠTEVILKA VZORCA	VZOREC	REZULTAT (TOSV)	REZULTAT (SFNV)	REZULTAT (SFSV)
138	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
139	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
140	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
141	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
142	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
143	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
144	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
145	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
146	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
147	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
148	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
149	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
150	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
151	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
152	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
153	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
154	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
155	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
156	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
157	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
158	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
159	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
160	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
161	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
162	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
163	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
164	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
165	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
166	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
167	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
168	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
169	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
170	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
171	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
172	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
173	Kri (za serološke preiskave)	POZ (OD 0.483)	POZ (OD 0.876)	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

**PRILOGA A:** Rezultati prvega presejalnega testiranja z metodo ELISA

ŠTEVILKA VZORCA	VZOREC	REZULTAT (TOSV)	REZULTAT (SFNV)	REZULTAT (SFSV)
174	Kri (za serološke preiskave)	POZ (OD 0.649)	POZ (OD 1.032)	NEG
175	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
176	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
177	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
178	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
179	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
180	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
181	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
182	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
183	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
184	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
185	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
186	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
187	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
188	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
189	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
190	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
191	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
192	Kri (za serološke preiskave)	NEG/POZ (OD 0.106)	NEG/POZ (OD 0.098)	NEG
193	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
194	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
197	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
195	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
196	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
198	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
199	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
200	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
205	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
201	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
202	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
203	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
206	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
207	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
204	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
208	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
209	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

**PRILOGA A:** Rezultati prvega presejalnega testiranja z metodo ELISA

ŠTEVILKA VZORCA	VZOREC	REZULTAT (TOSV)	REZULTAT (SFNV)	REZULTAT (SFSV)
210	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
211	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
212	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
213	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
214	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
215	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
216	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
217	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
218	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
219	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
220	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG
221	Kri (za serološke preiskave)	NEG	NEG	NEG