

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja JELEN

**PRIMERJAVA ROČNE IN AVTOMATSKE
IZOLACIJE RNA VIRUSA KLOPNEGA
MENINGOENCEFALITISA V KLINIČNIH IN
ŽIVALSKIH VZORCIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja JELEN

**PRIMERJAVA ROČNE IN AVTOMATSKE IZOLACIJE RNA
VIRUSA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA V KLINIČNIH IN
ŽIVALSKIH VZORCIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF MANUAL AND AUTOMATIC RNA ISOLATION
METHODS FOR DETECTION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS
VIRUS IN CLINICAL AND ANIMAL SAMPLES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

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

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc

Recenzent: doc. dr. Miroslav Petrovec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc

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

Član: doc. dr. Miroslav Petrovec

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Jelen

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.7+ 578.5: 599.322/.324:616.831.9 – 002 (043)=163.6
KG	virusi/klopni meningoencefalitis/KME/virus klopnega meningoencefalitisa/izolacija virusne RNA/RT-PCR v realnem času/avtomatska izolacija RNA/ročna izolacija RNA/klinični vzorci
AV	JELEN, Mateja
SA	AVŠIČ- ŽUPANC, Tatjana (mentorica) / PETROVEC, Miroslav (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	PRIMERJAVA ROČNE IN AVTOMATSKE IZOLACIJE RNA VIRUSA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA V KLINIČNIH IN ŽIVALSKIH VZORCIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 59 str., 6 pregl., 17 sl., 4 pril., 69 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Virus klopnega meningoencefalitisa je povzročitelj meningoencefalitisa in je najpomembnejša arbovirusna bolezen v Evropi. Slovenija je endemično območje, kjer virus (evropski podtip) prenaša navadni gozdni klop, <i>Ixodes ricinus</i> . Pomembna gostitelja virusa KME sta tudi rumenogrla gozdna miš (<i>Apodemus flavicollis</i>) in gozdna voluharica (<i>Myodes glareolus</i>). Ljudje se najpogosteje okužijo z vbodom klopa. V laboratoriju lahko virus neposredno dokazujemo z metodo RT-PCR v realnem času. Za pravilno dokazovanje virusa z molekularnimi metodami je potrebna učinkovita izolacija virusne RNA, zato smo v diplomski nalogi preverili učinkovitost ročne izolacije in avtomatske izolacije RNA na 30 humanih in 32 živalskih vzorcih. V raziskavo smo vključili 18 serumov, 12 vzorcev krvi, 22 tkivnih vzorcev rumenogrlih miši in gozdnih voluharic ter 10 skupin klopov, vrste <i>Ixodes ricinus</i> . Uspešnost izolacije RNA smo preverili s kvantitativnim enostopenjskim RT-PCR v realnem času in s kvantifikacijo celokupne RNA. Na podlagi pridobljenih koncentracij virusne RNA nismo uspeli dokazati statistično značilnih razlik med obema metodama izolacije RNA. Statistično značilno razliko v prid ročni metodi izolacije smo dokazali pri vzorcih krvi ($p=0,000$) in tkiv ($p=0,018$), vendar le pri koncentraciji celokupne RNA. Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da je ročna metoda učinkovitejša pri izolaciji RNA iz vzorcev krvi, tkiv in klopov. Pri serumskih vzorcih pa je avtomatska izolacija RNA učinkovitejša in hitrejša in je zato primerna za rutinsko diagnostiko.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 578.7+ 578.5: 599.322/.324:616.831.9 – 002 (043)=163.6
CX	viruses/tick-borne encephalitis/TBE/Tick-borne encephalitis virus/Real-Time RT-PCR/ viral RNA isolation/automatic RNA isolation/manual RNA isolation/clinical samples
AU	JELEN, Mateja
AA	AVŠIČ- ŽUPANC, Tatjana (supervisor) / PETROVEC, Miroslav (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2010
TI	COMPARISON OF MANUAL AND AUTOMATIC RNA ISOLATION METHODS FOR DETECTION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN CLINICAL AND ANIMAL SAMPLES
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 59 p., 6 tab., 17 fig., 4ann., 69 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Tick-borne encephalitis virus is a causative agent of meningoencephalitis and is the most important arboviral disease in Europe. Slovenia is an endemic country, where the European subtype of the virus is transmitted by the tick, <i>Ixodes ricinus</i>. Common hosts of TBE are yellow-necked mice (<i>Apodemus flavicollis</i>) and bank voles (<i>Myodes glareolus</i>). People usually acquire the infection by a tick bite. TBE virus can be detected in a laboratory by real-time RT-PCR. Effective RNA isolation is the most important step before PCR amplification. Therefore we compared the effectiveness of manual and automatic RNA isolation. Isolation was performed on 30 human samples and 32 animal samples. These included 18 sera samples, 12 blood samples, 22 animal tissue samples and 10 pools of ticks. Effectiveness of RNA isolation was assessed by one-step quantitative real-time RT-PCR for specific detection of KME virus genome and total RNA quantification. On the basis of viral RNA concentrations we were unable to conclude whether the two isolation methods differ significantly. Statistically significant difference was only observed for blood (p value=0,000) and tissue samples (p value=0,018) when concentrations of total RNA were compared. Nevertheless, our results suggest that manual method of RNA isolation is more effective when performing on blood, tissue and tick samples. Automatic method is more effective for isolation of virus RNA from human sera samples. On the whole we have showed that automatic method for RNA isolation from human sera samples can be equally used in the daily routine diagnostics.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE.....	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED.....	3
2.2 TAKSONOMIJA	4
2.3 ZGRADBA VIRUSA	5
2.3.1 Virusni genom.....	5
2.3.2 Virusne beljakovine.....	6
2.3.2.1 Strukturne beljakovine	6
2.3.2.2 Nestrukturne beljakovine	7
2.4 RAZMNOŽEVANJE VIRUSA.....	8
2.5 PATOGENEZA	8
2.6 POTEK BOLEZNI IN KLINIČNA SLIKA.....	9
2.7 STABILNOST VIRUSA	11
2.8 EPIDEMIOLOGIJA.....	11
2.8.1 Naravna žarišča.....	12
2.8.2 Okoljski in socialni faktorji vpliva za povečanje števila obolelih.....	12
2.8.3 KME v svetu.....	13
2.8.4 KME v Sloveniji	14
2.9 KROŽENJE VIRUSA V NARAVI.....	15
2.9.1 Klopi.....	15
2.9.2 Gostitelji	17
2.9.3 Klopi in njihova aktivnost	18
2.10 DIAGNOSTIKA KME.....	18
2.10.1 Posredno dokazovanje virusa	18
2.10.2 Neposredno dokazovanje virusa.....	20

2.11	ZDRAVLJENJE IN PREVENTIVA.....	21
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	VZORCI.....	22
3.2	METODE DELA	22
3.2.1	Izolacija RNA.....	22
3.2.1.1	Ročna izolacija RNA iz seruma in krvi	23
3.2.1.2	Ročna izolacija RNA iz klopov.....	24
3.2.1.3	Ročna izolacija RNA iz živalskih tkivnih vzorcev.....	24
3.2.1.4	Avtomatska izolacija RNA iz seruma.....	25
3.2.1.5	Avtomatska izolacija RNA iz krvi in tkivnih vzorcev.....	26
3.2.2	Teoretične osnove enostopenjskega kvantitativnega RT-PCR v realnem času	28
3.2.3	Izbira začetnih oligonukleotidov, sonde in interne kontrole.....	29
3.2.4	Enostopenjski kvantitativen RT-PCR v realnem času za dokaz virusa KME	30
3.2.5	Kvantifikacija celokupne RNA.....	31
3.2.6	Statistična obdelava podatkov	32
3.2.6.1	Preizkus domneve o razliki povprečij za odvisna vzorca.....	32
4	REZULTATI.....	33
4.1	PRIMERJAVA USPEŠNOSTI ROČNE IN AVTOMATSKE IZOLACIJE RNA	33
4.2	KVANTIFIKACIJA CELOKUPNE RNA S SPEKTROFOTOMETRIJO.....	41
4.3	STATISTIČNA ANALIZA	43
4.3.1	Preizkus domneve o razliki povprečij.....	43
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1	UVOD	45
5.2	ANALIZA REZULTATOV	46
6	SKLEPI	49
7	POVZETEK.....	50
8	VIRI	52
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava skladnosti ročne in avtomatske izolacije virusne RNA za 12 vzorcev humane krvi	34
Preglednica 2: Primerjava skladnosti ročne in avtomatske izolacije virusne RNA za 18 vzorcev humanega seruma	34
Preglednica 3: Primerjava skladnosti ročne in avtomatske izolacije virusne RNA za 22 živalskih tkivnih vzorcev	35
Preglednica 4: Primerjava skladnosti ročne in avtomatske izolacije virusne RNA za 10 skupin klopov	36
Preglednica 5: Povprečne koncentracije virusne RNA po ročni in avtomatski izolaciji in rezultati statistične analize	44
Preglednica 6: Povprečne koncentracije celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji in rezultati statistične analize	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Virusna RNA (McMinn, 1997).....	6
Slika 2: Zgradba virusa KME (Mandl, 2005).....	7
Slika 3: Zemljepisna razširjenost klopa <i>I. ricinus</i> na zahodu in <i>I. persulcatus</i> na vzhodu (Lindquist in Vapalahti, 2008)	14
Slika 4: Prijavljeni primeri KME po mesecu obolenja, za Slovenijo v obdobju 2006 do 2008 (IVZ, 2009a). 15	
Slika 5: Prenos virusa KME v naravi. (Lindquist in Vapalahti, 2008).....	16
Slika 6: Dvofazen potek bolezni KME (Holzmann, 2003).....	20
Slika 7: Primerjava izmerjenih koncentracij virusne RNA (kopij RNA/ml) iz 5 pozitivnih vzorcev humane krvi po ročni in po avtomatski izolaciji.....	37
Slika 8: Porazdelitev koncentracije virusne RNA, izolirane z avtomatsko in ročno metodo iz 5 pozitivnih vzorcev humane krvi.....	37
Slika 9: Primerjava izmerjenih koncentracij virusne RNA (kopij RNA/ml) iz 10 pozitivnih vzorcev humanega seruma po ročni in po avtomatski izolaciji.....	38
Slika 10: Porazdelitev koncentracije virusne RNA, izolirane z avtomatsko in ročno metodo iz 10 pozitivnih vzorcev humanega seruma.....	39
Slika 11: Primerjava izmerjenih koncentracij virusne RNA (kopij RNA/ml) iz 16 pozitivnih živalskih tkivnih vzorcev po ročni in po avtomatski izolaciji.	39
Slika 12: Porazdelitev koncentracije virusne RNA, izolirane z avtomatsko in ročno metodo iz 16 pozitivnih živalskih tkivnih vzorcev.....	40
Slika 13: Primerjava izmerjenih koncentracij virusne RNA (kopij RNA/ml) iz 5 pozitivnih skupin klopov po ročni in po avtomatski izolaciji.	40
Slika 14: Primerjava izmerjenih koncentracij celokupne RNA (ng/ μ l) iz 12 vzorcev humane krvi po obeh metodah izolacije.....	41
Slika 15: Primerjava izmerjenih koncentracij celokupne RNA (ng/ μ l) iz 18 vzorcev humanega seruma po obeh metodah izolacije.	42
Slika 16: Primerjava izmerjenih koncentracij celokupne RNA (ng/ μ l) iz 22 živalskih tkivnih vzorcev po obeh metodah izolacije.....	42
Slika 17: Primerjava izmerjenih koncentracij celokupne RNA (ng/ μ l) iz 10 skupin klopov po obeh metodah izolacije.....	43

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Rezultati kvantifikacije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji RNA, pridobljeni na vzorcih humane krvi.
- Priloga B: Rezultati kvantifikacije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji RNA, pridobljeni na vzorcih humanega seruma.
- Priloga C: Rezultati kvantifikacije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji RNA, pridobljeni na živalskih tkivnih vzorcih.
- Priloga D: Rezultati kvantifikacije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji RNA, pridobljeni na skupinah klosov.

OKRAJŠAVE

cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl.: complementary DNA)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid fosfat
ELISA	encimskoimunska metoda (angl.: enzyme-linked immunosorbent assay)
IFT	metoda posredne imunofluorescence (angl.: indirect immunofluorescent assay)
ORF	odprt bralni okvir (angl.: open reading frame)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
poliA rep	poliadeninski rep
RNA	ribonukleinska kislina
RNA-ze	ribonukleaze
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (angl.: polymerase chain reaction with reverse transcriptase)

SLOVARČEK

Asimptomatski	brez simptomov, bolezenskih znakov
Citopatska okužba	okužba, ki povzroča patološke spremembe v celici
Encefalitis	vnetje možganskega parenhima
Epileptoidni sindrom	sindrom, ki spominja na epilepsijo
Hematogeno širjenje	širjenje po krvi
Hemoragična mrzlica	mrzlica s krvavitvami notranjih organov
Hiperkineza	povečana aktivnost mišic
Levkocitopenija	zmanjšanje števila levkocitov v krvi
Meningitis	vnetje mening (možganskih ovojnic)
Meningoencefalomielitis	vnetje mening, parenhima in hrbtenjače
Mielitis	vnetje hrbtenjače
Radikulitis	vnetje korenin živcev v hrbtenjači
Transcitoza	prenos preko celice
Trombocitopenija	zmanjšanje števila trombocitov v krvi
Viremija	prisotnost virusa v krvi

1 UVOD

Virus klopnega meningoencefalitisa (KME) uvrščamo v družino *Flaviviridae*. Je povzročitelj meningoencefalitisa in je najpomembnejša arbovirusna bolezen v Evropi. Glede na serološke in genetske značilnosti ter zemljepisno razširjenost ločimo tri podtipove virusa KME: evropski, daljnovzhodni in sibirski. V Sloveniji je endemičen evropski podtip virusa KME, katerega glavni prenašalec je klop vrste *Ixodes ricinus*. Klopi so naravni rezervoar virusa, ki se v naravi ohranja tako, da kroži med klopi in njihovimi gostitelji (glodavci, žužkojedi, divjad). Virus KME se prenaša na človeka z vbodom klopa, ali redkeje z zaužitjem okuženega nepasteriziranega mleka in mlečnih izdelkov.

KME je virusno obolenje osrednjega živčevja. Pri vsaj dveh tretjinah obolelih, ki kažejo prizadetost osrednjega živčevja, je potek bolezni dvofazen. Po kratki inkubacijski dobi se lahko pojavijo splošni znaki bolezni, podobni gripi (glavobol, vročina, utrujenost, slabost). Sledi obdobje brez simptomov bolezni. Druga faza bolezni se pojavi pri 20 do 30 % obolelih, kjer nastopijo klinični znaki meningitisa, meningoencefalitisa in meningoencefalomielitisa. Smrtnost zaradi okužbe z evropskim podtipom virusa KME je 1 do 2 %.

Laboratorijska diagnostika temelji na dokazovanju specifičnih protiteles IgM in IgG v serumu in likvorju. Metoda izbire je encimsko-imunski test, ELISA. Zaradi prisotnosti navzkrižno reaktivnih protiteles in pogosto neuspešnega dokazovanja specifičnih protiteles IgM v zgodnji fazi bolezni, je uporaba metode omejena. V zgodnji fazi bolezni lahko dokažemo virus neposredno v vzorcih krvi in seruma z verižno reakcijo s polimerazo in reverzno transkriptazo (RT-PCR) v realnem času. Za uspešno dokazovanje virusa z RT-PCR v realnem času je potrebna predhodna učinkovita izolacija virusne RNA.

1.1 NAMEN DELA

Okužbo z virusom KME je potrebno potrditi v laboratoriju, saj je klinična slika KME nespecifična. V zgodnjem obdobju bolezni, ko specifičnih protiteles ne moremo dokazati s serološkimi metodami, lahko virusno okužbo dokažemo z RT-PCR v realnem času. Za uspešno dokazovanje virusne okužbe z RT-PCR v realnem času je potrebna učinkovita predhodna izolacija virusne RNA. Virusno RNA lahko izoliramo z ročno metodo ali z

avtomatiziranim postopkom. Z diplomsko nalogo smo želeli preveriti učinkovitost avtomatizirane metode izolacije RNA glede na ročno izolacijo RNA, ki je še vedno zlati standard v molekularni diagnostiki. Prav tako smo želeli ugotoviti katera metoda izolacije je bolj primerna za določen tip vzorca. V ta namen smo med seboj primerjali uspešnost izolacije RNA iz vzorcev seruma, krvi in živalskega tkiva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Prvi zapisi o obstoju klopnega meningoencefalitisa segajo v 18. stoletje. V župnijskih registrih iz Alandskih otokov (Finska) je omenjena bolezen primerljiva s klopnim meningoencefalitisom. Prvi zdravniški opis te bolezni je iz leta 1931. Takrat je avstrijski zdravnik Schneider opazil reden sezonski pojav te bolezni pri odraslih iz province Neukirchen (južno od Dunaja). Bolezen je imenoval »epidemische akute meningitis serosa«. Kljub temu povzročitelj in način prenosa bolezni še vedno nista bila znana (Kunz in Heinz, 2003). V letih 1937-1939 je rusko ministrstvo za zdravje, takratne Sovjetske zveze, organiziralo raziskavo z namenom odkritja povzročitelja okužbe osrednjega živčevja, ki se je pojavljala na vzhodu države in v vzhodni Sibiriji že od leta 1934. Raziskavo je vodil profesor Zilber, skupaj s sodelovanjem Pavlovskega, ki je proučeval ekologijo te regije (Graščenkov, 1964; Kunz in Heinz, 2003). Zilber je prvi dokazal, da bolezen povzroča virus, ki se prenaša s klopom *Ixodes persulcatus*. Pavlovski in sodelavci so bili prvi, ki so opisali prenos virusa med klopi in sesalci (Dumpis in sod., 1999). Kmalu po tem, so ugotovili, da se opisana bolezen pojavlja tudi v evropskem delu nekdanje Sovjetske zveze, kjer je bil prenašalec bolezni navadni gozdni klop (*Ixodes ricinus*) (Blaškovič, 1967). V Evropi so virus klopnega meningoencefalitisa prvič izolirali na Češkoslovaškem, in sicer leta 1948. Izoliral ga je Gallia s sodelavci (Blaškovič, 1967; Kunz in Heinz, 2003).

Leta 1951 je na Slovaškem prišlo do izbruha meningoencefalitisa, kjer je zbolelo več kot 600 ljudi. Ugotovili so, da so ti ljudje uživali surovo kravje in kozje mleko, zato so sklepali, da okužba z virusom lahko poteka tudi po oralni poti. Bolezen so poimenovali dvofazna mlečna vročica (Blaškovič, 1967). Zaradi postopne prepoznave virusa na različnih zemljepisnih področjih, je klopni meningoencefalitis dobil različna imena: ruski pomladno-poletni encefalitis, »Taiga encephalitis«, centralnoevropski encefalitis, »Kumlinge disease«, dvofazna mlečna vročica (Kunz in Heinz, 2003).

V Sloveniji so leta 1946 prvič opazili posebno obliko meningitisa neznanega izvora. Bedjanič je leta 1948, na prvem kongresu zdravnikov Jugoslavije v Beogradu, poročal o

novi bolezni (Lešničar in Lešničar, 1993). Bolezen so podrobneje opisali po izbruhu epidemije leta 1953, kjer je v okolici Ljubljane zbolelo 208 ljudi. Bolezen je bila endemična v osrednjem delu države, prav tako pa so opazili tudi sezonsko pojavljanje bolezni: v 95 % se je pojavljala med majem in septembrom, z največjim številom obolelih v mesecu juliju (Kmet in sod., 1955). Bolezen se je izražala kot meningitis in encefalitis (Bedjanič in sod., 1955). Povzročitelja so iz krvi pacienta izolirali leta 1953 (Vesenjāk-Zmijanac in sod., 1955). Bolniki, ki so zboleli za meningoencefalitisom, so poročali o vbodu klopa. Ta informacija je pripomogla k odkritju prenašalca virusa. Virus so izolirali iz klopa, vrste *I. ricinus* in tako dokazali, da je ta vrsta glavni prenašalec virusa meningoencefalitisa v Sloveniji (Likar in Kmet, 1956).

2.2 TAKSONOMIJA

Virus KME uvrščamo v rod *Flavivirus*, znotraj družine *Flaviviridae* (ICTVdB, 2006). V družino *Flaviviridae* sodijo tudi virusi iz rodov *Pestivirus* in *Hepacivirus*, od katerih se virusi iz rodu *Flavivirus* razlikujejo v antigenskih, ekoloških in epidemioloških značilnostih. Rod *Flavivirus* vsebuje več kot 50 vrst, od katerih je približno 50 % človeških patogenov, ki povzročajo dvofazno vročico, encefalitis ali hemoragično mrzlico (Grard in sod., 2007).

Viruse iz rodu *Flavivirus* prenašajo členonožci: komarji (virus rumene mrzlice (YFV), virus zahodnega Nila (WNV), virus Denga (DV), virus japonskega encefalitisa (JEV)) in klopi (virus KME) (Mandl, 2005). Virusi, ki se prenašajo s klopi, se dalje delijo v dve podskupini: M-TBFV (»mammalian tick-borne virus group«) in S-TBFV (»seabird tick-borne virus group«). Skupina M-TBFV vključuje šest človeških in živalskih patogenov: virus Luping III (LIV), virus KME, virus hemoragične vročice Omsk (OHFV), virus Langat (LGTV), virus bolezni Kyasanur gozda (KFDV) in virus Powassan (POWV) (Grard in sod., 2007).

Virus KME delimo na tri podtipe: evropski podtip (vključuje skoraj vse znane izolate iz Evrope), daljnovzhodni podtip (v glavnem vključuje izolate iz daljnega vzhoda Rusije) in sibirski podtip (v glavnem vključuje izolate iz Urala, Sibirije in daljnega vzhoda Rusije)

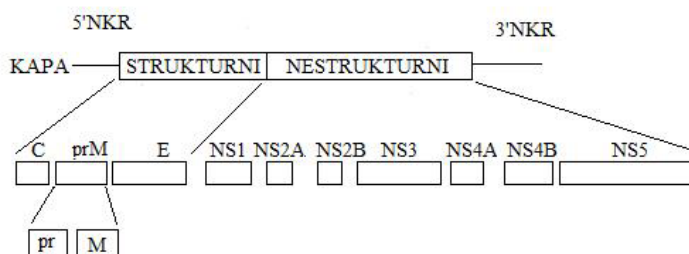
(Donoso Mantke in sod., 2008). Klop, vrste *I. ricinus* prenaša evropski podtip virusa, *I. persulcatus* pa druga dva tipa KME (Lindquist in Vapalahti, 2008).

2.3 ZGRADBA VIRUSA

Flavivirusi, kamor spada tudi KME, so sferične oblike in so obdani z lipidno ovojnico (Mansfield in sod., 2009). Lipidno ovojnico pridobijo od gostitelja (ICTVdB, 2006). V premeru merijo 40 do 60 nm. Njihov genom predstavlja enovijačna, pozitivno polarna RNA, dolga približno 11000 baznih parov (Mansfield in sod., 2009).

2.3.1 Virusni genom

Posebnost genoma flavivirusov je, da ima le en odprt bralni okvir (ORF), ki zavzema približno 90 % genoma. Na 5' in 3' koncu sta nekodirajoči regiji in lahko tvorita sekundarne strukture, ki sodelujejo v procesih podvajanja, prevajanja in pakiranja virusne RNA (Chambers in sod., 1990; McMinn, 1997; Gould in Solomon, 2008). RNA ima na 5' koncu metilirano kapo, ki daje molekuli stabilnost in je pomembna pri prevajanju RNA. Na 3' koncu ni poliA repa (Mansfield in sod., 2009). Odprt bralni okvir kodira poliprotein, ki je med in po prevajanju cepljen s celičnimi in virusnimi proteazami na tri strukturne beljakovine in sedem nestrukturnih beljakovin (Lindquist in Vapalahti, 2008). Strukturne beljakovine so: kapsidna beljakovina C (angl.: capsid), membranska beljakovina M (angl.: membrane), ki nastane s cepitvijo prekurzorske beljakovine prM in glikozilirana beljakovina E (angl.: envelope), ki je ovojnična beljakovina. Nestrukturne beljakovine so: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B in NS5 (slika 1) (Chambers in sod., 1990). Strukturne beljakovine zavzemajo približno 25 % bralnega okvirja in so kodirane na 5' koncu genoma, nestrukturne beljakovine pa so kodirane na 3' koncu in zavzemajo preostali del bralnega okvirja, približno 75 % (McMinn, 1997). Virusna RNA je infektivna (Mandl in sod., 1997).

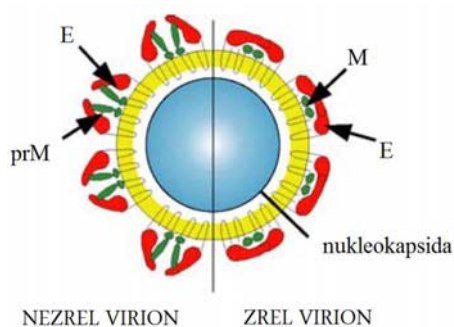


Slika 1: Virusna RNA (McMinn, 1997).

2.3.2 Virusne beljakovine

2.3.2.1 Strukturne beljakovine

Kapsidna beljakovina C je močno bazična (Chambers in sod., 1990) in skupaj z virusno RNA tvori sferično kapsido, ki v premeru meri 30 nm. Kapsido obdaja lipidni dvosloj z dvema membranskima beljakovinama, M in E. Beljakovina E je najpomembnejši antigen in deluje hkrati kot ligand, pri vezavi na ustrezen receptor, in kot fuzijska beljakovina (Lindquist in Vapalahti, 2008). Beljakovina E je virusni hemaglutinin in je primarna tarča nevtralizirajočih protiteles (Venturi in sod., 2009). Pri vstopu virusa sodeluje tako, da se veže s celičnim receptorjem, pri izstopu virusa iz celice pa inducira membransko fuzijo endocitotskih mešičkov in celične membrane (Mandl, 2005). Pri zrelem virusu tvori beljakovina E dimere (slika 2), ki so ploščati in so na virusni ovojnici orientirani tako, da je del, ki je pomemben za vezavo protiteles, na zunanji površini beljakovine (Mansfield in sod., 2009).



Slika 2: Zgradba virusa KME (Mandl, 2005). Okrajšave: E: ovojnična beljakovina, prM: prekursor beljakovine M, M: membranska beljakovina.

Beljakovina prM deluje kot šaperon, ki omogoča pravilno zvitje beljakovine E in ga ščiti pred prezgodnjimi, ireverzibilnimi konformacijskimi spremembami, do katerih lahko pride med prenosom nezrelega virusa iz celice (Lindquist in Vapalahti, 2008). Posebna lastnost beljakovine E je, da lahko skupaj s prM tvori virusom podobne ikozahedralne delce, velike 30 nm, brez kapside. Ker so brez RNA in kapside, so neinfektivni, vendar zelo imunogeni (Heinz in sod., 1995; Jääskeläinen in sod., 2003). Sestavljajo se v endoplazmatskem retikulumu in se izločajo po enaki poti kot pravi, zreli virusi (Lorenz in sod., 2003). Izražamo jih lahko v rekombinantnih sistemih za pripravo zaščitnih sredstev za živali ali za diagnostične teste (Heinz in sod., 1995; Jääskeläinen in sod., 2003).

2.3.2.2 Nestrukturne beljakovine

NS1 je pomemben antigen, saj sproža imunski odgovor pri gostitelju. Pri okuženih ljudeh znatno pripomore k povišanju koncentracije protiteles (Jacobs in sod., 1992). Beljakovini NS2A in NS2B sta proteazni komponenti. NS3 beljakovina ima več aktivnosti. Na C-terminalnem koncu ima nukleozid trifosfatazno in helikazno aktivnost (Mansfield in sod., 2009), na N-terminalni strani pa proteazno aktivnost, ki je nujno potrebna pri cepitvi virusnega poliproteina (Chambers in sod., 1990). Skupaj z NS5 tvori polimerazni kompleks, ki je med sestavljanjem virusa verjetno povezan z membrano preko beljakovine NS1. Beljakovina NS5 ima dve domeni, pri čemer je C-terminalna domena od RNA odvisna RNA polimeraza, N-terminalna domena pa je metiltransferaza, ki je potrebna za metilacijo kape na 5' koncu virusne RNA (Egloff in sod., 2002). NS4A in NS4B verjetno

nudita primerno orientacijo poliproteina in s tem zagotavljata njegovo pravilno cepitev in pravilno delovanje polimeraznega kompleksa (Gritsun in sod., 2003).

2.4 RAZMNOŽEVANJE VIRUSA

V prvi stopnji okužbe se virusi vežejo na površino gostiteljske celice, pri čemer sodeluje beljakovina E, ki se veže z receptorjem heparan sulfatom (Kroschewski in sod., 2003). Podatki iz raziskav virusa zahodnega Nila nakazujejo, da so virioni po vezavi z receptorjem prenešeni v celico z endocitozo, s klatrinskimi mešički (Chu in Ng, 2004). Znižanje pH v endosomu povzroči konformacijske spremembe beljakovine E (Mansfield in sod., 2009). Izpostavi se fuzijska domena in posledično pride do fuzije virusne membrane z membrano endosoma. Virusna nukleokapsida se sprostí v citoplazmo (Mansfield in sod., 2009). Po sprostitvi virusnega genoma pride do prepisa virusnega poliproteina, cepitve poliproteina in do iniciacije razmnoževanja virusnega genoma (Chambers in sod., 1990). Negativno polarne RNA služijo kot matrica za proizvodnjo novih pozitivno polarnih RNA (Mansfield in sod., 2009). Ko kapsidna beljakovina C obda RNA molekulo, nastala nukleokapsida brsti v lumen endoplazmatskega retikuluma (ER). Beljakovini E in prM sta ob tem tudi že v ER, zato sta ob brstenju nukleokapside v ER že zasidrani v membrani (Chambers in sod., 1990). Nastali neinfektivni, nezreli virioni se prenesejo preko gostiteljske sekretorne poti. V zakisanih mešičkih trans-Golgijevega aparata pride do cepitve prM beljakovine s celično furin proteazo (Mansfield in sod., 2009). Cepitev beljakovine prM vodi do reorganizacije beljakovine E v fuzijske homodimere, s pomočjo katerih pride do fuzije prenosnih mešičkov in gostiteljeve membrane (Mansfield in sod., 2009). Na ta način se virus sprosti iz celice.

2.5 PATOGENEZA

Večina okužb z virusom KME je posledica vboda klopa. Manjše število okužb je posledica zaužitja okuženega nepasteriziranega mleka (Dumpis in sod., 1999). Po okužbi se virus razmnožuje na mestu inokulacije in kasneje v limfnih vozlih, ki obkrožajo mesto inokulacije (Mansfield in sod., 2009). Razmnoževanju v limfnih vozlih sledi viremija.

Hematogeno širjenje virusa omogoči okužbo različnih organov, še posebej retikuloendotelijski sistem (vranico, jetra in kostni mozeg) (Haglund in Günther, 2003). V fazi hematogenega širjenja pride tudi do prečkanja krvno-možganske pregrade in virus vdre v osrednje živčevje. Tu se razmnožuje, kar povzroči vnetje, moteno delovanje celic in njihovo lizo (Dumpis in sod., 1999). Receptor za vstop virusa KME v možgane še ni poznan (Haglund in Günther, 2003). Predlagani možni mehanizmi vstopa virusa v možganske celice vključujejo: pasivno difuzijo ali transcitozo virusnih delcev preko cerebralnih kapilarnih endotelijskih celic ali pa razmnoževanje virusa v endotelijskih celicah, čemur sledi brstenje virusa na parenhimski strani. Alternativna možnost je, da virus prečka krvno-možgansko pregrado tako, da iz krvnega obtoka vdre v nosni epitelij, čemur sledi okužba nosnih nevronov in vstop v osrednje živčevje (McMinn, 1997). Dokazovanje virusne RNA v likvorju med fazo encefalitisa je težavna. To močno podpira hipotezo, da je virusno razmnoževanje onemogočeno, ko se v serumu in likvorju pojavijo nevtralizirajoča protitelesa (Haglund in Günther, 2003). Sposobnost virusa, da se lahko razmnožuje v perifernih tkivih, da povzroča viremijo in vdira v osrednje živčevje, imenujemo nevroinvazivnost. Sposobnost virusa, da začne citopatsko okužbo v osrednjem živčevju in povzroči encefalitis, imenujemo nevrovirulenca (McMinn, 1997). Beljakovina E ima pomembno vlogo pri določanju virulence virusnega fenotipa, saj je zadosti že ena aminokislinska zamenjava, da virus izgubi nevrovirulenco ali nevroinvazivnost. Predpostavljajo, da so pri določanju virulence vpleteni tudi drugi deli genoma, na primer gen, ki kodira NS1 beljakovino (McMinn, 1997). Vstop virusa KME v osrednje živčevje je kompleksen proces, ki verjetno vključuje več receptorjev na gostiteljski celici (Mandl, 2005).

2.6 POTEK BOLEZNI IN KLINIČNA SLIKA

Okužba z virusom KME je v 70 do 95 % asimptomatska (Venturi in sod., 2009).

Okužba z daljnovzhodnim podtipom virusa povzroča enofazni potek bolezni, okužba z evropskim podtipom pa običajno povzroči dvofazni potek bolezni (Dumpis in sod., 1999; Gritsun in sod., 2003). Pri vsaj dveh tretjinah bolnikov, ki kažejo prizadetost osrednjega živčevja, je potek bolezni dvofazen (Avšič-Županc in sod., 2009) Inkubacijska doba traja

običajno 7 do 14 dni. Tipični simptomi prve faze bolezni so podobni gripi in lahko trajajo 1 do 8 dni. Ti znaki so: vročina, glavobol, utrujenost, bolečina v vratu, ramenih, spodnjem delu hrbta in bljuvanje. Pojavijo se lahko tudi težave s prebavili, levkocitopenija, trombocitopenija in povečano število jetrnih encimov. Ti klasični simptomi se pojavijo nenadno. Pri nekaterih bolnikih se pojavijo meningealni simptomi, kot je otrdelost vratu. Bolniku lahko tudi zmanjkije sape, na obrazu, vratu in zgornjem delu trupa se pojavi rdečica (Gritsun in sod., 2003; Donoso Mantke in sod., 2008). Akutna vročinska faza sovpada s prisotnostjo virusa v krvi. Vročinski fazi pogosto sledi faza brez simptomov in traja 2 do 10 dni. Pri 20 do 30 % obolelih napreduje bolezen v drugo fazo, ki sovpada z vdorom virusa v osrednje živčevje (Dumpis in sod., 1999; Donoso Mantke in sod., 2008). Če bolezen napreduje v drugo fazo, pride do nevroloških zapletov. Okužba osrednjega živčevja se lahko kaže kot meningitis, encefalitis, mielitis, radikulitis ali kot kombinacija vseh teh. Simptome akutnega vnetja osrednjega živčevja spremlja visoka vročina, močan glavobol, huda slabost, otrdelost vratu in bruhanje (Haglund in Günther, 2003; Avšič-Županc in sod., 2009). Večina obolelih si po preboleli bolezni popolnoma opomore, 10 do 20 % obolelih pa lahko ima dolgotrajne posledice. Pojavijo se lahko trajne paralize ali pareze udov (Avšič-Županc in sod., 2009). Težka oblika bolezni se na splošno pojavlja pogosteje pri odraslih, še posebej pri starejših od 60 let (Jereb in sod., 2006).

Kronično obliko KME opazajo pri bolnikih iz Sibirije in daljnega vzhoda Rusije, kar nakazuje povezavo z okužbo s sibirskim podtipom virusa KME. Obstajata dve obliki kroničnega KME. Prva oblika se kaže kot dolgoročne ponovitve akutnega KME. Pri tej obliki lahko pride do nevroloških zapletov tudi po več letih po vbodu okuženega klopa. Druga oblika kroničnega KME je povezana s hiperkinezo in epileptoidnim sindromom (Gritsun in sod., 2003). Smrtnost zaradi okužbe z evropskim podtipom virusa KME je 1 do 2 %, po okužbi z daljnovzhodnim podtipom pa 20 do 40 %. Smrtnost po okužbi s sibirskim podtipom je 2 do 3 %. Visoko smrtnost po okužbi z daljnovzhodnim podtipom bi morda lahko pojasnilo pomanjkanje podatkov o blažjih oblikah bolezni (Mansfield in sod., 2009). Dvofazna vročica je oblika bolezni, ki se pojavi po zaužitju okuženega, nepasteriziranega mleka. Za razliko od okužb z vbodom klopa, se dvofazna vročica pojavlja epidemično, zbolevalo celotne družine. Dvofazna vročica se prične nenadno, s hitrim porastom telesne temperature, hudim glavobolom in bolečinami v vratu, pasu, mečih in sklepkih. Ostali simptomi so slabost, bljuvanje, nespečnost, utrujenost. Visoka temperatura traja 5 do 10

dni, potem se postopoma znižuje. Bolnik okreva, vendar po 6 do 10 dnevih pride do ponovnega povišanja temperature, ki traja do 10 dni. V drugi fazi bolezni se pojavijo enaki simptomi kot v prvi fazi, le da so bolj intenzivni. Do težjih nevroloških zapletov ne prihaja, bolniki v veliki večini popolnoma okrevajo (Gritsun in sod., 2003).

2.7 STABILNOST VIRUSA

Flavivirusi so v obliki aerosolov, pri sobni temperaturi in 23 % do 80 % vlagi, obstojni 6 ur (Gritsun in sod., 2003).

Virus KME ima lipidno ovojnico, zato ga hitro inaktivirajo organska topila in detergenti. Lipidna ovojnica ščiti notranjost virusa. Ko pride do razgradnje le-te, pride do izpostavitve virusnega genoma ribonukleazam. Kužnost flavivirusov je optimalna v pH območju 8,4 do 8,8. Pri nizkem pH pride do konformacijske spremembe v beljakovini E, kar zmanjša kužnost virusa. Virus KME lahko ohrani delno kužnost tudi v pH območju 1,42 do 9,19, podobno kot enterovirusi. To pojasnjuje možnost okužbe z virusom po oralni poti, saj virus ostane kužen tudi v sesirjenem mleku in želodčnem soku (Gritsun in sod., 2003).

Če je flavivirus raztopljen v krvi ali v kateri drugi beljakovinski raztopini, ga lahko inaktiviramo s 30 minutnim segrevanjem pri 56 °C (Gritsun in sod., 2003). Inaktivacija flavivirusov je uspešna tudi s formaldehidom, glutaraldehidom, vodikovim peroksidom, klorom, alkoholom, jodom, fenolnimi jodofori in z obsevanjem z UV svetlobo ter gama žarki (Gritsun in sod., 2003).

2.8 EPIDEMIOLOGIJA

Epidemiologija klopnega meningoencefalitisa je tesno povezana z ekologijo in biologijo klopov (Arnež in Avšič-Županc, 2009). Poznamo tri podtipe virusa KME: evropski, daljnovzhodni in sibirski (Donoso Mantke in sod., 2008). V Sloveniji kroži evropski podtip virusa KME, katerega glavni prenašalec je klop, vrste *Ixodes ricinus* (Avšič-Županc in sod., 2009). Ocene prekuženosti klopov *I. ricinus* z virusom KME se v osrednji Evropi gibljejo od manj kot 0,1 do približno 5 %. Prekuženost klopov *I. persulcatus*, je večja v Sibiriji, do 40 % (Dumpis in sod., 1999; Süß, 2003).

2.8.1 Naravna žarišča

Naravno žarišče je po definiciji Pavlovskega območje različnih zemljepisnih značilnosti in ekoloških okvirjev, kjer je med evolucijo prišlo do razvoja odnosov med vrstami, na primer med patogenom in njegovim prenašalcem (vektorjem) (Heinz, 2007). Razvoj naravnega žarišča je odvisen tudi od gostote in dinamike populacije okuženih klopotov in gostiteljev, od dovzetnosti gostiteljev, deleža imunih gostiteljev, lastnosti biotopa, temperature in socioloških sprememb (Heinz, 2007).

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

2.8.2 Okoljski in socialni faktorji vpliva za povečanje števila obolelih

V zadnjih 30 letih se je v Evropi število obolelih za KME povečalo (Arnež in Avšič-Županc, 2009). Veliko raziskav posveča pozornost globalnemu segrevanju, ki naj bi vplivalo na življenjski cikel klopotov in njihovo širjenje v bolj severna področja kot tudi območja z višjo nadmorsko višino (Süss, 2008). Zviševanje povprečne temperature in povečanje količine padavin vodita do povečanja vlažnosti, kar izboljša življenjske pogoje za klope. Klopi so med letom aktivni dlje časa, prihaja tudi do sočasnega hranjenja (angl.: co-feeding) ličink in nimf (Arnež in Avšič-Županc, 2009).

K povišanju incidence obolelih prispevajo tudi drugi faktorji, ki so posledica socialnega dogajanja. Omenimo jih le nekaj: povečanje števila nezaposlenih in na drugi strani povečanje prostega časa pri ljudeh z višjim ekonomskim standardom. Upokojeni ljudje z višjim standardom so bolj zdravi in zato tudi bolj aktivni. Ponekod se je z zmanjševanjem obdelovanja zemlje in uporabe nevarnih pesticidov povečala možnost za bivanje klopnim gostiteljem (glodavcem). Povečalo se je tudi število preseljevanj in s tem zbolevanje ljudi, ki potujejo na endemična območja (Randolph, 2008a; Süss in sod., 2008).

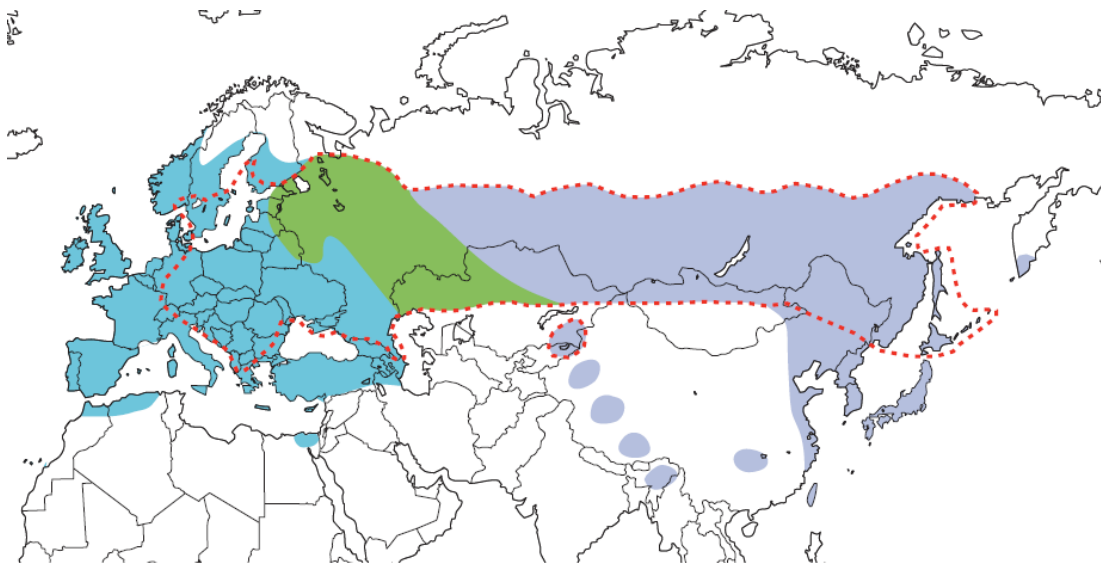
2.8.3 KME v svetu

Klopni meningoencefalitis je najpomembnejša flavivirusna okužba osrednjega živčevja v Evropi in Rusiji (Donoso Mantke in sod., 2008). Bolezen je potrebno obvezno prijaviti v 16 državah: v 13 državah Evropske unije (Avstrija, Češka, Estonija, Finska, Nemčija, Grčija, Madžarska, Latvija, Litva, Poljska, Slovaška, Slovenija, Švedska) in na Norveškem, v Rusiji in Švici (Süss, 2008). Virus KME je endemičen na področju, ki sega od severa Kitajske in Japonske ter preko Rusije v Evropo (Mansfield in sod., 2009). Po definiciji pomeni endemičen običajno prisoten na nekem zemljepisnem področju oz. se nanaša na običajno pojavljajočo bolezen na določenem zemljepisnem območju (Gordis, 2004).

V Evropi in Rusiji zbolijo v povprečju zbolijo 8755 ljudi na leto. Samo v Evropi zbolijo 2805 ljudi na leto. Primerjava obdobja 1976 do 1989 in 1990 do 2007 kaže, da se je delež obolelih na območju Rusije in Evrope povečal za 317,8 %, samo v Evropi pa za 193,2 % (Süss, 2008).

Največjo incidenco zabeležijo v Latviji (30 primerov na 100.000 prebivalcev na leto). Sledijo določeni deli Rusije (20,5), Estonija (16,5), Slovenija (14) in Litva (11,2) (Kaiser, 2008).

Prenašalec *I. ricinus* je razširjen predvsem v Evropi, na zemljepisnem prostoru, ki sega do Turčije, severnega Irana in Kavkaza na severovzhodu. Klop *I. persulcatus* pa najdemo na zemljepisnem področju, ki sega od vzhodne Evrope do Kitajske in Japonske. Na severovzhodnem delu Evrope in delu Rusije je območje, kjer obe vrsti klopa sobivata (slika 3). Posledično najdemo na tem območju vse podtipe virusa KME (Lindquist in Vapalahti, 2008).



Slika 3: Zemljepisna razširjenost klopa *I. ricinus* na zahodu (modra barva) in *I. persulcatus* na vzhodu (siva barva). Obe vrsti klopa sobivata na področju, ki je označeno z zeleno barvo. Z rdečo prekinjeno črto je označena meja, ki obkroža endemično območje (Lindquist in Vapalahti, 2008).

2.8.4 KME v Sloveniji

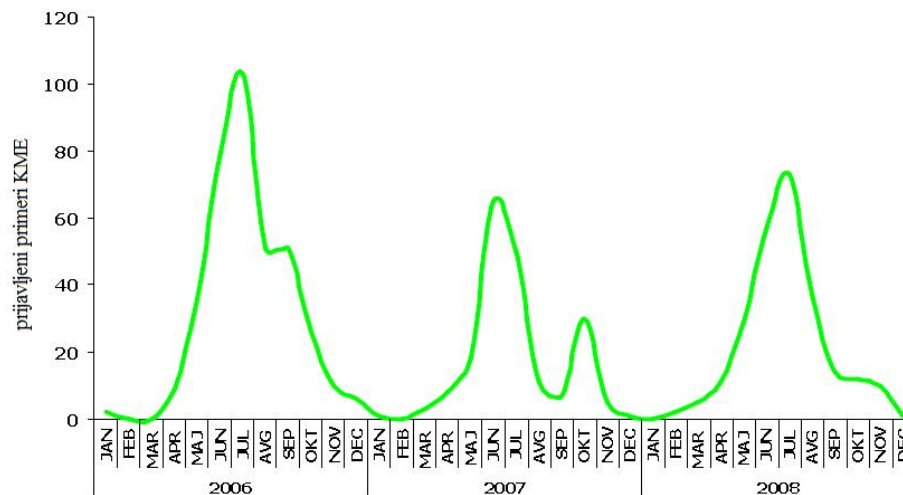
Od leta 1976 je v Sloveniji potrebno vsak primer KME prijaviti epidemiološki službi (Eržen in Kraigher, 1993).

Ker je KME naravnožariščna okužba, se virus KME v naravi ohranja na endemičnih območjih. Naravna žarišča v Sloveniji imajo različno intenziteto: izredno aktivna (Mozirje in Kranj), nizko aktivna (Škofja Loka, Ilirska Bistrica) ali celo latentna območja, kjer okužba z virusom KME ni verjetna (Avšič-Županc in sod., 1995). V Sloveniji je KME endemičen predvsem v osrednjem delu države, na Gorenjskem, Štajerskem in Koroškem. Letno število prijavljenih primerov bolezni se v zadnjih petih letih giblje med 204 in 251, z izjemo leta 2006, ko je bilo prijavljenih 373 primerov. Povprečna letna incidenca znaša 13,1 na 100.000 prebivalcev (IVZ, 2009b).

Večina okuženih z virusom KME najverjetneje ne zbolijo, kar dokazuje velika prekuženost prebivalstva na endemičnih področjih (Avšič-Županc in sod., 1995). Dejavnik tveganja za okužbo predstavlja stalno bivanje na endemičnem področju. Okužbi so izpostavljeni ljudje vseh starostnih skupin. Med obolelimi je vedno nekaj več moških kot žensk. Največ oseb

se okuži med zadrževanjem v gozdu, zaradi rekreacije, nabiranja gozdnih sadežev ali kmetovanja (IVZ, 2009a).

KME se pojavlja sezonsko. Največ obolelih je v poletnih mesecih, predvsem v mesecu juliju (slika 4) (IVZ, 2009a).



Slika 4: Prijavljeni primeri KME po mesecu obolenja, za Slovenijo v obdobju 2006 do 2008 (IVZ, 2009a).

2.9 KROŽENJE VIRUSA V NARAVI

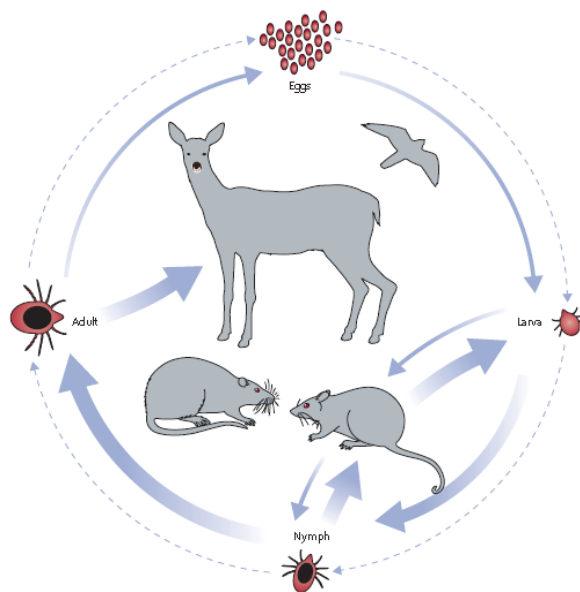
2.9.1 Klopi

Življenjski krog navadnega gozdnega klopa (*I. ricinus*) zajema razvojne stopnje: jajčece, ličinka, nimfa in odrasla žival (Heinz, 2007). Prehod iz ene razvojne stopnje v drugo traja približno eno leto, zato se celoten življenjski cikel običajno zaključi v treh letih, vendar lahko traja tudi dlje (Mansfield in sod., 2009).

Za prehod v vsako razvojno stopnjo se mora klop hraniti na vretenčarju. Hranjenje traja različno dolgo in je odvisno od tega, na kateri razvojni stopnji se nahaja klop (Süss in sod., 2008). Vsaka razvojna stopnja klopa se hrani le enkrat, izjeme so samci, ki se hranijo večkrat ali pa sploh ne. Nimfe predstavljajo verjetno najpomembnejšo razvojno stopnjo klopa pri prenosu virusa, saj so številne in lahko okužijo različne gostitelje (Süss, 2003). Ko se klop okuži z virusom KME, ostane kužen doživljenjsko (Gritsun in sod., 2003). Med

hranjenjem klop vsrka virus, ki se nato razmnožuje v črevesnih celicah, iz katerih se nato širi v žleze slinavke. Virus se prenese na gostitelja po vbodu klopa, z njegovo slino (Mansfield in sod., 2009).

Virus KME se med klopi prenaša vertikalno, kar vključuje spolni prenos (iz okuženega samca na samico), transovarialni prenos (iz samice na jajčeca) in transstadialni prenos (iz ličinke na nimfo in iz nimfe na odraslega klopa). Pri prehodih v nove stadije prihaja do izgub virusa (le 1 % jajčec okužene samice prejme virus; le 10 % odraslih klopov, ki se razvijejo iz okuženih ličink in 30 %, ki se razvijejo iz okuženih nimf). Zato je za dolgotrajni obstoj virusa v naravi nujno potreben prenos virusa iz viremičnega gostitelja (malih in velikih sesalcev) na klopa ter s sočasnim hranjenjem ličink in nimf na neviremečnem gostitelju (slika 5). Temu prenosu pravimo horizontalen prenos (Malovrh in Marc, 1997).



Slika 5: Prenos virusa KME v naravi. Prekinjena črta označuje življenjski krog klopa, polna črta označuje prenos virusa KME med različnimi razvojnimi stopnjami klopa (jajčece, ličinka, nimfa, odrasel klop) in njegovimi gostitelji (Lindquist in Vapalahti, 2008).

2.9.2 Gostitelji

Klopi zaznavajo svojo okolico s Hallerjevim organom, ki se nahaja v njihovem prvem paru nog. Gostitelja zaznajo po njegovi senci, toploti telesa, telesnem vonju in vibracijah, ki nastanejo med njegovim gibanjem (Süss in sod., 2008).

Klopi, vrste *I. ricinus* parazitirajo na več kot 300 različnih vrstah divjih in domačih sesalcev, ptičev in plazilcev (Dobler, 2009). Glodavci so za večino KME virusov glavni gostitelji in rezervoarji. Te vrste se hitro razmnožujejo, vendar je njihova življenjska doba pogosto krajša od življenjske dobe klopa. Zato porastu populacije glodavcev sledi porast populacije klopov, čemur sledi povečanje tveganja za okužbo pri ljudeh, in sicer v času 1 do 2 let (Süss, 2003). Pomembna gostitelja evropskega podtipa virusa KME sta rumenogrla gozdna miš (*Apodemus flavicollis*) in gozdna voluharica (*Myodes glareolus*) (Dobler, 2009).

Različne razvojne stopnje klopa zajedajo na različnih gostiteljih. Na splošno se ličinke in nimfe hranijo na malih sesalcih in pticah. Veliki sesalci (koze, krave, ovce, srnjad, jelenjad) so gostitelji odraslih klopov. Vloga ptic pri prenosu virusa KME še ni pojasnjena. Ptice so verjetno manj pomembni rezervoarji virusa, imajo pa pomembno vlogo pri prenosu virusa na večje razdalje (Süss, 2003).

Za večino gostiteljev velja, da ne razvijejo bolezni. Okužba z evropskim podtipom virusa KME redko povzroči nevrološke težave pri psih ali povišano temperaturo pri teletih (Süss, 2003; Dobler, 2009). Gostitelji razvijejo specifična protitelesa in ostanejo zaščiteni doživljenjsko (Süss, 2003). Pri malih sesalcih traja viremija 2 do 8 dni, pri velikih sesalcih je krajša (Heinz, 2007). Prav tako je količina virusa v krvi malih sesalcev večja kot pri velikih sesalcih (Heinz, 2007). Naravni gostitelji imajo pomembno vlogo pri kroženju virusa v naravi, saj so dokazali, da lahko pride do prenosa virusa iz okuženega klopa na neokuženega klopa, ob sočasnem hranjenju (angl.: co-feeding) tudi na nevremitičnih gostiteljih (Labuda in sod., 1993; Labuda in sod., 1997). Virus je prisoten tudi v mleku okuženih koz, krav in ovc in se lahko prenaša na njihove potomce in tudi na človeka. Človek predstavlja prekinitev kroženja virusa v naravi, saj ne razvije dovolj visoke viremije, da bi lahko okužil kri- sesajočega klopa (Dobler, 2009).

2.9.3 Klopi in njihova aktivnost

Za aktivnost klopov je ugodna temperatura nad 7 °C in visoka vlažnost, nad 85 % (Süss in sod., 2008). V področju zmernega podnebja je sezonska aktivnost *I. ricinus* dvofazna. To pomeni, da se največja aktivnost kaže v zgodnjih poletnih mesecih, nekoliko manjša pa doseže vrh jeseni (Knap in sod., 2009).

2.10 DIAGNOSTIKA KME

Slovenija je znana kot endemično področje tudi za druge bolezni, ki se prenašajo s klopi (Saksida in sod., 2005). Klinična slika začetne faze KME je enaka akutni fazi humane granulocitne anaplazmoze. Pri obeh boleznih je značilna levkocitopenija in trombocitopenija in obe bolezni nastopita po vbodu klopa. Zato je potrebna takojšnja, pravilna diagnoza, saj se zdravljenje teh bolezni med seboj bistveno razlikuje (Arnež in Avšič-Županc, 2009).

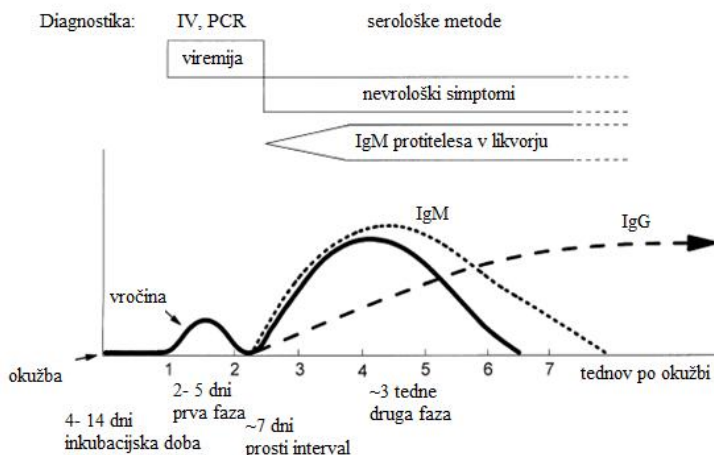
Končno diagnozo je potrebno potrditi v laboratoriju. Pred tem je potrebna temeljita anamneza. Od bolnika je potrebno izvedeti ali je v zadnjih 4 tednih obiskal kraj, ki je endemičen, ali se spominja vboda klopa pred pojavom simptomov oz. ali je užival izdelke iz nepasteriziranega mleka in ali je bil cepljen proti virusu KME ali proti kateremu drugemu flavivirusu (virus rumene mrzlice, virus japonskega encefalitisa). To je pomembno, saj je virus KME antigensko soroden ostalim flavivirusom, kar lahko povzroči navzkrižne reakcije protiteles pri posrednem dokazovanju okužbe z virusom KME (Holzmann, 2003).

2.10.1 Posredno dokazovanje virusa

Metoda izbire za specifično diagnostiko virusa KME je ELISA (angl.: enzyme linked immunosorbent assay), encimsko imunski test (Donoso Mantke in sod., 2008). Test temelji na dokazovanju protiteles IgM in IgG v serumu in likvorju. Protitelesa zaznamo običajno takrat, ko so nevrološki simptomi že prisotni (2 do 3 tedne po okužbi). Zato je slaba stran uporabe te metode ta, da protiteles IgM pogosto ni mogoče dokazati v prvi fazi bolezni

(Dumpis in sod., 1999; Holzmann, 2003). Velika ovira pri uporabi testa ELISA je lahko tudi prisotnost navzkrižno reaktivnih protiteles, ki pa niso nevtralizirajoča in so lahko prisotna v serumu kot posledica okužbe ali cepljenja proti drugim flavivirusom (virus Denga, virus zahodnega Nila, virus rumene mrzlice, virus japonskega encefalitisa). To predstavlja predvsem velik problem v Evropi, saj ljudje veliko potujejo v tropske in subtropske dežele, kjer so endemični tudi drugi flavivirusi. V takih primerih je potrebno za potrditev diagnoze izvesti še test nevtralizacije. Test nevtralizacije na celičnih kulturah je nevaren za laboratorijsko osebje, tehnično zahteven, drag in se izvaja le v specializiranih laboratorijih. Navzkrižne reakcije protiteles predstavljajo težavo tudi pri dokazovanju okužbe z imunofluorescenčnim testom (IFA) (Holzmann, 2003; Donoso Mantke in sod., 2008). Problem se pojavi tudi pri cepljenih osebah, kjer zgodnja diagnoza z dokazovanjem protiteles IgM ni zadostna. Specifična protitelesa IgM se lahko ohranijo namreč tudi do 10 mesecev po cepljenju ali po naravni okužbi. V takih primerih priporočajo potrditev prisotnosti specifičnih protiteles IgG, in sicer 1 do 2 tedna kasneje (slika 6) (Donoso Mantke in sod., 2008).

Pri vrednotenju seroloških rezultatov je potrebna pazljivost, saj trenutno ne obstajajo mednarodni standardi za diagnostiko virusa KME. Pri kritični interpretaciji rezultatov je potrebno sodelovanje zdravnika in laboratorijskega osebja (Arnež in Avšič-Županc, 2009). Serološki in molekularni testi bi morali biti standardizirani in kot taki uporabljeni v vseh evropskih državah, da bi bila zagotovljena primerljivost podatkov med posameznimi državami (Donoso Mantke in sod., 2008).



Slika 6: Dvofazen potek bolezni KME: dokazovanje virusa, virusne nukleinske kisline in razvoj specifičnih protiteles. Okrajšave: IV- izolacija virusa, PCR- verižna reakcija s polimerazo (Holzmann, 2003).

2.10.2 Neposredno dokazovanje virusa

Virus lahko osamimo iz krvi v prvi, viremični fazi bolezni. Prav tako lahko v tej fazi dokažemo virusno RNA z verižno reakcijo s polimerazo in reverzno transkriptazo (RT-PCR) (Holzmann, 2003). RT-PCR se lahko uporablja pri dokazovanju virusne RNA v serumu in krvi, pred pojavom protiteles. Prav tako je zelo pomembna metoda v diferencialni diagnostiki vročinske bolezni v primerih, ko pride do vboda klopa na področju, kjer je endemičnih več povzročiteljev, ki se prenašajo s klopi (Saksida in sod., 2005). RT-PCR uporabljajo tudi takrat, ko bolnik v drugi fazi bolezni ne razvije protiteles ali ko boleha za težko obliko KME ali je umrl zelo kmalu po okužbi (Donoso Mantke in sod., 2007). Glavni razlog omejene uporabe molekularnih metod za dokaz KME v diagnostiki, je kratko obdobje trajanja viremijske in neuspešnost dokazovanja virusa v krvi ob pojavu nevroloških znakov bolezni (Cinque in sod., 2003). Bolniki običajno obiščejo zdravnika takrat, ko so nevrološki simptomi že prisotni. Takrat se razvije humoralna imunost in virusa ni več v krvi in likvorju (slika 6) (Holzmann, 2003).

Za razlikovanje med posameznimi podtipi virusa KME, so Růžek in sod. (2007) razvili metodo multiplex RT-PCR, kjer lahko na podlagi različnih pomnoženih zaporedij, ki kodirajo beljakovino E, ločimo posamezne tri podtipi virusa KME. Metoda je primerna za analizo okuženih klopov kot tudi za analizo človeškega seruma (Růžek in sod., 2007).

Kvantitativna RT-PCR metoda z notranjo kontrolo omogoča kvantifikacijo virusne RNA v kliničnih vzorcih (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

2.11 ZDRAVLJENJE IN PREVENTIVA

Za zdravljenje KME ne obstaja nobeno specifično zdravilo. Ker zdravil, ki bi učinkovala neposredno na virus, nimamo, je za bolnike potrebno podporno zdravljenje, ki vključuje paracetamol, aspirin in druga nesteroidna protivročinska zdravila (Dumpis in sod., 1999) (Heinz, 2007).

Edina uspešna preventiva je aktivna imunizacija (Kunze, 2008). Aktivna imunizacija je varna in v 95 do 99 % učinkovita (Heinz in sod., 2007). Trenutno so na voljo vsaj štiri cepiva, ki so pripravljena iz očiščenega, s formaldehidom inaktiviranega virusa. Ta cepiva so: avstrijsko cepivo »FSME-Immun 0,5 ml« in FSME-Immun 0,25 ml Junior«, nemško cepivo »Encepur Adult and Children« in dve ruski cepivi (Leonova in sod., 2007).

Mednarodni znanstveni odbor ISW-TBE (The International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis) priporoča cepljenje otrokom in odraslim, ki živijo na endemičnem območju ali tja potujejo (Kunze, 2008).

V Sloveniji je cepljenje obvezno za gozdne delavce, kmetovalce, vojake in vse, ki so poklicno izpostavljeni tveganju za okužbo (Donoso Mantke in sod., 2008). Kljub povečanemu številu cepljenih v zadnjih letih, je delež cepljenih proti KME v Sloveniji še vedno nizek, okoli 10 % (IVZ, 2009a). Cepimo s tremi odmerki cepiva. Cepljenje s prvima dvema odmerkoma naj bi opravili v zimskih mesecih, da dosežemo zaščito pred sezonsko aktivnostjo klopov. Običajna shema cepljenja narekuje cepljenje z drugim odmerkom cepiva 1 do 3 mesece po prvem in tretji odmerek 9 do 12 mesecev po drugem odmerku. Potrebne so revakcinacije: 3 leta po zadnjem odmerku in nato vsakih 5 let (IVZ, 2008).

Izrednega pomena je tudi poučenost prebivalstva o ostalih možnostih preventive. Zelo pomembno je preprečevanje stika klopa s kožo. V ta namen uporabljamo repelente, primerno obleko (dolgi rokavi), pomembno je tudi samopregledovanje in odstranjevanje še ne prisesanih klopov (Eržen in Kraigher, 1993; Kraigher in sod., 1993).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

V diplomsko nalogo smo vključili klinične vzorce, poslane v laboratorijsko potrditev okužbe s KME v Laboratorij za diagnostiko zoonoz in WHO laboratorij, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Med poslanimi vzorci smo izbrali: 18 serumskih vzorcev iz leta 2008 in 12 vzorcev krvi iz let 2008 in 2009.

Poleg tega smo v študijo vključili tudi živalske vzorce, ki so bili nabrani oziroma ulovljeni v sodelovanju Laboratorija za diagnostiko zoonoz in Prirodoslovnega Muzeja Slovenije. Med živalskimi vzorci smo v nalogo vključili vzorce naravnih gostiteljev virusa KME in sicer: 22 tkivnih vzorcev (20 vranic in 2 ledvici) rumenogrele miši (*A. flavicollis*) in gozdne voluharice (*M. glareolus*). Glodavci so bili ujeti v letih 2006, 2007 in 2008 v osrednji Sloveniji, na Gorenjskem, Savinjskem in Notranjsko-Kraškem območju.

Dodatno smo za primerjavo učinkovitosti izolacij izbrali tudi vzorce klopov, ki so bili predhodno potrjeni kot pozitivni ali negativni na virus KME, in je bila izolacija RNA z ročno metodo že izvedena.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Izolacija RNA

Izolacijo RNA smo opravili v varnostni komori II. varnostne stopnje. Pred delom v komori smo delovno površino, pipete, stojala in centrifugo razkužili z natrijevim hipokloritom in z RNase ZAP (Applied Biosystem, Carlsbad, Kalifornija), ki odstranjuje encime, ki razgrajujejo RNA in so lahko vzrok za neuspešno izolacijo RNA. Po delu smo vse pripomočke in delovno površino razkužili z natrijevim hipokloritom. Pred in po delu smo komoro tudi obsevali z UV svetlobo, vsaj 10 minut. Pri delu smo uporabljali avtoklavirane pripomočke (pipete, nastavke za pipete in epruvetke). Med delom smo pogosto menjevali rokavice.

3.2.1.1 Ročna izolacija RNA iz seruma in krvi

Iz vzorcev seruma in krvi smo izolirali celokupno RNA po izboljšani metodi Chomczynskega in Sacchija (Chomczynski in Sacchi, 1987), ki jo pri uporabi reagenta TRIZOL[®]LS priporoča podjetje Invitrogen Life TechnologiesTM (Carlsbad, Kalifornija, ZDA). TRIZOL[®]LS Reagent ohranja integriteto RNA. Po izolaciji je RNA primerna za obdelavo z drugimi metodami, saj ne vsebuje nečistoč: DNA, beljakovin in lipidov.

V 1,5 ml epruvetko smo prenesli 200 µl vzorca (v primeru, da ni bilo dovolj vzorca smo za izolacijo vzeli 100 µl) in mu dodali 600 µl Trizol LS Reagent. Epruvetko z vzorcem smo 5-krat sunkovito obrnili in na kratko vorteksirali. Vzorec z reagentom smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Trizol LS Reagent je raztopina gvanidin izotiocianata in fenola, ki omogoča lizo celic in s tem izolacijo celokupne RNA. Po inkubaciji smo dodali 120 µl kloroforma, ki smo ga hranili v temi, pri sobni temperaturi. Epruvetko smo 15-krat sunkovito obrnili, na kratko vorteksirali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorec 15 minut centrifugirali v na 4 °C ohlajeni centrifugi, pri 15000 obratih/minuto. Po dodatku kloroforma in centrifugiranju smo dobili v epruvetki tri plasti: zgornjo, vodno plast, v kateri je bila raztopljena RNA, srednjo plast z beljakovinami in lipidi in spodnjo fenol-kloroformsko plast z raztopljeno DNA. Zgornjo, vodno plast, smo prenesli v novo 1,5 ml epruvetko. Pri prenašanju smo bili previdni in pazili, da nismo prenesli srednje plasti, v kateri so bile raztopljene beljakovine in lipidi. Preostanek smo zavrgli v posebno steklenico, z napisom fenol in oznako biohazard. RNA raztopini smo dodali 300 µl izopropanola, ki smo ga hranili pri -20 °C. Vzorec smo ponovno 5-krat sunkovito obrnili in nato 15 minut centrifugirali pri 4 °C in 15000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo odstranili čim več supernatanta, saj je med centrifugiranjem RNA precipitirala na dnu in na stenah epruvetke. Nato smo dodali 600 µl 75 % etanola, ohlajenega na -20 °C in vorteksirali 1 minuto. Po 6 minutnem centrifugiranju pri 4 °C in 12000 obratih/minuto, smo ponovno odstranili čim več supernatanta in pazili, da se s pipeto ne dotikamo stene epruvetke. Z etanolom smo RNA oborili. Epruvetke smo odprli in RNA sušili v varnostni komori približno 15 minut. Oborino smo nato raztopili v 30 do 60 µl sterilizirane vode Molecular Biology Grade (Promega, Madison, ZDA), ki ne vsebuje nukleaz. Raztopljeno RNA smo hranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.1.2 Ročna izolacija RNA iz klopov

Klopi so bili ustrezno očiščeni in shranjeni v sterilnih epruvtkah. Razporejeni so bili tako, da je bila v vsaki epruvtki shranjena skupina odraslih klopov.

Priprava klopov za izolacijo celokupne RNA je potekala v varnostni komori II. stopnje. Klope, shranjene pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo s sterilno pinceto prenesli na objektno stekelce, ki smo ga predhodno obrisali z absolutnim etanolom. Odrasle klope smo s sterilnim skalpelom prerezali na polovice. Prve polovice smo shranili za nadaljnje raziskave v sterilne epruvetke, druge polovice klopov pa smo združili v 2 ml epruvtko za homogenizacijo, v katero smo predhodno dodali sterilno kroglico za homogenizacijo in 300 μl filtriranega fosfatnega pufra (PBS; angl.: Phosphate Buffer Saline). Epruvetke za homogenizacijo smo prenesli v plastične posodice in jih vstavili v homogenizator TissueLyser (Qiagen, Hilden, Nemčija). Klope smo homogenizirali 8 minut pri 8000 tresljajih/minuto. Homogenate smo nato kratko centrifugirali in s sterilnimi pincetami odstranili kroglice za homogenizacijo. Nato smo homogenate ponovno na kratko centrifugirali in 100 μl vsebine prenesli v novo 1,5 ml epruvtko za izolacijo RNA. 200 μl ostalega homogenata smo shranili za nadaljnje raziskave, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za izolacijo celokupne RNA iz klopov smo uporabili izboljšano metodo Chomczynskega in Sacchija (Chomczynski in Sacchi, 1987), ki jo pri uporabi reagenta TRIZOL[®] Reagent, priporoča podjetje Invitrogen Life Technologies[™] (Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Nadaljnji postopek izolacije RNA iz klopov je potekal enako kot je opisano v točki 3.2.1.1.

3.2.1.3 Ročna izolacija RNA iz tkivnih vzorcev

Ročna izolacija RNA iz tkivnih vzorcev je bila že predhodno opravljena v istem laboratoriju. Potekala je po enakem postopku kot izolacija RNA iz klopov. Majhen košček tkiva (približno 1 mm^3) je potrebno najprej homogenizirati, nato poteka izolacija z reagentom TRIZOL[®] Reagent Invitrogen Life Technologies[™] (Carlsbad, Kalifornija, ZDA) po enakem postopku kot pri vzorcih klopov.

3.2.1.4 Avtomatska izolacija RNA iz seruma

Komplet EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Hilden, Nemčija) omogoča avtomatiziran postopek izolacije celokupne RNA iz seruma, z uporabo delovne postaje EZ1 Advanced XL. Tehnologija izolacije nukleinskih kislin vključuje štiri korake: proteolizo seruma s proteinazo K in inaktivacijo ribonukleaz, vezavo nukleinskih kislin na površino magnetnih delcev, spiranje vezanih nukleinskih kislin z dvema spiralnima pufroma in etanolom ter elucijo očiščenih nukleinskih kislin z elucijskim pufrom. Izolacija RNA poteka v delovni postaji EZ1 Advanced XL pri sobni temperaturi. Protokoli za izolacijo RNA se nahajajo na karticah EZ1.

Pred začetkom izolacije smo v ugasnjeno delovno postajo vstavili kartico EZ1 Virus, s shranjenimi protokoli za izolacijo virusne RNA iz seruma, plazme, likvorja in respiratornih brisov. Iz delovne postaje smo prenesli stojala v varnostno komoro II. stopnje, ki smo jo predhodno razkužili z 10 minutnim obsevanjem z UV lučjo, z natrijevim hipokloritom in z RNase ZAP (Applied Biosystem, Carlsbad, Kalifornija). V stojala smo vstavili kartuše z reagenti. Kartuše smo pred vstavitvijo dobro pretresli, da smo premešali magnetne delce in hkrati preverili nivo reagentov. Epruvetke, kartuše in pufri so bili priloženi v kitu. Pipete in stojala smo razkužili na enak način kot v prejšnjih postopkih. Nato smo v 2 ml epruvetke prenesli po 200 µl seruma (v primeru, da seruma ni bilo dovolj, smo vzeli 100 µl seruma). V 1,5 ml epruvetkah smo zmešali 56,4 µl pufra AVE in 3,6 µl nosilca RNA. Nosilec RNA je bil predhodno pripravljen v količini 12 µl in shranjen pri -20 °C.

Vse epruvetke in nastavke smo po navodilih proizvajalca vnesli v stojala po naslednjem vrstnem redu:

- vrsta 1: prazne 1,5 ml epruvetke za elucijo;
- vrsta 2: nosilci z nastavki;
- vrsta 3: 1,5 ml epruvetke z AVE pufrom in RNA nosilcem;
- vrsta 4: 2 ml epruvetke z vzorcem;
- kartuše z reagenti;
- prazne 2 ml epruvetke.

Stojala z epruvetkami in kartušami smo vrnili v delovno postajo. Nato smo na ekranu aparata vnesli podatke o vrsti vzorca (serum), količini vnesenega vzorca, in izbrali

elucijski volumen (60 µl). Na koncu smo preverili, če smo vse epruvetke, nastavke in kartuše vstavili pravilno, zaprli vrata postaje in zagnali protokol. Po končani izolaciji smo elucijske epruvetke zaprli z ustreznimi pokrovčki in jih shranili v hladilnik na -20 °C za nadaljnje raziskave. Stojala v delovni postaji smo izpraznili in vse epruvetke, nastavke in nosilce zavrgli v poseben kontejner. Delovno postajo smo sterilizirali tako, da smo za 30 minut vključili obsevanje z UV lučjo.

3.2.1.5 Avtomatska izolacija RNA iz krvi in tkivnih vzorcev

Kit EZ1 RNA Universal Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) omogoča avtomatiziran postopek izolacije celokupne RNA, z uporabo delovne postaje EZ1 Advanced XL in predhodno ročno pripravo vzorca z reagentom QIAzol Lysis (Qiagen, Hilden, Nemčija). Kit lahko uporabljamo za izolacijo celokupne RNA iz vseh vrst človeškega in živalskega tkiva.

Postopek izolacije s kitom EZ1 RNA Universal Tissue Kit je sestavljen iz dveh delov: prvi del vključuje homogenizacijo tkiva in fenolno lizo celic z reagentom QIAzol Lysis (Qiagen, Hilden, Nemčija). Reagent QIAzol Lysis pospešuje lizo vseh tipov tkiva in inhibira ribonukleaze. Po dodatku kloroforma in centrifugiranju se homogenat loči na vodno in organsko fazo, ki ju ločuje vmesna, beljakovinska faza. Vodna faza vsebuje raztopljeno RNA, organska pa fenol in kloroform. Vodno fazo uporabimo v drugem, avtomatiziranem delu postopka izolacije RNA.

Pred začetkom izolacije smo kri, klope in tkiva pripravili v varnostni komori II. stopnje. Komoro, centrifugo in pipete smo pred delom razkužili z natrijevim hipokloritom in z RNase ZAP (Applied Biosystem, Carlsbad, Kalifornija). Priprava vzorcev je potekala po naslednjem postopku:

Pri vzorcih krvi: v 2 ml epruvetko smo prenesli 200 µl krvi in ji dodali 750 µl QIAzol reagenta, ki smo ga hranili v temi na sobni temperaturi. Vzorec z reagentom smo 5-krat sunkovito obrnili, na kratko vorteksirali in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 150 µl kloroforma in inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi. Centrifugo smo ohladili na 4 °C in po inkubaciji vzorce centrifugirali 15 minut pri 12.000 obratih/minuto.

V nove 2 ml epruvetke smo previdno prenesli zgornjo, vodno fazo, v kateri je bila raztopljena RNA. Preostanek smo zavrgli v posebno steklenico, označeno z napisom fenol in nalepko biohazard. Na pokrovčke 1,5 ml elucijskih epruvetk smo napisali zaporedno številko izolacije RNA in jih shranili v škatlici ob aparatu.

Pri tkivnih vzorcih: na objektnem stekelcu, ki smo ga predhodno očistili z absolutnim etanolom, smo s sterilnim skalpelom odrezali košček vranice (približno 1 mm³). Košček tkiva smo nato prenesli v 2 ml epruvetko, mu dodali kroglico za homogenizacijo in 750 µl QIAzol reagenta. Epruvetke smo nato prenesli v plastične posodice in jih vstavili v homogenizator TissueLyser (Qiagen, Hilden, Nemčija). Vzorce smo homogenizirali 5 minut pri 30.000 tresljajih/minuto. Epruvetke s homogenatom smo nato inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. S sterilno pinceto smo odstranili kroglico za homogenizacijo in dodali 150 µl kloroforma. Vzorec smo nato kratko centrifugirali in inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi. Po 15 minutnem centrifugiranju pri 4 °C in 12.000 obratih/minuto, smo vodno fazo previdno prenesli v novo 2 ml epruvetko. Preostanek smo zavrgli v posebno steklenico, označeno z napisom fenol in nalepko biohazard.

Pri vzorcih klopov: v 2 ml epruvetko smo prenesli 100 µl homogenata klopa ali polovico klopa (1 mm³) in mu dodali kroglico za homogenizacijo in 750 µl QIAzol reagenta, ki smo ga hranili v temi na sobni temperaturi. Epruvetke smo nato prenesli v plastične posodice in jih vstavili v homogenizator TissueLyser (Qiagen, Hilden, Nemčija). Vzorce smo homogenizirali 5 minut pri 30.000 tresljajih/minuto. Epruvetke s homogenatom smo nato inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. S sterilno pinceto smo odstranili kroglico za homogenizacijo in dodali 150 µl kloroforma. Vzorec smo nato kratko centrifugirali in inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi. Po 15 minutnem centrifugiranju pri 4 °C in 12.000 obratih/minuto, smo vodno fazo previdno prenesli v novo 2 ml epruvetko. Preostanek smo zavrgli v posebno steklenico, označeno z napisom fenol in nalepko biohazard.

Pred začetkom izolacije smo v ugasnjeno delovno postajo vstavili kartico EZ1 RNA, s shranjenimi protokoli za izolacijo RNA iz tkiv. Iz delovne postaje smo prenesli stojala v varnostno komoro II. stopnje. V stojala smo vstavili kartuše z reagenti. Kartuše smo pred

vstavitvijo dobro pretresli, da smo premešali magnetne delce in hkrati preverili nivo reagentov. Epruvetke, kartuše, nastavki in nosilci so bili priloženi v kitu. Vse epruvetke in nastavke smo po navodilih proizvajalca vnesli v stojala po naslednjem vrstnem redu:

- vrsta 1: prazne 1,5 ml epruvetke za elucijo;
- vrsta 2: nosilci z nastavki;
- vrsta 3: nosilci z nastavki;
- vrsta 4: 2 ml epruvetke z vzorcem;
- kartuše z reagenti.

Stojala z epruvetkami in kartušami smo postavili v delovno postajo. Nato smo na ekranu aparata vnesli podatke o vrsti vzorca, količini vnesenega vzorca, in izbrali elucijski volumen (50 µl). Na koncu smo preverili, če smo vse vstavili pravilno, zaprli vrata postaje in zagnali protokol. Po končani izolaciji smo elucijske epruvetke zaprli z ustreznimi pokrovčki in jih shranili v hladilnik na -20 °C za nadaljnje raziskave. Stojala v delovni postaji smo izpraznili in vse epruvetke, nastavke in nosilce zavrgli v poseben kontejner. Delovno postajo smo sterilizirali tako, da smo za 30 minut vključili obsevanje z UV lučjo.

3.2.2 Teoretične osnove enostopenjskega kvantitativnega RT-PCR v realnem času

Enostopenjski kvantitativen RT-PCR v realnem času vključuje reverzni prepis RNA in klasičen postopek PCR v realnem času v eni epruvetki. Metoda vključuje oba encima: reverzno transkriptazo in DNA polimerazo. Encim reverzna transkriptaza prepíše RNA matrico v komplementarno DNA, ki potem služi kot matrica za nadaljnje pomnoževanje. Med postopkom PCR Taq DNA polimeraza cepi TaqMan sondo, ki ima na 5' koncu vezano reportersko fluorescenčno barvilo in na 3' koncu dušilec. Ko Taq DNA polimeraza cepi sondo s 5' proti 3' nukleazno aktivnostjo, se fluorescenčno barvilo odstrani od dušilca in fluorescira. Količina izsevane fluorescence je sorazmerna količini PCR pridelkov. Test vključuje tudi interno kontrolo, s katero kontroliramo prisotnost inhibitorjev, zato nam pomaga odkriti lažno negativne rezultate. Interna kontrola je zasnovana enako kot tarčno zaporedje divjega tipa virusa, vendar se od njega razlikuje le v zaporedju, kamor nalega

sonda, specifična za interno kontrolo. Specifične lastnosti začetnih oligonukleotidov in sond TaqMan omogočajo sočasno pomnoževanje in detekcijo divjega tipa virusa in interne kontrole. Pozitivno kontrolo reakcije predstavljajo v test vključeni standardi. To so redčitve kloniranih tarčnih prepisov divjega tipa virusa KME. Standardi so potrebni za izris umeritvene krivulje, na podlagi katere računalniški program izračuna koncentracijo RNA v reakcijski mešanici. Metoda je visoko občutljiva, saj lahko v testiranem vzorcu zaznamo manj kot 10 kopij virusne RNA. Visoka občutljivost je izrednega pomena, saj je lahko v času testiranja količina virusne RNA v vzorcu izredno mala (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

3.2.3 Izbira začetnih oligonukleotidov, sonde in interne kontrole

Z začetnimi oligonukleotidi izberemo odsek virusnega genoma, ki ga želimo pomnožiti, zato je pravilen izbor le-teh najpomembnejši korak optimizacije PCR (Poljak, 2005).

Za dokazovanje virusa KME smo izbrali začetna oligonukleotida, ki sta homologna zaporedju nekodirajoče regije, na 3' koncu virusnega genoma. Z začetnima oligonukleotidoma F-TBE1 (nukleotidno zaporedje: 5'-GGGCGGTTCTTGTTCTCC-3') in R-TBE1 (nukleotidno zaporedje: 5'-ACACATCACCTCCTTGTCAGACT-3') smo pomnoževali 67 baznih parov dolg tarčni odsek 3' nekodirajoče regije virusnega genoma. Kot sondo smo izbrali TBE-Probe-WT (TaqMan sonda) (nukleotidno zaporedje: 5'-TGAGCCACCATCACCCAGACACA -3'). Na 5' koncu sonde je bilo vezano barvilo FAM, na 3' koncu sonde pa dušilec TAMRA. Interna kontrola je bila osnovana tako, da se je od tarčnega zaporedja divjega tipa virusa KME razlikovala le v zaporedju, kamor nalega sonda. Zato smo za interno kontrolo uporabili posebno sondo YFP 3 (nukleotidno zaporedje: 5'-ACACAGACCCACTACCACCGAGTGG-3'), ki je imela na 5' koncu vezano barvilo JOE in na 3' koncu dušilec TAMRA. Začetne oligonukleotide in sondo smo izbrali na podlagi članka avtorjev Schwaiger in Cassinotti (2003).

3.2.4 Enostopenjski kvantitativen RT-PCR v realnem času za dokaz virusa KME

Uporabili smo komplet reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Reakcija je potekala v aparatu Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Avstralija). Reagente smo pipetirali v posebnem prostoru, kamor vzorcev z DNA ali RNA ne prinašamo. Možnost kontaminacije reagentov je tako bistveno zmanjšana. Pred delom smo delovne površine, pipete in stojala razkužili z natrijevim hipokloritom in z RNase ZAP (Applied Biosystem, Carlsbad, Kalifornija). Po delu smo vse pripomočke in delovno površino razkužili z natrijevim hipokloritom.

Volumen reakcijske mešanice je bil 25 µl in je vseboval:

- 12,5 µl 2-krat koncentrirane reakcijske mešanice (vsebuje ustrezen puferski sistem, MgSO₄, dNTP-je in stabilizatorje);
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida F-TBE1 (50 µM);
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida R-TBE1 (50 µM);
- 0,25 µl sonde TBE-WT (20 µM);
- 0,25 µl sonde YFP 3 (20 µM);
- 2,5 µl interne kontrole (TBE IC) (redčitev 10⁻¹¹);
- 0,5 µl encima SSIII RT/Platinum Taq Mix;
- 3 µl vode;
- 5 µl RNA.

Umeritveno krivuljo smo izrisali na podlagi standardov, ki smo jih vključili v vsako reakcijo: STD 5: 10⁻⁸ (4x10⁵ kopij/reakcijo), STD 4: 10⁻⁹ (4x10⁴ kopij/reakcijo), STD 3: 10⁻¹⁰ (4x10³ kopij/reakcijo), STD 2: 10⁻¹¹ (4x10² kopij/reakcijo), STD 1: 10⁻¹² (4x10¹ kopij/reakcijo).

Temperaturni cikli so potekali po naslednjem vrstnem redu: najprej je potekal reverzni prepis RNA v komplementarno DNA (cDNA), in sicer 30 minut pri 42 °C. Nato je sledila inaktivacija reverzne transkriptaze SS III in aktivacija Platinum Taq polimeraze pri 95 °C,

4 minute. Nato je sledilo 40 temperaturnih ciklov, kjer je 15 sekund pri 95 °C potekala denaturacija hibridne dvojnovežne RNA/cDNA, prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde 1 minuto pri 60 °C in podaljševanje tarčnega odseka 1 minuto pri 60 °C. Po končani reakciji smo rezultate analizirali na računalniku in količino izhodne virusne RNA izračunali po formuli (1).

$$\frac{\text{koplj RNA}}{\text{ml}} = \frac{\text{koplj RNA/reakcija} \times \text{elucijski volumen} [\mu\text{l}] \times 1000}{\text{volumen RNA v reakciji} [\mu\text{l}] \times \text{dslovni volumen vzorca} [\mu\text{l}]} \quad \dots (1)$$

Vzorci, pri katerih se je krivulja dvignila nad linijo fluorescenčnega praga oz. pri katerih je bila podana vrednost Ct, smo obravnavali kot pozitivne.

3.2.5 Kvantifikacija celokupne RNA

Uspešnost izolacije RNA smo preverili tudi z merjenjem koncentracije celokupne RNA z metodo spektroskopije. Za merjenje koncentracije RNA smo uporabili spektrofotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, ZDA). ND-1000 je spektrofotometer, ki meri absorbanco DNA, RNA, proteinov in barvil. Spekter valovnih dolžin, ki jih lahko izmeri, je širok od 220 do 750 nm. ND-1000 meri absorbanco s pomočjo dveh optičnih vlaken, ki sta vgrajeni v merilnem podstavku in krovnem delu aparata. Prednost tega spektrofotometra je, da lahko meri koncentracijo snovi že v 1 µl vzorca. Pri merjenju absorbance ni potrebna uporaba kivet (NanoDrop Technologies, 2007).

Vzorec izolirane RNA (2 µl) smo odpipetirali na merilni podstavek in izmerili koncentracijo celokupne RNA. Da bi preprečili prenašanje vzorca med merjenjem, smo po vsakem merjenju merilni podstavek in krovni del aparata obrisali s staničevino. Po približno desetih merjenjih smo merilne površine očistili tudi z 2 µl sterilne deionizirane vode.

3.2.6 Statistična obdelava podatkov

3.2.6.1 Preizkus domneve o razliki povprečij za odvisna vzorca

S preizkusom o razliki povprečij smo želeli preveriti ali v povprečju ročna in avtomatska izolacija dajeta enake rezultate (v povprečju enake koncentracije RNA). Analizirana spremenljivka pri uporabi tega statističnega modela je razlika vrednosti na parih, zato preizkus o razliki povprečij imenujemo tudi preizkus parov (Košmelj, 2007).

Pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$ smo definirali ničelno in alternativno domnevo:

- Ničelna domneva: Povprečje razlik je 0 oz. metodi izolacije v povprečju dajeta enake rezultate.
- Alternativna domneva: Povprečje razlik ni 0 oz. metodi izolacije v povprečju ne dajeta enakih rezultatov.

Testno statistiko (t-statistiko) smo izračunali po enačbi (2).

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_{D0}}{s_d / \sqrt{n}} \quad \dots (2)$$

Pri čemer povprečni \bar{d} pomeni povprečje razlik koncentracij RNA, pridobljenih z obema metodama izolacije μ_{D0} predstavlja povprečje razlik, ki ga pričakujemo in je v našem primeru 0, s_d predstavlja standardno deviacijo razlik koncentracij RNA, n je število parov, ki jih proučujemo. Pri preizkušanju domnev smo preverjali tudi vrednost p . Če je bila vrednost p manjša od α , smo rezultate obravnavali kot statistično značilne. Če je bila vrednost p večja od α , smo ničelno domnevo obdržali in rezultate obravnavali kot statistično neznačilne.

Testno statistiko smo izračunali s programom SPSS Statistics 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ZDA). Rezultate smo obdelovali za vsak tip vzorca posebej.

4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 30 humanih in 32 živalskih vzorcev. Humani vzorci so vključevali 12 vzorcev krvi in 18 serumskih vzorcev. V raziskavo smo vključili tudi 22 tkivnih vzorcev miši, vrste *Apodemus flavicollis* in voluharic, vrste *Myodes glareolus* ter 10 skupin klopov, vrste *Ixodes ricinus*. Iz pridobljenih vzorcev smo z ročno in avtomatsko izolacijo izolirali celokupno RNA. Pri 35 vzorcih je bila ročna izolacija opravljena že predhodno, v istem laboratoriju po enaki metodi. Uspešnost izolacije RNA smo ovrednotili s kvantitativnim RT-PCR v realnem času, ki specifično pomnožuje tarčni odsek na virusnem genomu. Uspešnost izolacije RNA smo dodatno preverili tudi z merjenjem koncentracije celokupne RNA z metodo spektroskopije. Vsi pridobljeni rezultati so v prilogah A, B, C in D.

4.1 PRIMERJAVA USPEŠNOSTI ROČNE IN AVTOMATSKE IZOLACIJE RNA

Uspešnost ročne in avtomatske izolacije smo preverili s kvantitativnim enostopenjskim RT-PCR v realnem času. Primerjava skladnosti rezultatov, pridobljenih po obeh metodah izolacije je prikazana v preglednicah 1, 2, 3 in 4. Iz preglednice 1 je razvidno, da smo pri vseh vzorcih krvi, z obema metodama dobili enake rezultate. Dokazali smo 5 (41,7 %) pozitivnih vzorcev krvi in 7 (58,3 %) negativnih vzorcev.

Preglednica 1: Primerjava skladnosti ročne in avtomatske izolacije virusne RNA za 12 vzorcev humane krvi.

		Ročna izolacija RNA (Trizol LS)	
		pozitivni	negativni
Avtomatska izolacija RNA (RNA Universal)	pozitivni	5 (41,67 %)	0 (0,00 %)
	negativni	0 (0,00 %)	7 (58,33 %)

Iz preglednice 2 je razvidno, da smo pri 18 vzorcih seruma z avtomatsko metodo izolacije dokazali 2 (11,1 %) pozitivna vzorca več kot z ročno izolacijo. Z ročno izolacijo smo dokazali 8 (44,4 %) pozitivnih vzorcev, z avtomatsko pa 10 (55,5 %).

Preglednica 2: Primerjava skladnosti ročne in avtomatske izolacije virusne RNA za 18 vzorcev humanega seruma.

		Ročna izolacija RNA (Trizol LS)	
		pozitivni	negativni
Avtomatska izolacija RNA (Virus Mini kit)	pozitivni	8 (44,44 %)	2 (11,11 %)
	negativni	0 (0,00 %)	8 (44,44 %)

Pri dokazovanju virusne RNA iz tkivnih vzorcev smo bili bolj uspešni z ročno metodo izolacije. Z ročno metodo izolacije smo namreč potrdili 16 (72,7 %) pozitivnih vzorcev, medtem ko smo z avtomatsko izolacijo potrdili le 12 (54,5 %) pozitivnih vzorcev (preglednica 3).

Preglednica 3: Primerjava skladnosti ročne in avtomatske izolacije virusne RNA za 22 živalskih tkivnih vzorcev.

		Ročna izolacija RNA (Trizol)	
		pozitivni	negativni
Avtomatska izolacija RNA (RNA Universal)	pozitivni	12 (54,55 %)	0 (0,00 %)
	negativni	4 (18,18 %)	6 (27,27 %)

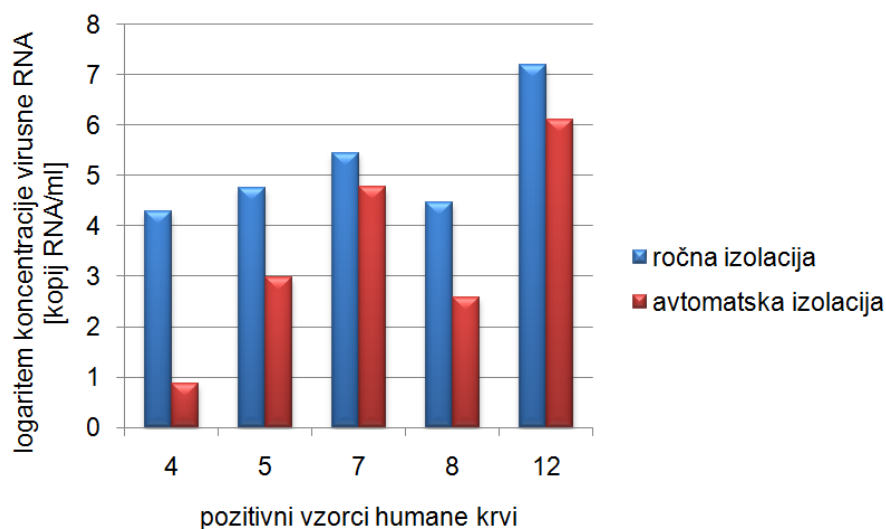
Od 10 skupin klopov smo z ročno metodo izolacije RNA uspeli dokazati 5 (50 %) pozitivnih, medtem ko smo z avtomatsko izolacijo dokazali le 2 (20 %) pozitivni skupini (preglednica 4).

Preglednica 4: Primerjava skladnosti ročne in avtomatske izolacije virusne RNA za 10 skupin klopov.

		Ročna izolacija RNA (Trizol)	
		pozitivni	negativni
Avtomatska izolacija RNA (RNA Universal)	pozitivni	2 (20 %)	0 (0,00 %)
	negativni	3 (30 %)	5 (50 %)

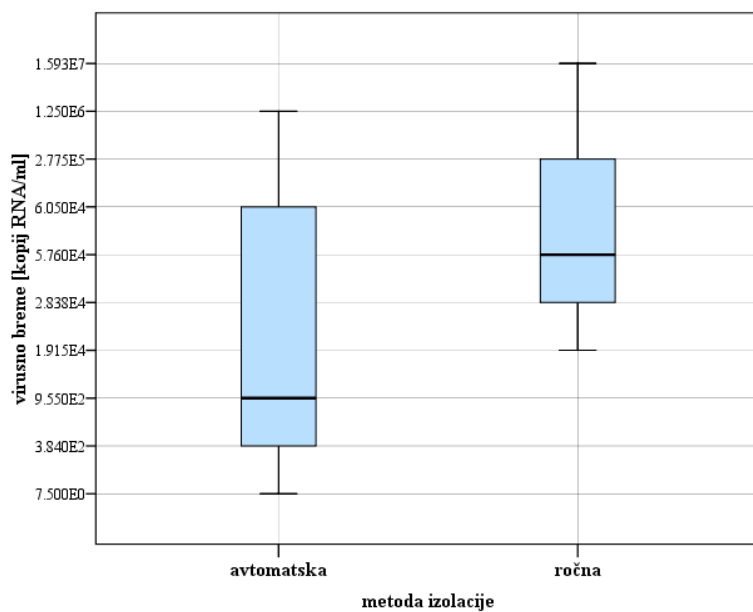
Primerjave izmerjenih koncentracij virusne RNA (RNA kopij/ml), pridobljenih po obeh metodah izolacije, so prikazane na slikah 7, 9, 11 in 13. Zaradi večje preglednosti smo izvzeli vzorce, pri katerih virusne RNA po obeh metodah izolacije nismo dokazali. Preostale koncentracije virusne RNA smo nato logaritmirali. S tem smo dobili enakomernejšo porazdelitev koncentracij virusne RNA na grafu in zmanjšali vpliv zelo visokih in zelo nizkih koncentracij virusne RNA. Zaradi večje preglednosti smo rezultate predstavili tudi z okvirji z ročaji (slike 8, 10 in 12). Tudi v tem primeru smo izvzeli vzorce, pri katerih virusne RNA po obeh metodah izolacije nismo uspeli dokazati.

Od 12 vzorcev krvi smo virusno RNA uspeli dokazati pri 5 vzorcih (slika 7). Iz slike 7 je razvidno, da smo pri vseh 5 pozitivnih vzorcih krvi, pri ročni izolaciji, dobili višje koncentracije virusne RNA kot pri avtomatski izolaciji.



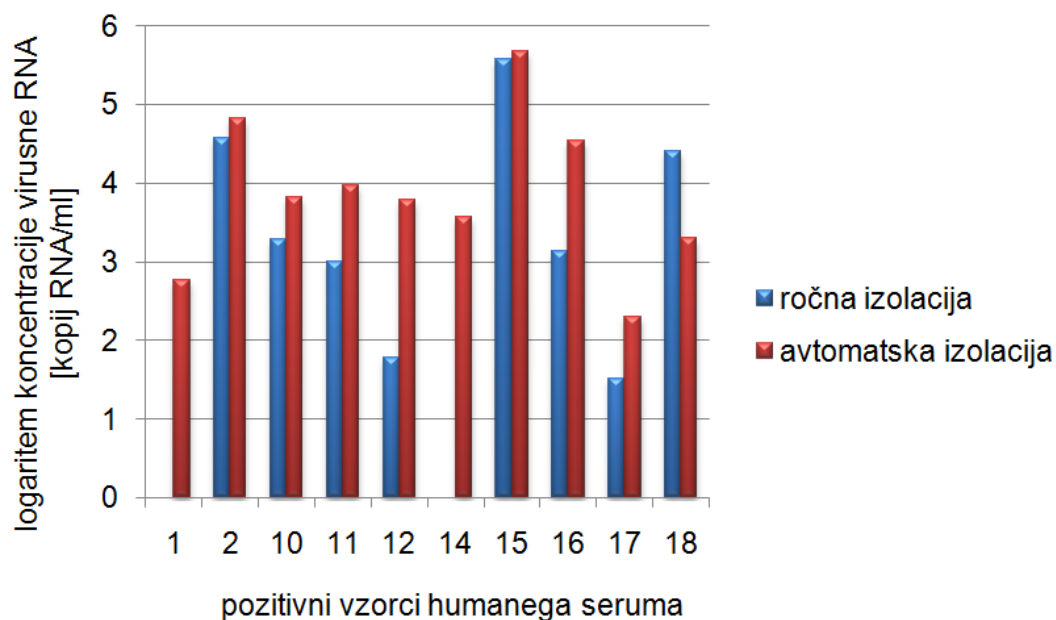
Slika 7: Primerjava izmerjenih koncentracij virusne RNA (kopij RNA/ml) iz 5 pozitivnih vzorcev humane krvi po ročni in po avtomatski izolaciji.

Hiter pregled nad koncentracijami virusne RNA, izoliranih iz vzorcev krvi, nudi slika 8. Okvirja z ročaji kažeta bistvene razlike v porazdelitvi koncentracij virusne RNA.



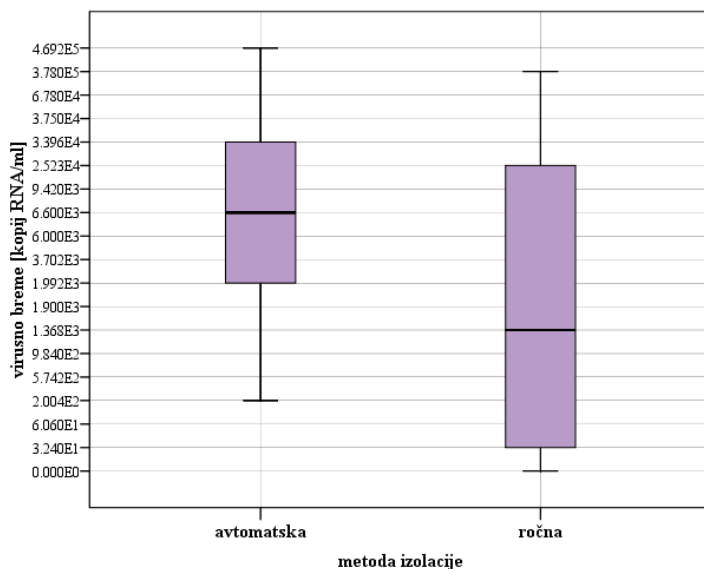
Slika 8: Porazdelitev koncentracije virusne RNA, izolirane z avtomatsko in ročno metodo iz 5 pozitivnih vzorcev humane krvi.

Od 18 vzorcev seruma je bilo 10 vzorcev pozitivnih. Pri 9 vzorcih so bile koncentracije virusne RNA višje pri avtomatski metodi izolacije (slika 9). Iz slike 9 je tudi razvidno, da smo pri 2 vzorcih (vzorca 1 in 14) virusno RNA uspeli dokazati le pri avtomatski metodi izolacije.



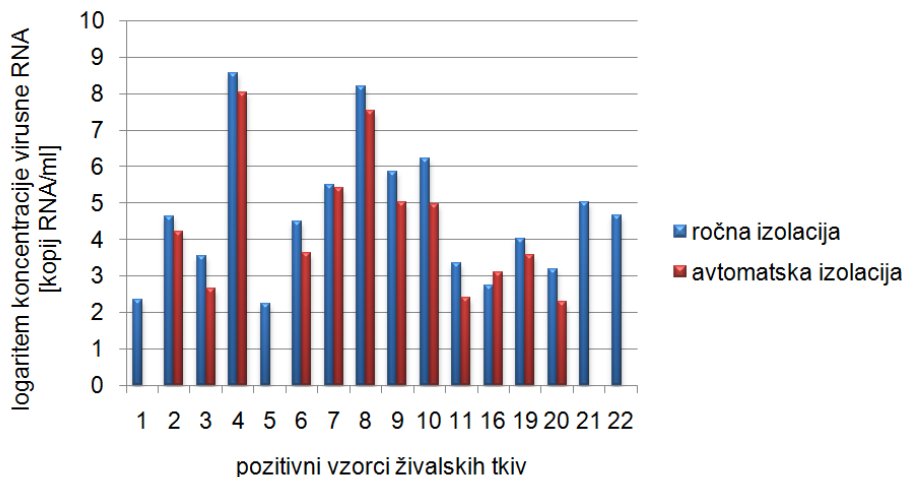
Slika 9: Primerjava izmerjenih koncentracij virusne RNA (kopij RNA/ml) iz 10 pozitivnih vzorcev humanega seruma po ročni in po avtomatski izolaciji.

Slika 10, kjer sta prikazana okvirja z ročaji za vzorce seruma, kaže bistveno razliko v porazdelitvi koncentracij virusne RNA.



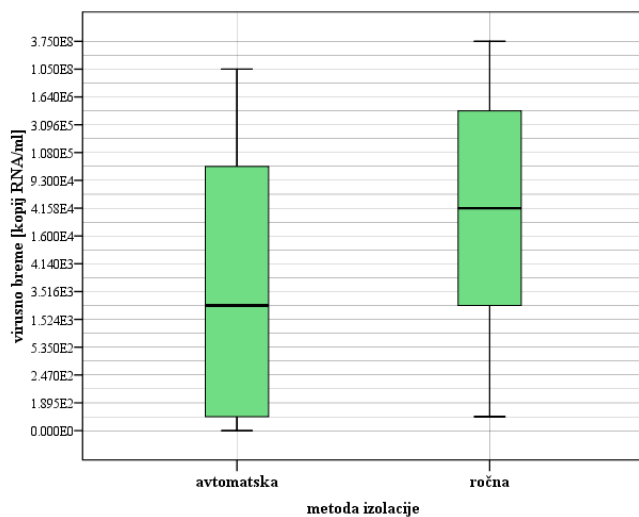
Slika 10: Porazdelitev koncentracije virusne RNA, izolirane z avtomatsko in ročno metodo iz 10 pozitivnih vzorcev humanega seruma.

Od 22 tkivnih vzorcev je bilo 16 vzorcev pozitivnih (slika 11). Koncentracija virusne RNA je bila pri 15 vzorcih višja pri ročni metodi izolacije. Pri 4 vzorcih smo virusno RNA uspeli dokazati le z ročno metodo izolacije (vzorci 1, 5, 21, 22). Na sliki 11 vidimo, da je bila avtomatska metoda izolacije uspešnejša le v enem primeru (vzorec 16).



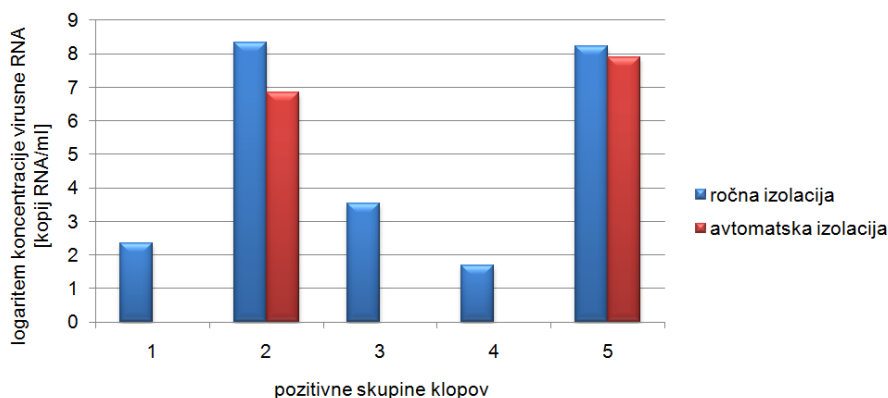
Slika 11: Primerjava izmerjenih koncentracij virusne RNA (kopij RNA/ml) iz 16 pozitivnih živalskih tkivnih vzorcev po ročni in po avtomatski izolaciji.

Slika 12, kjer sta prikazana okvirja z ročaji za tkivne vzorce, kaže bistvene razlike v porazdelitvi koncentracij virusne RNA.



Slika 12: Porazdelitev koncentracije virusne RNA, izolirane z avtomatsko in ročno metodo iz 16 pozitivnih živalskih tkivnih vzorcev.

Od 10 skupin klopov je bilo le 5 pozitivnih (slika 13). V vseh 5 primerih je bila virusna koncentracija RNA višja z ročno metodo izolacije. Pri 3 skupinah klopov (vzorci 1, 3 4) virusne RNA nismo uspeli dokazati z avtomatsko metodo izolacije.

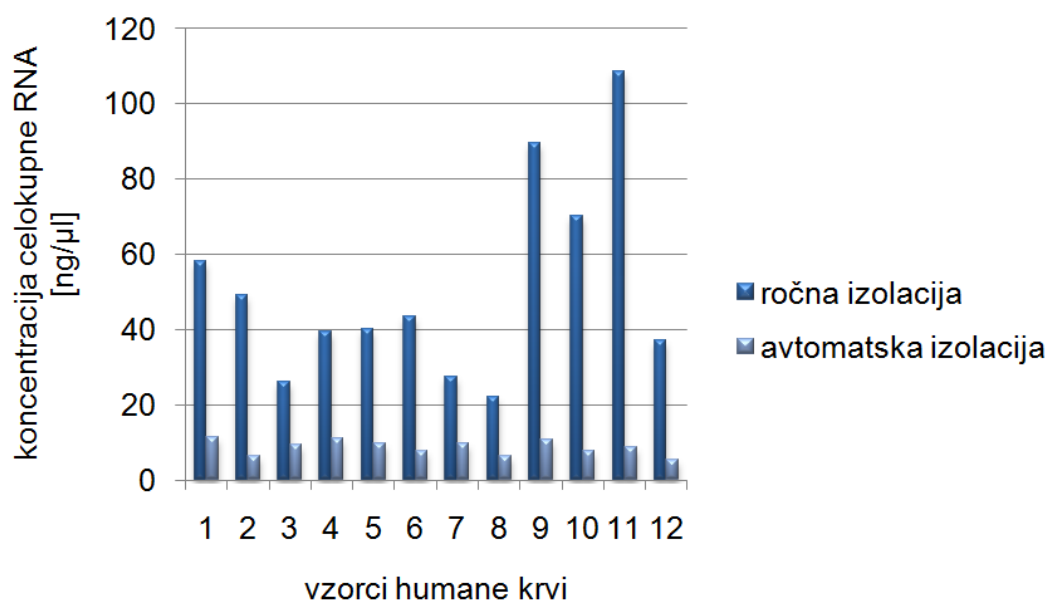


Slika 13: Primerjava izmerjenih koncentracij virusne RNA (kopij RNA/ml) iz 5 pozitivnih skupin klopov po ročni in po avtomatski izolaciji.

4.2 KVANTIFIKACIJA CELOKUPNE RNA S SPEKTROFOTOMETRIJO

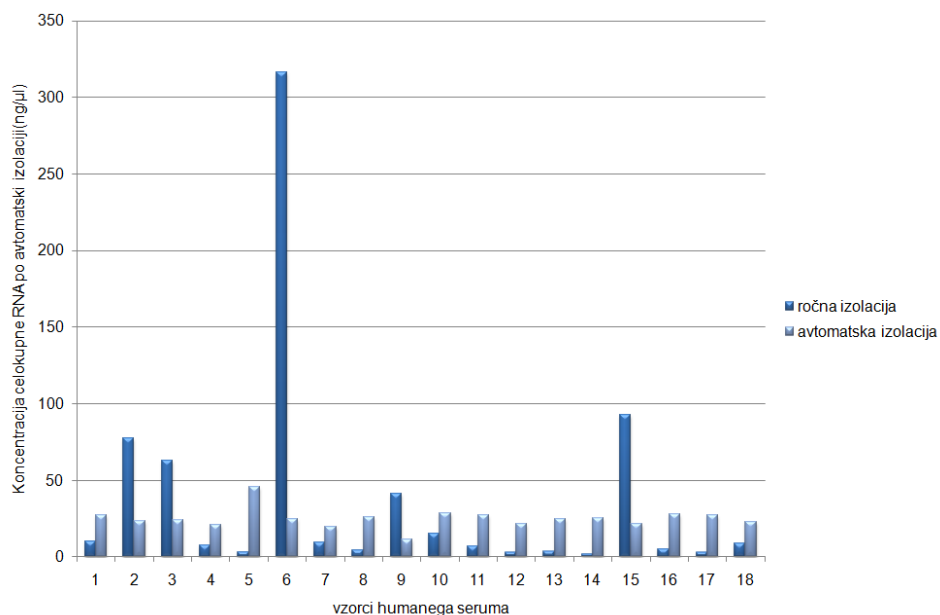
S kvantifikacijo celokupne RNA smo želeli dodatno preveriti, s katero metodo izolacije smo izolirali več RNA. Na slikah 14, 15, 16 in 17 so prikazane koncentracije celokupne RNA, izmerjene s spektrofotometrom, po ročni in avtomatski izolaciji.

Iz slike 14 je razvidno, da smo pri vseh 12 (100 %) vzorcih krvi, z ročno izolacijo izolirali več RNA kot z avtomatsko.



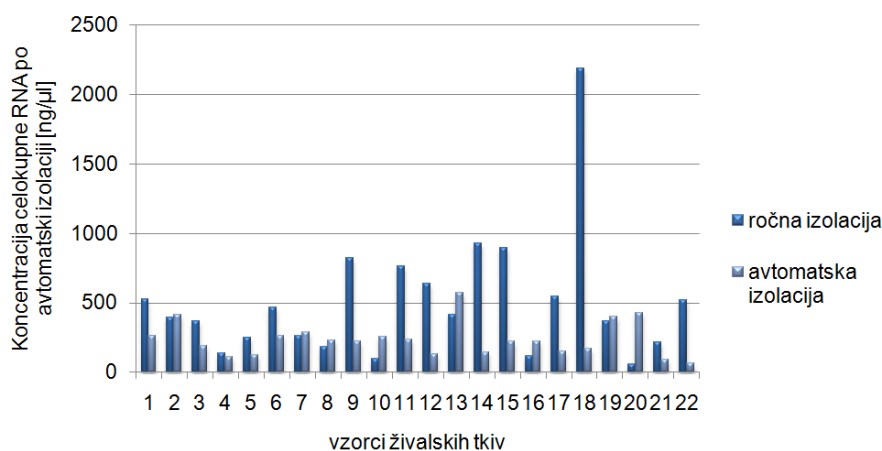
Slika 14: Primerjava izmerjenih koncentracij celokupne RNA (ng/μl) iz 12 vzorcev humane krvi po obeh metodah izolacije.

Iz slike 15 je razvidno, da smo bili pri vzorcih seruma uspešnejši z avtomatsko izolacijo. Od 18 vzorcev seruma smo pri 13 (72,2 %) vzorcih izolirali več RNA z avtomatsko metodo in le pri 5 (27,8 %) vzorcih smo več RNA izolirali z ročno metodo izolacije.



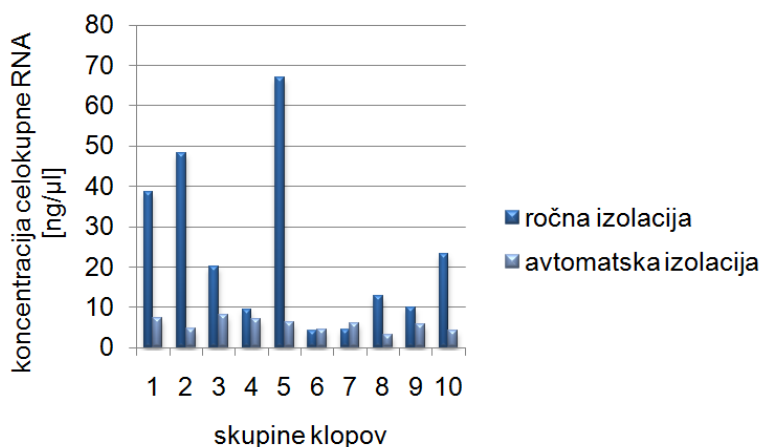
Slika 15: Primerjava izmerjenih koncentracij celokupne RNA (ng/μl) iz 18 vzorcev humanega seruma po obeh metodah izolacije.

Ročna izolacija RNA je bila pri tkivnih vzorcih uspešnejša od avtomatske. Pri 14 vzorcih (63,6 %) je bila uspešnejša ročna metoda, pri 8 (36,4 %) pa avtomatska (slika 16).



Slika 16: Primerjava izmerjenih koncentracij celokupne RNA (ng/μl) iz 22 živalskih tkivnih vzorcev po obeh metodah izolacije.

Pri 10 skupinah klopov je bilo več RNA izolirane z ročno metodo, in sicer pri 8 (80 %) vzorcih (slika 17).



Slika 17: Primerjava izmerjenih koncentracij celokupne RNA (ng/μl) iz 10 skupin klopov po obeh metodah izolacije.

4.3 STATISTIČNA ANALIZA

4.3.1 Preizkus domneve o razliki povprečij

S preizkusom domneve o razliki povprečij (t-test) smo želeli preveriti ali v povprečju ročna in avtomatska izolacija dajeta enake rezultate. V ta namen smo preverili dve domnevi o razliki povprečij. Preverili smo ali so koncentracije virusne RNA, pridobljene po obeh metodah izolacije v povprečju enake. Preverili smo tudi ali so koncentracije celokupne RNA po obeh metodah izolacije v povprečju enake. V preglednicah 5 in 6 so podane povprečne koncentracije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji in rezultati statistične analize.

Z uporabo t-testa smo ugotovili, da pri vseh vzorcih (kri, serum, tkivni vzorci, skupine klopov) ni statistično značilne razlike med avtomatsko in ročno izolacijo RNA ($\alpha=0,05$; p vrednost za vzorce krvi je 0,328, p vrednost za vzorce seruma je 0,145, p vrednost za tkivne vzorce je 0,191, p vrednost za vzorce klopov je 0,202).

Ko smo s t-testom analizirali povprečne celokupne koncentracije RNA, smo ugotovili, da pri vzorcih krvi in tkivnih vzorcih obstaja statistično značilna razlika med avtomatsko in ročno izolacijo ($\alpha=0,05$; $p=0,000$ in $p=0,018$).

Glede na to, da smo za izolacijo RNA iz tkivnih vzorcev in kloпов uporabili enake postopke in reagente, smo naredili dodatno analizo, kjer smo v t-test vključili virusne koncentracije RNA vseh živalskih vzorcev. S t-testom smo pri celokupnih koncentracijah RNA dokazali, da metodi v povprečju ne dajeta enakih rezultatov ($p=0,016$).

Preglednica 5: Povprečne koncentracije virusne RNA po ročni in avtomatski izolaciji in rezultati statistične analize.

	Povprečna koncentracija virusne RNA po ročni izolaciji (RNA kopij/ml)	Povprečna koncentracija virusne RNA po avtomatski izolaciji (RNA kopij/ml)	p vrednost
Humana kri	1,36E+06	1,09E+05	0,328
Humani serum	2,47E+04	3,33E+04	0,145
Živalski tkivni vzorci	2,42E+07	6,37E+06	0,191
Skupine kloпов	3,80E+07	8,55E+06	0,202
Živalski tkivni vzorci in skupine kloпов	2,850E+07	7,054E+06	0,063

Preglednica 6: Povprečne koncentracije celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji in rezultati statistične analize.

	Povprečna koncentracija celokupne RNA po ročni izolaciji (RNA ng/ μ l)	Povprečna koncentracija celokupne RNA po avtomatski izolaciji (RNA ng/ μ l)	p vrednost
Humana kri	5,09E+01	1,09E+05	0,000
Humani serum	3,74E+01	2,51E+01	0,500
Živalski tkivni vzorci	5,07E+02	2,37E+02	0,018
Skupine kloпов	2,38E+01	5,77E+00	0,230
Živalski tkivni vzorci in skupine kloпов	3,56E+02	1,65E+02	0,016

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 UVOD

Virus klopnega meningoencefalitisa je iz družine *Flaviviridae* in je povzročitelj klopnega meningoencefalitisa (KME) v Evropi in Aziji (Masfield in sod., 2009; Avšič-Županc in sod., 2009). Poznamo tri podtipе virusa KME: evropski, daljnovzhodni in sibirski (Donoso Mantke in sod., 2008). V Sloveniji kroži evropski podtip virusa KME, katerega glavni prenašalec je klop, vrste *Ixodes ricinus*. Klopi predstavljajo naravni rezervoar virusa. Z virusom se okužijo med hranjenjem na viremičnih gostiteljih ali ob sočasnem hranjenju z okuženim klopom na neviremični živali (Avšič-Županc in sod., 2009). Človek se okuži z virusom z vbodom klopa, ali redkeje z zaužitjem okuženega nepasteriziranega mleka in mlečnih izdelkov (Dumpis in sod., 1999).

KME je vnetje osrednjega živčevja. Pri približno dveh tretjinah obolelih, ki kažejo prizadetost osrednjega živčevja, je potek bolezni dvofazen. V prvih dveh tednih po okužbi se pojavi prva faza bolezni, kjer so simptomi podobni gripi (glavobol, vročina, utrujenost, slabost). Sledi teden dni dolgo obdobje brez simptomov. Druga faza bolezni se pojavi nenadno, pri 20 do 30 % obolelih, kjer nastopijo klinični znaki meningitisa, meningoencefalitisa in meningoencefalomielitisa. Smrtnost zaradi okužbe z evropskim podtipom virusa KME je 1 do 2 % (Avšič-Županc, 2009; Donoso Mantke in sod., 2008).

Laboratorijska diagnostika KME temelji na dokazovanju specifičnih protiteles IgM in IgG v serumu in likvorju. Metoda izbire je encimsko-immunski test, ELISA. Zaradi prisotnosti navzkrižno reaktivnih protiteles in pogosto neuspešnega dokazovanja specifičnih protiteles IgM v zgodnji fazi bolezni, je uporaba metode omejena (Holzmann, 2003; Donoso Mantke in sod., 2008). V zgodnji fazi bolezni lahko dokažemo virus neposredno v vzorcih krvi in seruma z metodo RT-PCR v realnem času (Holzmann, 2003). Za uspešno dokazovanje virusa z RT-PCR v realnem času, je potrebna predhodna učinkovita izolacija virusne RNA. V današnjem času je zato na voljo večje število kompletov za izolacijo RNA, ki nudijo hiter in avtomatiziran postopek, vendar pa so primerni le za določen tip vzorca. Prav zato smo z diplomsko nalogo preverili učinkovitost avtomatiziranih kompletov glede na izolacijo RNA z ročno metodo, ki še vedno velja za zlati standard v molekularni diagnostiki.

5.2 ANALIZA REZULTATOV

Z diplomsko nalogo smo želeli preveriti učinkovitost avtomatizirane metode izolacije RNA glede na ročno izolacijo RNA. Prav tako smo želeli ugotoviti, katera metoda izolacije je bolj primerna za določen tip vzorca. V ta namen, smo med seboj primerjali uspešnost izolacije RNA iz vzorcev krvi, seruma, tkivnih vzorcev in klopov. Uspešnost izolacije smo preverili s kvantitativnim RT-PCR v realnem času in z merjenjem celokupne izolirane RNA s spektrofotometrom.

V raziskavo smo vključili 12 vzorcev humane krvi, 18 vzorcev humanega seruma, 22 tkivnih vzorcev glodavcev in 10 skupin klopov, vrste *Ixodes ricinus*. Virusno RNA smo dokazali v 5 vzorcih krvi (41,7 %), v 10 vzorcih seruma (55,6 %), v 16 tkivnih vzorcih (72,7 %) in v 5 skupinah klopov (50 %).

Pri vzorcih krvi smo z obema metodama izolacije dokazali enako število pozitivnih vzorcev (5) in negativnih vzorcev (7). Z raziskavo smo ugotovili, da je bila v vseh primerih ročna izolacija učinkovitejša, tako pri primerjavi rezultatov glede na koncentracije virusne RNA kot tudi celokupne RNA (sliki 7 in 14). S t-testom smo pri stopnji značilnosti 0,05 primerjali povprečja koncentracij virusne in celokupne RNA po obeh metodah izolacije. Po primerjavi povprečij virusne koncentracije, smo ugotovili, da med metodama izolacije ni statistično značilne razlike oz., da metodi izolacije v povprečju dajeta enake rezultate ($p=0,328$). Po primerjavi povprečji celokupne koncentracije izolirane RNA, smo ugotovili, da je med metodama izolacije statistično značilna razlika ($p=0,000$). Glede na to, da je bilo le 5 pozitivnih vzorcev krvi (41,7 %), je bil vzorec premajhen, da bi z njim lahko zaznali statistično pomembno razliko med obema metodama izolacije pri koncentraciji virusne RNA. Pri primerjavi učinkovitosti izolacije celokupne RNA smo v analizo vključili 12 vzorcev, zato je možno, da smo s to analizo prišli do pravilnejših rezultatov. Pri avtomatski izolaciji RNA iz krvi smo uporabili Kit EZ1 RNA Universal Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) po protokolu, ki ga priporoča proizvajalec. Kljub temu, smo ugotovili, da je učinkovitost avtomatske izolacije RNA iz krvi manjša, za kar lahko obstajata dve razlagi: 1) protokol, ki ga priporoča proizvajalec ni najbolj primeren za tip vzorca, ki smo ga testirali ali 2) večja uspešnost ročne izolacije je posledica izolacije RNA iz bolj svežih vzorcev (pri 3 od 5 vzorcev je bila ročna izolacija narejena takoj po odvzemu vzorca).

Glede na to, da so molekule RNA zelo občutljive, lahko zamrzovanje in odtajanje vzorcev negativno vpliva na njihovo stabilnost.

Pri serumskih vzorcih je iz preglednice 2 razvidno, da smo z avtomatsko izolacijo dokazali več pozitivnih vzorcev (10) kot z ročno izolacijo (8). Na sliki 9 vidimo, da je od 10-tih pozitivnih vzorcev, pri 9-tih bila avtomatska izolacija bolj učinkovita. Prav tako je tudi koncentracija celokupne RNA pri avtomatski izolaciji višja pri večini vzorcev (13 od 18). Kljub temu, pa je statistična analiza v obeh primerih pokazala, da metodi v povprečju dajeta enake rezultate ($p=0,145$ in $p=0,500$). Pri vzorcih seruma je potrebno omeniti, da je ročna izolacija potekala predhodno le pri enem vzorcu. Ker je bil ta vzorec po obeh izolacijah negativen, ne prispeva k zaključku, da je pri serumskih vzorcih avtomatska izolacija RNA učinkovitejša.

V nasprotju je ročna metoda izolacije RNA iz tkivnih vzorcev uspešnejša, saj smo dokazali več pozitivnih vzorcev. Od 22 vzorcev smo z ročno izolacijo dokazali 16 pozitivnih vzorcev (72,7 %) in z avtomatsko 12 (54,5 %). V 15 primerih od 16 pozitivnih vzorcev smo z ročno metodo izolacije RNA dokazali višje koncentracije virusne RNA v vzorcih. Še več, pri 4 vzorcih smo virus lahko dokazali le po ročni metodi izolacije. Celokupne koncentracije RNA so bile v 14 primerih (63,6 %) višje po ročni metodi izolacije. S t-testom smo pri stopnji značilnosti 0,05 primerjali povprečja koncentracij virusne in celokupne RNA po obeh metodah izolacije. Po primerjavi povprečij virusne koncentracije, smo ugotovili, da med metodama izolacije ni statistično značilne razlike ($p=0,191$). Po primerjavi povprečji celokupne koncentracije izolirane RNA, smo ugotovili, da med metodama izolacije obstaja statistično značilna razlika ($p=0,018$). Razlog, da smo statistično značilno razliko dobili le pri primerjavi povprečij celokupnih koncentracij RNA, je morda ta, da je bila RNA z ročno izolacijo iz vseh tkivnih vzorcev izolirana predhodno. Kot smo omenili že prej, lahko izolacija, ki poteka pred zamrzovanjem vzorca, pozitivno vpliva na uspešnost izolacije RNA. Ne glede na to, pa se količina virusne RNA v tkivnih vzorcih ni razlikovala toliko, da bi zaznali statistično značilno razliko. Povprečni koncentraciji virusa v tkivnih vzorcih po ročni in po avtomatski izolaciji sta bili: $2,42 \times 10^7$ in $6,37 \times 10^6$ kopij/ml homogeniziranega tkiva.

Za primerjavo metod na vzorcih klosov smo si izbrali 5 pozitivnih in 5 negativnih skupin klosov. Pri primerjavi ročne in avtomatske metode izolacije RNA, se je ročna izolacija izkazala za učinkovitejšo. Z avtomatsko metodo izolacije smo dokazali virusno RNA le pri

2 skupinah klopov. Glede na to, da je bil vzorec klopov premajhen (10 skupin klopov), da bi z njim lahko zaznali statistično pomembno razliko med obema metodama izolacije, in glede na to, da smo za izolacijo RNA iz tkivnih vzorcev in klopov uporabili enake postopke in reagente, smo naredili dodatno analizo, kjer smo v t-test vključili virusne koncentracije RNA vseh živalskih vzorcev. Statistična analiza primerjav virusnih koncentracij je pokazala, da med metodama izolacije ni statistično značilne razlike ($p=0,063$), vendar, je bil p manjši kot v analizi, kjer smo vključili samo klope ($p=0,202$). Pri analizi celokupne koncentracije RNA, smo ugotovili, da je pri živalskih vzorcih statistično značilna razlika med ročno in avtomatsko izolacijo RNA ($p=0,016$). V tem primeru je vrednost p dokazala statistično pomembno razliko v primerjavi s prejšnjo analizo, ki je vključevala samo klope ($p=0,230$).

Z diplomsko nalogo smo ugotovili, da je pri serumskih vzorcih avtomatska izolacija RNA učinkovitejša. Poleg tega je avtomatska izolacija RNA tudi hitrejša, enostavnejša in zmanjšuje možnost kontaminacije vzorca, ter je zato primerna za vpeljavo v rutinsko diagnostiko virusa KME. V nasprotju s tem pa je ročna izolacija RNA še vedno zlati standard pri izolaciji virusne RNA iz tkiv in krvi, ki veljajo za bolj zahtevne vzorce, saj vsebujejo več nečistoč. Kljub temu, bi za statistično zanesljivejše rezultate potrebovali večje število vzorcev, ki bi jih hkrati izolirali z obema metodama.

6 SKLEPI

- Pri serumskih vzorcih je avtomatska izolacija primerna metoda za izolacijo RNA. Avtomatska metoda je hitra, relativno enostavna za izvajanje in učinkovita ter zato primerna za uporabo v rutinski diagnostiki.
- Pri vzorcih krvi, tkiv in klopov avtomatska izolacija RNA ne more zamenjati ročne izolacije RNA, saj je manj občutljiva in zato ni primerna za rutinsko diagnostiko.
- Ne glede na tip vzorca (kri, serum, tkivo, klop) ni statistično značilnih razlik v koncentraciji virusne RNA med obema metodama izolacije RNA.
- Ročna metoda izolacije RNA je statistično značilno učinkovitejša pri izolaciji celokupne RNA v vzorcih krvi in tkiv.

7 POVZETEK

Virus klopnega meningoencefalitisa (KME) je povzročitelj meningoencefalitisa, ki je najpomembnejša arbovirusna bolezen v Evropi (Mansfield in sod., 2009; Avšič-Županc in sod., 2009). V Sloveniji kroži evropski podtip virusa KME, ki ga prenaša navadni gozdni klop, *Ixodes ricinus*. Klopi so glavni vir okužbe, hkrati so tudi naravni rezervoar virusa (Avšič-Županc in sod., 2009). Različne razvojne stopnje klopa zajedajo na različnih gostiteljih, malih in velikih sesalcih (Süss, 2003). Glavna gostitelja evropskega podtipa virusa KME sta rumenogrla gozdna miš (*Apodemus flavicollis*) in gozdna voluharica (*Myodes glareolus*) (Dobler, 2009).

Ljudje se najpogosteje okužijo z vbodom klopa, virus pa se lahko prenese tudi z zaužitjem okuženega nepasteriziranega mleka ali mlečnih izdelkov (Dumpis in sod., 1999). Endemična območja v Sloveniji so predvsem centralni del države, Gorenjska, Štajerska in Koroška (Avšič-Županc in sod., 2009).

V laboratorijski diagnostiki je neposredno dokazovanje virusa z verižno reakcijo s polimerazo in reverzno transkriptazo v realnem času (RT-PCR v realnem času) izrednega pomena. Nujen postopek pred samim RT-PCR v realnem času je učinkovita izolacija virusne RNA. Za izolacijo RNA je v današnjem času na voljo večje število kompletov, ki nudijo hiter avtomatiziran postopek, vendar so primerni le za določen tip vzorca.

Z diplomsko nalogo smo preverili učinkovitost teh kompletov na različnih tipih vzorcev glede na izolacijo RNA z ročno metodo, ki velja za zlati standard v molekularni diagnostiki. Izolacije RNA smo izvedli na kliničnih vzorcih (18 serumskih vzorcev in 12 vzorcev krvi) in na živalskih vzorcih (22 tkivnih vzorcev in 10 skupin klopov). V standardnem postopku ročne izolacije RNA iz krvi in seruma smo uporabili TRIZOL[®] LS Reagent (Invitrogen Life Technologies[™], Carlsbad, Kalifornija, ZDA), pri ročni izolaciji RNA iz živalskih vzorcev pa TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen Life Technologies[™], Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Za avtomatsko izolacijo RNA iz seruma smo uporabili kit EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Hilden, Nemčija), za izolacijo RNA iz krvi, tkiv ter klopov pa kit EZ1 RNA Universal Tissue Kit.

Uspešnost izolacije smo preverili s kvantitativnim enostopenjskim RT-PCR v realnem času in s kvantifikacijo celokupne RNA. Pri primerjavi virusnih koncentracij RNA, s preizkusom domneve o razliki povprečij za dva odvisna vzorca, nismo dokazali statistično

značilnih razlik med obema metodama izolacije RNA. Statistično značilno razliko v prid ročni metodi izolacije RNA smo dokazali pri primerjavi celokupne koncentracije RNA iz vzorcev krvi in tkiv. Kljub temu, lahko iz pridobljenih rezultatov sklepamo, da je ročna metoda izolacije RNA učinkovitejša pri vzorcih krvi, tkiv in klopov. Pri serumskih vzorcih pa smo dokazali, da je avtomatska izolacija RNA učinkovitejša in hitrejša, zato je primerna za vpeljavo v rutinsko diagnostiko za dokazovanje okužb z virusom KME.

8 VIRI

- Arnež M., Avšič-Županc T. 2009. Tick-borne encephalitis in children: An update on epidemiology and diagnosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7: 1251-1260
- Avšič-Županc T., Knap N., Korva M., Lotrič-Furlan S. 2009. Z vektorji preneseni virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja. *Medicinski Razgledi*, 48: 61-65
- Avšič-Županc T., Petrovec M., Jelovšek M., Strle F. 1995. Medicinsko pomembni arbovirusi v Sloveniji. *Zdravstveni Vestnik*, 64: 15-19
- Bedjanič M., Rus S., Kmet J., Vesenjāk-Zmijanac J. 1955. Virus meningo-encephalitis in Slovenia. *Bulletin of the World Health Organization*, 12: 503-512
- Blaškovič D. 1967. The public health importance of tick-borne encephalitis in Europe. *Bulletin of the World Health Organization*, 36: 5-13
- Chambers T.J., Weir R.C., Grakoui A., McCourt D.W., Bazan J.F., Fletterick R.J., Rice C.M. 1990. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 8898-8902
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159
- Chu J.J., Ng M.L. 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of Virology*, 78: 10543-10555

- Cinque P., Bossolasco S., Lundkvist A. 2003. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *Journal of Clinical Virology*, 26: 1-28
- Cockerill F.R., 2003. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 127: 1112-1120
- Cook S., Holmes E.C. 2006. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: *Flaviviridae*) and the evolution of vector transmission. *Archives of Virology*, 151: 309-325
- Dobler G. 2009. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Veterinary Microbiology*, 140: 221-228
- Donoso Mantke O., Aberle S.W., Avšič-Županc T., Labuda M., Niedrig M. 2007. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections. *Journal of Clinical Virology*, 38: 73-77
- Donoso Mantke O., Schädler R., Niedrig M. 2008. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Eurosurveillance*, 13: 9
- Dumpis U., Crook D., Oksi J. 1999. Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 28: 882-890
- Egloff M.P., Benarroch D., Selisko B., Romette J.L., Canard B. 2002. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: Crystal structure and functional characterization. *European Molecular Biology Organization Journal*, 21: 2757-2768
- Eržen I., Kraigher A. 1993. Pregled epidemioloških značilnosti KME v Sloveniji. V: Klopni meningoencefalitis. Bedjaničev simpozij, Zdravilišče Dobrna, 25. sept. 1993. Celje, Infektološka sekcija SZD in Infekcijski oddelek bolnišnice Celje: 15-25

- Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512
- Gordis L. 2004. *Epidemiology*. 3rd ed. Philadelphia, Elsevier Inc.: 335 str.
- Gould E.A., Solomon T. 2008. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*, 371: 500-509
- Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T. S., Holmes E.C., Gould E.A., de Lamballerie X. 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*, 361: 80-92
- Graščenkov N.I. 1964. Tick-borne encephalitis in the USSR. *Bulletin of the World Health Organization*, 30: 187-196
- Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57: 129-146
- Haglund M., Günther G. 2003. Tick-borne encephalitis - pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*, 21, Suppl. 1: S11-S18
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994
- Heinz F.X. 2007. *Etiology V: Tick-borne encephalitis (TBE, FSME)*. Vienna, Baxter AG: 6-14
- Heinz F.X., Allison S.L., Stiasny K., Schlich J., Holzmann H., Mandl C. W., Kunz C. 1995. Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 13: 1636-1642

- Heinz F.X., Holzmann H., Essl A., Kundi M. 2007. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 25: 7559-7567
- Holzmann H. 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 21, Suppl.1: S36-S40
- ICTVdB. 2006. Tick-borne encephalitis virus. New York, ICTVdB - The Universal Virus Database (25. apr. 2006): 1 str.
<http://www.ictvdb.org/ICTVdB/index.htm> (24. dec. 2009)
- IVZ. 2008. Navodila za cepljenje proti klopnemu meningoencefalitisu. Ljubljana, IVZ-Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (23. dec. 2008): 3 str.
<http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=848> (21. dec. 2009)
- IVZ. 2009a. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2008. Ljubljana, IVZ-Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 102 str.
- IVZ. 2009b. Klopni meningoencefalitis. Ljubljana, IVZ-Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (23. jul. 2009): 1 str.
<http://ivz.arhiv.over.net/index.php?akcija=novica&n=1189> (21. dec. 2009)
- Jääskeläinen A., Han X., Niedrig M., Vaheri A., Vapalahti O. 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis by a mu-capture immunoglobulin M-enzyme immunoassay based on secreted recombinant antigen produced in insect cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4336-4342
- Jacobs S.C., Stephenson J.R., Wilkinson G. W. 1992. High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: Protection elicited in a murine model. *Journal of Virology*, 66: 2086-2095
- Jereb M., Karner P., Muzlovič I., Jurca T. 2006. Severe tick-borne encephalitis in Slovenia in the years 2001-2005: Time for a mass vaccination campaign? *Wiener Klinische Wochenschrift*, 118: 765-768

- Kaiser R. 2008. Tick-borne encephalitis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22: 561-575
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260
- Kmet J., Vesenjajk-Zmijanac J., Bedjanič M., Rus S. 1955. Virus meningo-encephalitis in Slovenia. *Bulletin of the World Health Organization*, 12: 491-501
- Knap N., Durmiši E., Saksida A., Korva M., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Veterinary Parasitology*, 164: 275-281
- Košmelj K. 2007. *Uporabna statistika*. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
- Kraigher A., Jurk K., Eržen I. 1993. Cepljenje proti klopnemu meningoencefalitisu - izziv in uspehi. V: *Klopni meningoencefalitis. Bedjaničev simpozij, Zdravilišče Dobrna*, 25. sept. 1993. Celje, Infektološka sekcija SZD in Infekcijski oddelek bolnišnice Celje: 67-71
- Kroschewski H., Allison S.L., Heinz F.X., Mandl C.W. 2003. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 308: 92-100
- Kunz C., Heinz F.X. 2003. Tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 21, Suppl.1: S1-S2
- Kunze U. 2008. Conference report of the 10th meeting of the international scientific working group on tick-borne encephalitis (ISW-TBE): Combating tick-borne encephalitis: Vaccination rates on the rise. *Vaccine*, 26: 6738-6740

- Labuda M., Kozuch O., Zuffová E., Elecková E., Hails R.S., Nuttall P.A. 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology*, 235: 138-143
- Labuda M., Nuttall P.A., Kozuch O., Elecková E., Williams T., Zuffová E., Sabo A. 1993. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: A mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia*, 49: 802-805
- Leonova G.N., Ternovoi V.A., Pavlenko E.V., Maistrovskaya O.S., Protopopova E.V., Loktev V.B. 2007. Evaluation of vaccine Encepur[®] Adult for induction of human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*, 25: 895-901
- Lešničar J., Lešničar G. 1993. Štirideset let hospitalizacije bolnikov s klopnim meningoencefalitisom (KME) na infekcijskem oddelku bolnišnice v Celju. V: Klopni meningoencefalitis. Bedjaničev simpozij, Zdravilišče Dobrna, 25. sept. 1993. Celje, Infektološka sekcija SZD in Infekcijski oddelek Celje: 6-14
- Likar M., Kmet J. 1956. Virus meningo-encephalitis in Slovenia. 4. Isolation of the virus from the ticks *Ixodes ricinus*. *Bulletin of the World Health Organization*, 15: 275-279
- Lindquist L., Vapalahti O. 2008. Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 371: 1861-1871
- Lorenz I.C., Kartenbeck J., Mezzacasa A., Allison S.L., Heinz F.X., Helenius A. 2003. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology*, 77: 4370-4382
- Malovrh T., Marc M. 1997. Proučevanje naravnih gostiteljev virusa klopnega meningoencefalitisa v aktivnih in latentnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Medicinski Razgledi*, 36: 465-478

- Mandl C.W. 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research*, 111: 161-174
- Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H., Kunz C., Heinz F.X. 1997. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *Journal of General Virology*, 78: 1049-1057
- Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. 2009. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 90: 1781-1794
- McMinn P.C. 1997. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *Journal of General Virology*, 78: 2711-2722
- NanoDrop Technologies. 2007. NanoDrop-1000 spectrophotometer V3. 3 user's manual. Wilmington, NanoDrop Technologies, Inc.: 51 str.
- Poljak M. 2005. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski Razgledi: 129-142
- Randolph S.E. 2008a. Tick-borne encephalitis incidence in Central and Eastern Europe: Consequences of political transition. *Microbes and Infection*, 10: 209-216
- Randolph S.E. 2008b. Tick-borne encephalitis virus, ticks and humans: Short-term and long-term dynamics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21: 462-467
- Růžek D., Št'astná H., Kopecký J., Golovljova I., Grubhoffer L. 2007. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 144: 133-137

- Saksida A., Duh D., Lotrič-Furlan S., Strle F., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2005. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *Journal of Clinical Virology*, 33: 331-335
- Schwaiger M., Cassinotti P. 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology*, 27: 136-145
- Süss J. 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, 21, Suppl.1: S19-S35
- Süss J. 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond-the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance*, 13: 1-8
- Süss J., Klaus C., Gerstengarbe F.W., Werner P.C. 2008. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *Journal of Travel Medicine*, 15: 39-45
- Venturi G., Martelli P., Mazzolini E., Fiorentini C., Benedetti E., Todone D., Villalta D., Fortuna C., Marchi A., Minelli G., Ciufolini M.G. 2009. Humoral immunity in natural infection by tick-borne encephalitis virus. *Journal of Medical Virology*, 81: 665-671
- Vesenjak-Zmijanac J., Bedjanič M., Rus S., Kmet J. 1955. Virus meningo-encephalitis in Slovenia. *Bulletin of the World Health Organization*, 12: 513-520

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem svoji mentorici prof. dr. Tatjani Avšič-Županc, ker mi je omogočila opravljanje diplomskega dela v svojem laboratoriju. Posebej bi se ji rada zahvalila, da mi je omogočila spoznati kako poteka laboratorijsko delo z virusi in da sem lahko svoje izkušnje pridobila na področju, ki je del aktualne, klinično pomembne virologije.

Zahvaljujem se svoji delovni mentorici Miši Korva za strokovno vodenje med delom in za vse praktične nasvete, ki so bili vedno dobrodošli, koristni in poučni.

Najlepša hvala tudi dr. Darji Duh in Nataši Knap za pomoč pri zbiranju vzorcev in vse nasvete pri laboratorijskem delu.

Nataši Knap, delovni mentorici Miši Korva, mentorici prof. dr. Tatjani Avšič-Županc in recenzentu doc. dr. Miroslavu Petrovcu se zahvaljujem za popravke in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Rada bi se zahvalila tudi svoji mami za vso ljubezen, razumevanje in vzpodbudo in Luki za vse koristne nasvete, potrpežljivost, dobro voljo in brezpogojno podporo. Hvala vama!

PRILOGE

Priloga A: Rezultati kvantifikacije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji RNA, pridobljeni na vzorcih humane krvi.

Št. vzorca	Koncentracija virusne RNA po ročni izolaciji (RNA kopij/ml)	Rezultat RT-PCR	Koncentracija celokupne RNA po ročni izolaciji (ng/ul)	Koncentracija virusne RNA po avtomatski izolaciji (RNA kopij/ml)	Rezultat RT-PCR	Koncentracija celokupne RNA po avtomatski izolaciji (ng/ul)
1	0,0000E+00	-	58,2	0,0000E+00	-	11,3
2	0,0000E+00	-	49,1	0,0000E+00	-	6,4
3	0,0000E+00	-	26,0	0,0000E+00	-	9,3
4	1,9145E+04	+	39,4	7,5000E+00	+	11,1
5	5,7600E+04	+	40,1	9,5500E+02	+	9,9
6	0,0000E+00	-	43,6	0,0000E+00	-	7,7
7	2,7750E+05	+	27,5	6,0500E+04	+	9,7
8	2,8380E+04	+	22,0	3,8400E+02	+	6,3
9	0,0000E+00	-	89,5	0,0000E+00	-	10,7
10	0,0000E+00	-	70,3	0,0000E+00	-	7,8
11	0,0000E+00	-	108,6	0,0000E+00	-	8,9
12	1,5930E+07	+	37,0	1,2500E+06	+	5,3

Priloga B: Rezultati kvantifikacije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji RNA, pridobljeni na vzorcih humanega seruma.

Št. vzorca humanega seruma	Koncentracija virusne RNA po ročni izolaciji (RNA kopij/ml)	Rezultat RT-PCR	Koncentracija celokupne RNA po ročni izolaciji (ng/ul)	Koncentracija virusne RNA po avtomatski izolaciji (RNA kopij/ml)	Rezultat RT-PCR	Koncentracija celokupne RNA po avtomatski izolaciji (ng/ul)
1	0,0000E+00	-	10,4	5,7420E+02	+	27,4
2	3,7500E+04	+	77,2	6,7800E+04	+	23,2
3	0,0000E+00	-	62,9	0,0000E+00	-	23,9
4	0,0000E+00	-	7,9	0,0000E+00	-	20,9
5	0,0000E+00	-	3,4	0,0000E+00	-	45,7
6	0,0000E+00	-	316,6	0,0000E+00	-	24,9
7	0,0000E+00	-	9,3	0,0000E+00	-	19,7
8	0,0000E+00	-	4,6	0,0000E+00	-	26,1
9	0,0000E+00	-	41,2	0,0000E+00	-	11,7
10	1,9000E+03	+	15,4	6,6000E+03	+	28,5
11	9,8400E+02	+	7,2	9,4200E+03	+	27,4
12	6,0600E+01	+	2,9	6,0000E+03	+	21,9
13	0,0000E+00	-	3,5	0,0000E+00	-	24,9
14	0,0000E+00	-	1,9	3,7020E+03	+	25,1
15	3,7800E+05	+	92,5	4,6920E+05	+	21,6
16	1,3680E+03	+	5,3	3,3960E+04	+	28,2
17	3,2400E+01	+	2,9	2,0040E+02	+	27,2
18	2,5230E+04	+	8,7	1,9920E+03	+	22,8

Priloga C: Rezultati kvantifikacije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji RNA, pridobljeni na vzorcih živalskih tkiv.

Št. vzorca živalskega tkiva	Koncentracija virusne RNA po ročni izolaciji (RNA kopij/ml)	Rezultat RT-PCR	Koncentracija celokupne RNA po ročni izolaciji (ng/ul)	Koncentracija virusne RNA po avtomatski izolaciji (RNA kopij/ml)	Rezultat RT-PCR	Koncentracija celokupne RNA po avtomatski izolaciji (ng/ul)
1	2,2260E+02	+	523,6	0,0000E+00	-	262,2
2	4,1580E+04	+	391,6	1,6000E+04	+	411,8
3	3,5160E+03	+	365,2	4,4650E+02	+	189,1
4	3,7500E+08	+	139,4	1,0500E+08	+	112
5	1,7220E+02	+	250,3	0,0000E+00	-	126,6
6	3,1560E+04	+	466,3	4,1400E+03	+	264,1
7	3,0960E+05	+	260,0	2,6450E+05	+	286,2
8	1,5440E+08	+	184,5	3,4750E+07	+	231,3
9	7,2000E+05	+	820,9	1,0800E+05	+	224,5
10	1,6400E+06	+	95,6	9,3000E+04	+	257,8
11	2,1915E+03	+	762,4	2,4700E+02	+	234,6
12	0,0000E+00	-	636,1	0,0000E+00	-	133,7
13	0,0000E+00	-	415,0	0,0000E+00	-	571,9
14	0,0000E+00	-	927,4	0,0000E+00	-	141,6
15	0,0000E+00	-	895,2	0,0000E+00	-	222,6
16	5,3500E+02	+	117,0	1,2750E+03	+	222,9
17	0,0000E+00	-	546,4	0,0000E+00	-	153,6
18	0,0000E+00	-	2187,6	0,0000E+00	-	168,3
19	1,0440E+04	+	370,9	3,6300E+03	+	402,6
20	1,5240E+03	+	59,1	1,8950E+02	+	430,3
21	1,0325E+05	+	219,5	0,0000E+00	-	92,8
22	4,6200E+04	+	522,9	0,0000E+00	-	67,9

Priloga D: Rezultati kvantifikacije virusne in celokupne RNA po ročni in avtomatski izolaciji RNA, pridobljeni na skupinah klosov.

Št. skupine klosov	Koncentracija virusne RNA po ročni izolaciji (RNA kopij/ml)	Rezultat RT-PCR	Koncentracija celokupne RNA po ročni izolaciji (ng/ul)	Koncentracija virusne RNA po avtomatski izolaciji (RNA kopij/ml)	Rezultat RT-PCR	Koncentracija celokupne RNA po avtomatski izolaciji (ng/ul)
1	2,2980E+02	+	38,7	0,0000E+00	+	7,3
2	2,1120E+08	+	48,3	7,0000E+06	+	4,7
3	3,4500E+03	+	20,0	0,0000E+00	+	8,2
4	4,7940E+01	+	9,4	0,0000E+00	+	7,1
5	1,6860E+08	+	67,0	7,8500E+07	+	6,4
6	0,0000E+00	-	4,2	0,0000E+00	-	4,6
7	0,0000E+00	-	4,5	0,0000E+00	-	6,1
8	0,0000E+00	-	12,7	0,0000E+00	-	3,1
9	0,0000E+00	-	10,0	0,0000E+00	-	5,9
10	0,0000E+00	-	23,3	0,0000E+00	-	4,3