

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Dejan KOCON

**FILOGENETSKA ANALIZA IZOLATOV VIRUSA
KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA IZ
KLINIČNIH VZORCEV BOLNIKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Dejan KOCON

**FILOGENETSKA ANALIZA IZOLATOV VIRUSA KLOPNEGA
MENINGOENCEFALITISA IZ KLINIČNIH VZORCEV BOLNIKOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TICK BORNE ENCEPHALITIS
VIRUS ISOLATES FROM CLINICAL SAMPLES OF PATIENTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

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

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

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

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

Recenzent: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

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

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

Član: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Dejan Kocon

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.7 : 578.833.2 : 616.831.9 – 002 (043)=163.6
KG	flavivirusi/ virus klopnega meningoencefalitisa/ klopni meningoencefalitis/ meningitis/ KME/ RT-PCR/ sekveniranje/ nukleotidna zaporedja/ ovojnična beljakovina E/ nestrukturna beljakovina NS5/ filogenetka analiza/ filogenetsko drevo/ klinični vzorci
AV	KOCON, Dejan
SA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentorica) / DUH, Darja (somentorica) / POLJAK, Mario (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	FILOGENETSKA ANALIZA IZOLATOV VIRUSA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA IZ KLINIČNIH VZORCEV BOLNIKOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Virus klopnega meningoencefalitisa (KME) je RNK virus iz družine flavivirusov, ki pri ljudeh povzroča vnetje možganske ovojnice z visoko vročino. Endemičen je na azijskem območju Rusije, na Japonskem in v Evropi, kot tudi v Sloveniji. Ločimo 3 podtipe virusa z različnimi sevi. V Sloveniji še ni objavljenih podatkov o molekularnih značilnostih in genetski raznolikosti virusa. Z diplomsko nalogo smo želeli filogenetsko opredeliti virus KME in dokazati obstoj genetskih različic virusa v Sloveniji. Iz 56 vzorcev bolnikov s KME smo izolirali celokupno RNK. Z metodo RT-PCR v realnem času smo izbrali 10 geografsko razpršenih vzorcev, v katerih smo dokazali virusno RNK. Iz teh vzorcev smo pomnožili del virusnega gena za beljakovino NS5 (212 bp) in beljakovino E (753 bp). Določili smo nukleotidno zaporedje in izvedli filogenetsko analizo z modeloma JC69 in K80. Z metodo vezanja smo dokazali ustreznost izračuna filogramov. Filogenetska analiza je bila zanesljivejša z daljšim odsekom zaporedja beljakovine E. Pokazala je, da virus KME iz Slovenije pričakovano uvrščamo v centralno evropski podtip (CEE). Znotraj tega podtipa smo dokazali obstoj vsaj treh genetskih različic virusa KME in tako potrdili domnevo o genetski raznolikosti virusa v Sloveniji. Rezultati raziskave kažejo dejansko sliko sorodnosti virusa KME v Sloveniji saj smo nukleotidno zaporedje določili neposredno iz virusne RNK izolirane iz kliničnih vzorcev bolnikov. Diplomaska naloga prdstavlja najbolj zanesljivo filogenetsko analizo izolatov virusa KME in prvo tovrstno v Sloveniji in Evropi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 578.7 : 578.833.2 : 616.831.9 – 002 (043)=163.6
CX	flaviviruses/ tick-borne encephalitis virus/ tick-borne encephalitis/ meningitis/ TBE/ RT-PCR/ sequencing/ nucleotide sequences/ envelope protein/ non structural protein NS5/ phylogenfilogenetic analysis/ phylogenetic tree/ clinical samples
AU	KOCON, Dejan
AA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor) / DUH, Darja (co-advisor) / POLJAK, Mario (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TICK BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES OF PATIENTS
DT	Graduation Thesis (University studies)
LA	Sl
AL	sl/en
AB	TBE virus is a member of the <i>Flaviviridae</i> family. The virus infects the central nervous system causing encephalitis and high fever. Tick borne encephalitis virus (TBE virus) is endemic in Russia, Japan and Europe as well as in Slovenia. The virus is divided into 3 subtypes; each subtype includes different virus strains. Currently, no information describing the molecular characteristics and the genetic variability of TBE virus in Slovenia exists. The aim of our study was to characterize the TBE virus and to determine the possible genetic variability of the virus in Slovenia. We have isolated RNA from 56 blood samples of patients with TBE. By using real time RT-PCR the presence of TBE RNA was determined. 10 geographically dispersed samples were selected for further sequence analysis. The nucleotide sequences of the partial NS5 protein (212 bp) and E protein (753 bp) were determined for those 10 samples. Sequences were aligned and pylogenetically analysed using the one-parameter JC69 and two-parameter K80 models. When the results were verified by bootstrap analysis we were concluded that the phylogeny based on the E protein was more accurate. It was revealed that TBE virus from Slovenia clusters with CEE subtype. Even more, 3 different genetic variants of TBE virus were detected within that subtype. Our results showed evidence of the existence of genetic variability for TBE virus in Slovenia. The pylogenetic analysis was performed on wild-type TBE virus isolated directly from clinical samples of patients with TBE. Our study represents the most accurate analysis and the first of its kind in Slovenia and in Europe.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK.....	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI VIRUSA KME	3
2.1.1 Zgradba virusa.....	3
2.1.2 Virusni genom	3
2.1.3 Virusne beljakovine.....	4
2.2 TAKSONOMIJA VIRUSA KME	5
2.2.1 Antigenska razvrstitev	5
2.2.2 Podtipi virusa KME	6
2.2.2.1 Genetska raznolikost podtipov KME	6
2.3 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽBE Z VIRUSOM KME	7
2.3.1 Naravno žarišče	7
2.3.2 Razširjenost KME po svetu	8
2.3.3 Razširjenost KME v Sloveniji	9
2.4 PATOGENEZA VIRUSNE OKUŽBE	10
2.5 DIAGNOSTIKA.....	11
2.5.1 Serološke metode	11
2.5.2 Neposredno dokazovanje virusa	12
2.6 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽBE	14
3 MATERIALI IN METODE	16

3.1	MATERIALI	16
3.2	METODE	16
3.2.1	Teoretične osnove	16
3.2.1.1	Teoretične osnove reakcije PCR.....	16
3.2.1.2	Teoretične osnove vgnezenega PCR	17
3.2.1.3	Teoretične osnove PCR v realnem času	18
3.2.1.4	Teoretične osnove sekvenčne reakcije	21
3.2.1.5	Teoretične osnove filogenetske analize nukleotidnih zaporedij.....	22
3.2.2	Metode za dokazovanje RNK virusa KME.....	25
3.2.2.1	Izolacija celokupne RNK.....	25
3.2.2.2	Merjenje koncentracije in čistosti izoliranih nukleinskih kislin.....	27
3.2.2.3	RT-PCR v realnem času za virus KME.....	27
3.2.2.4	Izbira začetnih oligonukleotidov za reakcije RT-PCR in vgnezdeni PCR.....	29
3.2.2.5	Pomnoževanje RNK virusa KME z metodo RT-PCR.....	30
3.2.2.5.1	Beljakovina NS5.....	31
3.2.2.5.2	Beljakovina E	32
3.2.2.6	Pomnoževanje odseka zaporedja pridelkov RT-PCR z vgnezdenim PCR.....	32
3.2.2.6.1	Beljakovina NS5.....	33
3.2.2.6.2	Beljakovina E	33
3.2.2.7	Elektroforeza pridelkov RT-PCR in vgnezenega PCR v agaroznem gelu ...	34
3.2.2.8	Čiščenje pridelkov PCR	35
3.2.2.9	Določanje koncentracije očiščene cDNK.....	36
3.2.2.10	Izbira začetnih oligonukleotidov za sekvenčno reakcijo	36
3.2.2.11	Sekvenčna reakcija	38
3.2.2.12	Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije.....	39
3.2.2.13	Analiza nukleotidnih zaporedij.....	39
4	REZULTATI.....	42
4.1	RT-PCR V REALNEM ČASU	42
4.2	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA	43
4.2.1	Beljakovina NS5.....	43
4.2.2	Beljakovina E	44
4.3	PORAVNAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ.....	45

4.3.1	Beljakovina NS5.....	45
4.3.2	Beljakovina E.....	45
4.4	IZRAČUNI STOPNJE SORODNOSTI IZOLATOV	46
4.4.1	Beljakovina NS5.....	46
4.4.2	Beljakovina E.....	46
4.5	FILOGENETSKA ANALIZA	46
4.5.1	Beljakovina NS5.....	47
4.5.2	Beljakovina E.....	50
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	53
5.1	UVOD.....	53
5.2	POTEK DELA.....	53
5.3	ANALIZA REZULTATOV	56
5.3.1	Sorodnost izolatov KME	56
5.3.2	Filogenetska analiza	57
5.4	SKLEPI.....	60
6	POVZETEK.....	61
7	VIRI	62
	ZAHVALE	70
	PRILOGE.....	71

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedje začetnih oligonukleotidov za sekvenčno reakcijo zaporedja za beljakovino E virusa KME	37
Preglednica 2: Rezultati RT-PCR v realnem času – prisotnost virusne RNK v kliničnih vzorcih bolnikov	42
Preglednica 3: Rezultati sekvenčne reakcije zaporedja za beljakovino NS5 virusa KME iz 10 kliničnih vzorcev bolnikov s KME v Sloveniji	43
Preglednica 4: Rezultati sekvenčne reakcije zaporedja za beljakovino E virusa KME iz 10 kliničnih vzorcev bolnikov s KME v Sloveniji	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Razširjenost KME glede na prijavljene primere v Sloveniji v letih 1998 do 2001 (Kraigher in sod., 2002: 37)	9
Slika 2: Diagnostika KME pri dvofaznem poteku bolezni. Kratice: IV - izolacija virusa, PCR - verižna reakcija s polimerazo (Holzmann, 2003: 37)	13
Slika 3 : Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (Klein, 2002).....	18
Slika 4: Princip delovanja TaqMan sonde (Cockerill, 2003)	20
Slika 5: Shema prikaza pripenjanja začetnih oligonukleotidov na odsek genoma z zapisom za protein NS5 virusa KME (Puchhammer-Stöckl in sod., 1995)	29
Slika 6: Shema prikaza prileganja začetnih oligonukleotidov za RT-PCR in vgnezdni PCR k nukleotidnemu zaporedju z zapisom za beljakovino E virusa KME – sev Ljubljana 1 (AF091012), (NCBI, 2008).....	30
Slika 7: Shema prikaza prileganja začetnih oligonukleotidov za sekveniranje k nukleotidnemu zaporedju za beljakovino E virusa KME – sev Ljubljana 1 (AF091012), (NCBI, 2008)	37
Slika 8: Filogram zaporedja beljakovine NS5 virusa KME (metoda JC69 in 500 ponovitev metode vezanja).....	48
Slika 9: Filogram zaporedja beljakovine NS5 virusa KME (metoda JC69 in 1000 ponovitev metode vezanja).....	48
Slika 10: Filogram zaporedja beljakovine NS5 virusa KME (metoda K80 in 500 ponovitev metode vezanja).....	49
Slika 11: Filogram zaporedja beljakovine NS5 virusa KME (metoda K80 in 1000 ponovitev metode vezanja).....	49
Slika 12: Filogram zaporedja beljakovine E virusa KME (metoda JC69 in 500 ponovitev metode vezanja).....	50
Slika 13: Filogram zaporedja beljakovine E virusa KME (metoda JC69 in 1000 ponovitev metode vezanja).....	51
Slika 14: Filogram zaporedja beljakovine E virusa KME (metoda K80 in 500 ponovitev metode vezanja).....	51
Slika 15: Filogram zaporedja beljakovine E virusa KME (metoda K80 in 1000 ponovitev metode vezanja).....	52

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati PCR v realnem času pozitivnih vzorcev izolirane celokupne RNK iz kliničnih vzorcev bolnikov s KME v Sloveniji in merjenje čistosti ter koncentracije celokupne RNK	71
Priloga B: Poravnava nukleotidnih zaporedij proteina NS5 (212 bp).....	72
Priloga C: Preglednica izračunanih razdalj med zaporedji proteina NS5 (212 bp).....	72
Priloga D: Poravnava nukleotidnih zaporedij proteina E (753 bp)	73
Priloga E: Preglednica izračunanih razdalj med zaporedji proteina E (753 bp).....	74

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
bp	bazni par
cDNK	komplementarna DNK (angl. complementary DNA)
CEE	centralno evropski encefalitis (angl. Central European encephalitis)
DDT	dikloro-difenil-trikloroetan (angl. Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane)
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat (angl. Deoxyribonucleotide triphosphate)
EIA	encimsko imunska metoda (angl. enzyme immuno assay)
IgG	imunoglobulin G
IHA	inhibicija hemaglutinacije
JC69	statistična metoda Jukes in Cantor izdana leta 1969
K80	statistična metoda Kimura izdana leta 1980
Kb	kilobazni pari
KME	klopni meningoencefalitis (angl. tick borne encephalitis)
NJ	metoda sosedskega združevanja (angl. neighbour joining)
nPCR	vgnezdeni PCR (angl. nested PCR)
OTU	operacijska taksonomska skupina (angl. operational taxonomic unit)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RNK	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic acid)
RSSE	ruski pomladno poletni encefalitis (angl. Russian spring summer encephalitis)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (angl. polymerase chain reaction with reverse transcriptase)
RVK	reakcije vezave komplementa
UPGMA	metoda neponderirane aritmetične sredine (angl. unweighted-pair group method with arithmetic mean)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

SLOVARČEK

encefalitis	vnetje možganov
filogram	filogenetsko drevo, ki poleg sorodstvenih razmerij prikazuje še genetske razdalje na osnovi razlik v zaporedju nukleotidov/aminokislin
kladogram	filogenetsko drevo, ki nakazuje sorodstvena razmerja med zaporedji genov in njihovo združevanje v skupine
meningitis	vnetje možganske ovojnice in hrbtenjače
meningoencefalitis	vnetje možganske ovojnice, hrbtenjače in možganskega tkiva hkrati

1 UVOD

Virus klopnega meningoencefalitisa (KME) je humani patogeni virus iz družine *Flaviviridae*. Ljudje se z virusom KME okužijo z vbodom okuženih klosov. Bolezen KME prizadene predvsem centralni živčni sistem in poteka v dveh fazah (Gritsun in sod., 2003). Virus KME je endemičen v številnih Evropskih državah, v južnem delu Rusije in severnih delih Kitajske in Japonske. Molekularno epidemiološke raziskave so pokazale, da obstajajo trije podtipi virusa KME: podtip centralnoevropskega encefalitisa (CEE), podtip ruskega pomladno poletnega encefalitisa (RSSE) in sibirski podtip. Sibirski podtip je nekoliko bolj podoben podtipu RSSE in je uvrščen v tretji samostojni podtip virusa KME. Med seboj se podtipi razlikujejo v vrsti klosov, ki jih prenašajo in po poteku ter teži bolezni, ki jo povzročajo pri ljudeh. Na molekularnem nivoju so med podtipi opazne spremembe v ovojnični beljakovini E (angl. envelope protein), ki je glavna beljakovina ovojnice virusa in je zato zelo ohranjena (Ecker in sod., 1999).

V Sloveniji so nedavno izvedli raziskavo s katero so pokazali, da je molekularna diagnostika z metodo vežine reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction with reverse transcriptase, RT-PCR) primerna za dokazovanje virusa KME v vzorcih krvi in seruma odvzetih v zgodnji fazi bolezni (Saksida in sod., 2005). Pomnoževali so 252 bp dolg fragment gena za nestrukturno beljakovino 5 (angl. non structural protein 5; NS5) in mu določili nukleotidno zaporedje. NS5, ki ima funkcijo od RNK odvisne RNK-polimeraze, je največja in - ob ovojnični beljakovini E - najbolj ohranjena virusna beljakovina. Na osnovi primerjave dobljenih zaporedij NS5 so potrdili, da virus KME iz Slovenije pripada podtipu CEE. Dokazali so tudi, da je znotraj podtipa več genetskih različic virusa, ki bi lahko imele potencialno vlogo pri patogenosti virusa KME. Za natančnejšo filogenetsko analizo je pomnoženi del prekratek, zaporedje na tem delu pa preveč podobno in zato za primerjalne genetske študije ni uporabno.

Predvidevamo, da bomo s filogenetsko analizo genetskega zapisa za virusne beljakovine potrdili, da obstajajo genetske različice virusa KME tudi v Sloveniji.

1.1 NAMEN DELA

Slovenija je endemsko območje podtipa CEE virusa KME. Prenaša ga klop *I. ricinus*, ki z vbodom okuži človeka. Iz podatkov v literaturi je možno zaslediti genetsko raznolikost in ločevanje različnih sevov tudi znotraj endemskih območij. Nekateri sevi povzročajo manj drugi bolj nevarne bolezenske simptome okužbe s KME. Vse dosedanje molekularno-filogenetske raziskave so potekale na virusnih sevih, ki so jih izolirali na celičnih kulturah in/ali sesajočih miškah. V Sloveniji še ni podatkov o molekularnih značilnostih virusa KME.

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti ali se na endemskem območju KME v Sloveniji pojavlja več genetskih različic virusa KME. Pri delu smo virusno RNK izolirali neposredno iz vzorcev bolnikov s KME. Tako smo izključili možnost genetskega spreminjanja virusa, ki je lahko posledica gojenja virusa na miškah ali celičnih kulturah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI VIRUSA KME

2.1.1 Zgradba virusa

Virus KME je po zgradbi enak ostalim virusom družine *Flaviviridae*. Virusni delec sferične oblike meri v premeru od 40 do 60 nm (Rice in sod., 1996). Kemično je sestavljen iz 6 % ribonukleinskih kislin (RNK), 66 % beljakovin, 17 % lipidov in 9 % ogljikovih hidratov (Schlesinger S. in Schlesinger M.I., 1991). Nukleokapsido, ki v premeru meri približno 30 nm, obdaja lipidna ovojnica (Rice in sod., 1996). Ta je gostiteljskega izvora in ščiti genom virusa pred celičnimi nukleazami (Monath in Heinz, 1996). Enoverižna, pozitivno polarna, genomska RNK je z eno vrsto kapsidnih beljakovin povezana v kapsidno jedro. Kapsidni polipeptid, imenujemo ga tudi beljakovina C (iz angl.: capsid), je majhna močno bazična beljakovina, ki je med predstavniki rodu *Flavivirus* najmanj ohranjena. Nukleokapsido obdaja lipidni dvosloj z dvema vrstama virusnih beljakovin: neglikozilirana membranska beljakovina M (iz angl.: membrane), ki je v nezrelem virionu še v necepljeni prekursorški obliki prM, in ovojnična beljakovina E, ki je glikozilirana (Ludwig in Iacono-Connors, 1993; Schlesinger S in Schlesinger MI, 1991).

2.1.2 Virusni genom

Genom virusa predstavlja enovijačna pozitivno polarna RNK dolga približno 11.000 nukleotidov. Kratki nekodirajoči regiji na 5' koncu sledi en sam odprt bralni okvir, ki je dolg več kot 10.000 nukleotidov. Temu sledi še kratka nekodirajoča regija na 3' koncu (Monath in Tsai, 1997). RNK ima na 5' koncu kapo, na 3' koncu pa nima poliA repa. Za nekodirajoče regije predvidevajo, da tvorijo sekundarne strukture, značilne za posamezne flaviviruse. Genomska RNK je kužna in je edina virusna informacijska mRNK prisotna v okuženih celicah (Rice in sod., 1996).

Genom kodira tri strukturne beljakovine in sedem nestrukturnih beljakovin, ki sodelujejo pri razmnoževanju virusa (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Geni za strukturne beljakovine predstavljajo približno 25 % bralnega okvirja na 5' koncu. Preostali del bralnega okvirja (približno 75 %) pa zavzemajo geni za nestrukturne beljakovine (McMinn in sod., 1997).

RNK se prevede v eno samo polipeptidno molekulo. Le-ta se nato kotranslacijsko in posttranslacijsko cepi na specifičnih mestih z gostiteljskimi in virusnimi proteazami. Nastanejo posamezne strukturne in nestrukturne beljakovine, ki sodelujejo pri razmnoževanju virusa (Rice in sod., 1996).

2.1.3 Virusne beljakovine

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

Strukturne beljakovine so gradbeni elementi viriona. Beljakovina C je majhna, močno bazična beljakovina, ki tvori strukturno komponento nukleokapside. Beljakovina prM je glikoziliran prekurzor strukturne beljakovine M (Rice in sod., 1996). V nezrelih virionih ima najverjetneje vlogo stabilizacije beljakovine E med procesom eksocitoze. Sočasno s sprostitvijo virusa iz celice pride do beljakovinskega cepljenja dela prekurzorske beljakovine prM in nastanka beljakovine M, ki je strukturni del zrelega viriona (Monath in Tsai, 1997). Beljakovina E je glavna ovojnična beljakovina virusa in je zato tudi glavna tarča nevtralizirajočih protiteles. Verjetno igra ključno vlogo pri več pomembnih procesih, kot so vezava z receptorjem na celici in zlitje virusne ovojnice z membrano endocitotskega vezikla. Zato tudi ni presenetljivo, da imajo mutacije v zapisu za to beljakovino velik vpliv na patogenezo virusne okužbe.

Nestrukturne beljakovine opravljajo več različnih funkcij. Sodelujejo tudi pri razmnoževanju virusa. Vloga beljakovine NS1 še ni povsem jasna. Skupaj z NS2A

sodeluje pri vezavi kompleksa NS5 in NS3 na membrano. NS3 je druga največja virusna beljakovina. Imela naj bi vsaj trojno vlogo pri razmnoževanju virusa: helikazno, RNK trifosfatazno in, v kompleksu z beljakovino NS2B, serin proteazno aktivnost (Lindenbach in Rice, 2003). Zadnja kodirana beljakovina v bralnem okvirju je NS5, največja in najbolj ohranjena virusna beljakovina. NS5 je od RNK odvisna RNK-polimeraza, ki ima metiltransferazno in RNK-polimerazno aktivnost (Rice in sod., 1996). Vpletena je tudi v modifikacijo imunskega odziva s tem, da vpliva na interferone kot njihov antagonist (Best in sod., 2005). Vloga beljakovin NS4A in NS4B je vsidranje poliproteina, ki nastane pri translaciji genoma virusa, v znotrajcelične membrane. To omogoča pravilno delovanje polimeraznega kompleksa in pravilno cepljenje poliproteina (Lindenbach in Rice, 2003).

2.2 TAKSONOMIJA VIRUSA KME

2.2.1 Antigenska razvrstitev

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

V rod *Flavivirus* uvrščamo več kot 68 virusov. Večino flavivirusov na vretenčarje prenašajo kronično okuženi komarji in klopi (Rice in sod., 1996). Na podlagi antigenskih značilnosti beljakovine E razdelimo flaviviruse s serološkimi testi (test navzkrižne reaktivnosti in nevtralizacijski test) v 8 serokompleksov (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Antigensko razvrstitev podpirajo tudi filogenetske raziskave, ki so jih dobili s primerjavo zaporedij genoma (Rice in sod., 1996).

Velik serokompleks predstavljajo flavivirusi, ki jih prenašajo klopi - serokompleks KME. V ta serokompleks uvrščamo 14 antigensko zelo sorodnih virusov, od katerih jih 8

povzročča boleznih pri ljudeh. Najpomembnejši med njimi je virus KME (Monath in Heinz, 1996).

2.2.2 Podtipi virusa KME

Poznamo tri podtipe virusa KME. Virus centralnoevropskega encefalitisa (CEE) s prototipnim sevom Neudoerfl je razširjen v osrednji Evropi in na Balkanu. Virus ruskega pomladno-poletnega encefalitisa (RSSE) s prototipnim sevom Sofjin je razširjen v vzhodni Evropi, Rusiji in na Japonskem. Tretji sibirski podtip virusa KME, ki je soroden podtipu RSSE, predstavlja prototipni sev Vasilchenko. Sibirski podtip je razširjen v sibirskem pasu Rusije in se nekoliko prekriva z območjem podtipa RSSE (Pletnev in sod. 1990; Gritsun in sod. 1993, 1997).

Podtipi se razlikujejo tudi v svojih prenašalcih. V predelu beljakovine E je homologija AK zaporedja podtipov 96 %. Podtipe lahko ločimo z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles proti beljakovini E. Klop vrste *Ixodes ricinus* prenaša virus iz podtipa CEE, *Ixodes persulcatus* pa prenaša RSSE in sibirski podtip virusa.

Podtipi KME se razlikujejo tudi v poteku bolezni pri ljudeh. Virus iz CEE in sibirskega podtipa povzročata običajno blažji potek bolezni od obolenja, ki ga povzročata virus podtipa RSSE. CEE ima navadno dvofazen potek, medtem ko ima RSSE eno samo fazo (Avšič Županc in Petrovec, 1997). Tudi smrtnost pri CEE je mnogo nižja (1 %) od smrtnosti pri RSSE (20 %). Stopnja smrtnosti pri sibirskem podtipu se giblje med CEE in RSSE (5 %).

2.2.2.1 Genetska raznolikost podtipov KME

Virus KME je genetsko raznolik. Znotraj posameznega endemskega področja in posameznega podtipa virusa KME se pojavljajo genetske različice. Trditve potrjujejo raziskave na področju filogenije virusa v Latviji (Han in sod., 2005) in na Švedskem (Haglund in sod., 2003). Genetske različice virusa znotraj endemskega območja podtipa CEE virusa KME se razlikujejo tudi v virulentnosti virusa (Wallner in sod., 1996).

Raziskave na avstrijskem izolatu Neudoerfl in češkima izolatoma Hypr ter TBE263 so pri poskusih na miškah kljub visoki sorodnosti sevov (preko 97 %) pokazale različno stopnjo virulence testiranih virusov. Razlogi za razliko v virulenci še niso povsem raziskani. Prav tako se endemska območja podtipov virusa KME prekrivajo. V Estoniji so v izolatih klosov in bolnikov dokazali vse tri podtipe virusa KME (Golovljova in sod., 2004).

Vse do zdaj objavljene filogenetske raziskave so izvedli na virusnih izolatih iz klosov ali virusih izoliranih iz bolnikov, ki so jih gojili na miškah ali celičnih kulturah (Golovljova in sod. 2004; Wallner in sod. 1996, Haglund in sod. 2003, Han in sod. 2005). Znano je, da se pri gojenju v miškah predvsem pa v humanih celičnih kulturah virus genetsko spreminja. Zato obstaja verjetnost, da raziskave niso povzele realne slike genetske raznolikosti (Wallner in sod. 1996; Ruzek in sod. 2008).

2.3 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽBE Z VIRUSOM KME

2.3.1 Naravno žarišče

Naravno žarišče je po teoriji Pavlovskega geografsko področje, kjer je evolucija vodila do posebnih odnosov med virusom, prenašalcem in gostiteljem. Virus in prenašalec sta lahko v simbiotskem odnosu. Prenašalec nudi virusu ugodno okolje, virus pa ne vpliva na razvoj, življenje in razmnoževanje prenašalca (Grešikova in Calisher, 1989). Prenašalec služi za prenos virusa od gostitelja - donorja do gostitelja - prejemnika (Avšič-Župane in Petrovec, 1997). Vsa medsebojna razmerja v tem okolju so se vzpostavila pred prihodom človeka (Grešikova in Calisher, 1989).

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

Naravno žarišče je aktivno, kjer so velike in stabilne populacije klopov, malih sesalcev in žužkojedov. Eden izmed pogojev za oznako aktivnega žarišča je vsaj 15 % prisotnost protiteles proti virusu KME pri zdravih ljudeh s tega področja (Grešikova in Calisher, 1989). Ob neugodnih spremembah pogojev, potrebnih za aktivnost žarišča, lahko le-to začasno ali trajno ugasne.

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

2.3.2 Razširjenost KME po svetu

Endemično območje klopnega meningoencefalitisa se razprostira preko širokega področja Evrope in držav bivše Sovjetske Zveze. CEE podtip virusa, katerega glavni prenašalec je klop *I. ricinus*, je razširjen v Srednji in Vzhodni Evropi. RSSE podtip virusa, ki ga prenaša *I. persulcatus*, pa je razširjen v azijskem delu držav bivše Sovjetske zveze, na Kitajski in na Japonskem. Zemljepisna razširjenost podtipov virusa sovпада z razširjenostjo prenašalcev (Monath in Tsai, 1997). V Evropi je znanih več naravnih žarišč bolezni. Okuženo območje se razprostira od Skandinavije čez Poljsko, Nemčijo, Češko, Slovaško, Avstrijo, Madžarsko, Slovenijo in Hrvaško (Tsai, 2000). Trenutno so države Beneluksa, Portugalska, Velika Britanija, Irska in Islandija edine evropske države, ki še niso poročale o primeru klopnega meningoencefalitisa (Gustafson, 1994).

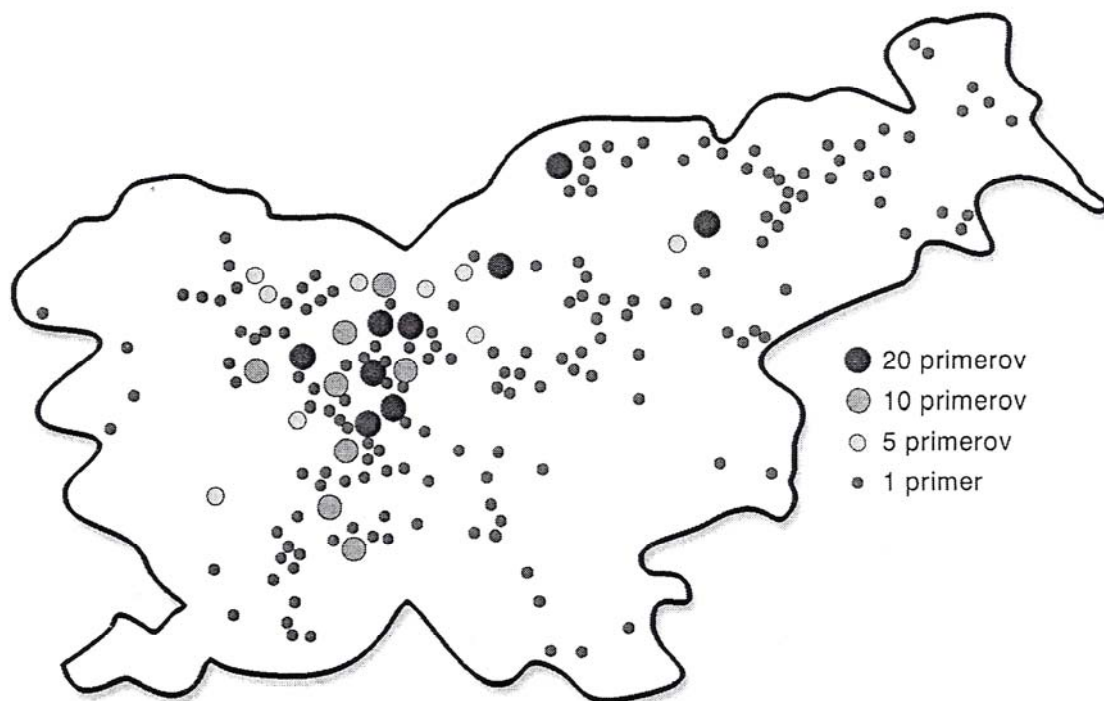
Na svetu je vsako leto prijavljenih 10.000 do 12.000 primerov KME, od tega 3000 v Evropi (Kunz, 2003). Avstrija, Slovenija, Madžarska, Češka in Slovaška so države z najvišjo incidenco KME v Evropi. V azijskem delu bivše Sovjetske Zveze pa je najvišja incidenca na področju zahodne Sibirije (Monath in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

Število prijavljenih obolenj se v posameznih državah iz leta v leto spreminja, kar je posledica sprememb podnebnih razmer, gostote populacije malih sesalcev in gostote populacije okuženih klopov (Stiss, 2003).

2.3.3 Razširjenost KME v Sloveniji

Slovenija je del velikega srednjeevropskega endemskega področja klopnega meningoencefalitisa. Tudi v Sloveniji je pojavljanje te bolezni vezano na naravna žarišča. Njihova intenziteta je različna - od izredno aktivnih (območje Mozirja in Kranja), kjer je možnost okužbe in obolevanja velika, do manj aktivnih (območje Škofje Loke in Ilirske Bistrice) in celo latentnih žarišč, kjer okužba in obolenje nista verjetni. Najbolj aktivna žarišča so na območju alpskega in dinarskega pokrajinskega tipa (Slika 1) (Avšič-Županc in sod., 1995; Kraigher in sod., 2002).

Endemično območje lahko navzven omejimo s črto, ki poteka od Jesenic čez Škofjo Loko, Postojno do Kočevja, nato proti Litiji, preko Zidanega mosta, mimo Celja in Šentjurja proti meji s Hrvaško (Kraigher in sod., 1993).



Slika 1: Razširjenost KME glede na prijavljene primere v Sloveniji v letih 1998 do 2001 (Kraigher in sod., 2002: 37)

V Sloveniji zabeležimo letno okoli 200-300 primerov bolezni (Jereb in sod., 2002). Tveganju okužbe so izpostavljeni ljudje vseh starostnih skupin. Struktura zbolelih po spolu ostaja iz leta v leto skoraj nespremenjena. Delež zbolelih moških je vedno večji kot delež žensk. Največje tveganje za okužbo je pri ljudeh, ki se začasno ali trajno zadržujejo na endemičnih območjih. Med take skupine ljudi spadajo predvsem delavci v kmetijstvu, gozdnem gospodarstvu, lesnih podjetjih, lesno-predelovalni industriji in gradbeništvu. Veliko število obolelih je tudi med ljudmi, ki hodijo v gozd zaradi rekreacije, nabiranja gozdnih sadežev in gob, trganja cvetja ipd (Kraigher in sod., 2002).

2.4 PATOGENEZA VIRUSNE OKUŽBE

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

Po vbodu klopa so virus dokazali v Langerhansovih celicah kože. Od tam se virus preko lokalnih bezgalk in limfatičnega sistema preseli v krvni obtok. Po krvi doseže različne organe, predvsem retikulo-endotelijski sistem (vranica, jetra in kostni mozeg). Virus se v organih namnoži in sprošča nazaj v krvni obtok, kar omogoča nekaj dnevno trajanje viremije. V času viremije pride tudi do vstopa virusa v možgane (McMinn, 1997). Receptor za vstop in način vstopa virusa v možgane ostaja neznan. Najbolj verjetni mehanizmi prehoda virusa preko hemato-encefalne bariere so pasivna difuzija ali transcitoza. Drugi možni načini vstopa so razmnoževanje v endotelijskih celicah ali invazija epitela nosne sluznice. Predlagana alternativna pot vnosa je preko nosne sluznice po izpostavitvi aerosolom ob laboratorijskem delu (Haglund in sod., 2003). Druga alternativna pot okužbe je prebavni trakt. Virus lahko zaužijemo z okuženim kravjim ali kozjim mlekom navidezno zdravih živali. Obolenje imenovano dvofazna mlečna vročina (angl. biphasic milk fever) je nekoliko milejše od klasičnega obolenja s KME (Shapoval 1977, cit. po Gritsun 2003; Pogodina 1958, 1960, cit. po Gritsun, 2003).

Sposobnost virusa, da se razmnožuje v perifernih tkivih, povzroča viremijo in vstopi v centralni živčni sistem, imenujemo nevroinvazivnost (McMinn, 1997). Neposreden napad

virusa in vnetna reakcija ob okužbi povzročita poškodbe, ki so lahko pri nekaterih bolnikih smrtne ali pa pustijo trajne posledice. Poznavanje mehanizma patogeneze virusa KME je nepopolno. Težave pri dokazovanju virusne RNK v likvorju v encefalitični fazi bolezni močno podpirajo hipotezo, da je razmnoževanje virusa inhibirano ali omejeno, ko se v serumu in likvorju pojavijo nevtralizirajoča protitelesa, vendar pa se virus lahko nahaja v nevronih.

Patološke spremembe v centralnem živčnem sistemu so razširjene in vključujejo predvsem sivo snov in leptomeninge, pri čemer so še posebej prizadeti medula oblongata, podaljšana hrbtenjača, jedra možganskih živcev, možgansko deblo, mali možgani in hrbtenjača. Opazna je degeneracija nevronov, nekroza in neuronofagija (Haglund in sod., 2003).

Sposobnost virusa, da povzroči citopatsko okužbo centralnega živčevja in razvoj encefalitisa, imenujemo nevrovirulenca (McMinn, 1997). Pomembno vlogo pri virulenci virusa KME igra ovojnična beljakovina E, saj so mutacije v zapisu za to beljakovino povezane z zmanjšanjem ali izgubo virulence (Heinz, 2003). Nasplošno ima beljakovina E družine flavivirusov po opažanjih pomembno vlogo pri nevrovirulenci in neuroinvazivnosti ter pomembno vlogo v patogenezi encefalitisa (Holzman in sod. 1990, 1997, McMinn 1997). V študiji (Wallner in sod. 1996) pa razlike v virulenci niso mogli pripisati različnemu aminokislinskemu (v nadaljenavnju AK) zaporedju beljakovine E. Spremembe AK zaporedja so bile konzervativne narave. Sklepajo, da bi bile lahko pri virulenci virusa KME vpletene še druge regije genoma virusa (Hayasaka in sod., 1999). V nedavni študiji so ugotovili, da je nevrovirulenca v večji meri odvisna od mutacij virusnih nestrukturanih beljakovin NS2B in NS3 (Ruzek in sod., 2008).

2.5 DIAGNOSTIKA

2.5.1 Serološke metode

KME je mogoče natančno potrditi le z laboratorijskimi metodami, saj so klinična znamenja bolezni pogosto neznačilna in nezadostna za postavitev diagnoze. Za hitro diagnostiko KME so danes najprimernejše različne serološke metode, ki temeljijo na dokazovanju specifičnih protiteles.

Do nedavnega je temeljila serološka diagnostika KME na dokazovanju štirikratnega porasta titra protiteles z metodami reakcije vezave komplementa (RVK) ali inhibicije hemaglutinacije (IHA), kjer sta si dva serumska vzorca sledila v časovnem intervalu 2 - 4 tednov. Omenjeni metodi je nasledila encimsko imunna metoda (EIA, iz angl. enzyme immuno assay). EIA je hitrejša in občutljivejša ter hkrati omogoča dokaz specifičnih IgM protiteles, ki nastanejo v zgodnji fazi bolezni. Z RVK in IHA metodama tega ni bilo mogoče ugotoviti.

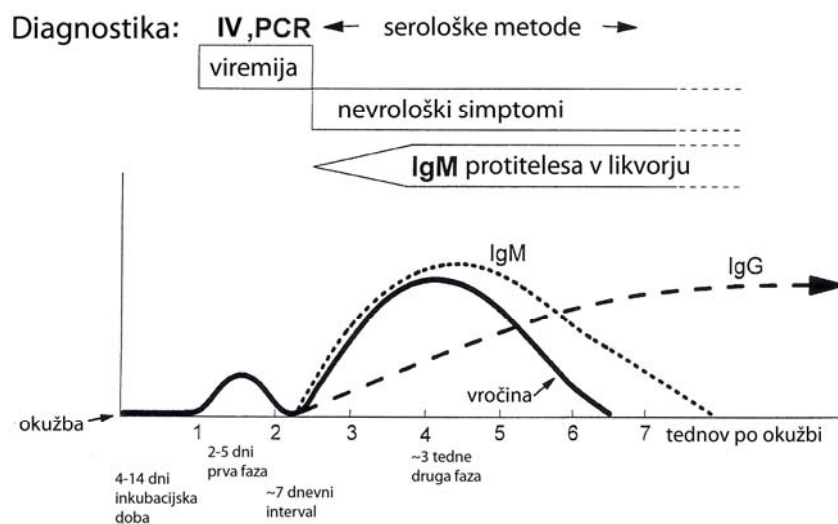
Pomanjkljivost seroloških metod je, da le posredno dokazujejo okužbo z virusom KME (Avšič-Županc in Poljak, 1993). Prav tako je v serološki diagnostiki KME potrebno upoštevati nekaj omejitev. Bolniki okuženi z drugimi flavivirusi proizvajajo protitelesa, ki so navzkrižno reaktivna s protitelesi IgG virusa KME. V serumu nedavno cepljenih oseb je možno zaslediti protitelesa IgM več mesecev. Serološke preiskave so lahko tudi negativne v prvi fazi bolezni (Dumpis in sod. 1999, Schwaiger in Cassinotti, 2003).

2.5.2 Neposredno dokazovanje virusa

Za neposredni dokaz okužbe je še vedno "zlata" metoda poskus osamitve virusa iz kužnin bolnika. Virus najbolj pogosto uspešno osamimo v obdobju viremije iz krvi ali likvorja ter včasih iz urina ali blata bolnikov. Po uspešni osamitvi tip virusa opredelimo z uporabo monoklonskih protiteles ali molekularno z določanjem nukleotidnega zaporedja genoma virusa. Poskus osamitve in nadaljnje opredelitve virusa je časovno zamuden, tehnično zahteven in relativno nevaren postopek, zato za hitro diagnostiko okužb ni primeren (Avšič-Županc in Poljak, 1993).

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

Čeprav so za večino pomembnih arbovirusov razvili visoko občutljive metode PCR za dokazovanje virusnega genoma v vzorcih bolnikov, pa je vloga le-teh v rutinski diagnostiki omejena. Glavni razlog je kratkotrajna viremija, zaradi česar virus ob pojavu nevroloških simptomov v vzorcih bolnikov ni več dokazljiv (Cinque in sod., 2003). Prav tak primer je okužba z virusom KME. Obdobje viremije je kratko, saj navadno traja le do pojava protiteles. Ob nastopu nevroloških simptomov viremija običajno ni več prisotna (Slika 2) (Holzmann, 2003). V redkih primerih je virusno RNK možno dokazati v vzorcih likvorja odvzetih v drugi fazi bolezni pred nastankom protiteles IgG (Puchhammer-Stoeckl, 1995).



Slika 2: Diagnostika KME pri dvofaznem poteku bolezni. Kratice: IV - izolacija virusa, PCR - verižna reakcija s polimerazo (Holzmann, 2003: 37)

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

Rezultati novejših študij kažejo, da je diagnostika okužbe z virusom KME z metodo RT-PCR uspešna pred pojavom protiteles v zgodnji fazi bolezni. Metoda RT-PCR zato predstavlja uporaben pripomoček pri rutinski diagnostiki in pri diferencialni diagnozi različnih bolezni po ugrizu klopa, kar je izraženo na območjih, kjer je endemičnih več bolezni, ki se prenašajo s klopi (Saksida in sod., 2005). Danes se kot najhitrejša in najbolj zanesljiva molekularna diagnostična metoda uporablja RT-PCR v realnem času, ki omogoča dokazovanje RNK virusa KME. Med mestom vezave začetnih oligonukleotidov za PCR se veže sonda, ki ima vezan fluorokrom in dušilec. Polimeraza med reakcijo sondo razdre, dušilec se sprosti. Fluorokrom oddaja svetlobo, ki jo aparat meri in izrisuje krivuljo nastajanja pridelkov PCR. Kvantitativna različica RT-PCR omogoča izračun koncentracije pridelkov PCR na osnovi standardov uporabljenih v reakcijski mešanici z vzorci (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

Izvajanje molekularnih metod za določanje prisotnosti virusa v krvi in serumu ni možna brez ustreznih vzorcev odvzetih v viremični fazi obolenja. Pomembno je pravočasno prepoznavanje nekaterih pokazateljev morebitne okužbe. Pri bolnikih z vročino, tromboter levkocitopenijo in pričevanju o nedavnem ugrizu klopa obstaja sum za okužbo z virusom KME. V takem primeru je primerno shraniti vzorec seruma za potrditev serokonverzije in/ali viremije v primeru kasnejšega razvoja simptomov bolezni KME. (Schultze, 2007).

2.6 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽBE

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

Teoretično bi bolezen lahko premagali s prekinitvijo virusnega ciklusa v naravi, tako da bi posegli med njegove gostitelje in rezervoarje, vretenčarje in členonožce. In vendar se do sedaj splošna uporaba pesticidov, kot je npr. DDT, ni izkazala za učinkovito (Monath in Heinz, 1996).

Poučenost prebivalstva o možnostih za zavarovanje pred boleznijo je izrednega pomena. Največjega pomena je preprečevanje stika klopa s kožo (Kraigher in sod., 1993). Na sprehodih in izletih v naravo se pred klopi zaščitimo z oblačili, pri katerih je čim več kože pokrite. Priporočljivo je, da so oblačila svetle barve, da klopa na oblačilih lahko opazimo. Namažemo se z repelentom, katerega vonj odganja klope. Kljub tem ukrepom je potrebno takoj po vrnitvi domov opraviti temeljit pregled telesa. Če klopa opazimo na telesu, ga je potrebno čim prej in previdno odstraniti. Čim hitreje klopa opazimo in pravilno odstranimo, manjša je možnost okužbe (Cepljenje proti..., 2008). Vendar tudi ta način preprečevanja okužbe ni zelo praktičen, še posebno ne za osebe, ki so nenehno izpostavljene okužbi (Kraigher in sod., 2002).

Najučinkovitejši način zaščite pred boleznijo je aktivna imunizacija s cepljenjem (Demicheli in sod., 1998). V Evropi se najpogosteje uporablja cepivo FSME-IMMUN (Baxter GmbH, Dunaj, Avstrija). Cepivo vsebuje očiščen antigen virusa KME, pripravljenega na celični kulturi piščančjih fibroblastov, inaktiviranega s formalinom in dodatno čiščenega s centrifugiranjem (Gustafson, 1994). Za popolno cepljenje so potrebni trije odmerki cepiva. Običajno dajemo prva dva odmerka v presledku enega meseca in tretjega 6-12 mesecev po drugem odmerku. Da dosežemo ustrezno zaščito še preden postanejo klopi aktivni, je najboljši čas za zacetek cepljenja v zimskih mesecih. Zaščito obnavljamo vsakih 3 do 5 let s poživitvenim odmerkom cepiva (Klopni..., 2001).

V Sloveniji se že več let izvaja obvezno cepljenje vseh oseb, ki so pri svojem delu ali terenskih vajah izpostavljene možnosti okužbe. Za osebe, ki bivajo na okuženih območjih ali nameravajo na teh območjih bivati krajši čas (počitnice, izleti v naravo), pa je cepljenje zelo priporočljivo (Cepljenje proti..., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

V diplomu smo uporabili sledeče materiale: klinične vzorce krvi in serumov bolnikov s KME, možgansko tkivo pokojnega bolnika s KME. Izbrali smo vzorce, ki so bili v letih od 2001 do 2007 poslani na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo v Laboratorij za diagnostiko zoonoz in laboratorij WHO na preiskavo za dokaz KME. Izbrali smo vzorce tistih bolnikov, kjer smo imeli na voljo vsaj tri vzorce krvi in/ali likvorja. V prvem vzorcu po seroloških preiskavah ni bilo protiteles proti virusu KME. Drugi vzorec je bil odvzet en teden po odvzemu prvega. Praviloma je vseboval specifična protitelesa IgM proti virusu KME. Tretji vzorec, ki je bil odvzet po treh tednih od začetka bolezni, je vseboval nižji titer protiteles IgM in povišan titer protiteles IgG.

Med omenjenimi vzorci smo za raziskavo uporabili tiste, ki so bili odvzeti v prvi viremični fazi KME.

3.2 METODE

3.2.1 Teoretične osnove

3.2.1.1 Teoretične osnove reakcije PCR

Metoda PCR je metoda sinteze nukleinskih kislin *in vitro*, s katero lahko z uporabo temperaturno obstojne DNK polimeraze v kratkem času pomnožimo določeni odsek DNK v velikem številu kopij (Poljak in sod., 1994). Najbolj razširjena je uporaba temperaturno obstojne Taq DNK polimeraze, ki so jo osamili iz seva YT1 termofilne bakterijske vrste *Thermus aquaticus* (Newton in Graham 1994; Poljak in sod. 1994).

Dokazovanje virusov s PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju za določen virus specifičnega majhnega odseka njegovega dednega materiala. Če poznamo kratek odsek nukleotidnega zaporedja, nam to omogoča pravilno izbiro začetnih oligonukleotidov, med katerima s PCR pomnožimo t.i. tarčni odsek virusnega genoma. Začetna oligonukleotida sta na nasprotnih verigah dvojne vijačnice usmerjena tako, da sinteza nove verige DNK poteka na odseku med mestoma prileganja oligonukleotidov.

PCR se v svoji klasični različici izvaja na naslednji način. Osamljeni DNK dodamo reakcijsko mešanico (temperaturno obstojna DNK polimeraza, deoksinukleotid trifosfati (dNTP), par začetnih oligonukleotidov, soli in detergent). Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en temperaturni cikel PCR (denaturacija pri 95 °C, pripenjanje začetnih oligonukleotidov na enojne vijačnice DNK pri 45-75 °C, sinteza nove komplementarne molekule DNK v smeri od 5' konca proti 3' koncu pri 72 °C).

Vsak naslednji temperaturni cikel podvoji količino tarčnega dela virusne DNK (od 25 do 40 zaporednih ponovitev). Pomnoženi tarčni odsek DNK se med tem eksponentno kopiči. PCR poteka v računalniško vodeni inkubacijski aparaturi (Poljak in sod., 1994).

S PCR pomnožujemo molekule DNK, zato je za dokazovanje virusov z RNK genomom potrebno pred izvajanjem PCR izolirano virusno RNK prepisati v komplementarno virusno DNK (angl. complementary DNA, cDNK). Različica PCR se imenuje RT-PCR in se uporablja za hitro dokazovanje prisotnosti virusne RNK. Reverzni prepis z encimom reverzno transkriptazo in pomnoževanje potekata v isti zaprti tubici. Možnost kontaminacije vzorcev se zmanjša, časovno ter tehnično pa je metoda manj zahtevna kot če bi ločeno opravljali reverzni prepis in PCR (Newton in Graham, 1994).

3.2.1.2 Teoretične osnove vgnezenega PCR

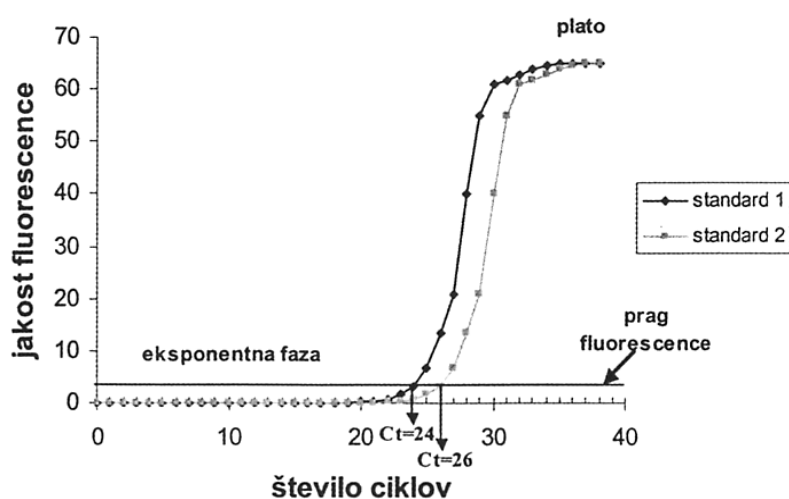
Pri vgnezenem PCR (angl. nested PCR, nPCR) se mesta za vezavo začetnih oligonukleotidov nahajajo znotraj vezavnih mest para začetnih nukleotidov iz prvega PCR.

Pridelki PCR služijo kot matrika DNK za vgnezdene PCR. Z uporabo vgnezdenega PCR se občutljivost in specifičnost pomnoževanja DNK poveča (manjša možnost nespecifične vezave začetnih oligonukleotidov na nespecifične pridelke PCR). Slaba stran vgnezdenega PCR je večja možnost kontaminacije, zaradi tega je pri izvajanju te metode potrebna še posebna pazljivost (Newton in Graham, 1994).

3.2.1.3 Teoretične osnove PCR v realnem času

Metodo PCR v realnem času so razvili kot nadgradnjo metode PCR. Poenostavili in izboljšali so kvantifikacijo nukleinskih kislin. Metoda je dragocen pripomoček mnogim znanstvenikom na različnih področjih (Klein, 2002).

Osnova metode je povsem enaka kot pri metodi PCR (Poljak in sod., 1994), razlikuje se v dokazovanju nastalih pridelkov. Pri običajnem PCR postopku poteka prepoznavanje pridelkov na agaroznem gelu po končani reakciji, medtem ko pri PCR v realnem času poteka prepoznavanje že med pomnoževanjem (merjenju fluorescence). Količino pridelka izmerimo v eksponentni fazi reakcije. Na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (Slika 3) (Klein, 2002; Niesters, 2001).



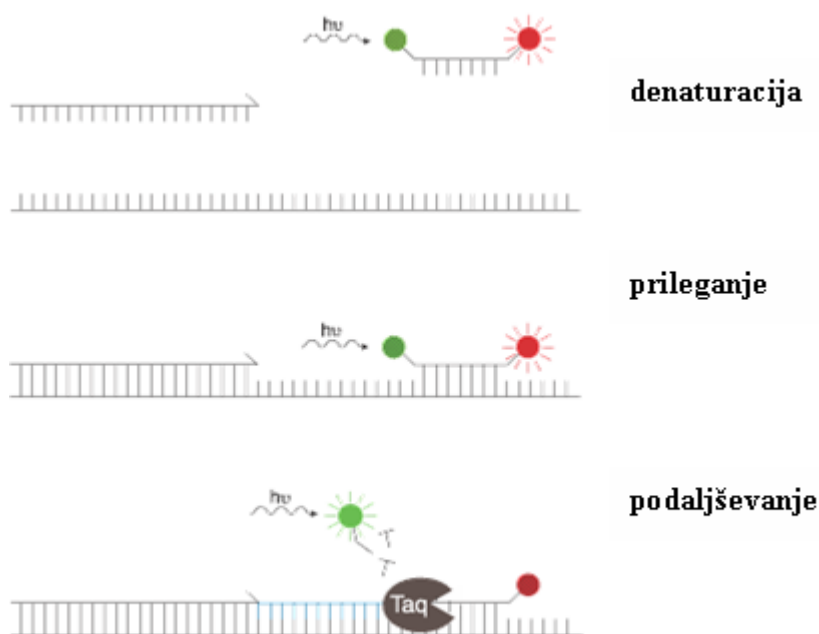
Slika 3 : Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (Klein, 2002)

Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga (intenziteta fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja). Nato za vsak vzorec določimo cikl, ko preseže ta prag (C_t). S primerjavo vrednosti C_t vzorcev z vrednostmi C_t standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu (Ginzinger, 2002; Klein, 2002).

Pridelke PCR v realnem času odkrivamo na dva načina:

- nespecifično odkrivanje - uporabljamo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvovertično DNK (npr. SYBR Green I). Barvila se vključno v nespecifične pridelke reakcije in z oligonukleotidnimi dimeri. Zato je verjetnost lažno pozitivnih rezultatov večja.
- specifično odkrivanje - količino nastalih pridelkov dokazujemo s sondami, ki so označene s fluorofori. Meritev signala se izvaja po principu fluorescenčnega resonančnega prenosa energije z donorske na akceptorsko molekulo (Wilhelm in Pingoud, 2003). Najpogosteje uporabljamo TaqMan sondo (Slika 4) (Cockerill, 2003).

TaqMan sonda je oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezan reporterski fluorofor, na 3' koncu pa dušilec. Intaktna sonda ne fluorescira, ker sta reporterski fluorofor in dušilec preblizu. Ob podaljšanju začetnega oligonukleotida z encimom Taq DNK polimeraza, ki ima 5' eksonukleazno aktivnost, pride do hidrolize sonde (prilega se na zaporedje med oligonukleotidoma RT-PCR) in reporterski fluorofor se odcepi. Fluorofor tako začne oddajati fluorescenco (Wilhelm in Pingoud, 2003).



Slika 4: Princip delovanja TaqMan sonde (Cockerill, 2003)

PCR v realnem času ima številne prednosti v primerjavi z običajnimi postopki. Metoda poteka v zaprtem sistemu in pridelke dokazujemo takoj, kar skrajša čas analize in zmanjša možnost kontaminacije (Klein, 2002). Postopki osamitve so postali avtomatizirani za kvantitativno dokazovanje tarčne RNK ali DNK molekule. Z uporabo več označenih sond je možno dokazovanje različnih pridelkov v eni reakcijski mešanici. Široko dinamično območje metode ter visoka občutljivost (<5 kopij) omogoča sočasno analizo vzorcev z zelo različnimi koncentracijami patogenov. Možnost odkrivanja in kvantifikacije virusov, bakterij, parazitov in gliv s PCR v realnem času je pomembna za diagnostiko bolezni. Metoda ima pomembno vlogo pri spremljanju uspešnosti zdravljenja, napovedovanju prognoze in ugotavljanju odpornosti na zdravila (Klein, 2002; Mackay in sod., 2002). Z metodo PCR v realnem času lahko dokazujemo spremembe v izražanju genov (spremembe v številu kopij genov, izražanju genov, inverzije, translokacije in točkaste mutacije) in je mogoče sklepati na njihovo vlogo pri razvoju bolezni, kar pripomore k razvoju novih diagnostičnih testov in zdravil (Snider in sod., 2001).

3.2.1.4 Teoretične osnove sekvenčne reakcije

Z metodo sekveniranja določamo nukleotidno zaporedje molekule DNK ali RNK (posredno preko njej komplementarne DNK). Določanje nukleotidnega zaporedja je tudi edina molekularna metoda, s katero neposredno in nedvomno dokažemo virusno DNK. Izvedba sekveniranja ne bi bila možna brez odkritja restrikcijskih endonukleaz - encimov, ki režejo dvojno verigo molekule DNK na specifičnih mestih. Računalniška tehnologija omogoča analizo zaporedij in shranjevanje le-teh v genske baze. Napredek v tehnologiji gelske elektroforeze je omogočil ločevanje fragmentov DNK, ki se v dolžini razlikujejo za en sam nukleotid. Vse te izboljšave so omogočile razvoj dveh različnih metod določanja nukleotidnega zaporedja.

Metoda sekveniranja z uporabo kemijskih agensov je dobila ime po odkriteljih Maxamu in Gilbertu. Pri tej metodi je en konec verige (običajno 5'- konec) radioaktivno označen z izotopom P³². Dimetil sulfat (DMS) in hidrazin sta molekuli, ki reagirata in kemijsko spremenita specifične nukleinske baze. DMS modificira purinske baze (adenin in gvanin), hidrazin pa pirimidinske baze (citozin in timin). Spremenjeni nukleotidi so občutljivi za hidrolizo in veriga se razcepi. Po kemijski obdelavi DNK dobimo mešanico različno velikih odsekov, med katerimi so tudi radioaktivno označeni odseki. Ta metoda temelji na štirih ločenih reakcijah (kemijska obdelava G, A + G hkrati, C ter C + T hkrati). Odseke DNK ločimo na posebnem sekvenčnem gelu in zaporedje preberemo iz autoradiograma (Voet D in Voet JG, 1995).

Pri Sangerjevi ali terminacijski metodi se pri in vitro sintezi DNK uporabljajo radioaktivno označeni nukleotidi in specifični terminatorji. Terminatorji so spremenjeni nukleotidi (dideoksinukleozid trifosfat ali ddNTP), ki imajo na mestu 3' -H namesto -OH skupine. Podaljševanje nukleinske verige se pri ddNTP ustavi, saj DNK polimeraza za podaljšanje potrebuje -OH skupino. V reakcijski mešanici je razmerje NTP / ddNTP običajno 100:1, tako da po sekvenčni reakciji dobimo mešanico različno dolgih odsekov, ki se končajo na vsakem mestu vezave terminatorja. V sekvenčni reakciji uporabljamo posebne DNK polimeraze, saj morajo biti manj občutljive na ddNTP in temperaturno obstojne. Tudi pri

tej metodi se štiri reakcije izvajajo ločeno, vsaka s specifičnim tenninatorjem (ddATP, ddCTP, ddGTP in ddTTP). Produkta reakcije nanese na gel vzporedno in jih ločimo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Zaporedje preberemo iz autoradiograma (Sanger in sod., 1977).

Sangerjeva metoda je prilagojena računalniški tehnologiji in je komercialno dostopna v avtomatiziranih sistemih. Na trgu je več sistemov, ki temeljijo na fluorescentno označenih ddNTP-jih. Sekvenčno reakcijo lahko izvajamo ločeno za vsak terminator (4 reakcije) ali v eni epruvetki, kjer je vsak terminator označen s svojim barvilom. Odseke DNK avtomatizirano ločujemo s kapilarno gelsko elektroforezo. Laserski čitalec zazna terminalne nukleotide na osnovi značilnega fluorescentnega spektra. V nadaljevanju z ustreznim računalniškim programom dobljene sekvence dodatno obdelamo in analiziramo (Voet D in Voet JG, 1995).

Na osnovi nukleotidnega zaporedja je nato mogoče določiti tudi AK zaporedje in predvideti funkcijo beljakovine, ki jo zaporedje DNK kodira.

3.2.1.5 Teoretične osnove filogenetske analize nukleotidnih zaporedij

Za izračun filogenetskih razdalj in dreves uporabljamo več različnih metod (Salemi, 2003). Gole podatke zaporedij najprej primerjamo med seboj in jih poravnamo. Sledi izračun razdalj med sekvencami z različnimi statističnimi metodami, ki so primerni za različna zaporedja. Na koncu še izrišemo filogenetsko drevo, ki nam grafično predstavi filogenetske odnose med preiskovanimi nukleotidnimi ali AK zaporedji.

Če želimo primerjati v sekvenčni reakciji dobljena skupna nukleotidna zaporedja (angl. consensus sequences) jih moramo najprej poravnati. Najenostavnejši algoritmi poravnajo po dve zaporedji z metodo združevanja sosedov (angl. neighbour joining, NJ). V vseh možnih kombinacijah izračunajo evolucijske razdalje med njima na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju. NJ združuje najbolj sorodni zaporedji in tvori novo samostojno zaporedje ter primerja znova le to z ostalimi zaporedji. Postopek se ponavlja tako dolgo, da

ostaneta le dve zaporedji. Tak algoritem je hiter in primeren. Ta deluje algoritem ClustalW, ki je prosto dostopen na spletu. Algoritem ClustalW oceni zaporedja glede na izračunano orientacijsko drevo.

Naslednji korak je analiza poravnave sekvenc, ki ga predstavlja izračun genetskih oz. evolucijskih razdalj med nukleotidnimi ali AK zaporedji. Metoda Markov temelji na predpostavki, da se dve zaporedji z istim prednikom po preteku določenega časa zaradi evolucijskih pritiskov začneta razhajati. Genetska razdalja je mera za razhajanje oz. za različnost dveh sekvenc. Če predpostavimo, da obstaja molekularna ura, se genetska razdalja s časom večja. Z izračunom filogenetskih razdalj lahko narišemo filogenetsko drevo, v katerem dolžine vej predstavljajo izračunane vrednosti razdalj.

Nukleotidna zaporedja se z evolucijo spreminjajo in te spremembe so naključne. Za izračun genetskih razdalj med zaporedji potrebujemo primeren matematični model, ki lahko statistično določi naključne spremembe zaporedij.

Najenostavnejši model primerja dve zaporedji in preračuna v kolikšnem odstotku se razlikujeta. Ta model imenujemo opazovana razdalja (angl p-distance). Ta model ne upošteva večkratnih naključnih zamenjav nukleotidov na istem mestu v zaporedju. Prav tako ne upošteva povratnih sprememb niti sočasnih sprememb obeh nukleotidnih zaporedij. Tako se evolucijska razdalja lahko podcenjuje in pride pri izračunu do napak.

Poissonova statistika dodatno upošteva, da se vsaka sprememba oz. mutacija lahko pojavi z neko verjetnostjo v določenem času. S časom se ta verjetnost povečuje. Tako dopolni nekatere pomankljivosti p-statistike. Ta statistika se uporablja v modelu Markov, ki predvideva verjetnost za nukleotidno zamenjavo za vsako nukleotidno mesto zaporedja. Različici tega modela oz. nadgradji sta modela, ki sta ga leta 1969 razvila Jukes in Cantor ter leta 1980 Kimura (K80).

Model JC69 predpostavlja da so vsi širje nukleotidi približno enako zastopani v nukleotidnih zaporedjih (vsak 25 % zaporedja). Po tem modelu naj bi imel vsak nukleotid enako možnost da se zamenja s katerim koli drugim nukleotidom.

Model K80 je nadgradnja modela JC69. Dovoljuje različne verjetnosti za tranzicije (purinski nukleotid se zamenja s purinskim ali pa pirimidinski s pirimidinskim) kot transverzije (zamenjava purinskega nukleotida za pirimidinski).

Obstajajo tudi kompleksnejši modeli od teh, ki so nadgradnje osnovnega modela za izračun genetskih razdalj. Od modela in števila uporabljenih parametrov je odvisna točnost izračunanih razdalj. Gola teorija nakazuje, da več parametrov kot uporabimo, večja je natančnost izračunov razdalj. Vendar pa ob uporabi kompleksnih modelov pri kratkih nukleotidnih zaporedjih naredimo večjo napako pri izračunu, kot če bi uporabili enostavnejši model. Z enostavnejšimi modeli pridobljeni rezultati so tudi statistično zanesljivejši. Bolj so primerni pri filogeniji ozko sorodnih zaporedij oz. tistih ki se med seboj razlikujejo v manjšem številu nukleotidov. Enostavnejši modeli so primerni za preračunavanje evolucijskih razdalj več kot 100 zaporedij in niso računsko zahtevni za računalnike, medtem ko so nekateri kompleksni modeli časovno zahtevni tudi za boljše računalnike.

Po poravnavi in izračunu genetskih razdalj zaporedij je za grafično predstavitev in lažjo primerjanje rezultatov potrebno izračunati in izrisati filogenetsko drevo. Za oblikovanje filogenetskih dreves obstaja več različnih metod, med katerimi se danes največ uporabljajo distančne metode.

Metoda neponderirane aritmetične sredine (angl. unweighted-pair group method with arithmetic mean, UPGMA) je distančna metoda, ki na osnovi matrike združuje sorodna zaporedja in razveji novo drevo na polovici razdalje med zaporedji. Filogenetsko drevo nastaja sproti in najbolj sorodna zaporedja se združujejo v nove operacijske taksonomske skupine (angl. operational taxonomic unit, OTU). Postopek združevanja se nadaljuje dokler ne ostaneta dve najmanj sorodni skupini.

Metoda združevanja sosedov deluje po principu najmanjše evolucije (angl. minimal evolution). Prav tako kot UPGMA primerja zaporedja v matriki in združi najsorodnejši zaporedji ter izračuna novo matriko kjer združeni zaporedji predstavljata nov OTU.

Za vrednotenje filogenetskih dreves oblikovanih z distančnimi metodami je najbolj zanesljiva uporaba NJ metode z metodo vezanja (angl. bootstrapping). Metoda vezanja omogoča statistično preverjanje filogenetskih dreves. Osnovne podatke iz poravnave zaporedij ponovno vzorči in poravna. Z večkratno ponovitvijo postopka (500-1000) se konstruirajo nova drevesa. Rezultate lahko prikažemo na dva načina. Pri prvem uporabimo filogenetsko drevo sestavljeno na osnovi prvotne poravnave zaporedij in na veje napišemo vrednosti analize z metodo vezanja. Te vrednosti nam povedo, v kolikšnem odstotku dreves se je pojavila posamezna veja iz prvotnega filogenetskega drevesa. Druga možnost je oblikovanje novega filogenetskega drevesa, ki je skupek vseh na novo izračunanih dreves. Na veje drevesa navedemo vrednosti analize z metodo vezanja, ki povedo, v kolikšnem odstotku dreves se določena veja pojavi na istem mestu kot v skupnem filogenetskem drevesu.

3.2.2 Metode za dokazovanje RNK virusa KME

3.2.2.1 Izolacija celokupne RNK

Iz vzorcev krvi, serumov in tkiva možganov smo izolirali celokupno RNK po izboljšani metodi Chomzynskega in Sacchija (Chomczynski in Sacchi, 1987), ki jo pri uporabi reagentov TRIZOL[®] LS za tekoče vzorce in TRIZOL[®] za tkivne vzorce priporoča podjetje Invitrogen Life Technologies[™] (Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Delo smo opravili v biološki komori za varno delo II. stopnje (laminarij). Uporabljali smo avtoklavirane pripomočke (sterilne tubice, pipetni nastavki, secirno orodje) in pogosto menjavali rokavice. Laminarij smo pred delom in po njem očistili s 5 % natrijevim hipokloridom. Delovno površino in pripomočke (pipete) smo pred delom obrisali z reagentom RNase Free Solution (Qbiogene Inc., Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki odstranjuje encime RNAze. RNAze so pogosto glavni razlog za neuspelo izolacijo, saj razgradijo RNK.

V 1,5 ml sterilno tubico smo prenesli 200 μ l vzorca in mu dodali 600 μ l na 4 °C ohlajenega reagenta TRIZOL[®] LS (raztopina gvanidina, izotiocianata in fenola). Kos tkiva možganov (30g) smo odrezali s secirnim orodjem ga dali v tubico. Po dodatku raztopine TRIZOL[®] smo tkivo ročno homogenizirali z avtoklaviranim pestilom. Vzorec smo nato premešali s sunkovitim obračanjem in kratkim vorteksiranjem. Vzorec smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, da smo omogočili dokončno lizo celic in razpad nukleoproteinskih kompleksov. Nato smo vzorcu dodali 120 μ l kloroforma hranjenega pri sobni temperaturi. Premešali smo s sunkovitim obračanjem in vorteksiranjem zaprtih tubic. Vzorec smo inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 4 °C in 15.000 obratih/minuto.

Po centrifugiranju smo dobili v tubici tri plasti: zgornjo vodno plast z raztopljeno RNK, srednjo plast iz beljakovin in lipidov, ter spodnjo fenol-kloroformno plast z raztopljeno DNK in preostalimi nečistočami. Vodno plast smo previdno prenesli v novo epruvetko, brez da bi se dotikali beljakovinskega obročka, preostanek pa smo zavrgli v posodo za nevarne odpadke. Vodni fazi smo dodali 300 μ l izopropanola ohlajenega na – 20 °C in premešali s sunkovitim obračanjem tubice. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 4 °C in 15.000 obratih/minuto. Po centrifugiranju RNK precipitira na dnu in steni epruvetke. Odstranili smo supernatant in pazili, da se pri tem nismo dotaknili stene tubice. RNK smo sprali s 600 μ l 75 % etanola ohlajenega na – 20 °C, 1 minuto vorteksirali in centrifugirali 7 minut pri 4 °C in 15.000 obratih/minuto.

Previdno smo odstranili supernatant in RNK sušili od 30 do 40 minut v laminariju ob toku zraka. Pazili smo, da se RNK ni presušila. Pomembno je, da izhlapi čim več etanola. Osušeno RNK smo resuspendirali v 30 - 50 μ l sterilne vode, ki je brez RNaz. Raztopljeno RNK smo do nadaljnje uporabe shranili pri – 20 °C.

3.2.2.2 Merjenje koncentracije in čistosti izoliranih nukleinskih kislin

Z metodo nanokaplje smo merili koncentracijo RNK v vzorcih. Postopek nam omogoča zaznavanje nečistoč v vzorcih izolirane RNK, zato smo izmerili še razmerja absorbance svetlobe valovnih dolžin 260 nm / 280 nm ter 260 nm / 230 nm.

Razmerje absorbance vzorca pri svetlobi valovne dolžine 260 in 280 nm nam omogoča, da določimo čistost nukleinskih kislin. Razmerje 1,8 pomeni, da je v vzorcu čista DNK, razmerje 2,0 pa da je v vzorcu čista RNK. Precej nižja vrednost tega razmerja nam lahko nakazuje prisotnost inhibitorjev (beljakovina, fenolna spojina). Razmerje absorbance svetlobe valovne dolžine 260 in 230 nm je drugotno merilo čistosti izoliranih nukleinskih kislin. Bistveno nižje razmerje od 1,8 nam nakazuje prisotnost kontaminant iz postopka čiščenja.

Koncentracijo smo merili s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000. Koncentracijo spektrofotometer samodejno izračuna glede na ekstinkcijski koeficient nukleinske kisline in absorpcijski koeficient ter dolžino snopa svetlobe po zakonu Beer-Lambert. Nukleinske kisline imajo vsaka svoj ekstinkcijski koeficient (za RNK je ta 40). Na podlagi vnešenih parametrov nam program izračuna koncentracijo željenega tipa nukleinskih kislin.

Aparat smo pred prvo meritvijo umerili z vodo. Dodali smo po 2 µl vzorca, kar zadostuje, da se v spektrofotometru zapolni kapilara, ki jo preseva snop svetlobe. Po vsaki meritvi smo obrisali vrh kapilare z vpojno papirnato brisačko in nanegli naslednji vzorec.

3.2.2.3 RT-PCR v realnem času za virus KME

Za dokazovanje virusa KME smo uporabili RT-PCR v realnem času. RNK pomnožujemo s parom začetnih oligonukleotidov in sondo, ki so homologni odseku zapisa genoma za nekodirajočo regijo (angl. non-coding region, NCR) seva Neudoerfl (U27495). Začetna oligonukleotida sta F-TBE 1 (nukleotidno zaporedje*: 5'-GGGCGGTTCTTGTTCTCC-3') in R-TBE 1 (nukleotidno zaporedje**: 5'-ACACATCACCTCCTTGTCAGACT-3') med katerima je tarčno zaporedje dolgo 28 baznih parov. Na to zaporedje se veže tudi sonda

TBE-probe-WT (nukleotidno zaporedje***: 5'-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-3'). Ta ima na 5' koncu fluorofor FAM, na 3' koncu pa ima vezan dušilec TAMRA (Schwaiger in Cassinotti, 2003). Uporabili smo komplet reagentov Invitrogen (SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, Life Technologies, Carlsbad, California, ZDA). Reakcija je potekala v aparaturi Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australija). Protokol za RT-PCR smo izvedli po navodilih avtorjev (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

Volumen reakcijske mešanice je 25 μ l, le ta pa je vseboval:

12,5 μ l 2-krat koncentrirane reakcijske mešanice (1-krat koncentriran),

0,75 μ l začetnega oligonukleotida F-TBE1 (300 nM),

0,15 μ l začetnega oligonukleotida R-TBE1 (300 nM),

0,25 μ l sonde TBE-probe-WT (200 nM),

0,5 μ l encima SSIII RT/Platinum Taq Mix,

5,85 μ l sterilizirane in deionizirane vode,

5 μ l virusne RNK.

-navedene so končne koncentracije uporabljene v reakcijski mešanici

Najprej je potekel reverzni prepis RNK v cDNK in sicer 30 minut pri 42 °C. Sledila je inaktivacija reverzne transkriptaze ter aktivacija polimeraze: 10 minut pri 95 °C ter reakcija v 45 temperaturnih ciklih:

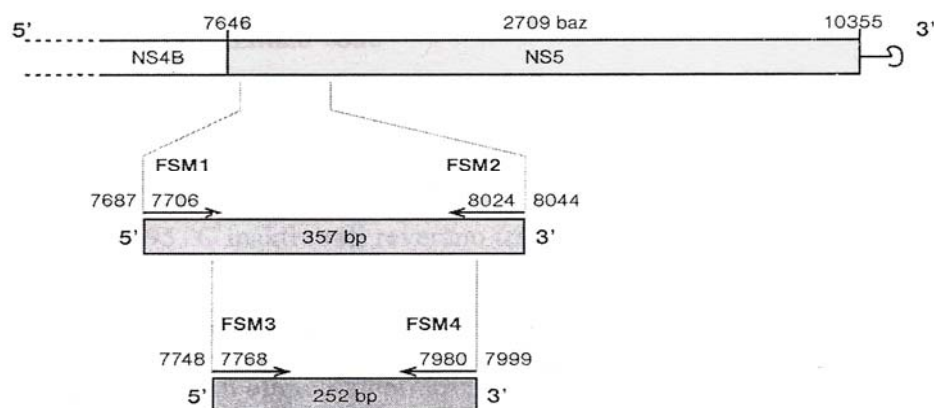
- denaturacija: 15 sekund pri 95 °C,
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov in sonde, podaljševanje tarčnega odseka: 1 minuta pri 60 °C, branje fluorescence v območju FAM

Po končani reakciji smo analizo rezultatov opravili na računalniku. Kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linijo fluorescenčnega praga (C_t) in jih primerjali z rezultatom pozitivne kontrole.

3.2.2.4 Izbira začetnih oligonukleotidov za reakcije RT-PCR in vgnezdni PCR

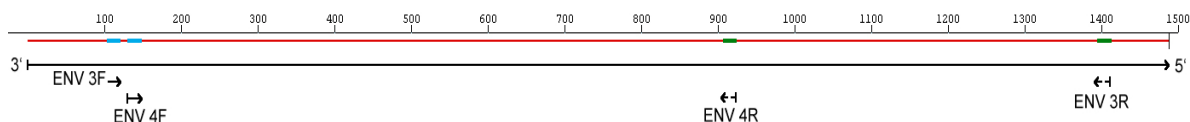
Za dokazovanje nukleotidnega zaporedja smo potrebovali PCR pridelke. V RT-PCR v realnem času nastanejo ob PCR pridelkih, tudi ostanki razgrajene sonde, ki motijo nadaljne postopke. Izvedli smo RT-PCR in vgnezdni PCR, da bi pridobili PCR pridelke primerne za sekveniranje .

Za pomnoževanje regije genoma virusa KME z zapisom za beljakovino NS5 smo uporabili začetne oligonukleotide: FSM1, FSM2, FSM3 in FSM4. Ti začetni oligonukleotidi so se v preteklih raziskavah izkazali kot najbolj učinkoviti (Puchhammer-Stöckl in sod., 1995). S parom zunanjih začetnih oligonukleotidov FSM1 (nukleotidno zaporedje: 5'-GAGGCTGAACAACACTGCACGA-3') in FSM2 (nukleotidno zaporedje: 5'-GAACACGTCCATTCCTGATCT-3') smo pomnoževali 357 baznih parov dolg tarčni odsek. FSM3 (nukleotidno zaporedje: 5'-ACGGAACGTGACAAGGCTAG-3') in FSM4 (nukleotidno zaporedje: 5'-GCTTGTTACCATCTTTGGAG-3') oligonukleotida pa se pripenjata znotraj tarčnega dela FSM1 in FSM2 začetnih oligonukleotidov in pomnožujeta 252 baznih parov dolg odsek. S parom FSM3 in FSM4 smo pomnoževali del pridelka PCR, ki smo ga dobili po uporabi prvega para oligonukleotidov. Tako smo povečali občutljivost in specifičnost reakcije PCR. Na sliki 5 je prikazana shema prileganja začetnih oligonukleotidov.



Slika 5: Shema prikaza prileganja začetnih oligonukleotidov na odsek genoma z zapisom za protein NS5 virusa KME (Puchhammer-Stöckl in sod., 1995)

Za pomnoževanje regije genoma virusa KME z zapisom za beljakovino E smo na osnovi poravnave nukleotidnih zaporedij beljakovine E iz genske podatkovne baze na spletu oblikovali in uporabili naslednje začetne oligonukleotide: ENV 3F, ENV 3R, ENV 4F, ENV 4R (Slika 6).



Slika 6: Shema prikaza prileganja začetnih oligonukleotidov za RT-PCR in vgnezdjeni PCR k nukleotidnemu zaporedju z zapisom za beljakovino E virusa KME – sev Ljubljana 1 (AF091012), (NCBI, 2008)

Začetna oligonuldeotida ENV 3F (nukl. zaporedje: 5'-TGAGGGGAAGCCTTCAAT-3') in ENV 3R (nukl. zaporedje: 5'-TCATGTTTCAGGCCCAACCA-3') smo uporabili za pomnoževanje 1309 baznih parov dolgega tarčnega odseka genoma KME. Začetna oligonuldeotida ENV 4F (nukl. zaporedje: 5'-GGCTTGACGCCATTTACCA-3') in ENV 4R (nukl. zaporedje: 5'-TGTCACACATTGTGTACG-3') se pripenjata na zaporedje znotraj tračnega dela ENV 3F ter ENV 3R in pomnožujeta 790 baznih parov dolg tarčni odsek. Z začetnima oligonuldeotidoma ENV 4F in ENV 4R smo pomnoževali odsek pridelka PCR, ki smo ga dobili s prvim parom začetnih oligonuldeotidov. S tem smo želeli povečati občutljivost in specifičnost reakcije PCR.

3.2.2.5 Pomnoževanje RNK virusa KME z metodo RT-PCR

Po osamitvi celokupne RNK iz vzorca smo za dokazovanje prisotnosti virusne RNK uporabili različico metode PCR imenovano RT-PCR. Ta se od klasične metode PCR razlikuje v tem, da vključuje reverzni prepis molekul RNK v komplementarno DNK. Pomnoževali smo dva dela genoma virusa KME: delne zapise za beljakovini NS5 in E.

3.2.2.5.1 Beljakovina NS5

Reverzni prepis smo izvedli z encimom reverzna transkriptaza, ki je osamljena iz virusa ptičje mieloblastoze (AMV, iz angl.: Avian Mieloblastosis Virus). Uporabili smo komplet reagentov Access RT-PCR System (ProMega Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA).

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

- 10 μ l 5-krat koncentriranega reakcijskega pufra AMV/Tfl
- 4 μ l MgSO₄ (2 mM)
- 4 μ l dNTP mešanice (0,8 mM)
- 1 μ l začetnega oligonukleotida FSM1 (1 μ M)
- 1 μ l začetnega oligonukleotida FSM2 (1 μ M)
- 1 μ l I encima AMV reverzne transkriptaze (0,1 enot/ μ l)
- 1 μ l encima Tfl DNK polimeraze (0,1 enot/ μ l)
- 23 μ l sterilne deionizirane vode
- 5 μ l vzorca RNK

-v oklepajih so navedene končne koncentracije reagentov v reakcijski mešanici

Reverzni prepis RNK v cDNK je potekal eno uro pri 42 °C. Nato smo z 2 minutnim segrevanjem pri 95 °C inaktivirali reverzno transkriptazo in razdvojili nastale RNK-cDNK dvojnovičajnice. Sledila je reakcija v 35 ciklih:

- denaturacija cDNK: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 40 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 45 sekund pri 68 °C
- ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

RT-PCR je potekala v aparatu Eppendorf gradient mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija). Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C.

3.2.2.5.2 Beljakovina E

Reverzni prepis in verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli s kompletom reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step RT-PCR with Platinum Taq DNK Polymerase (Invitrogen).

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

- 25 µl 2-krat koncentriranega reakcijske mešanice (1-krat koncentriran)
- 1 µl začetnega oligonukleotida ENV 3F (1 µM)
- 1 µl začetnega oligonukleotida ENV 3R (1 µM)
- 1 µl SSIIRT/Platinum Taq Mix
- 12 µl sterilne deionizirane vode
- 10 µl vzorca RNK

-v oklepajih so navedene končne koncentracije reagentov v reakcijski mešanici

Reverzni prepis RNK v cDNK je potekal 30 minut pri 50 °C. Nato smo z 2 minutnim segrevanjem pri 95 °C inaktivirali reverzno transkriptazo in razdvojili nastale RNK-cDNK dvojne vijačnice. Sledila je reakcija v 45 ciklih:

- denaturacija cDNK: 30 sekund pri 94 °C,
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuta pri 56 °C,
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuta 30 sekund pri 68 °C,
- ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C

RT-PCR je potekala v aparatu Eppendorf gradient mastercycler. Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C.

3.2.2.6 Pomnoževanje odseka zaporedja pridelkov RT-PCR z vgnezdenim PCR

Pri pomnoževanju zapisa za beljakovini NS5 in E smo želeli izboljšati občutljivost, zato smo izvedli vgnezdeni PCR.

3.2.2.6.1 Beljakovina NS5

Pri pomnoževanju odseka pridelka PCR, ki smo ga dobili v RT-PCR, smo uporabili par začetnih oligonukleotidov FSM 3, FSM4. Ti začetni oligonukleotidi se pripenjajo na odsek genoma z zapisom za protein NS5 med prvotno uporabljenima začetnima oligonukleotidoma v reakciji RT-PCR. Uporabili smo mešanico reagentov Abgene® PCR Master Mix (Abgene®, Epsom, Velika Britanija).

Reakcija je potekala v reakcijski mešanici s skupnim volumnom 50 µl, ki je vsebovala:

- 45 µl, 1-krat koncentriran PCR Master Mix
- 1 µl začetnega oligonukleotida FSM3 (1 µM)
- 1 µl začetnega oligonukleotida FSM4 (1 µM)
- 1 µl sterilne deionizirane vode
- 2 µl pridelka PCR, pridobljenega s FSM3, FSM4 parom začetnih oligonukleotidov

-v oklepajih so navedene končne koncentracije reagentov v reakcijski mešanici

Začetni enominutni denaturaciji pri 94 °C je sledila reakcija v 35 ciklih:

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

Reakcija je potekala v aparaturi Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA). Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C.

3.2.2.6.2 Beljakovina E

V vgnezdni PCR reakciji smo pri pomnoževanju odseka pridelka PCR, ki smo ga dobili v RT-PCR, uporabili par začetnih oligonukleotidov ENV4F, ENV4R. Ta začetna oligonukleotida se pripenjata v prostor med prvotno uporabljenima začetnima

oligonukleotidoma v reakciji RT-PCR. Uporabili smo mešanico reagentov Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen).

Reakcija je potekala v reakcijski mešanici s skupnim volumnom 25 µl, ki je vsebovala:

- 22,5 µl, 1-krat koncentriran PCR Master Mix
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida ENV 4F (0,5 µM)
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida ENV 4R (0,5 µM)
- 2 µl pridelka PCR, pridobljenega s ENV 3F, ENV 3R parom začetnih oligonukleotidov

-v oklepajih so navedene končne koncentracije reagentov v reakcijski mešanici

Začetni denaturaciji za 2 minuti pri 94 °C je sledila reakcija v 45 ciklih:

- denaturacija DNK: 30 sekund pri 94 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 40 sekund pri 52 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuto pri 68 °C

Reakcija je potekala v aparaturi Primus 96 plus. Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C.

3.2.2.7 Elektroforeza pridelkov RT-PCR in vgnezenega PCR v agaroznem gelu

Prisotnost pridelkov PCR smo ugotavljali z vodoravno elektroforezo v agaroznem gelu. Pridelke PCR smo ločevali v 2 % agaroznem gelu (agaroza NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1 krat koncentriranega TAE pufra (Tris acetat EDTA pufer; vsebuje Tris bazo, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH = 8,3). Raztopino smo do vrelišča segrevali v mikrovalovni pečici. Raztopljen gel smo ohladili na približno 60 °C in dodali 5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml) (Promega). Gel smo nalili v plastičen nosilec, odstranili morebitne zračne mehurčke in počakali, da se je strdil. Strjeni gel smo na nosilcu prenesli v elektroforezno kad, ki smo jo napolnili z 1x koncentriranim TAE pufrom tako, da je bil celoten gel prekrit s pufrom. Pufer omogoča tok elektronov od katode na anodo.

V vdolbinice gela smo nanесли 10 μ I pridelka PCR, katerim smo dodali 2 μ I nosilne raztopine (0,35 % brom-fenol modri) Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija). V prvo vdolbinico smo nanесли 5 μ I molekularnega označevalca - DNK lestvica 1 Kb (Invitrogen). Elektroforeza je tekla 30 minut pri napetosti 80 V pri sobni temperaturi. Gel smo pregledali pri ultravijolični svetlobi in fotografirali s polaroidnim fotoaparatom.

3.2.2.8 Čiščenje pridelkov PCR

Pred sekvenčno reakcijo je potrebno iz pridelkov PCR odstraniti ostanke polimeraze Taq, začetnih oligonukleotidov in deoksiribonukleotidov. Pridelke PCR smo čistili z uporabo komercialnega kompleta Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Čiščenje temelji na vezavi DNK na delce silicijevega dioksida v membrani posebne kolone in spiranju s pufrji.

Pri elektrogorezi pridelkov PCR na agaroznem gelu smo opazili nespecifične pridelke PCR reakcije. Vzorec smo zato v celoti nanесли na 1,2 % agarozni gel ter pognali elektroforezo z namenom, da bi ločili željene pridelke od nespecifičnih PCR pridelkov. Elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti 80V. Po elektroforezi smo iz agaroznega gela pod UV lučjo izrezali željen pridelek PCR in se s tem znebili nespecifičnih pridelkov. Kos agaroznega gelčka smo spravili v 1,5 ml tubico in ga stehali z elektronsko tehtnico.

V epruvetko smo dodali količino puфра MBS (angl. Membrane Binding Solution), ki je ustrezala teži izrezanega gelčka in vorteksirali. Raztopino v epruvetki smo segrevali na 60 °C tako dolgo dokler se gel ni popolnoma raztopil (od 2 do 5 minut). Nato smo vse prenesli v tubico z membrano in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Centrifugirali smo 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. S tem postopkom se je DNK, ki smo jo s PCR pomnožili, vezala na membrano. V primeru, da je raztopine bilo več kot 700 μ l, smo postopek ponovili.

Sledilo je spiranje nečistoč, pri tem smo na membrano dali 700 μ l pufra MWS (angl. Membrane Wash Solution) ter ponovno centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni epruvetki, smo zavrgli, na membrano pa smo dali 500 μ l pufra MWS ter centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih/minuto. Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni tubici smo zavrgli, nato smo še enkrat centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto, s tem da smo notranji pokrov centrifuge odstranili. To je omogočilo odstranjevanje alkoholnih hlapov med centrifugiranjem. Nato smo membrano prenesli v označeno, čisto 1,5 ml epruvetko in sledil je korak elucije vezane DNK. Dodali smo 50 μ l segrete sterilne vode, inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Tako očiščene pridelke PCR smo shranili v hladilniku pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.2.9 Določanje koncentracije očiščene cDNK

Pripravili smo 50 ml 1,6 % agaroznega gela (NuSieve OTO) in mu dodali 4,5 μ l etidijevega bromida. Na gel smo nanašali 3 μ l očiščene DNK, raztopljene v 7 μ l deionizirane vode, ter 2 μ l brom-fenol modrila. Elektorforeza je potekala 10 minut pri napetosti 90 V. Po končani elektroforezi smo glede na jakost fragmenta ocenili koncentracijo DNK. Jakost fragmenta smo ovrednotili z oceno 1 do 5 in temu primerno določili količino DNK, ki smo jo uporabili za sekvenčno reakcijo. Pri oceni 1 je bila količina DNK v sekvenčni reakciji 1 μ l, pri oceni 5 pa 5 μ l.

3.2.2.10 Izbira začetnih oligonukleotidov za sekvenčno reakcijo

Za sekvenčno reakcijo odseka genoma KME z zapisom za beljakovino NS5 smo uporabili enake začetne oligonukleotide kot v reakciji vgnezenega PCR (Preglednica 1). Te smo si odmerili v posebne tubice, ki smo jih uporabljali samo v prostoru, kjer smo izvajali sekveniranje.

Pri sekvenčni reakciji za beljakovino E smo v eni reakciji dokazali največ 400 bp. Da bi pokrili celotno zaporedje v obe smeri nukleotidnega zaporedja (~1300 bp), smo izdelali

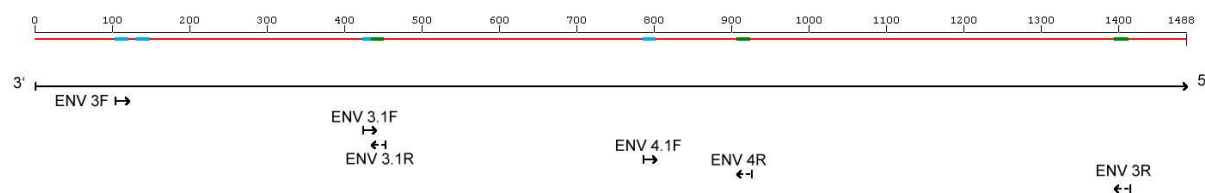
nove začetne oligonukleotide. Pridelke PCR vseh izolatov RNA smo sekvenirali z začetnimi oligonukleotidi uporabljenimi v reakciji RT-PCR in vgnezdjeni PCR. Sekveniranje je bilo pri večih vzorcih neuspešno z začetnim oligonukleotidom ENV 4F, zato smo ga izločili iz sklopa oligonukleotidov za sekveniranje. Zaporedja dolga od 400 do 500 baznih parov (bp) smo vključno z zaporedji beljakovine E nekaterih evropskih sevov virusa KME poravnali s programom Megalign programskega paketa LaserGene (DnaStar, Wisconsin, ZDA, 1999). Za sekvenčno reakcijo za odsek z zapisom za beljakovino E reakcijo smo tako postopno izbrali notranje začetne oligonukleotide, s katerimi smo ponovili cel postopek PCR.

Poravnava zaporedij nam je omogočila vpogled na ohranjene odseke znotraj zaporedja beljakovine E. Izbirali smo ohranjene odseke, ki so se ujemali z zaporedjem seva Ljubljana 1 (AF091012), (NCBI, 2008). To je sev virusa KME, ki so ga izolirali v Sloveniji iz krvi laboratorijske delavke leta 1993, delno nukleotidno zaporedje pa objavili kasneje (Ecker in sod., 1999) Naročili smo nove začetne oligonukleotide (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Nemčija), ki so nam omogočili sekveniranje celotnega odseka zapisa za beljakovino E v obe smeri (Preglednica 1, Slika 7).

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za sekvenčno reakcijo zaporedja za beljakovino E virusa KME

Zač. olig.	mesto naleganja ¹	nukleotidno zaporedje (od 5' proti 3' koncu)
ENV 3F	105-122	TGAGGGGAAGCCTTCAAT
ENV 3R	1396-1414	TCATGTTTCAGGCCCAACCA
ENV 3.1F	425-441	AAGTCGAACCACACACG
ENV 3.1R	436-452	ACATAGTCTCCCGTGTG
ENV 4.1F	787-803	GTGTTACTGAAGGCTCT
ENV 4R	908-925	GGCTTGACGCCATTTACCA

Legenda: 1- mesto naleganja na nukleotidno zaporedje beljakovine E virusa KME – sev Ljubljana 1 (AF091012) (NCBI, 2008)



Slika 7: Shema prikaza prileganja začetnih oligonukleotidov za sekveniranje k nukleotidnemu zaporedju za beljakovino E virusa KME – sev Ljubljana 1 (AF091012), (NCBI, 2008)

3.2.2.11 Sekvenčna reakcija

Uporabili smo komercialni komplet reagentov »BigDye[®] terminator cycle sequencing ready reaction kit« (ABI Prism, PE Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA). Princip reagentov BigDye[®] temelji na Sangerjevi metodi sekveniranja, kjer je vsak terminator označen s svojim barvilom. Za vsak pridelek reakcije PCR smo naredili več ločenih sekvenčnih reakcij, po eno za vsak oligonukleotidni začetnik, ki so usmerjeni tako da smo dobili sekvence prepisa obeh verig PCR pridelkov. Uporabili smo reakcijsko mešanico, v kateri so fluorescentno označeni dideoksi terminatorji, mešanica dNTP-jev in polimeraza FS (različica polimeraze Taq).

20 µl reakcijske mešanice je vsebovalo:

- 1-5 µl DNK (glede na kvantitativno oceno iz agaroznega gela)
- 1,3 µl začetnega oligonukleotida (3,25 µM),
- 4 µl mastermix reakcijske mešanice*
- 2 µl reakcijskega pufra*
- deionizirano vodo do skupnega volumna 20 µl

(*Pri vzorcih slabše kvalitete smo uporabili 8 µl reakcijske mešanice mastermix in nismo dodali reakcijskega pufra.)

Sekvenčna reakcija je potekala v 25 ciklih:

- denaturacija DNK: 10 sekund pri 96 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 5 sekund pri 50 °C
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 4 minute pri 60 °C
- ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C

Reakcija je potekala v aparaturi Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA). Po končani reakciji smo pridelke sekvenčne reakcije shranili pri 4 °C.

3.2.2.12 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije

Pred avtomatskih sekveniranjem smo pridelke sekvenčne reakcije prečistili in odstranili neporabljene dideoksi terminatorje, začetne oligonukleotide in polimerazo FS. Uporabili smo komercialni komplet DyeEx[®] (Qiagen, Hilden, Nemčija), ki temelji na gelski filtraciji.

Komercialni komplet vsebuje kolumne v katerih je hidriran gel, ki se med centrifugiranjem strdi. Zato smo kolumne najprej rahlo vorteksirali, da se tekočina premešala, nato smo jih centrifugirali 3 minute pri 3000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo v kolumni dobili gel, odvečno tekočino pa smo zavržli. Kolumno smo prenesli v čisto 1,5 ml tubico in na gel nanесли pridelok sekvenčne reakcije (20 µl) ter ponovno centrifugirali 3 minute pri 3000 obratih/minuto. Med centrifugiranjem se je očiščena DNK izprala v tubico. DNK smo zaradi slabe obstojnosti v vodi posušili in nato raztopili v formamidu. DNK smo sušili v vakuumski hladilni centrifugi približno 20 minut, nato je sledila rehidracija. Dodali smo 25 µl formamida in vorteksirali. Po 2 minutni denaturaciji pri 95 °C smo vzorce hitro predstavili na led za 2 minut. Tako obdelani vzorci so bili pripravljene za avtomatsko sekveniranje in smo jih shranili pri -20 °C.

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

3.2.2.13 Analiza nukleotidnih zaporedij

Rezultate smo analizirali in končna nukleotidna zaporedja sestavili s programom SeqMan programskega paketa LaserGene. Paket vsebuje programe za sestavljanje zaporedij (SeqMan), urejanje zaporedij (EditSeq) ter primerjavo zaporedij in prikaz sorodnosti v obliki fenogramov (MegAlign).

Analiza nukleotidnega zaporedja odseka genoma z zapisom za beljakovino NS5 je obsegala naslednje korake. S programom SeqMan smo sestavili pare zaporedij, ki smo jih dobili s sekvenčno reakcijo (po dve zaporedji vsakega vzorca - po eno z vsakim začetnim

oligonukleotidom). Uporabili smo surove podatke s končnico .ab1, ki vsebujejo informacijo za fluorescenčne signale pri posameznih nukleotidih. Neberljiv začetek in konec vsakega zaporedja smo izrezali ter preverili kvaliteto sekvenčne analize posameznih baz nukleotidnega zaporedja. Poravnano in sestavljeno zaporedje smo preverili vzdolž verige zaradi morebitnih neujemanj. S programom EditSeq smo zaporedja še enkrat pregledali in odstranili končne dele, ki pripadajo začetnim oligonukleotidom.

Analiza nukleotidnega zaporedja odseka genoma z zapisom za beljakovino E je bila nekoliko zahtevnejša. S programom SeqMan smo dobljena delna nukleotidna zaporedja dobljena z šestimi začetnimi oligonukleotidi sestavili v skupno nukleotidno zaporedje. Uporabili smo surove podatke s končnico .ab1. Preverili smo morebitna neujemanja in v skupnem zaporedju upoštevali informacije iz kvalitetnejšega zaporedja z jasnimi vrhovi fluorescenčnega signala. Zaradi različne kvalitete signalov delnih nukleotidnih zaporedij smo dobili različno dolga skupna zaporedja. Odstranjevanje zaporedij začetnih oligonukleotidov na koncih zaporedij ni bila potrebna. Najkrajša zaporedja niso segala do zunanjih začetnih oligonukleotidov in jih zaradi tega nismo pregledovali.

Vsa skupna zaporedja smo shranili v formatu seq, ki ga lahko prebere Editseq in je primeren za vnos v program MegAlign. Prav tako smo shranili konsenze sestavljene s programom SeqMan s končnico .sqd. Program SeqMan nam omogoča tudi strateški pregled sestavljenega konsenznega zaporedja. V primeru konsenza za nukleotidni zapis beljakovine E smo tega izkoristili za lažjo predstavo o naleganju začetnih oligonukleotidov, ki smo jih tudi grafično predstavili.

Skupna nukleotidna zaporedja smo primerjali z zaporedji v genski banki preko medmrežnega servisa NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA) s spletnim orodjem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI, 2008). Zaporedje smo preko programa EditSeq v formatu fasta prekopirali na vmesnik na strani BLAST in zaporedja primerjali z nukleotidno bazo podatkov »nucleotide blast«. Za bazo podatkov smo izbrali postavko »drugo« (angl. other). S tem smo preverili ali naša zaporedja ustrezajo zaporedju virusa KME in v kolikšni meri se ujemajo z izolati virusa.

S programom MegAlign, smo zaporedja vseh analiziranih vzorcev poravnali in uredili. Program uporablja algoritem clustalw poravnave nukleotidnih zaporedij. Odrezali smo konce zaporedij in jih prilagodili najkrajšim zaporedjem. Izračunali smo odstotke ujemanja zaporedij (priloga C in E) in izpisali poročilo poravnave (priloga B in D). Program ponuja enostaven način izrisa kladogramov. Za filogenetsko analizo smo izbrali programski paket Treecon (TREECON for Windows, različica 1.3b, Antwerpen, Belgija) (Van de Peer, 1994). Program omogoča analizo z večimi različnimi statističnimi metodami kot program MegAlign. Podatke poravnave smo shranili v formatu .meg za kasnejšo analizo. Za program Treecon smo poravnavo shranili v formatu .msf.

Program Treecon je skupek večih programov. Prva stopnja je izračun genetskih razdalj. Podatke v formatu .msf smo uvozili v Treecon in označili vse vzorce. Izbrali smo dve distančni metodi: dvoparameterni model K80 in enoparameterni model JC69. V vsakem koraku je treba označiti polje z »bootstrap analysis«, kar nam omogoča statistično preverjanje z metodo vezanja. Izbrali smo analizo s 500 in 1000 ponovitvami (vsako posebej). Naslednji korak je sestavljanje dreves. Izbrali smo metodo NJ in označili »bootstrap analysis«. Nekoreninjenim drevesom smo določili korenino tako, da smo izbrali najmanj sorodno zaporedje (v našem primeru virus hemoragične mrzlice OMSK). Potrdili smo tudi polje »bootstrap analysis«. Zadnja faza obdelave je grafični izris filogenetskega drevesa. V programu za risanje dreves (angl. tree drawing program) smo odprli novo datoteko, da se je izrisalo konsenzno filogenetsko drevo. Prilagodili smo poimenovanje zaporedij in pripisali vrednosti analize z metodo vezanja v odstotkih. Prikazali smo samo vrednosti nad 50 %.

4 REZULTATI

V raziskavi smo pregledali 55 vzorcev telesnih tekočin bolnikov in en vzorec možganskega tkiva pokojnega bolnika. Vzorce smo izbrali na podlagi rezultatov seroloških testov in sicer vzorce iz prve faze okužbe z virusom KME. Izolirali smo celokupno RNK, jo označili in shranili za nadaljno uporabo na -20 °C.

4.1 RT-PCR V REALNEM ČASU

Prisotnost virusne RNK smo potrdili z metodo RT-PCR v realnem času (Preglednica 2). Najpogosteje smo virusno RNK dokazali v vzorcih krvi (92,5 %). Pri vzorcih seruma smo bili pri dokazovanju virusa KME manj uspešni. Pozitivnih je bilo le 50 % vseh vzorcev.

Preglednica 2: Rezultati RT-PCR v realnem času – prisotnost virusne RNK v kliničnih vzorcih bolnikov

RT PCR v realnem času	poz.	neg.	% poz.	skupaj
št. vzorcev krvi	40	3	92,5	43
št. vzorcev seruma	8	4	50	12
št. vzorcev tkiv	1	0	100	1
skupno št. vzorcev	49	7	85,7	56

V vseh vzorcih smo preverili virusno RNK z RT-PCR v realnem času. Z aparatom NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc.) smo izmerili koncentracijo in čistost RNK. Za posamezne pozitivne vzorce vključene v raziskavo, smo prikazali rezultate RT-PCR v realnem času ter koncentracije in čistost celokupne RNK izolirane iz vzorcev bolnikov (Priloga A).

4.2 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

Za nadaljnje raziskave smo med 56 predstavljenimi vzorci izbrali 10 vzorcev po sledečih merilih:

- pozitiven rezultat RT-PCR v realnem času
- kvaliteta RNK izolatov
- čim večja geografska razpršenost izolatov (največ dva na kraj)
- zadostne količine materiala (krvi / seruma)

Desetim vzorcem smo pomnožili odsek genoma z zapisom za beljakovino NS5 in beljakovino E.

4.2.1 Beljakovina NS5

Vsem 10 izbranim vzorcem smo določili nukleotidno zaporedje odseka zapisa za beljakovino NS5 dolžine 212 bp. To ustreza zaporedju med mestoma prileganja začetnih oligonukleotidov FSM3 in FSM4 (Preglednica 3).

Preglednica 3: Rezultati sekvenčne reakcije zaporedja za beljakovino NS5 virusa KME iz 10 kliničnih vzorcev bolnikov s KME v Sloveniji

bolnik	dolžina sest. nukleot. zap. (bp)	datum odvzema vzorca	kraj bivanja bolnika
B1	212	20.06.2000	Škofja Loka
B2	212	11.06.2002	Kamnik
B3	212	27.06.2003	Ribnica
B4	212	05.07.2000	Kamnik
B5	212	28.06.2003	Črnomelj
B6 ¹	212	/	Nazarje
B7	220	01.09.2005	Vrhnika
B8	221	02.10.2006	Tržič
B9	223	21.05.2007	Cerkno
B10	226	16.06.2007	Ljubljana

Legenda: 1 – vzorec bolnika, ki mu je bilo z biopsijo posmrtno odvzeto možgansko tkivo, datum odvzema je neznan

4.2.2 Beljakovina E

Pri določanju nukleotidnega zaporedja odseka genoma z zapisom za beljakovino E smo uporabili naslednje začetne oligonukleotide: ENV 3F, ENV 3R, ENV 3.1R, ENV 3.1F, ENV 4F, ENV 4.1F. Dobili smo različno kvalitetne rezultate in sestavili skupna nukleotidna zaporedja. V delovni preglednici (Preglednica 5) smo predstavili dolžine sestavljenih skupnih zaporedij, koeficiente čistosti ter koncentracije celokupne izolirane RNK iz vzorcev bolnikov, kot tudi kraje od koder bolniki izvirajo ter datume sprejema vzorcev.

Preglednica 4: Rezultati sekvenčne reakcije zaporedja za beljakovino E virusa KME iz 10 kliničnih vzorcev bolnikov s KME v Sloveniji

bolnik	dolžina zap.¹	260/280²	260/230³	konc. RNK	datum odvzema	kraj bivanja
B1	1070	1,68	0,17	71,56	20.06.2000	Škofja Loka
B2	963	1,74	0,34	14,48	11.06.2002	Kamnik
B3	833	1,59	0,12	107,11	27.06.2003	Ribnica
B4	811	1,71	0,26	124,98	05.07.2000	Kamnik
B5	1242	1,96	0,15	40,87	28.06.2003	Črnomelj
B6 ⁴	1231	/	/	/	/	Nazarje
B7	1375	1,86	0,05	8,30	01.09.2005	Vrhnika
B8	1239	2,54	0,04	7,00	02.10.2006	Tržič
B9	1370	2,02	0,16	5,70	21.05.2007	Cerkno
B10	1326	2,46	0,37	6,50	16.06.2007	LJ

Legenda: 1 – dolžina sestavljenih nukleotidnih zaporedij (bp); 2, 3 – koeficienti čistosti izolatov celokupne RNK, 4 – vzorec bolnika, ki mu je bilo z biopsijo posmrtno odvzeto možgansko tkivo in je datum odvzema neznan, kolicentracija in čistost RNK vzorca niso prikazani, saj je vzorec vseboval visoko število virusnih kopij

4.3 PORAVNAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

S programi iz programskega paketa LaserGene smo sestavljena zaporedja pregledali in jih poravnali.

4.3.1 Beljakovina NS5

V primeru beljakovine NS5 smo dobili enako dolga zaporedja (212 bp) potem, ko smo odstranili zaporedje začetnih oligonukleotidov. Poravnali smo jih z zaporedji izolatov podtipa CEE, RSSE in sibirskega podtipa virusa KME. Poravnavo zaporedij smo izrisali tako, da so vidne nukleotidne zamenjave posameznih izolatov KME (priloga B).

4.3.2 Beljakovina E

Pri sekvenčni reakciji zapisa za beljakovino E smo dobili različno dolga skupna zaporedja (od 811 do 1375 bp). Prikazali smo jih v preglednici 4. Sekvenčna reakcija ni bila uspešna z vsemi začetnimi oligonukleotidi pri večih vzorcih. Za nezanesljivega se je izkazal začetni oligonukleotid ENV 3R (v 4 od 10 primerov) ter ENV 3.1R (v 2 primerih). Pri starejših vzorcih (pred letom 2004) smo pogosteje opazili manj kakovostne rezultate. V vzorcih smo izmerili bistveno večjo količino nečistoč in višjo koncentracijo celokupne RNK. To povezujemo z razpadlimi eritrociti pri daljšem shranjevanju vzorcev na -20 °C.

Ko smo nukleotidna zaporedja sestavili, smo jih poravnali z znanimi sevi podtipov CEE, RSSE in sibirskega podtipa virusa KME. S programskim paketom Lasergene smo izvedli poravnavo skupnih nukleotidnih zaporedij. Ta uporablja za izračun poravnave algoritem ClustalW. S programom MegAlign smo zaporedja beljakovine E ročno obdelali. Odrezali smo konce zaporedij in dobili zaporedja enake dolžino (753 bp). Poravnavo zaporedij smo izrisali tako, da so vidne nukleotidne zamenjave posameznih izolatov KME (priloga D).

4.4 IZRAČUNI STOPNJE SORODNOSTI IZOLATOV

V prilogi B in D smo predstavili odstotke sorodnosti skupnih nukleotidnih zaporedij beljakovine NS5 in beljakovine E. Daljša zaporedja beljakovine E kažejo nekoliko višjo sorodnost kot krajša zaporedja beljakovine NS5. Ta razlika je od 1 do 3 odstotna.

4.4.1 Beljakovina NS5

V primeru beljakovine NS5 smo pokazali visoko sorodnost med izolati uporabljenimi v študiji (96,2-100 %) kakor tudi s sevom Ljubljana 1. Iz te skupine izstopa izolat št. 3, ki kaže nekoliko nižjo sorodnost z nekaterimi slovenskimi izolati (94,8-100 %). Opazili smo tudi visoko sorodnost slovenskih izolatov z drugimi izolati podtipa CEE virusa KME (95,8-99,5 %). CEE skupina izolatov se jasno loči od skupine RSSE in sibirskega podtipa, ki kažejo nekoliko nižjo sorodnost s CEE podtipom virusa (79,8-82,1 %).

4.4.2 Beljakovina E

Pri primerjavi zaporedij beljakovine E kažejo nukleotidna zaporedja vzorcev znotraj Slovenije visoko sorodnost (96,9-100 %). Nekoliko izstopa izolat št. 6 (95,9-96,8 %) in se jasno loči iz gruče podtipa CEE virusa KME. Slovenski izolati so prav tako visoko sorodni z drugimi sevi v podtipu CEE virusa KME (96,3-98,9 %). Skupina CEE se skupaj s slovenskimi izolati jasno loči od podtipa RSSE in od sibirskega podtipa virusa KME (83,7-86,1 %).

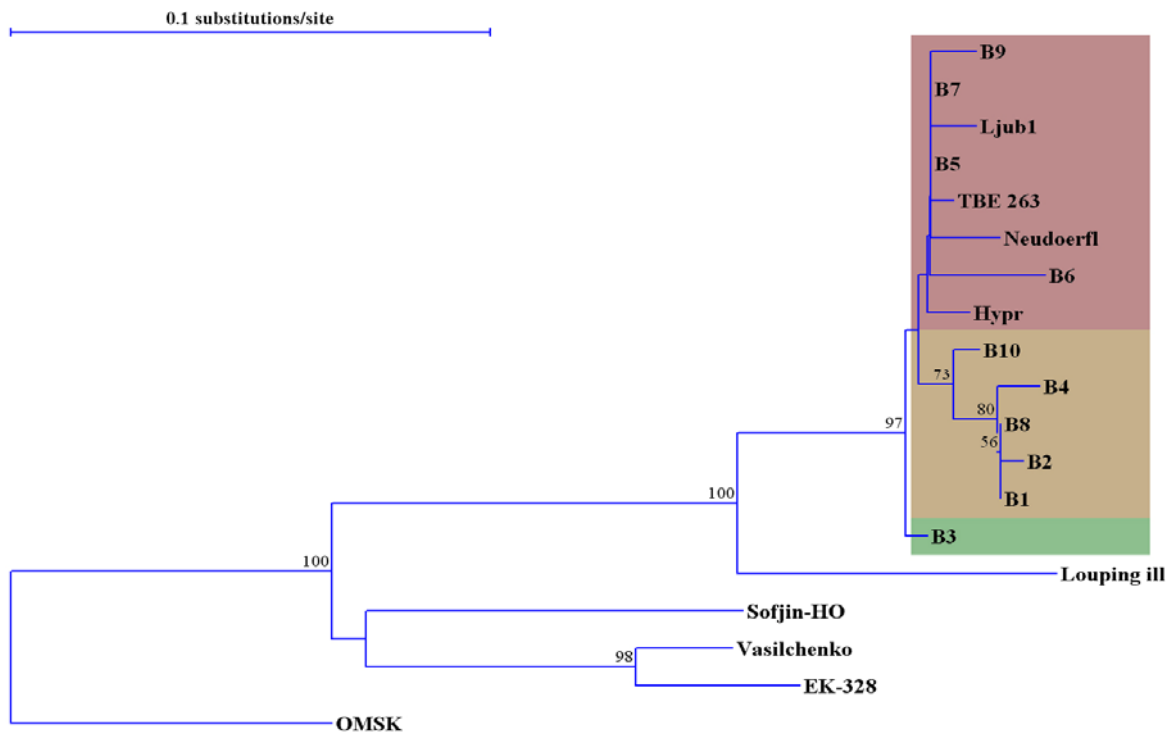
4.5 FILOGENETSKA ANALIZA

Poravnave nukleotidnih zaporedij smo uporabili za natančnejšo filogenetsko analizo. Izbrali smo program Treecon (Van der Peer, 1994), ki omogoča izbiro večih filogenetskih statističnih metod. Uporabili smo model JC69 z eno spremenljivko in model K80 z dvema

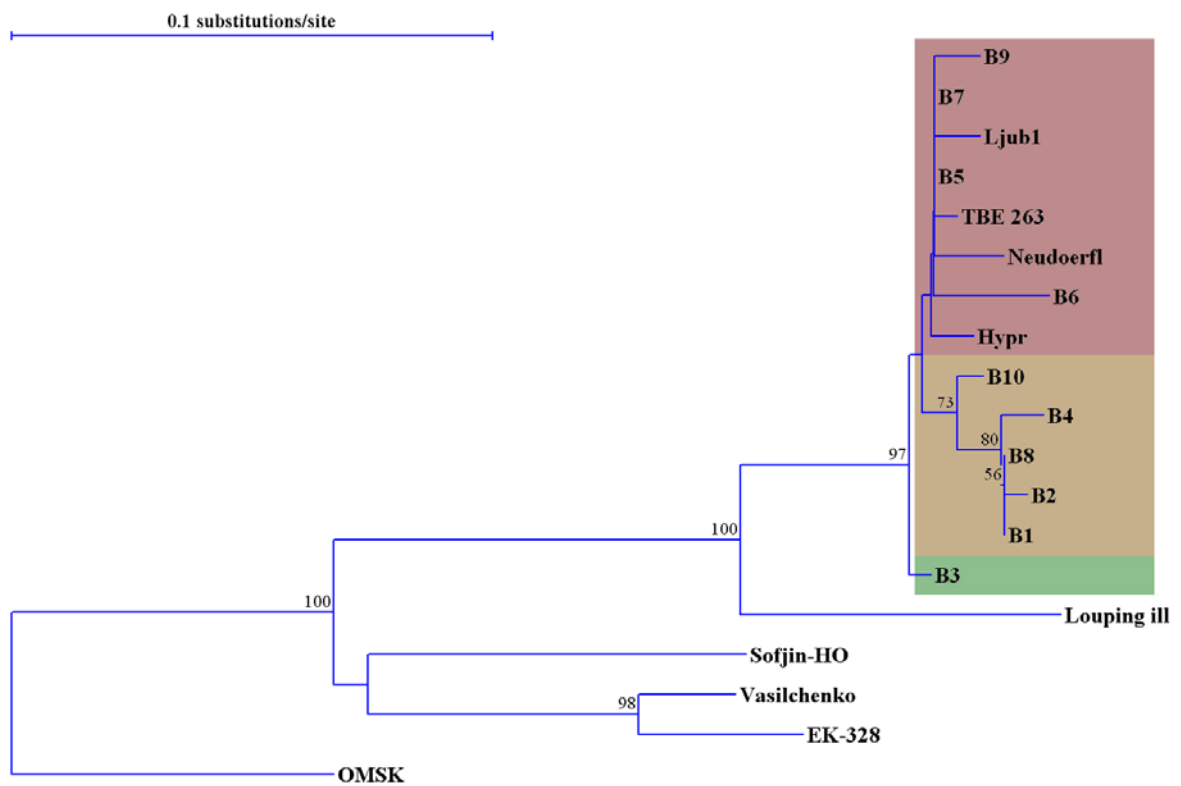
spremenljivkama. Statistično moč izdelanih dreves z obema metodama in zanesljivost postavljenih vej smo preverili z metodo vezanja s 500 in 1000-kratnimi ponovitvami. Rezultate smo grafično predstavili v obliki filogramov (Slike od 8 do 15). V poravnavi smo uporabili naslednje seve virusov (NCBI, 2008): Ljubljana 1 (AF091012), Neudoerfl (U27495), Hypr (U39292), TBE263 (U27491), EK-328 (DQ486861), Vasilchenko (L40361), Sofjin-HO (AB062064), Louping ill virus (Y07863) in kot zunanjo skupino zaporedje virusa hemoragične mrzlice OMSK (NC_005062).

4.5.1 Beljakovina NS5

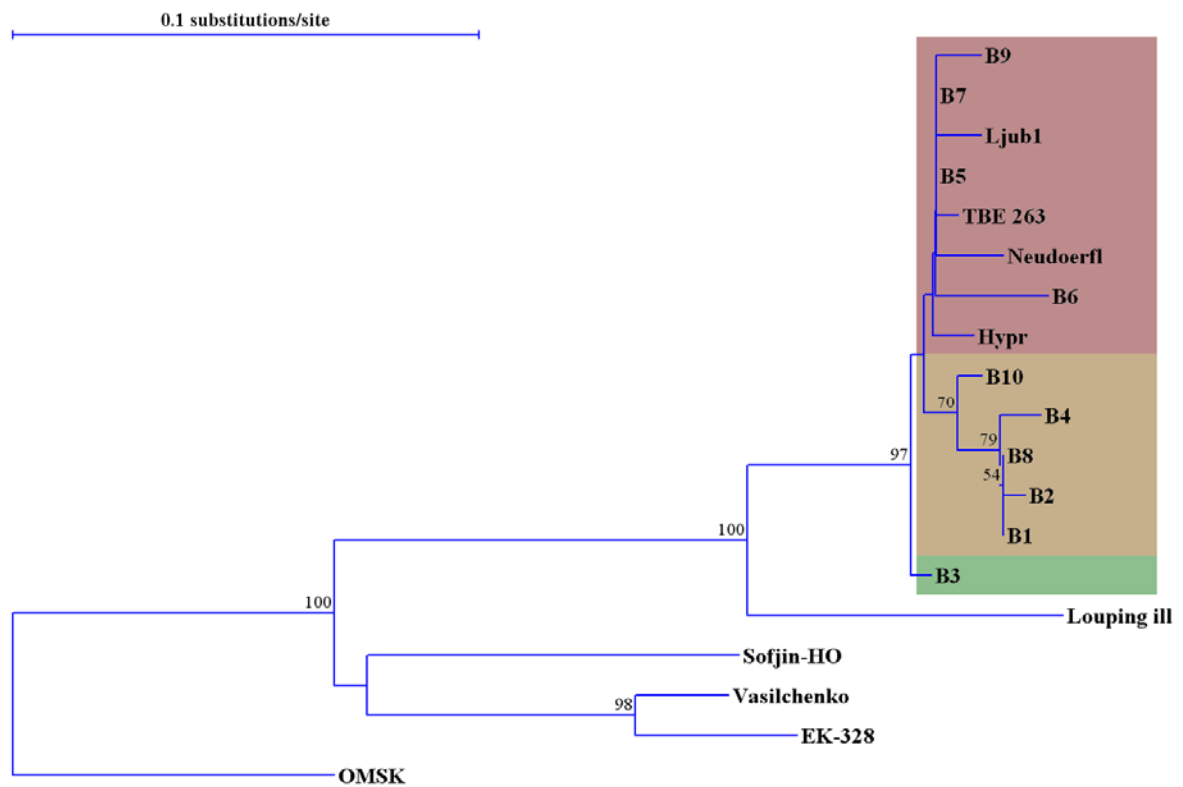
Filogrami za beljakovino NS5 (Slike od 8 do 11) kažejo skladnost oblike in razporejanja vej z različnima metodama izračuna dreves JC69 in K80 ter 500 ter 1000 ponovitvami z metodo vezanja. Manjše razlike so se pojavile le pri izračunih z metodo vezanja (od 1 do 2 %). Slovenski izolati tvorijo dve gruči znotraj podtipa CEE virusa KME. 4 izolati iz bolnikov se povezujejo v gručo s slovenskim izolatom Ljubljana 1, češkima TBE 263 in Hypr ter avstrijskim Neudoerfl. Pet izolatov tvori znotraj podtipa CEE virusa KME posebno gručo, ki se jasno loči od slovenskega izolata Ljubljana 1. Poleg tega popolnoma izstopa izolat bolnika 3, čeravno še vedno sodi v podtip CEE virusa KME. Izolati podtipa RSSE in sibirskega podtipa virusa KME tvorijo jasno ločeno skupino izven podtipa CEE virusa KME.



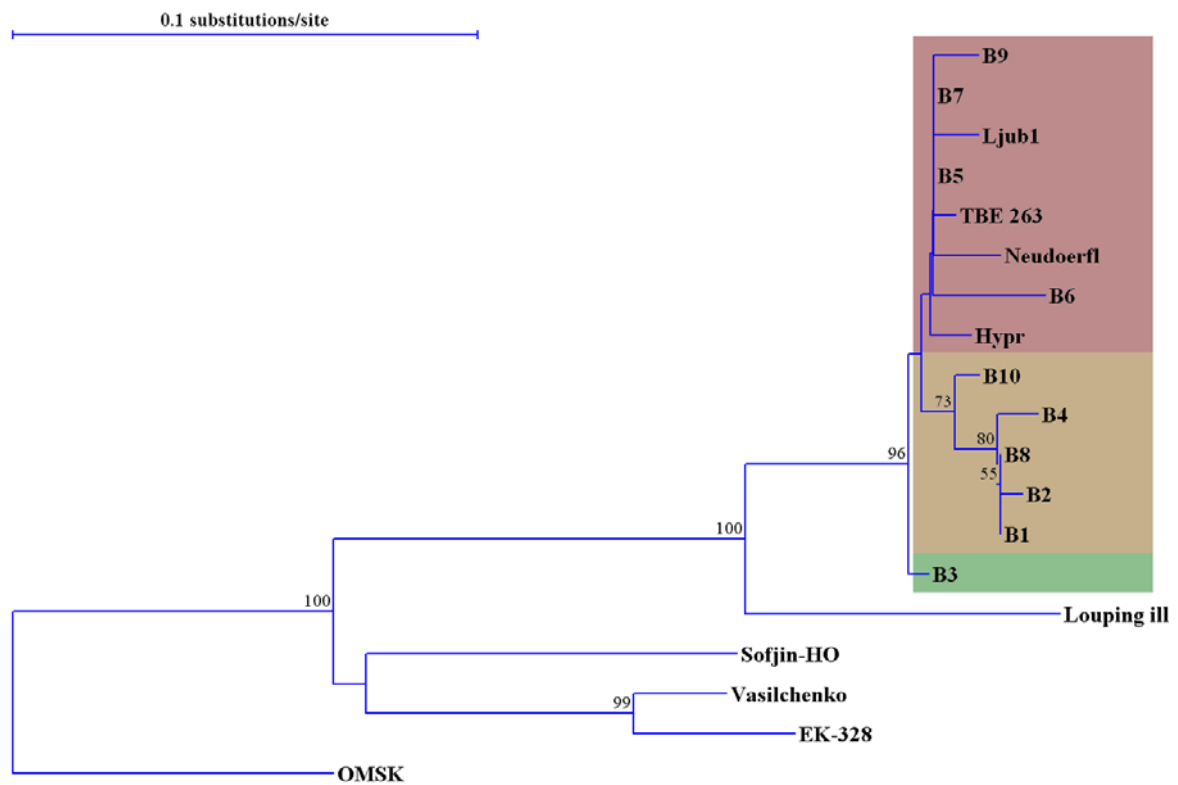
Slika 8: Filogram zaporedja beljakovine NS5 virusa KME (metoda JC69 in 500 ponovitev metode vezanja)



Slika 9: Filogram zaporedja beljakovine NS5 virusa KME (metoda JC69 in 1000 ponovitev metode vezanja)



Slika 10: Filogram zaporedja beljakovine NS5 virusa KME (metoda K80 in 500 ponovitev metode vezanja)

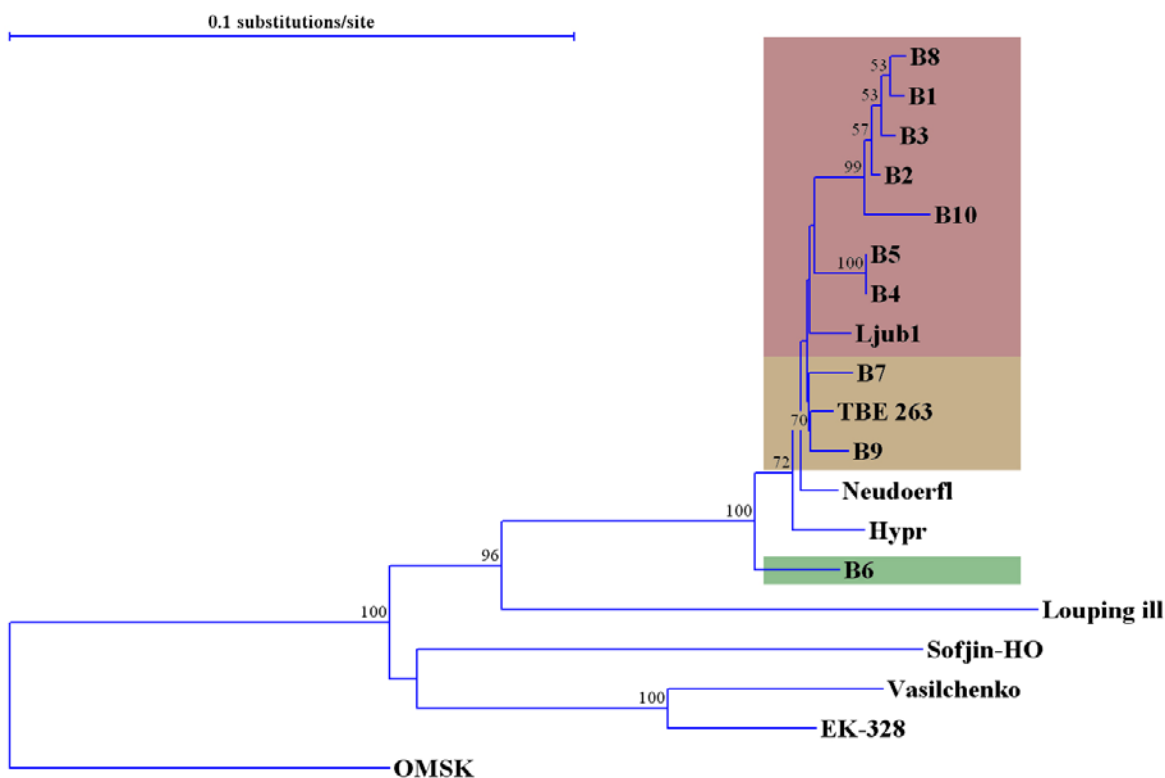


Slika 11: Filogram zaporedja beljakovine NS5 virusa KME (metoda K80 in 1000 ponovitev metode vezanja)

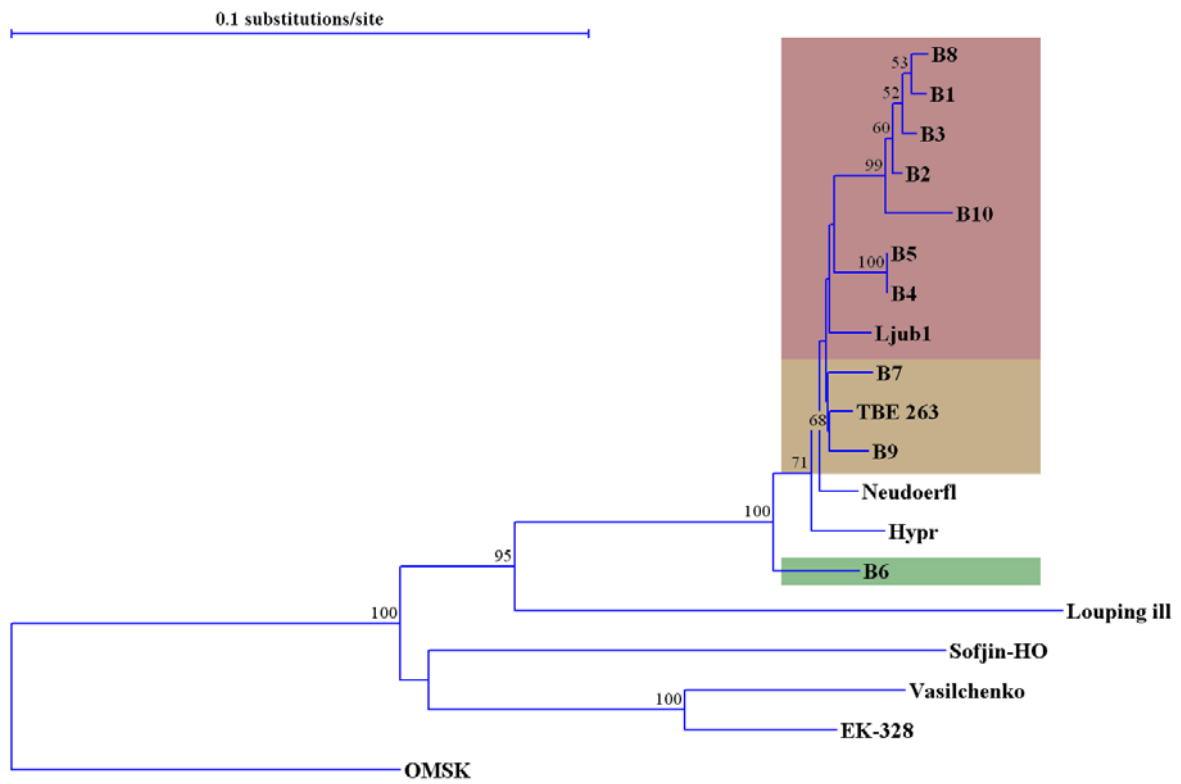
4.5.2 Beljakovina E

Rezultati sekvenčne analize zaporedja beljakovine E (Slike od 12 do 15) kažejo drugačno sliko, kot rezultati analize krajšega zaporedja beljakovine NS5. Filogrami izračunani z različnimi statističnimi metodami (JC69 in K80) ter različnimi ponovitvami z metodo vezanja (500 in 1000), so bili skoraj identični. Manjše razlike so bile le v izračunih z metodo vezanja (od 1 do 2 %).

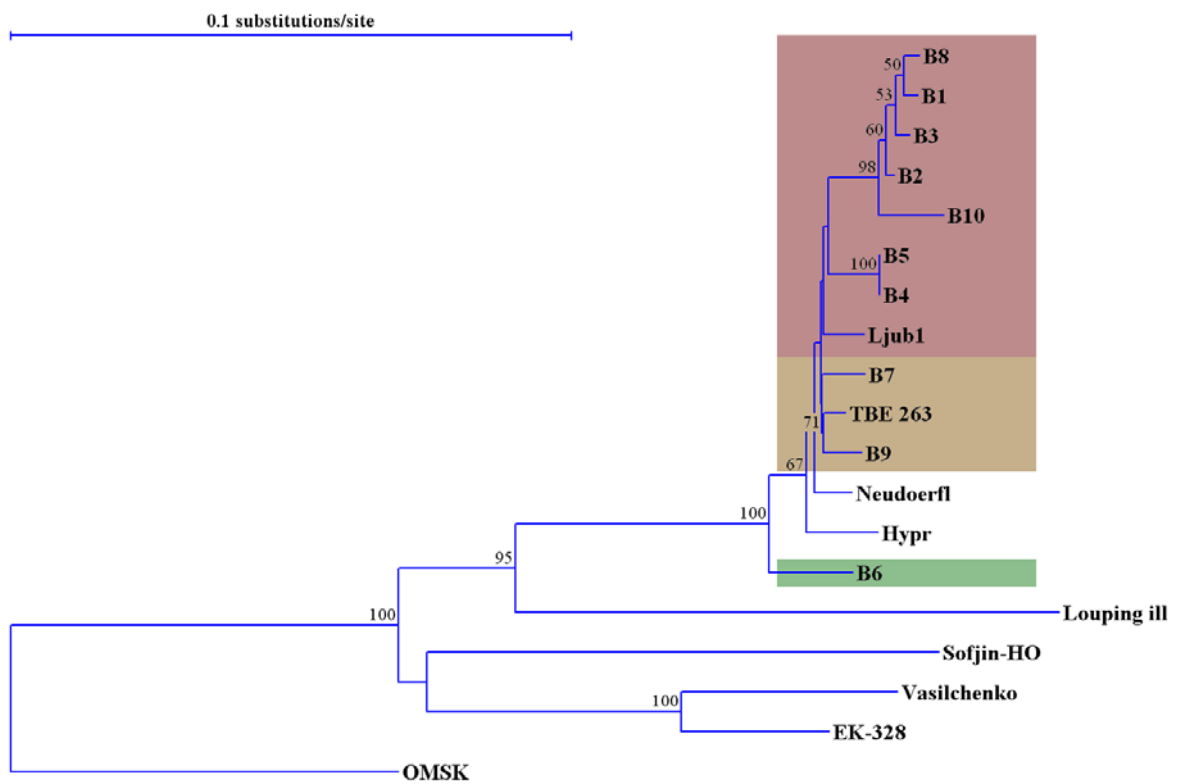
Slovenski izolati se jasno ločijo v dve gruči. Eno gručo tvorita izolata 2 bolnikov, ki sovпада s češkim izolatom TBE 263. Drugo gručo, ki je najbolj sorodna s slovenskim izolatom Ljubljana 1, sestavljajo iztolati 7 bolnikov. Seva Neudoerfl in Hypr tvorita dve ločeni veji znotraj podtipa CEE virusa KME. Povsem samostojno vejo znotraj podtipa CEE virusa KME tvori izolat virusa, ki smo ga dobili iz možganskega tkiva preminulega bolnika (B6).



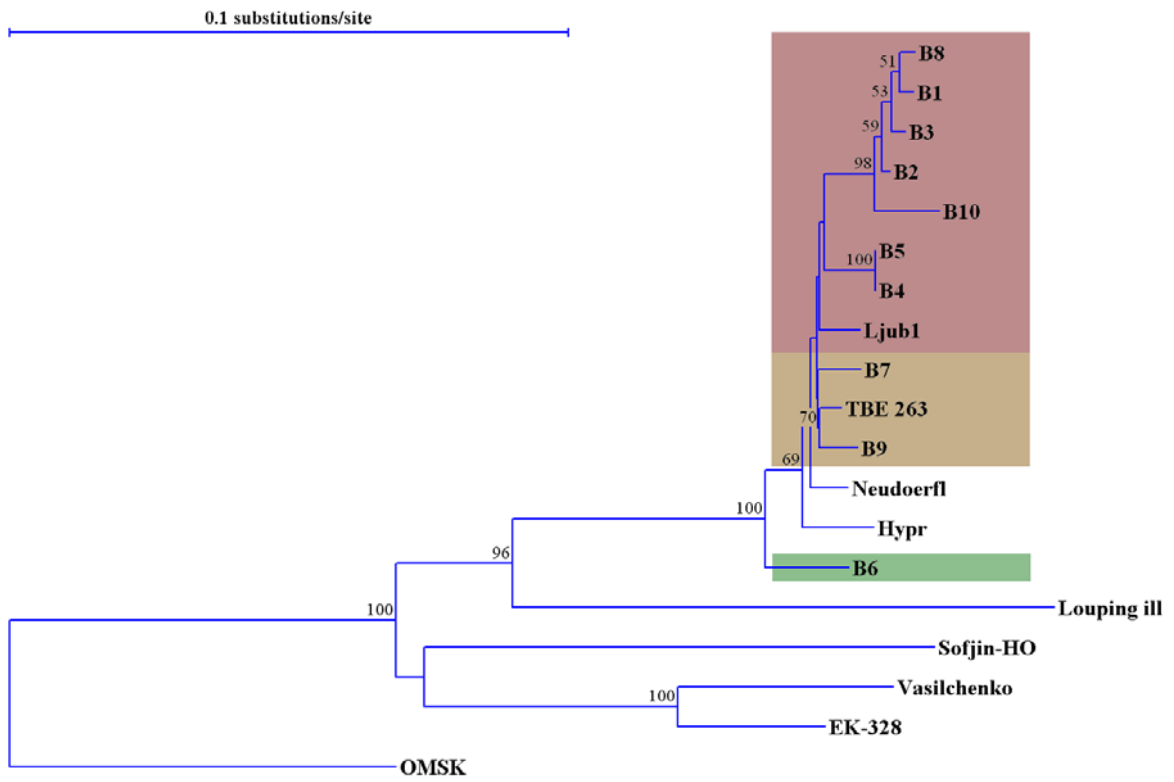
Slika 12: Filogram zaporedja beljakovine E virusa KME (metoda JC69 in 500 ponovitev metode vezanja)



Slika 13: Filogram zaporedja beljakovine E virusa KME (metoda JC69 in 1000 ponovitev metode vezanja)



Slika 14: Filogram zaporedja beljakovine E virusa KME (metoda K80 in 500 ponovitev metode vezanja)



Slika 15: Filogram zaporedja beljakovine E virusa KME (metoda K80 in 1000 ponovitev metode vezanja)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 UVOD

Virus KME je RNK virus iz družine flavivirusov. Virus je endemičen v Evropi, Rusiji in na Japonskem. Med endemična področja prištevamo tudi Slovenijo. Virus KME povzroča nevarno obolenje z visoko vročino in vnetjem možganske ovojnice. Zanj je značilna visoka genetsko raznolikost. Razvrščamo ga v tri podtipe, znotraj katerih ločimo tudi več sevov. V Sloveniji do danes še ni objavljenih molekularnih značilnosti virusa KME, prav tako nimamo podatkov o genetski raznolikosti virusa znotraj endemskega območja. Z diplomsko nalogo smo želeli dokazati, da pri nas obstajajo genetske različice virusa KME in te uvrstiti v Evropski prostor.

5.2 POTEK DELA

Za filogenetsko analizo smo morali namnožiti primerno ohranjen odsek genoma virusa. Po pregledu objav smo se odločili za pomnoževanje in sekveniranje nukleotidnega zaporedja beljakovine E. Našo odločitev podpira več raziskav.

Raziskave so pokazale da je beljakovina E primerna za filogenetske študije (Rice 1994), saj je poleg beljakovine NS5 najbolj ohranjena beljakovina flavivirusov, ki omogoča zanesljive izračune evlucijskih razdalj (Zanotto in sod. 1996, McGuire in sod. 1998). Molekularno epidemiološke raziskave se večinoma nanašajo na največjo ovojnično glikozilirano beljakovino E. Neposredno je vpletena pri vstopu virusa v celico, predvsem pri vezavi na celico in pri zlitju membran virusa ter celice (Rice in sod., 1996). Sklepajo, da evlucijski pritisk kaže v prid ohranjanju zaporedja AK beljakovine E in je večina sprememb tega zaporedja konzervativne narave (Ecker in sod., 1999).

V začetnih poskusih smo izbrali izolat RNK iz možganov pokojnega bolnika, kjer smo predvidevali visoko koncentracijo virusne RNK. Kot pozitivno kontrolo smo izbrali izolat

Ljubljana 1. Uporabili smo začetne oligonukleotidne, ki pomnožujejo odsek zapisa za beljakovino E in se prilegajo zaporedju genotipa Neudoerfl virusa KME.

Pričakovali smo, da bomo za namen filogenetske raziskave uspešno pomnožili daljša zaporedja virusne RNK. Izvedli smo temperaturno optimizacijo postopka RT-PCR, da bi ugotovili optimalno temperaturno območje prileganja začetnih oligonukleotidov. Prvo pomnoževanje z RT-PCR je bilo po analizi z gelsko elektroforezo negativno. Šibko pozitivna je bila le pozitivna kontrola. V naslednji stopnji smo pripravili različne redčitve vzorcev RNK. Želeli smo se izogniti nastajanju nespecifičnih produktov zaradi prevelike koncentracije izolirane celokupne RNK. Znižali smo tudi koncentracijo ionov Mg^{2+} , ki jo priporoča proizvajalec (Superscript one step RT-PCR z mešanico encimov RT Platinum Taq mix). Rezultat PCR so bili nespecifični pridelki PCR.

Po neuspešnih poskusih smo se odločili poiskati vzroke za neuspeh pri pomnoževanju željenih nukleotidnih zaporedij. Preverili smo prisotnost virusne RNK z molekularnimi metodami. Izbrali smo visoko specifično metodo RT-PCR v realnem času, ki nam je omogočila izločitev lažno pozitivnih vzorcev. Večina serološko pozitivnih vzorcev krvi in seruma je bila pozitivna. Rezultati so se skladali s preliminarno študijo, kjer so uspešno dokazali prisotnost RNK virusa KME v krvi in serumu bolnikov. Želeli smo ugotoviti če so v vzorcih prisotni inhibitorji reakcije PCR. Izvedli smo postopek merjenja čistosti in koncentracije celokupne RNK izolirane iz vzorcev bolnikov. Po analizi rezultatov smo ugotovili, da so vsi izolati vsebovali kontaminante. Nižji koeficienti 260/280 (pod 1,5) nakazujejo na prisotnost beljakovin. Bistveno več je bilo prisotnih ostankov iz postopka izolacije, na kar kažejo zelo nizki koeficienti 230/260 (pod 0,4). Med pozitivnimi in negativnimi izolati celokupne RNK nismo opazili razlik, ki bi jih bilo možno pripisati inhibitorjem PCR. Sklepamo, da prisotnost kontaminant ni bistveno vplivala na neuspešno pomnoževanje virusne RNK z RT-PCR. V nasprotnem primeru bi bilo pomnoževanje z RT-PCR v realnem času moteno ali neuspešno.

Kot zadnjo možnost optimizacije postopka smo vzeli pod drobnogled sestavo uporabljenih začetnih oligonukleotidov. S programom MegAlign smo poravnali nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov in genetskega zapisa evropskih sevov KME. Začetni

oligonukleotidi so se prilegali na izolat Neudoerfl. Opazili smo neujemanja s slovenskim izolatom Ljubljana 1 (3 od 18 bp), zato smo se odločili za pripravo novih začetnih oligonukleotidov. Z internetnim orodjem BLAST (NCBI, 2008) smo poiskali nukleotidna zaporedja zapisov za beljakovino E večih sevov virusa KME. Kot modelni sev smo vključili sev Ljubljana 1. Iz poravnave s programom MegAlign smo izbrali najprimernejše začetne oligonukleotide za RT-PCR in vgnezdni PCR. Pozorni smo bili na to, da so imeli začetni oligonukleotidi približno enako optimalno temperaturo prileganja (razlika do 2 °C) in so bili dolgi vsaj 18 bp.

Med 56 vzorci smo za sekveniranje izbrali 10 vzorcev. Ti so bili geografsko razpršeni po Sloveniji. Pri tem moramo upoštevati, da je v bazi podatkov zaveden kraj bivanja bolnikov, nimamo pa podatkov o kraju vboda klopa. Za sklepanje o geografski povezavi primerov bolezni in genetskim podtipom KME bi morali izvesti dodatne filogenetske raziskave na izolatih RNK iz okuženih klopov oziroma poznati anamnezo bolnikov.

RT-PCR je bil uspešen pri vseh izbranih vzorcih vključenih v nadaljno raziskavo. Po analizi gelske elektroforeze so bili vidni tudi nespecifični pomnožki PCR. Da bi želeno nukleotidno zaporedje še dodatno namnožili smo uporabili vgnezdni PCR. Pri večini vzorcev smo dobili samo nespecifične pridelke PCR, zato smo se odločili, da uporabimo pridelke RT-PCR. Nespecifične pridelke smo od tarčnih ločili z nizkoodstotno agarozno gelsko elektroforezo. Koncentracije pridelkov so bile nizke, kar se je odražalo pri sekvenčni reakciji. Zaradi prenizkega signala fluorescence smo le to v nekaterih primerih morali ponoviti.

Za pomnoževanje krajšega 252 baznih parov dolgega odseka genskega zapisa za protein NS5 smo uporabili uveljavljeno metodo iz predhodnih raziskav (Saksida in sod., 2005). Odrezali smo zaporedje, ki se ujema z zaporedjem začetnih oligonukleotidov in za filogenetsko analizo uporabili vmesni odsek dolg 212 bp.

Določanje nukleotidnega zaporedja odseka zapisa za beljakovino E je zaradi njegove dolžine (~1400 bp) potekala v več fazah. Najprej smo uporabili začetne oligonukleotide za RT-PCR in vgnezdni PCR posebej pripravljene samo za sekvenčno reakcijo. Izkazalo se je, da je nov začetni oligonukleotid ENV 4F neprimeren za pomnoževanje notranjega

tarčnega odseka zapisa za beljakovino E. Slednji se ni prilegal na večino zaporedij RNK izolatov bolnikov KME.

Nukleotidna zaporedja dolga približno 400 bp smo poravnali s programom MegAlign. Določili smo najbolj ohranjene in primerne odseke za pripravo novih začetnih oligonukleotidov. Postopoma smo pokrili nukleotidno zaporedje v obe smeri zapisa DNK. Sestavljanje zaporedij smo opravili v programu SeqMan. Program omogoča vpogled v surove podatke nukleotidnih odsekov. Nesoglasja med posameznimi prekrivajočimi se deli nukleotidnih odsekov smo popravili tako, da smo upoštevali zaporedje nukleotidnega odseka z jasno ločenimi in višjimi signali. Tako smo sestavili nukleotidna zaporedja dolga od 811 bp do 1375 bp. Pri poravnavi zaporedij smo prekrivajoče dele odrezali na dolžino 753 bp. Menimo, da je razlog za neuspešne sekvenčne reakcije z določenimi začetnimi oligonukleotidi nepopolno ujemanje le teh s pridelki PCR. V 4 primerih smo imeli težave pri sekveniranju z začetnim oligonukleotidom ENV 3R in pri dveh z začetnim oligonukleotidom ENV 3.1R. Da bi določili optimalne začetne oligonukleotide za sekvenčno reakcijo za vpogled v celoten zapis za beljakovino E, bi bile potrebne še dodatne raziskave na večjem številu vzorcev.

5.3 ANALIZA REZULTATOV

5.3.1 Sorodnost izolatov KME

S programom MegAlign smo ugotavljali v kolikšni meri so posamezni izolati sorodni med seboj (priloga C in E). Izolati s slovenskega endemskega območja kažejo v analizi zaporedij beljakovine NS5 in beljakovine E visoko sorodnost s sevi iz podtipa CEE. Pri izračunu sorodnosti zaporedij za beljakovino E smo opazili v povprečju za 1-2 % višjo sorodnost kot pri sorodnostih zapisa za beljakovino NS5. Te razlike so se kazale tudi pri sorodnosti CEE sevov tako kot tudi pri ostalih dveh podtipih RSSE in sibirskem podtipu virusa KME. Na podlagi izračunov sorodnosti smo opazili jasno razliko med podtipi virusa KME, tega pa ne moremo trditi za posamezne seve znotraj CEE podtipa virusa. V ta

namen smo izrisali še filogenetska drevesa, ki bi nam dala podroben in jasen pregled sorodstvenih odnosov med posameznimi izolati.

5.3.2 Filogenetska analiza

Pri analizi rezultatov smo ugotovili, da se filogrami beljakovine NS5 in E razlikujejo. Razlogov je več. Za filogenetsko analizo beljakovine E smo pomnožili skoraj štiri krat daljši odsek genskega zapisa (753 bp). Ta je primernejši za filogenetsko raziskavo kot kratki odsek zaporedja beljakovine NS5 (212 bp). Tako kratko nukleotidno zaporedje ne izraža prave filogenije beljakovine NS5. Beljakovina NS5 ima bolj ohranjeno zaporedje AK in se ne spreminja bistveno med posameznimi sevi virusa KME. Beljakovina NS5, ki ima funkcijo od RNK odvisne RNK-polimeraze je z razlogom bolj konzervativne narave. Medtem je beljakovina E bolj variabilna, saj sodeluje v procesih vezave in zlitja z membrano gostiteljske celice. Spremembe ovojnične beljakovine E manj dramatično vplivajo na razmnoževanje virusa. Beljakovina E je zato bolj primerna za filogenetske in epidemiološke študije.

Če primerjamo filograme za zaporedja posamezne beljakovine se ti med seboj ne razlikujejo. Namenoma smo izbrali enostavna modela za izračun filogenetskih razdalj (JC69 in K80), saj sta primerna za analizo kratkih zaporedjih in obdelavo majhnega števila vzorcev. Kljub uporabi različnih modelov izračuna evolucijskih razdalj se filogrami skoraj popolnoma skladajo. Razlike v izračunih z metodo vezanja so bile zanemarljivo majhne (1-2 %). Skorajšnja identičnost filogenetskih dreves z uporabo različnih ponovitev z metodo vezanja dokazuje, da so ta pravilna in da smo v naši raziskavi za filogenetsko analizo izbrali ustrezne metode za izračuna filogenetskih razdalj. Z bolj zapletenimi metodami kot je Fitch Margoliash in podobnimi bi dobili bistveno bolj nezanesljive izračune in nezanesljive filograme. Te metode so bolj primerne pri obsežnih raziskavah z velikim številom vzorcev (>100) z daljšimi nukleotidnimi zaporedji (>10.000 bp).

Po topologiji se filogenetska drevesa beljakovine NS5 in beljakovine E med seboj bistveno razlikujejo. Pri beljakovini NS5 so zaporedja zbirajo v gruče znotraj podtipa CEE vendar so te gruče drugače sestavljene in kažejo drugačno sorodnost kot v primeru beljakovine E.

Razlike med filogrami ene in druge beljakovine so se pojavile v razporeditvi vzorcev v ti dve gruči in v sorodstvenih odnosih z izolati CEE virusa KME. Pri analizi razvejanosti filogramov beljakovine NS5 smo opazili, da je nekaj slovenskih izolatov v eni gruči z avstrijskim sevom Neudoerfl, češkima sevoma TBE 263 in Hypr ter slovenskim sevom Ljubljana 1. Preostanek slovenskih izolatov se je zbiral v posebni gruči, jasno ločeni od ostalih sevov podtipa CEE. To nas nekoliko preseneča saj smo domnevali, da se bodo vsi slovenski izolati zbrali v gruči ob izolatu Ljubljana 1.

Pri analiza sorodstvenih odnosov zaporedij beljakovine E smo dobili povsem drugačne rezultate. Slovenski izolati (7 od 10 vključenih v raziskavo) so se ločili v dve gruči, ki sta bili najbolj sorodni s slovenskim sevom Ljubljana 1. Slovenski izolati virusa KME so tvorili v primeru beljakovine E povsem samostojno vejo znotraj podtipa CEE. S tem smo dokazali, da je v Sloveniji razširjena genetska različica virusa KME znotraj podtipa CEE virusa KME. Opazili smo posamezne izjeme. Namreč, pri 2 izolatih smo dokazali sorodnost s češkim sevom TBE 263, za katerega so značilne zmanjšane nevrovirulentne lastnosti pri miškah (Wallner, 1996). Predvidevamo, da se endemski področji teh dveh genetskih različic virusa prekrivata. Za dokaz naše domneve bo potrebno preučiti večje število izolatov bolnikov s KME iz različnih endemskih področij v Sloveniji.

Posebej zanimiv in izstopajoč primer je bolnik št. 6, ki se uvršča v posebno filogenetsko vejo znotraj podtipa CEE virusa KME. Bolnikov vzorec je bil odvzet po smrti z biopsijo možganov. Omenjen izolat bi bil primeren v nadaljnjih raziskovalnih projektih vezanih na študij virulence virusa KME. To sklepamo iz nedavnih raziskav na češkem nenevrovirulentnem sevu TBE 263. Ugotovili so, da ima virus v različnih tkivih različno antigensko zgradbo. Še več, pri gojenju virusa na sesajočih miškah je po večih pasažah virus pridobil nevrovirulentne lastnosti. Prav tako so dokazali, da se spreminja tudi nukleotidno zaporedje nestrukturnih beljakovin NS2B in NS3 (Ruzek et. al 2008). Zato ne izključujemo možnosti, da se tudi protein E lahko spreminja. Za potrditev te domneve bi bile potrebne nadaljne raziskave.

Naši rezultati predstavljajo realno sliko filogenije virusa KME v Sloveniji, saj smo za sekveniranje nukleotidnega zapisa virusa uporabili RNK izolirano neposredno iz vzorcev bolnikov. Tako smo se izognili morebitnemu spreminjanju genetskega materiala virusa med gojenjem na sesajočih miškah in celičnih kulturah.

Potrdili smo, da je odsek genoma z zapisom za beljakovino E primeren za filogenetske raziskave. Pokazali smo tudi, da je nekoliko bolj variabilen od zaporedja beljakovine NS5. Proti našim pričakovanjem se določeni izbrani začetni oligonukleotidi niso prilegali nukleotidnim zaporedjem vseh izolatov virusa. Izsledki naše raziskave kažejo, da je največja pomanjkljivost filogenije pri analizi odseka beljakovine NS5 v dolžini fragmenta. Ta je prekratek in neprimeren za filogenetsko analizo saj predstavlja le 15 % nukleotidnega zaporedja beljakovine NS5. Kljub temu pa je metoda analize odseka beljakovine NS5 uporabna in enostavneje izvedljiva, saj lahko izolate virusnih RNK nedvomno uvrstimo v podtip CEE. Za določanje visoko natančne sorodnosti med sevi virusa KME je po našem mnenju ta metoda neprimerna. Rezultati naše preliminarne študije vsekakor kažejo na to, da je analiza beljakovine E primernejša za filogenetske študije.

Ob koncu lahko zaključimo, da se slovenski izolati virusa KME, ki smo jih dobili neposredno iz kliničnih vzorcev, med seboj genetsko razlikujejo. Zato se odpirajo nova vprašanja in ideje za raziskave v bodoče. Zanimivo bi bilo preučiti ali so genetske različice geografsko povezane (večje število izolatov iz različnih območij Slovenije) in ali obstaja povezava med genetskimi različicami ter razliko v (nevro)virulenci posameznega izolata?

5.4 SKLEPI

- Metoda RT-PCR v realnem času je ustrezna presejalna metoda za neposreden dokaz virusa v vzorcu, saj je visoko specifična in občutljiva.
- V literaturi objavljeni začetni oligonukleotidi za pomnoževanje virusnega gena za beljakovine E niso primerni za virus KME, ki kroži v Sloveniji.
- Z začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih oblikovali v okviru diplomske naloge, smo uspešno pomnožili gen za beljakovino E virusa KME iz Slovenije.
- Filogenetska analiza je primernejša na daljših nukleotidnih zaporedjih (753 bp) beljakovine E kot na krajših nukleotidnih zaporedjih (212 bp) beljakovine NS5.
- Uporaba modela JC z enim ali modela K80 z dvema spremenljivkama ni pokazala sprememb v izrisanem filogenetskem drevesu. Filogenetsko drevo je ostalo enako tudi, ko smo uporabili 500 ali 1000 ponovitev z metodo vezanja.
- Virus KME iz Slovenije smo po pričakovanjih uvrstili v podtip CEE. Slovenski izolati virusa KME so najbolj podobni prototipnemu sevu Neudorfl iz Avstrije in izolatu TBE263 iz Češke.
- Znotraj slovenskega endemskega območja KME smo dokazali vsaj 3 genetske različice virusa KME. Najbolj raznolik je bil virus KME izoliran iz možganskega tkiva bolnika s KME.
- Rezultati filogenetske analize kažejo dejansko sliko sorodstvenih razmerij virusa KME v Sloveniji, saj smo nukleotidno zaporedje virusa KME določili neposredno iz virusne RNK izolirane iz kliničnih vzorcev bolnikov.

6 POVZETEK

Virus KME je RNK virus iz družine flavivirusov (Monath in Heinz, 1996). Endemičen je na azijskem območju Rusije, na Japonskem in v Evropi, kamor sodi tudi endemično območje Slovenije. Zanj značilna je visoka genetska raznolikost (Han in sod. 2005, Mats in sod. 2003). Ločimo 3 podtipe virusa KME in znotraj podtipov več sevov virusa (Pletnev in sod., 1990; Gritsun in sod. 1993, 1999). Virus podtipa CEE povzroča obolenje v dveh fazah ter nevarno vnetje možganske ovojnice z visoko vročino (Gritsun in sod, 2002). V Sloveniji do sedaj še ni objavljenih podatkov o molekularnih značilnostih virusa KME, kakor tudi ne podatkov o njegovi genetski raznolikosti.

Z diplomsko nalogo smo želeli filogenetsko opredeliti virus KME in dokazati obstoj genetskih različic virusa KME v Sloveniji. Izolirali smo virusno RNK neposredno iz 56 vzorcev bolnikov. Prisotnost virusne RNK smo preverili z metodo RT-PCR v realnem času. Med 49 pozitivnimi vzorci smo izbrali 10 geografsko razpršenih vzorcev. Določili smo nukleotidno zaporedje odsekov genov za beljakovino NS5 (212 bp) in beljakovino E (753 bp). Izvedli smo filogenetsko analizo skupnih nukleotidnih zaporedij z distančno metodo. Uporabili smo model JC69 z eno in model K80 z dvema spremenljivkama. Statistično smo podatke preverili z metodo vezanja s 500 in 1000 ponovitvami in dokazali ustreznost uporabljene metode izračuna filogenetskih dreves.

Ugotovili smo, da je filogenetska analiza bolj zanesljiva z daljšimi zaporedji beljakovine E. Virus KME iz Slovenije smo po pričakovanjih uvrstili v centralno-evropski podtip virusa. Slovenski izolati virusa KME so najbolj podobni prototipnemu sevu Neudorfl iz Avstrije in izolatu TBE263 iz Češke. Znotraj 10 vzorcev virusne RNK smo dokazali tri genetske različice virusa KME ter tako potrdili domnevo o genetski raznolikosti virusa v Sloveniji. Menimo, da rezultati naše raziskave kažejo dejansko sliko sorodnostnih odnosov virusa KME v Sloveniji, saj smo virusno RNK izolirali neposredno iz vzorcev bolnikov. Na ta način smo se izognili spreminjanju dednega materiala virusa, do katerega pride pri gojenju virusa v miškah ali na celičnih kulturah.

7 VIRI

- Avšič-Županc T., Poljak M. 1993. Uporaba metod molekularne virologije pri raziskovanju etiologije klopnega meningoencefalitisa. V: Klopni meningoencefalitis. Bedjaničev simpozij, Zdravilišče Dobrna, 25. sept. 1993. Celje, Infektološka sekcija SZD in Infekcijski oddelek bolnišnice Celje: 61-66
- Avšič-Županc T., Petrovec M., Jelovšek M., Strle F. 1995. Medicinsko pomembni arbovirusi v Sloveniji. Zdravniški vestnik, 64, Suppl. 3: 15-19
- Avšič-Županc T., Petrovec M. 1997. Epidemiology of tick-borne encephalitis. V: Factors in the emergence of arbovirus diseases: emergency diseases. Saluzzo J.F., Dodet B. (eds). Paris, Elsevier: 215-222
- Best S.M., Morris K.L., Shannon J.G., Robertson S.J., Mitzel D.N., Park G.S., Boer E., Wolfenbarger J.B., Bloom M.E. 2005. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of Virology*; 79, 12: 828–839
- NCBI. 2008. Blast. Bethesda, NCBI (National Center for Biotechnology Information) (21. mar. 2008).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (10. sept. 2008)
- Cepljenje proti klopnemu meningoencefalitisu. 2008. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (5. sept. 2008).
<http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=1615> (15. sept. 2008): 2 str.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 1: 156-159

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: 1-28

Cockerill F.R. III. 2003. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 127, 9: 1112-1120

Demicheli, V., Graves P., Pratt M., Jefferson T. 1998. Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1. Art. No.: CD000977. DOI: 10.1002/14651858.CD000977 (26. jan. 1998)
<http://mrw.interscience.wiley.com/cochrane/clsystrev/articles/CD000977/frame.html> (10. sept. 2008): 8 str.

Dumpis U., Crook D., Oksi J. 1999. Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 28, 4: 882-890

Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*, 80 (Pt 1), 179-185

Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 6: 503-512

Golovljova, I., Vene S., Sjolander K.B., Vasilenko V., Plyusnin A., Lundkvist A. 2004. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *Journal of Medical Virology*, 74, 4: 580-588

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

Gritsun, T.S., Frolova T.V., Pogodina V.V., Lashkevich V.A., Venugopal K., Gould E.A. 1993. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the

Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses. *Virus Research*, 27, 2: 201-209

Gritsun, T.S., Venugopal K., Zanutto P.M, Mikhailov M.V., Sall A.A., Holmes E.C., Polkinghorne I., Frolova T.V., Pogodina V.V., Lashkevich V.A., Gould E.A. 1997. Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Virus Research*, 49, 1: 27-39

Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57, 1-2: 129-146

Gustafson R. 1994. Epidemiological studies on Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Suppl. 92: 1-63

Haglund, M., Vene S., Forsgren M., Gunther G., Johansson B., Niedrig M., Plyusnin A., Lindquist L., Lundkvist A. 2003. Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden. *Journal of Medical Virology*, 71, 4: 610-621

Han, X., Juceviciene A., Uzcategui N.Y., Brummer-Korvenkontio H., Zygtiene M., Jaaskelainen A., Leinikki P., Vapalahti O. 2005. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania. *Journal of Medical Virology*, 77, 2: 249-256

Hayasaka, D., Y. Suzuki, H. Kariwa, L. Ivanov, V. Volkov, V. Demenev, T. Mizutani, T. Gojobori, Takashima I. 1999. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia. *Journal of General Virology*, 80 (Pt 12), 3127-3135

Heinz F.X. 2003. Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine*, 21, Suppl. 1, S3-S10

Holzmann, H., Heinz F.X., Mandl C.W., Guirakhoo F., Kunz C. 1990. A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *Journal of Virology*, 64, 10: 5156-5159

Jereb M., Muzlovič I., Avšič-Županc T., Karner P. 2002. Severe tick-borne encephalitis in Slovenia: Epidemiological, clinical and laboratory findings. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114, 13-14: 623-626

Jung M. 1992. O virusu in diagnostiki klopnega meningoencefalitisa. V: Lešničar J. Klopni meningoencefalitis. Strle F.(ur.). *Lymenska borelijoza*. Celje, Cetus: 22-26

Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 6: 257-260

Klopni meningoencefalitis. 2001. Ljubljana, Zavod za zdravstveno varstvo Ljubljana (2001).

http://www.zzv-lj.si/c-epi/ambulanta/epidemiološka/meningitis/klopni_m.html (3.jun. 2003): 2 str.

Kraigher A., Turk 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

Kraigher A., Hočevnar-Grom A., Klavs I., Sočan M., Grgič-Vitek M., Pahor L., Kastelic Z. 2002. Transmisivne nalezljive bolezni. V: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2001. Zdravstveno varstvo. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 35-40

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

- Lindenbach, B.D. in Rice C.M. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 59, 23-61
- Ludwig G.V., Iacono-Connors C. 1993. Insect-transmitted vertebrate viruses: *Flaviviridae*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 29A, 4: 296-309
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6: 1292-1305
- Malovrh T., Marc M. 1997. Proučevanje naravnih gostiteljev virusa klopnega meningoencefalitisa v aktivnih in latentnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Medicinski razgledi*, 36: 465-478
- McGuire, K., Holmes E.C., Gao G.F., Reid H.W., Gould E.A. 1998. Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis. *Journal of General Virology*, 79 (Pt 5), 981-988
- McMinn P.C. 1997. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *Journal of General Virology*, 78 (Pt 11): 2711-2722
- Monath T.P., Heinz F.X. 1996. Flaviviruses. V: *Fields virology*. 3rd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott - Raven Publishers: 961-1034
- Monath T.P., Tsai T.F. 1997. Flaviviruses. V: *Clinical virology*. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (eds.). New York, Churchill Livingstone Inc.: 1133-1185
- Newton C.R., Graham A. 1994. Instrumentation, reagents and consumables. V: *PCR*. Graham J.M., Billington D. (eds.). Oxford, BIOS Scientific Publishers Limited: 9-25
- Niesters H.G.M. 2001. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*, 25, 4: 419-429

- Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. 1990. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 174, 1: 250-263
- Poljak M., Avšič-Župane T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33, 3: 379-400
- Puchhammer-Stöckl E., Kunz C., Mandl C.W., Heinz F.X. 1995. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clinical and Diagnostic Virology*, 4, 4: 321-326
- Ramelow C., Süß J., Berndt D., Roggendorf M., Schreier E. 1993. Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 45, 1: 115-119
- Rice C.M. 1996. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. V: *Fields virology*. 3rd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott - Raven Publisher: 931-960
- Ruzek, D., Gritsun T.S., Forrester N.L., Gould E.A., Kopecky J., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L. 2008. Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 374, 2: 249-255
- Salemi M., Vandamme A.M. 2003. *The phylogenetic handbook. A practical approach to DNA and protein phylogeny*. Cambridge, Cambridge University Press: 406 str.
- Saksida A., Duh D., Lotric-Furlan S., Strle F., Petrovec M., Avsic-Zupanc T. 2005. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *Journal of Clinical Virology*, 33, 4: 331-335

- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 12: 5463-5467
- Schlesinger S., Schlesinger M.J. 1991. Replication of *Togaviridae* and *Flaviviridae*. V: *Fundamental virology*. 2nd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Chanock R.M., Hirsch M.S., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B. (eds.). New York, Raven Press, Ltd.: 453-467
- Schrader C., Süß J. 1999. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 289, 3: 319-328
- Schultze, D., G. Dollenmaier, A. Rohner, T. Guidi, P. Cassinotti 2007. Benefit of detecting tick-borne encephalitis viremia in the first phase of illness. *Journal of Clinical Virology*, 38, 2: 172-5
- 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, 2: 136-145
- Snider J.V., Wechsler M.A., Lossos I.S. 2001. Human disease characterization: real-time quantitative PCR analysis of gene expression. *Drug Discovery Today*, 6, 20: 1062-1067
- Süß J., Beziat P., Ramelow C., Kahl O. 1997. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) - specific RT-PCR for characterization of natural foci of TBE and for other applications. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 286, 1: 125-138
- Süß J. 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, 21, Suppl. 1: S19-S35
- Telford S.R. III, Foppa I.M. 2000. Tickborne encephalitides. V: *Tickborne infectious diseases*. Cunha B.A. (ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 193-213

- Tsai T.F. 2000. Flaviviruses. V: Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.). Philadelphia, Churchill Livingstone: 1714-1736
- Van de Peer Y., De Wachter Y. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 5: 569-570
- Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2002. van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (eds.). San Diego, Academic Press: 1162 str.
- Voet D., Voet J.G. 1995. Biochemistry. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 882-896
- Wallner, G., Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H., Stiasny K., Kunz C., Heinz F.X. 1996. Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 77 (Pt 5), 1035-1042
- Wilhelm J., Pingoud A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem*, 4, 11: 1120-1128
- Zanotto, P.M., Gould E.A., Gao G.F., Harvey P.H., Holmes E.C. 1996. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 2: 548-553

ZAHVALA

Zahvalo za pomoč pri izdelavi diplomske naloge dolgujem mnogim.

Najprej bi se rad zahvalil svoji mentorici prof. dr. Tatjani Avšič Županc, ker mi je omogočila delo v svojem laboratoriju in izdelavo diplomske naloge iz področja, ki me še posebej zanima in veseli.

Zahvalil bi se rad tudi somentorici dr. Darji Duh za nasvete, pomoč in ideje pri praktičnem delu, tako kot tudi veliko mero potrpežljivosti pri popravljanju pisnega dela diplomske naloge.

K nastajanju diplomske naloge so veliko pripomogle tudi Ana Saksida, Nataša Knap, Katja Strašek Smrdel, Mateja Jelovšek, Emina Durmiši in Miša Korva, ki so mi pomagale pri delu v laboratoriju in me vzpodbujale kadar je šlo kaj narobe. Zagotovo bi bilo brez njih in njihovih nasvetov, delo v laboratoriju težje.

Nazadnje bi se rad zahvalil še mojima staršema ter vsem svojim najbližjim, ki mi ne le ob diplomi, ampak že celo življenje stojijo ob strani, verjamejo vame in me spodbujajo k doseganju višjih ciljev.

Najlepša hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A: Rezultati PCR v realnem času pozitivnih vzorcev izolirane celokupne RNK iz kliničnih vzorcev bolnikov s KME v Sloveniji in merjenje čistosti ter koncentracije celokupne RNK

št. vz.	bilnik	vrsta vz.	odvzem	konc. ¹	čistost RNK		RT-PCR	
					260/280 ²	260/230 ³		Ct ⁴
1		kri	13.8.2003	106,56	1,66	0,27	poz	35,81
2		kri	18.10.2003	147,05	1,63	0,33	poz	35,29
3		kri	18.10.2003	14,82	1,67	0,09	poz	32,15
4		kri	24.5.2002	27,16	1,70	0,13	poz	34,04
5		serum	24.5.2002	87,96	1,68	0,33	poz	34,48
7	B5	kri	28.6.2003	40,87	1,96	0,15	poz	34,62
8		serum	28.6.2003	75,23	1,77	0,31	poz	33,71
9		kri	11.5.2001	98,93	1,70	0,17	poz	35,99
10		serum	11.5.2001	8,98	2,43	0,05	poz	40,67
11		kri	30.5.2007	6,83	2,92	0,03	poz	30,07
14		kri	27.6.2007	65,74	2,01	0,09	poz	33,98
16		kri	14.6.2005	24,85	1,94	0,04	poz	26,67
17	B8	kri	2.10.2006	5,68	2,02	0,16	poz	31,45
18	B10	kri	16.6.2007	6,52	2,61	0,24	poz	30,48
19		kri	21.8.2004	8,13	2,23	0,05	poz	32,12
20	B1	kri	20.6.2000	71,56	1,68	0,17	poz	31,86
21		serum	20.6.2000	7,09	3,25	0,08	poz	38,30
22		kri	20.6.2000	15,86	1,72	0,08	poz	38,04
23		kri	28.7.2000	516,80	1,53	0,28	poz	31,89
24		serum	28.7.2000	30,87	1,71	0,12	poz	32,37
25		kri	28.7.2000	67,96	1,39	0,22	poz	35,46
26		kri	21.7.2005	22,91	1,82	0,14	poz	28,96
27		kri	26.6.2007	44,81	1,97	0,07	poz	34,87
28		kri	16.8.2004	7,89	2,27	0,05	poz	33,60
29		kri	9.10.2006	24,30	3,52	0,06	poz	28,88
30	B7	kri	1.9.2005	8,30	1,86	0,05	poz	30,07
31		kri	7.10.2003	81,34	1,76	0,26	poz	34,29
32		serum	7.10.2003	5,39	4,44	0,04	poz	35,96
33		kri	29.6.2005	26,84	2,05	0,04	poz	36,44
35		kri	16.7.2003	102,57	1,70	0,31	poz	35,51
36		kri	16.7.2003	50,06	1,63	0,08	poz	36,74
37		kri	12.5.2003	83,70	1,62	0,26	poz	35,02
38		kri	21.7.2001	85,33	1,65	0,15	poz	42,80
40	B4	kri	5.7.2000	124,98	1,71	0,26	poz	32,00
41		serum	5.7.2000	80,00	1,59	0,31	poz	35,67
42		kri	20.6.2002	47,98	1,73	0,08	poz	33,74
43		kri	20.6.2002	21,67	1,50	0,10	poz	37,29
44		kri	28.11.2002	434,55	2,05	0,95	poz	37,07
45		kri	30.6.2003	203,05	1,73	0,66	poz	38,68
46	B9	kri	21.5.2007	6,48	2,46	0,37	poz	31,75
47	B6	možgani	/	/	/	/	/	/
49		kri	27.6.2003	107,11	1,66	0,20	poz	31,36
50		serum	27.6.2003	165,56	1,67	0,32	poz	30,47
51	B3	kri	27.6.2003	37,94	1,59	0,12	poz	37,72
52		kri	9.7.2004	6,65	2,73	0,35	poz	29,19
53		kri	11.6.2002	14,48	2,22	0,08	poz	33,52
54	B2	serum		47,24	1,74	0,34	poz	31,93
55		kri	17.8.2004	7,75	2,04	0,21	poz	32,88
56		kri	3.7.2007	11,11	2,94	0,02	poz	27,92

Legenda: 1 – koncentracija izražena v enotah ng/ml; 2, 3 – koeficienti čistosti izolirane celokupne RNK; 4 - Cikel RT-PCR v realnem času, ko fluorescenca preseže fluorescenčni prag ozadja

Priloga B: Poravnava nukleotidnih zaporedij proteina NS5 (212 bp)

AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC Majority

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150

1 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B1

1 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B2

1 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B3

1 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B4

1 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B5

1 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B6

5 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B7

6 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B8

5 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B9

9 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 B10

828 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 Neudoerfl

812 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 Hypr

828 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 TBE 263

123 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 EK-328

827 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 Vasilchenko

123 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 Sofjin-HO

778 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 Louping III

778 AGAGTTGCTCAGAAAGGAGAGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGACCGCAAAAGCTTGCCTGGCTTGAAGAACCGGGATATGCCACCTCAAAGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGAAAGGGGGCGCTGGTCTATTATGC NS5 OMSK

GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG Majority

160 170 180 190 200 210

151 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B1

151 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B2

151 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B3

151 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B4

151 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B5

151 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B6

156 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B7

156 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B8

156 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B9

159 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 B10

159 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 Lub1

978 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 Neudoerfl

978 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 Hypr

978 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 TBE 263

962 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 EK-328

273 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 Vasilchenko

977 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 Sofjin-HO

273 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 Louping III

7938 GGCATCCGACCGGCGCATGAGTGTGAGGCATACACCAATTGGTGGAAAGGGCCAGAGG NS5 OMSK

Priloga C: Preglednica izračunanih razdalj med zaporedji proteina NS5 (212 bp)

		Percent Identity																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Divergence	1	■	99.5	97.2	99.1	98.1	95.8	98.1	100.0	97.2	98.6	97.2	96.7	97.2	97.6	80.2	81.1	80.7	88.7	78.3	1	NS5 B1
	2	0.5	■	96.7	98.6	97.6	95.3	97.6	99.5	96.7	98.1	96.7	96.2	96.7	97.2	79.7	80.7	80.2	88.2	78.3	2	NS5 B2
	3	2.9	3.4	■	97.2	99.1	96.7	99.1	97.2	98.1	97.6	98.1	97.6	98.1	98.6	80.2	82.5	81.6	91.0	77.4	3	NS5 B3
	4	1.0	1.4	2.9	■	97.2	94.8	97.2	99.1	96.2	97.6	96.2	95.8	96.2	96.7	80.2	81.1	80.7	88.7	78.3	4	NS5 B4
	5	1.9	2.4	1.0	2.9	■	97.6	100.0	98.1	99.1	98.6	99.1	98.6	99.1	99.5	80.2	81.6	81.6	90.1	77.4	5	NS5 B5
	6	4.4	4.9	3.4	5.4	2.4	■	97.6	95.8	96.7	96.2	96.7	96.2	96.7	97.2	78.3	79.7	80.7	88.2	77.8	6	NS5 B6
	7	1.9	2.4	1.0	2.9	0.0	2.4	■	98.1	99.1	98.6	99.1	98.6	99.1	99.5	80.2	81.6	81.6	90.1	77.4	7	NS5 B7
	8	0.0	0.5	2.9	1.0	1.9	4.4	1.9	■	97.2	98.6	97.2	96.7	97.2	97.6	80.2	81.1	80.7	88.7	78.3	8	NS5 B8
	9	2.9	3.4	1.9	3.9	1.0	3.4	1.0	2.9	■	97.6	98.1	97.6	98.1	98.6	80.7	82.1	81.1	89.2	77.4	9	NS5 B9
	10	1.4	1.9	2.4	2.4	1.4	3.9	1.4	1.4	2.4	■	97.6	97.2	97.6	98.1	80.2	81.1	80.7	89.2	77.8	10	NS5 B10
	11	2.9	3.4	1.9	3.9	1.0	3.4	1.0	2.9	1.9	2.4	■	97.6	98.1	98.6	80.2	80.7	82.1	89.2	77.4	11	NS5 Ljub1
	12	3.4	3.9	2.4	4.4	1.4	3.9	1.4	3.4	2.4	2.9	2.4	■	97.6	98.1	79.7	81.1	81.1	89.6	76.9	12	NS5 Neudoerfl
	13	2.9	3.4	1.9	3.9	1.0	3.4	1.0	2.9	1.9	2.4	1.9	2.4	■	98.6	81.1	82.5	81.6	90.1	77.4	13	NS5 Hypr
	14	2.4	2.9	1.4	3.4	0.5	2.9	0.5	2.4	1.4	1.9	1.4	1.9	1.4	■	80.7	82.1	81.1	89.6	77.8	14	NS5 TBE 263
	15	23.8	24.5	24.2	23.8	24.2	27.2	24.2	23.8	23.4	24.0	24.2	24.9	22.7	23.4	■	94.8	85.8	79.2	81.1	15	NS5 EK-328
	16	22.3	23.0	20.5	22.3	21.9	24.8	21.9	22.3	21.2	22.5	23.3	22.6	20.5	21.2	5.5	■	85.4	80.2	80.7	16	NS5 Vasilchenko
	17	22.7	23.3	21.5	22.7	21.5	22.9	21.5	22.7	22.2	22.8	20.8	22.2	21.5	22.2	15.8	16.5	■	80.2	81.1	17	NS5 Sofjin-HO
	18	12.4	12.9	9.6	12.4	10.7	13.0	10.7	12.4	11.9	11.8	11.9	11.3	10.7	11.3	25.3	23.9	23.5	■	76.4	18	NS5 Louping III
	19	26.1	26.0	27.7	26.1	27.7	26.9	27.7	26.1	27.7	26.8	27.7	28.4	27.7	26.9	22.1	22.9	22.1	29.1	■	19	OMSK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			

Priloga E: Preglednica izračunanih razdalj med zaporedji proteina E (753 bp)

		Percent Identity																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Divergence	1	■	99.5	99.5	97.5	97.5	95.9	97.3	99.5	97.7	98.3	97.6	97.3	96.7	97.7	85.5	84.7	83.5	85.9	80.5	1	B1
	2	0.5	■	99.2	98.0	98.0	96.4	97.9	99.5	98.0	98.5	98.1	97.9	97.2	98.3	86.1	85.3	83.8	85.9	80.9	2	B2
	3	0.5	0.8	■	97.7	97.7	96.1	97.6	99.2	97.7	98.3	97.9	97.6	96.9	98.0	86.1	85.3	83.8	86.2	81.0	3	B3
	4	2.6	2.0	2.3	■	100.0	96.8	98.4	97.5	98.1	97.1	98.3	98.3	97.3	98.4	85.4	84.3	84.1	85.4	81.4	4	B4
	5	2.6	2.0	2.3	0.0	■	96.8	98.4	97.5	98.1	97.1	98.3	98.3	97.3	98.4	85.4	84.3	84.1	85.4	81.4	5	B5
	6	4.3	3.7	4.0	3.3	3.3	■	96.9	96.1	97.1	95.8	97.2	97.5	96.3	97.3	85.8	84.5	85.4	86.1	81.7	6	B6
	7	2.7	2.2	2.4	1.6	1.6	3.1	■	97.3	98.5	96.9	98.4	98.4	97.7	98.8	85.9	85.0	84.6	85.9	81.4	7	B7
	8	0.5	0.5	0.8	2.6	2.6	4.0	2.7	■	97.5	98.3	97.6	97.3	96.7	97.7	85.9	85.1	83.7	85.9	80.7	8	B8
	9	2.3	2.0	2.3	1.9	1.9	3.0	1.5	2.6	■	97.1	98.5	98.5	97.9	98.9	86.2	85.1	84.2	85.4	81.0	9	B9
	10	1.8	1.5	1.8	3.0	3.0	4.4	3.1	1.8	3.0	■	97.2	97.2	96.3	97.3	85.9	85.1	83.7	85.7	80.9	10	B10
	11	2.4	1.9	2.2	1.8	1.8	2.9	1.6	2.4	1.5	2.9	■	98.4	97.7	98.8	85.7	84.7	84.1	85.5	81.4	11	Ljub1 PK
	12	2.7	2.2	2.4	1.8	1.8	2.6	1.6	2.7	1.5	2.9	1.6	■	98.0	98.8	86.1	85.0	84.9	85.7	81.1	12	Neudoerfl
	13	3.4	2.9	3.1	2.7	2.7	3.9	2.3	3.4	2.2	3.9	2.3	2.0	■	98.1	85.7	84.7	84.3	86.2	81.8	13	Hypr
	14	2.3	1.8	2.0	1.6	1.6	2.7	1.2	2.3	1.1	2.7	1.2	1.2	1.9	■	85.9	84.3	84.7	85.9	81.5	14	TBE 263
	15	16.4	15.8	15.8	16.7	16.7	16.1	15.9	15.9	15.6	15.9	16.3	15.8	16.3	15.9	■	93.9	85.4	83.5	80.9	15	EK-328
	16	17.6	16.9	16.9	18.2	18.2	18.0	17.3	17.1	17.1	17.1	17.6	17.3	17.6	18.2	6.4	■	85.1	82.2	80.6	16	Vasilchenko
	17	19.2	18.8	18.9	18.5	18.5	16.7	17.7	19.0	18.3	19.0	18.5	17.4	18.1	17.6	16.8	17.2	■	81.9	81.1	17	Sofjin-HO
	18	15.9	15.9	15.6	16.6	16.6	15.8	16.0	15.9	16.6	16.3	16.5	16.3	15.6	16.0	19.0	20.8	21.2	■	79.0	18	Louping ill
	19	23.4	22.9	22.7	22.1	22.1	21.7	22.0	23.0	22.6	22.9	22.1	22.5	21.5	21.9	22.6	23.1	22.3	25.3	■	19	OMSK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			