

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Miša KORVA

**DOKAZ DVEH GENETSKIH LINIJ HANTAVIRUSA  
PUUMALA IZOLIRANEGA IZ GOSTITELJEV V  
SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Miša KORVA

**DOKAZ DVEH GENETSKIH LINIJ HANTAVIRUSA PUUMALA  
IZOLIRANEGA IZ GOSTITELJEV V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DEMONSTRATION OF TWO DISTINCT LINEAGES OF  
HANTAVIRUS PUUMALA ISOLATED FROM NATURAL HOSTS IN  
SLOVENIA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

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

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

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

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

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

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

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

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

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

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Miša Korva

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.7: 578.5 (043)=863
KG	virusi/hantavirusi/Puumala/ <i>Clethrionomys glareolus</i> /HMRS/hemoragična mrzlica z renalnim sindromom/«nephropathia epidemica»/filogenetske analize/genetska raznolikost/RT-PCR v realnem času/biotop gozdnih voluharic
AV	KORVA, Miša
SA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentor) / DUH, Darja (somentorica) / PETROVEC, Miroslav (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	DOKAZ DVEH GENETSKIH LINIJ HANTAVIRUSA PUUMALA IZOLIRANEGA IZ GOSTITELJEV V SLOVENIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 65 str., 3 pregl., 16 sl., 5 pril., 108 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Še pred odkritjem hantavirusov so švedski zdravniki poročali o bolezni imenovani nephropathia epidemica. To danes imenujemo hemoragična mrzlica z renalnim sindromom in jo povzročajo hantavirusi. Hantavirus Puumala so odkrili leta 1980 v gozdnih voluharicih <i>Clethrionomys glareolus</i> , ki so jo ujeli v mestu Puumala na Finskem. Virus se iz kronično okuženega naravnega gostitelja prenaša na človeka z vdihovanjem okuženih aerosolov iz izločkov glodavcev. Zaradi velike genske raznolikosti je hantavirus Puumala predmet številnih raziskav. Naravni gostitelj, gozdna voluharica, je razširjen tudi po Sloveniji, zato smo pričakovali, da bomo genetsko raznolikost, ki jo zaznavajo po vsej Evropi, dokazali tudi pri nas. V raziskavo smo vključili 317 gozdnih voluharic ujetih na endemičnih območjih HMRS v Sloveniji od leta 1993 do leta 2006. Virus Puumala smo z molekularnimi metodami dokazali v 39 vzorcih (12,3 %) iz 6 različnih lokacij. Ugotovili smo, da sta v Sloveniji v naravnih gostiteljih, prisotni vsaj dve genetski liniji virusa Puumala, ki tvorita značilne zemljepisne gruče. Z obsežno analizo smo potrdili Alpe-Adrijsko genetsko linijo virusa Puumala, ki jo tvorijo vzorci iz Slovenije, Avstrije in Balkana. Sklepamo, da je virus Puumala prisoten v našem okolju že dolgo časa, in da so novo odkrite genetske linije posledica večjega raziskovanja in ne hitrejše evolucije hantavirusa.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDK 578.7: 578.5 (043)=863
CX	viruses/hantavirus/Puumala/ <i>Clethrionomys glareolus</i> / HMRS/ haemorrhagic fever with renal syndrome/«nephropathia epidemica»/genetic analysis/real time RT-PCR/genetic diversity
AU	KORVA, Miša
AA	AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor) / DUH, Darja (co-advisor) / PETROVEC, Miroslav (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2007
TI	DEMONSTRATION OF TWO DISTINCT LINEAGES OF HANTAVIRUS PUUMALA ISOLATED FROM NATURAL HOSTS IN SLOVENIA
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XII, 65 p., 3 tab., 16 fig., 5 app., 108 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Nephropathia epidemica or a haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is a disease well known in Fennoscandia. It was first described by Swedish doctors in early 1934. The infectious agent remained unknown until 1980, when the causative agent was described as Puumala hantavirus. The principal rodent reservoirs of Puumala virus are bank voles from the genus <i>Clethrionomys glareolus</i> . In rodents, hantaviruses cause a lifelong infection which has no deleterious effect. Transmission among rodents and on to humans occurs with aerosolized infective secretions. Among hantaviruses, Puumala is the most variable and it is therefore the most investigated. Bank voles are found all over Europe and they are common in Slovenia as well. In our study, we have tested 317 bank voles, caught in endemic regions of HFRS in Slovenia from the period 1993 to 2006. By using molecular techniques we demonstrated Puumala virus in 39 samples (12,3 %) from 6 different locations in Slovenia. We showed that at least two distinct genetic lineages of Puumala hantavirus are present in the natural reservoir in Slovenia. Each lineage clusters samples from a unique geographical region. With this extensive study we confirmed the samples from Slovenia, Austria and Balkan form an Alpe-Adrian lineage. We also concluded that Puumala virus is present in Slovenia for a long period of time and that newly discovered genetic lineages of Puumala virus are due to present increase in researcher's interest to the topic rather than a rapid evolution.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
SLOVARČEK .....	XII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED.....	3
2.2 ZNAČILNOSTI HANTAVIRUSOV .....	4
<b>2.2.1 Zgradba .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Taksonomija in filogenetske analize .....</b>	<b>5</b>
2.2.2.1 Filogenetske analize virusa Puumala.....	7
2.3 NARAVNI GOSTITELJI HANTAVIRUSOV .....	8
<b>2.3.1 Virus PUU in naravni gostitelj, gozdna voluharica <i>C. glareolus</i>.....</b>	<b>9</b>
2.3.1.1 Ekologija, življenje in zemljepisna razporeditev <i>C. glareolus</i> v Sloveniji .....	10
<b>2.3.2 Koevolucija in naključno gostiteljstvo.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3.3 Prenos virusa med gostitelji in ohranjevanje v naravi.....</b>	<b>13</b>
2.4 EPIDEMIOLOGIJA HEMORAGIČNE MRZLICE Z RENALNIM SINDROMOM .....	14
<b>2.4.1 HMRS v Sloveniji .....</b>	<b>15</b>
2.5 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA HMRS .....	16
<b>2.5.1 Patogeneza pri naravnih gostiteljih .....</b>	<b>18</b>
2.6 DIAGNOSTIKA HMRS .....	19
<b>2.6.1 Laboratorijska diagnostika .....</b>	<b>19</b>
2.7 ZDRAVLJENE HMRS .....	20

<b>3 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>21</b>
3.1 VZORCI .....	21
3.2 METODE DELA .....	21
3.2.1 Metoda posredne imunofluorescence (IFT) .....	21
3.2.2 Izolacija RNA iz ledvic glodavcev .....	23
3.2.3 Pomnoževanje izolirane RNA.....	24
3.2.3.1 Izbira začetnih oligonukleotidov .....	24
3.2.3.2 PCR v realnem času.....	25
3.2.3.2.1 Teoretične osnove .....	25
3.2.3.2.2 Enostopenjski RT-PCR v realnem času za virus PUU.....	28
3.2.3.3 Verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT- PCR) .....	29
3.2.3.4 PCR z notranjima začetnima oligonukleotidoma .....	30
3.2.4 Elektroforeza pridelkov PCR v agaroznem gelu.....	31
3.2.5 Določanje nukleotidnega zaporedja.....	32
3.2.5.1 Teoretične osnove sekvenčne reakcije .....	32
3.2.5.2 Čiščenje pridelkov PCR .....	33
3.2.5.3 Določanje koncentracije očiščene DNA.....	34
3.2.5.4 Izbira začetnih oligonukleotidov za sekvenčno reakcijo.....	34
3.2.5.5 Sekvenčna reakcija .....	35
3.2.5.6 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije.....	36
3.2.6 Analiza nukleotidnih zaporedij .....	36
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>38</b>
4.1 REZULTATI POSREDNE IMUNOFLUORESCENČNE METODE .....	38
4.2 REZULTATI POMONOŽEVANJA Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU .....	39
4.3 REZULTATI POMNOŽEVANJA S KLASIČNIM RT-PCR IN »NESTED« PCR .....	40
4.4 REZULTATI DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA .....	42

**5 RAZPRAVA IN SKLEPI ..... 48**

5.1	UVOD.....	48
5.2	ANALIZA REZULTATOV .....	48
5.3	SKLEPI.....	52

**6 POVZETEK..... 53**

**7 VIRI ..... 54**

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število serološko testiranih gozdnih voluharic, <i>C. glareolus</i> , z metodo posredne imunofluorescence ter razdelitev v skupine glede jakosti imunskega odgovora.....	38
Preglednica 2: Prikaz primerjave rezultatov dobljenih s serološko in molekularno metodo ter izračun deleža ujemajočih se vzorcev z metodo IFA in RT-PCR v realnem času.....	39
Preglednica 3: Časovni pregled pozitivnih gozdnih voluharic, <i>C. glareolus</i> , na virus Puumala. ....	41

## KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura genoma hantavirusov.....	5
Slika 2: Filogenetsko drevo hantavirusov – analiza segmenta S .....	7
Slika 3: Zemljepisna razširjenost <i>C. glareolus</i> po Evropi in Aziji.....	9
Slika 4: <i>Clethrionomys glareolus</i> .....	10
Slika 5: Zemljepisna razširjenost vrste <i>C. glareolus</i> v Sloveniji.....	11
Slika 6: Endemična območja HMRS v Sloveniji .....	16
Slika 7: Shematski prikaz kliničnega poteka bolezni »nephropathia epidemica«.....	17
Slika 8: Shematski prikaz mesta pripenjanja začetnih oligonukleotidov .....	25
Slika 9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času .....	26
Slika 10: Princip delovanja <i>TaqMan</i> sonde.....	27
Slika 11: Dokazovanje pridelkov PCR z gelsko elektroforezo .....	40
Slika 12: Grafični prikaz porazdelitve pozitivnih <i>C. glareolus</i> na virus PUU v Sloveniji.....	42
Slika 13: Filogram nukleotidnih zaporedij virusa PUU izoliranega iz <i>C. glareolus</i> ujetih v Sloveniji – zaporedja segmenta S dolga 307 bp .....	43
Slika 14: Filogram nukleotidnih zaporedij virusa PUU izoliranega iz <i>C. glareolus</i> ujetih v Sloveniji – zaporedja segmenta S dolga 160 bp .....	44
Slika 15: Dendrogram nukleotidnih zaporedij segmenta S virusa PUU dolžine 307 bp .....	46
Slika 16: Dendrogram nukleotidnih zaporedij segmenta S virusa PUU dolžine 160 bp .....	47

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času .....	67
Priloga B: Poravnava nukleotidnih zaporedij dolžine 307 bp .....	69
Priloga C: Preglednica izračunanih razdalj med zaporedji, ki so dolga 307 bp .....	70
Priloga D: Poravnava nukleotidnih zaporedij dolžine 160 bp.....	71
Priloga E: Preglednica izračunanih razdalj med zaporedji, ki so dolga 160 bp .....	72

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DOB	virus Dobrava
HMRS	Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (angl. Haemorrhagic Fever with Renal Syndrom)
HPS	Hantavirusni pljučni sindrom (angl. Hantavirus Pulmonary Syndrome)
HTN	virus Hantaan
IFT	Metoda posredne imunofluorescence (angl. indirect immunofluorescent assay)
kb	kilo baznih parov
NE	nephropathia epidemica
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PUU	virus Puumala
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic acid)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (angl. polymerase chain reaction with reverse transcriptase)
SAA	virus Saarema
SEO	virus Seoul

## SLOVARČEK

anurija	popolno prenehanje izločanja urina iz ledvic
hematurija	prisotnost krvi v urinu
hemoragična mrzlica	mrzlica s krvavitvami notranjih organov
levkocitoza	povečana koncentracija levkocitov v krvi
oligurija	zmanjšana tvorba urina (manj kot 500 ml v 24 urah)
poliurija	izločanje nenormalno velike količine urina
proteinurija	prisotnost beljakovin v urinu
trombocitopenija	znižana koncentracija trombocitov v krvi

## 1 UVOD

V zadnjem desetletju so odkrili večje število novih patogenih mikroorganizmov, ki so nevarni za ljudi in njihovo zdravje. Skoraj v vseh primerih so to patogeni mikroorganizmi, ki se ohranjajo v naravi s kroženjem med živalskimi gostitelji. Med njimi so tudi hantavirusi, ki sodijo v družino *Bunyaviridae* (Zeier in sod., 2005) in so tako imenovani **robovirusi** (angl. rodent borne), saj se v naravi ohranjajo med malimi sesalci, s katerimi so evolucijsko in genetsko tesno povezani.

Hantaviruse delimo na dve veliki skupini: hantavirusi »starega sveta« in hantavirusi »novega sveta«. Med hantaviruse »starega sveta« spadajo virusi: Hantaan (HTN), Puumala (PUU), Dobrava (DOB) in Seoul (SEO), ki povzročajo hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS). Ta se kaže z odpovedjo ledvic, hemoragično mrzlico in šokom. Hantaviruse »novega sveta«, Prospect Hill (PH), Sin Nombre (SN), Andes (AND), Bayou (BAY), Black Creek Canal (BCC), so odkrili šele leta 1993 v Združenih državah Amerike (Nichol in sod., 1993). Virusi se prav tako ohranjajo med glodavci, vendar povzročajo drugačno bolezensko sliko – hantavirusni pljučni sindrom (HPS).

Hantavirusi so razširjeni po vsem svetu in so domnevno prisotni v človekovem okolju že stoletja. Razvijali so se skupaj s svojimi naravnimi gostitelji in se prilagajali spremembam v okolju, posledično danes zaznavamo med njimi veliko genetsko raznolikost.

Z raziskovalno nalogo smo želeli potrditi domnevo, da tudi v Sloveniji obstaja več genetskih linij hantavirusa Puumala. V ta namen smo izolirali celokupno virusno RNA iz ledvic gozdnih voluharic *Clethrionomys glareolus* in naredili filogenetske analize.

Predvidevali smo, da bomo na slovenskem območju našli vsaj dve genetski liniji glede na pilotsko raziskavo in razširjenost gozdnih voluharic pri nas. Prav tako smo domnevali, da bomo potrdili tudi genetsko linijo, ki so jo opisali v Avstriji (Plyusnina in sod., 2006).

### 1.1 NAMEN DELA

Slovenija predstavlja s svojimi raznolikimi biotopi idealne pogoje za različne vrste glodavcev in njihovih virusnih »parazitov«.

Za hantaviruse je značilno zemljepisno združevanje v skupine, ki ga povezujemo z tesno koevolucijo gostitelja in virusa. Prav tako je za hantaviruse značilna tudi velika genetska raznolikost znotraj vrste oziroma zemljepisnih skupin. V pilotski raziskavi, ki je bila nedavno narejena, so nakazali obstoj dveh genetskih linij hantavirusa PUU v Sloveniji (Avsic-Zupanc in sod., 2007).

Namen diplomske naloge je, da potrdimo dve genetski liniji hantavirusa PUU z obsežno analizo na številnih vzorcih izbranih glede na daljše časovno obdobje in različne zemljepisne lokacije v Sloveniji. S filogenetsko analizo smo skušali potrditi genetsko linijo, ki so jo nedavno opisali v Avstriji in skupaj z vzorci iz Slovenije tvori t.i. Alpe-adrijsko genetsko linijo virusa PUU.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (HMRS) je oznaka za skupino klinično podobnih bolezni, ki se pojavljajo po Evropi in Aziji (Gajdusek, 1962). To so bolezni, ki so bile znane tudi kot »korejska hemoragična mrzlica«, »endemična hemoragična mrzlica«, »nephropathia epidemica« ... (Yanagihara in Gajdusek, 1987).

Čeprav je bila bolezen prisotna v Aziji že stoletja, je HMRS postala zanimiva, med leti 1951 in 1954, ko je izbruhnila epidemija med ameriškimi vojaki v Koreji. Pred tem so poročali že o epidemiji v Rusiji, leta 1913 in 1932, in med japonskimi vojaki v Mandžuriji leta 1932 (Casals in sod., 1970). Skandinavski zdravniki so se srečevali s podobno boleznjijo, vendar se je ta izražala v blažji obliki (Peters in sod., 1999).

Že leta 1940 so ruski in japonski znanstveniki sumili, da gre za virusno bolezen, po tem ko so poskusnim osebam vbrizgali filtriran urin bolnika s HMRS. Japonski raziskovalci so domnevali, da bolezen izvira iz dimaste miši (*Apodemus agrarius*) in se širi preko pršic, ki se hranijo na miših. Šele leta 1976 je korejski virolog Ho Wang Lee s sodelavci uspel iz pljučnega tkiva naravnega gostitelja, dimaste miši *A. agrarius*, izolirati povzročitelja HMRS. Virus so poimenovali Hantaan (HTN), po bližnji reki Hantaan, kjer so miši ulovili (Lee H.W. in sod., 1978). postal je tipska vrsta za rod *Hantavirus* (Schmaljohn in sod., 1985).

Temu so sledila odkritja po vsej Evraziji: virus Seoul (SEO) iz podgane vrste *Rattus norvegicus* (Lee P.W. in sod., 1980), virus Puumala (PUU) iz gozdne voluharice *Clethrionomys glareolus* (Brummer-Korvenkontio in sod., 1980), virus Dobrava (DOB) iz rumenogrle miši *Apodemus flavicollis* (Avsic-Zupanc in sod., 1992). Do danes so odkrili že več kot 20 predstavnikov rodu *Hantavirus*.

Leta 1993 se je v Združenih državah Amerike pojavila epidemija, ki je vodila do naslednjega večjega odkritja - novega hantavirusa, Sin Nombre (SN). Bolezen se je

razlikovala od HMRS predvsem po tem, da so bila namesto ledvic prizadeta pljuča. Zato so jo poimenovali hantavirusni pljučni sindrom (HPS) (Nichol in sod., 1993). Kljub temu, da so povzročitelje HPS odkrili šele pred dobrimi 10 leti, to ne pomeni, da gre za nove virusne. Zgodovinski viri indijanskega plemena Navajo opisujejo bolezen, ki se je pojavila ob povečani gostoti glodavcev na območju, kjer so živeli Navajo Indijanci. Tudi leta 1993, ob epidemiji HPS, je prišlo do ekoloških sprememb, ki so prisilile miši, da so se zatekle v okolico ljudi, zaradi potrebe po hrani. Posledica je bil izbruh bolezni, z značilnimi znaki hemoragične mrzlice in pljučnega edema (Mertz in sod., 1997). Kasneje so odkrili še več virusnih povzročiteljev HPS po celotnem ameriškem kontinentu.

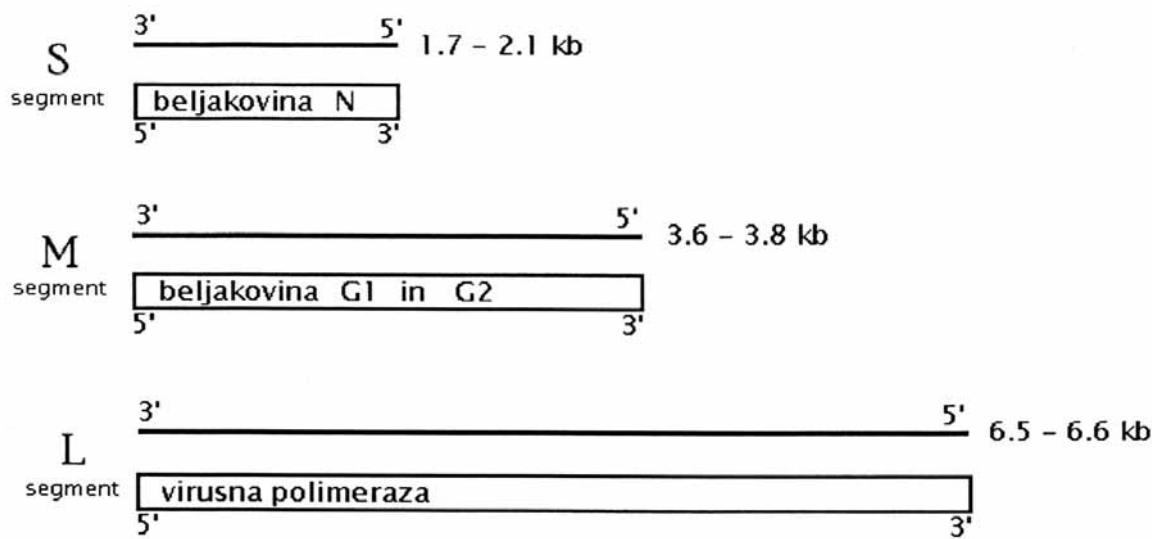
## 2.2 ZNAČILNOSTI HANTAVIRUSOV

### 2.2.1 Zgradba

Hantavirusi so serološko, genetsko in epidemiološko povezana skupina virusov, ki spadajo v družino *Bunyaviridae* (McCormick in sod., 1982).

So ovalne oblike, veliki od 95 do 120 nm. Virus je obdan z lipidno ovojnico. Površina ima značilen mrežast vzorec, ki je razpoznaven pod elektronskim mikroskopom. Znotraj nukleokapside se nahaja negativno polarna enovijačna segmentirana ribonukleinska kislina (RNA, angl. ribonucleic acid). Sestavlja jo trije deli (Slika 1): velik (L, angl. large), srednji (M, angl. medium) in majhen (S, angl. small). Segment L je velik približno 6500 bp in nosi zapis za RNA polimerazo, ki prevaja virusni genom. Segment M je velik približno 3700 bp in nosi zapis za prekurzor površinskih glikoproteinov G<sub>1</sub> in G<sub>2</sub>, ki nastaneta po proteolitski cepitvi med translacijo. Glikoproteina sta odgovorna za prepoznavanje hantavirusnih receptorjev na tarčnih celicah (Hart in Bennett, 1999; Plyusnin, 2002). Na segmentu S, 1800 bp, je zapis za nukleoprotein, ki tvori nitasto viačno nukleokapsido okrog genoma (Mertz in sod., 1997), hkrati pa sproži antigenski odziv (Kallio-Kokko in sod., 1993).

Na 5' in 3' koncih so močno ohranjena zaporedja, ki omogočajo tvorbo zanke in tako dosežejo vizualen učinek krožne molekule (Plyusnin, 2002).



**Slika 1:** Struktura genoma hantavirusov

### 2.2.2 Taksonomija in filogenetske analize

Družina *Bunyaviridae* združuje štiri rodove: *Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* in *Hantavirus*. Vse rodove, z izjemo *Hantavirusa*, prenašajo členonožci iz enega rezervoarja na drugega. Samo hantavirusi se naravno zadržujejo in razmnožujejo le v glodavcih, kjer povzročajo brezsимptomne okužbe. Hantavirusi se razvijajo v naravnem gostitelju, zato ne preseneča dejstvo, da so se določene lastnosti hantavirusov oblikovale kot prilagoditev na genetsko okolje njihovih gostiteljev. To ugotovitev podpira tudi dejstvo, da današnja zemljepisna razporeditev odseva razvoj glodavskih vrst in selitve v preteklosti (Plyusnin in Morzunov, 2001).

Filogenetski odnosi med hantavirusi odsevajo filogenetske odnose med naravnimi gostitelji, zato jih glede na to lahko razdelimo v 3 skupine:

#### Hantavirusi, ki pripadajo poddružini *Murinae* (miši)

Virusi, ki spadajo v to družino tvorijo samostojno filogenetsko skupino. Pogosto jih imenujemo tudi »hantavirusi starega sveta«, saj jih najdemo le v Evropi in Aziji.

Sem sodijo virusi: Hantaan – gostitelj *A. agrarius* (Lee H.W. in sod., 1978), Seoul – gostitelja *R. rattus* in *R. norvegicus* (Lee P.W. in sod., 1980), Dobrava – gostitelj *A.*

*flavicollis* (Avsic-Zupanc in sod., 1992), Saarema (SAA) – gostitelj *A. agrarius* (Nemirov in sod., 1999; Avsic-Zupanc in sod., 2000).

#### Hantavirusi, ki pripadajo poddružini *Arvicolineae* (voluharice)

Poddružina *Arvicolineae* združuje voluharice, ki živijo v Evropi in Aziji. Sem spadajo virusi: Puumala – gostitelj *C. glareolus* (Brummer-Korvenkontio in sod., 1980), Tula (TUL) – gostitelj *M. arvalis* (Plyusnin in sod., 1994a), Khabarovsk (KBR) – gostitelj *M. fortis* (Hörling in sod., 1996), Topografov (TOP) – gostitelj *Lemmus sibiricus* (Plyusnin in sod., 1996b) in virus Prospect Hill (PH) – gostitelj *M. pennsylvanicus*, ki pa ga, za razliko od ostalih najdemo v Severni Ameriki in spada med tako imenovane »hantaviruse novega sveta« (Parrington in Kang, 1990; Parrington in sod., 1991).

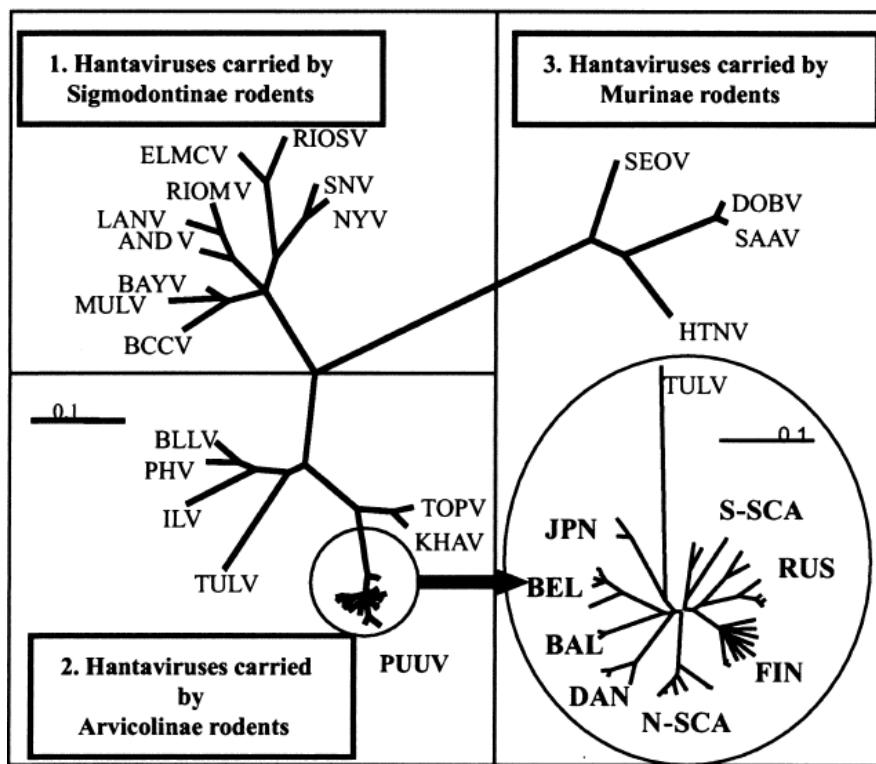
#### Hantavirusi, ki pripadajo poddružini *Sigmodontinae* (miši »novega sveta«)

Ob epidemiji HPS, leta 1993, so z molekularnimi metodami odkrili celo vrsto hantavirusov, ki parazitirajo v glodavcih iz poddružin *Sigmodontinae* in *Arvicolineae*. Sem spada virus Sin Nombre (SN) in njemu podobni virusi: New York (NY), Bayou (BAY), Black Creek Canal (BCC), Andes (AND) (Plyusnin in Morzunov, 2001).

Taksonomija hantavirusov je kompleksno področje, ki ga raziskujejo mnogi znanstveniki in raziskovalci. Jasno je, da je zaradi mnogih zemljepisnih razlik in evolucijskega pritiska nastalo veliko različnih genetskih linij hantavirusov. Te se med seboj lahko tudi močno razlikujejo, vendar to še ne pomeni, da gre za nov virusni tip. Mednarodna komisija za taksonomijo virusov je objavila 4 kriterije, ki jim mora nov izolat zadostiti, da ga lahko razglasimo za nov virusni tip: 1) imeti mora specifičnega gostitelja, 2) vsaj 7 % raznolikosti v aminokislinskem zaporedju kompletnega zaporedja površinskih glikoproteinov G1 in G2 ter nukleoproteina, 3) ne sme biti podvržen preurejanju genoma z drugimi hantavirusi in 4) po osamitvi na celični kulturi mora med homolognima in heterolognima virusoma obstajati vsaj štirikratna razlika pri nevtralizacijskem testu redukcije plakov (Elliot in sod., 2000).

### 2.2.2.1 Filogenetske analize virusa Puumala

Virus PUU je verjetno najbolj raznolik hantavirus. Filogenetske analize kažejo na zemljepisno kopičenje, ki odseva kolonizacijske in migracijske poti gozdnih voluharic v preteklosti (Slika 2) (Plyusnin in sod., 1995). Glavni vir genetske raznolikosti je genski odmik, kjer prihaja do baznih substitucij, delecij in insercij. Zaradi segmentiranega RNA genoma lahko prihaja tudi do genske prerazporeditve. To so dokazali pri virusu SN (Henderson in sod., 1995) in menijo, da so prisotne tudi pri virusu PUU (Plyusnin, in sod., 1997). Prav tako so dokazali, da poleg virusa TUL (Plyusnin in sod., 1996a) tudi virus PUU tvori navidezne vrste (angl. quasispecies) (Plyusnin in sod., 1995), ki jih ponavadi povezujejo s hitrejšo evolucijo virusa, zaradi imunskega pritiska v gostitelju.



**Slika 2:** Filogenetsko drevo hantavirusov – analiza segmenta S (vir: Sironen in sod., 2001)

**Okrnjave:** 1. hantavirusi, ki pripadajo poddržini *Sigmodontinae*: Sin Nombre (SNV), New York (NYV), Bayou (BAYV), El Moro Canyon (ELMCV), Andes (ANDV), Rio Mamore (RIOMV), Laguna Negra (LNV), Balck Creek Canal (BCCV), Murine leukemia (MULV) 2. hantavirusi, ki pripadajo poddržini *Arvicolineae*: Prospect Hill (PHV), Tula (TULV), Isla Vista (ILV), Topografov (TOPV), Khabarovsk (KHAV), Puumala (PUU) 3. hantavirusi, ki pripadajo poddržini *Murinae*: Seoul (SEOV), Hantaan (HTNV), Dobrava (DOB), Saarema (SAA)

**Okrnjave genotipov virusa Puumala:** Japonska (JPN), Belgija (BEL), Balkan (BAL), Danska (DAN), severna Skandinavija - Švedska (N-SCA), Finska (FIN), Rusija (RUS), južna Skandinavija – Švedska in Norveška (S-SCA)

Filogenetske analize temeljijo na proučevanju genoma segmenta S, saj le ta nosi zapis za nukleoprotein, ki je glavni virusni antigen. Poleg tega je koncentracija RNA segmenta S v organih gostitelja višja kot segmenta M in je zato dokaz virusne RNA uspešnejši (Plyusnin in sod., 1994b).

Filogenetska analiza nukleotidnega zaporedja segmenta S je pokazala osem različnih genetskih linij: **Finsko** (FIN), **Rusko** (RUS), **severno skandinavsko** (NSCA), **južno skandinavsko** (SSCA), **Belgijsko** (BEL), **Balkansko** (BAL) in **Japonsko** (JPN). Vse linije imajo skupnega prednika, a so se razvijale samostojno, zato je filogenetsko drevo značilne zvezdaste oblike (Sironen in sod., 2001). Med vsemi linijami je najbolj oddaljena JPN, ki izvira iz gostitelja *C. rufocanus*, ujetega v mestu Hokkaido na Japonskem (Kariwa in sod., 1995). Glede nato, da je virus izoliran iz drugega, sicer zelo sorodnega gostitelja, menijo, da ne gre za virus PUU, ampak za PUU podoben virus.

Zaradi velike genetske raznolikosti je virus PUU predmet številnih raziskav. Zato ne preseneča, da se prvotnim linijam pridružujejo vedno nove, iz vse Evrope. O novo odkritih genetskih linijah poročajo iz **Norveške** (Lundkvist in sod., 1998), **Francije**, **Z Nemčije** (Heiske in sod., 1999), **Estonije** (Golovljova in sod., 2002), **Hrvaške** (Cvetko in sod., 2005), **JV Nemčije** (Essbauer in sod., 2006), **Avstrije** (Plyusnina in sod., 2006) in tudi **Slovenije** (Avsic-Zupanc in sod., 2007).

### 2.3 NARAVNI GOSTITELJI HANTAVIRUSOV

Hantaviruse pogosto označimo z imenom »robovirusi«, saj krožijo znotraj specifične populacije glodavcev. Vsaka izmed vrst hantavirusov je tesno povezana s specifično vrsto glodavcev, v kateri povzročijo trajno, brezsимptomно okužbo (Plyusnin in Morzunov, 2001).

Protitelesa proti hantavirusom so našli tudi pri drugih živalih (psih, mačkah, budrah, zajcih in ptičih), vendar so te živali živele skupaj s seropozitivnimi glodavci (Xu in sod., 1987; Tsai, 1987). Zato ne predstavljajo naravnega gostitelja, temveč naključno okužbo, ki je prehodna.

### 2.3.1 Virus PUU in naravni gostitelj, gozdna voluharica *C. glareolus*

»Nephropathia epidemica« je blažja oblika HMRS, ki je pogosta v Fenoskandinaviji in so o njej poročali švedski zdravniki že leta 1934 (Myhrman, 1934 cit. po Vapalahti in sod., 2003; Zetterholm, 1934, cit. po Vapalahti in sod., 2003). Vendar je povzročitelj ostal neznan vse do leta 1980, ko so osamili virus iz gozdne voluharice *C. glareolus*, ki so jo ujeli v mestu Puumala na Finskem (Brummer-Korvenkontio in sod., 1980).

Naravni gostitelj virusa (rezervoar) je gozdna voluharica (*C. glareolus*), ki je razširjena po vsej Evropi, razen ob obalah Sredozemskega morja, Grčije in na skrajnem severu. V S Evropi, Fenoskandinaviji, se gostota glodavcev ciklično spreminja na 3-4 leta, odvisno od gostote plenilcev. Temu sledijo tudi epidemije HMRS jeseni in zgodaj pozimi. V toplejšem delu Evrope je populacija gozdnih voluharic stabilnejša, z značilnim sezonskim gibanjem. Na tem območju je prenos virusa na človeka redkejši in epidemije so pogostejše v letih, ko je v naravi veliko želoda in zato tudi več voluharic. V srednji in južni Evropi se pojavijo epidemije spomladi in poleti. Najverjetneje, zaradi obilice hrane več glodavcev prezivi zimo. Zato se začnejo že zgodaj spomladi razmnoževati (Vapalahti in sod., 2003).

V Aziji lahko *C. glareolus* najdemo v južni Sibiriji, v gorovju Ural, vse do Balhaškega jezera, v severnem Kazahstanu ter v gorovjih Altaj in Sajan (Musser in Carleton 1993). Vendar o HMRS poročajo le iz območja okoli Urala (Slika 3).



Slika 3: Zemljepisna razširjenost *C. glareolus* po Evropi in Aziji (vir: Zeier in sod., 2005)

### 2.3.1.1 Ekologija, življenje in zemljepisna razporeditev *C. glareolus* v Sloveniji

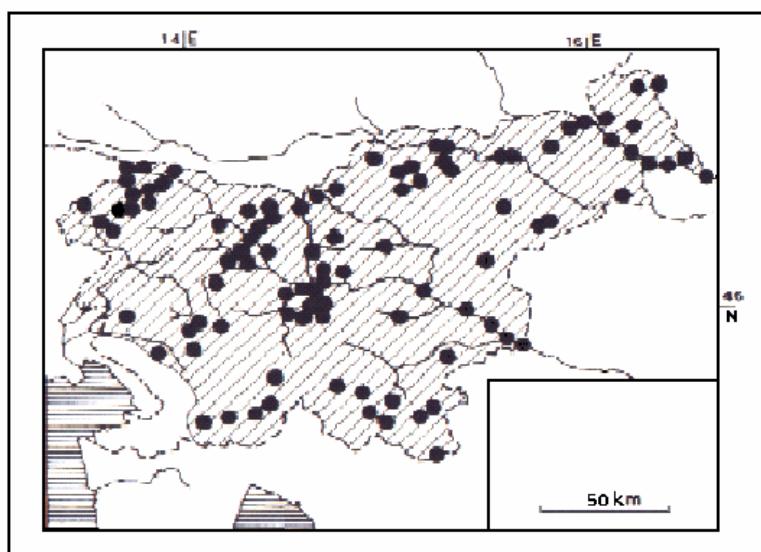
*C. glareolus* ali gozdna voluharica spada med manjše voluharice, ki ima razmeroma dolg rep in ušesa. Hrbet je intenzivno rdečerjav, trebuh siv, z rumenimi ali oker odtenki. Tudi rep je dvobarven, zgoraj je temno rjav, spodaj pa svetel (Slika 4) (Kryštufek 2001).



Slika 4: *Clethrionomys glareolus* (vir: Stephen Dalton: [www.nhpa.co.uk](http://www.nhpa.co.uk))

Gozdna voluharica je aktivna cel dan, ponoči bolj kot podnevi. Je rastlinojeda, najraje uživa mehke plodove in slive, poleg tega pa je še glice, mahove, zelene dele rastlin in nevretenčarje. Razmnožuje se od aprila do septembra/oktobra. Brejost traja 17-18 dni, nato se skotijo goli in slepi mladiči. Življenska doba v ujetništvu je 40 mesecev, medtem ko v naravi preživi največ 18 mesecev (Kryštufek 2001).

V Sloveniji je gozdna voluharica razširjena po celinskem delu, od 80 m do 2000 m nadmorske višine. Po JZ pobočjih dinarskih planin se spušča do vznožja in prodira v sosednja submediteranska območja (Slika 5). Najdemo jo tudi v Brkinih. Njen habitat so vlažni iglasti in mešani gozdovi, čeprav jo najdemo tudi v listnatem gozdu, barjanskem grmišču, v gostem rastlinju ob vodah in v živih mejah. Živi predvsem na gozdnih tleh, čeprav izvrstno pleza (Kryštufek 2001).



**Slika 5:** Zemljepisna razširjenost vrste *C. glareolus* v Sloveniji  
(Kryštufek, 1991)

### 2.3.2 Koevolucija in naključno gostiteljstvo

Hantavirusi, za razliko ostalih virusov v družini *Bunyaviridae*, nimajo vmesnega prenašalca, ki bi dovoljeval širjenje preko zemljepisnih ovir. Zato so se prilagodili naravnemu gostitelju in se tako ohranili med evolucijo.

V naravi se hantavirusi ohranjajo v malih sesalcih in sicer, vsak tip hantavirusa, v točno določenem glodavcu. Pri tem lahko opazimo značilno koevolucijo virusa in gostitelja. Genetska raznolikost pri virusu nastaja predvsem z genskim odmikom, z akumulacijo točkovnih mutacij, insercij in delecij (Plyusnin, 2002). Opazili so tudi nastanek navideznih vrst virusa PUU v gostitelju, kar pripisujejo koevoluciji. Navidezne vrste so majhne različice virusa, ki zagotavljajo stabilnost in lažjo prilagoditev na spremembe (Sironen in sod., 2001).

Kljub temu se hantavirusi gostitelju niso vedno uspešno prilagodili. Namreč pri filogenetskih analizah opazimo določene »nepravilnosti«, ki nakazujejo, da je med evolucijo prišlo do zamenjave gostitelja (Plyusnin in Morzunov, 2001). Prve domneve o zamenjavi gostitelja je postavil Morzunov s sodelavci (Morzunov in sod., 1998), ki je ugotovil, da je virus NY nastal kot posledica prilagoditve virusa Monogahella (MGLV), pri

prehodu iz gostitelja *Peromyscus maniculatus* na *P. leucopus*. Nastanek hantavirusov TOP in KBR je prav tako verjetno posledica prilagoditve virusa na novega gostitelja. Najverjetneje je prednik virusa PUU, ki izhaja iz vrste *Clethrionomys* sp. prešel na vrsto *Lemmus* sp. in nato celo na *Microtus* sp. (Vapalahti in sod., 1999). Podobno opažajo tudi pri virusu SAA, ki ga najdemo v vrsti *A. agrarius*, ta pa je naravni gostitelj virusa HTN. SAA je genetsko najbolj podoben virusu DOB, ki ga najdemo v rumenogrli miši (*A. flavicollis*). Obe vrsti miši živita v zahodni Evropi. Njuna ekosistema se prekrivata, zato je možno, da je prišlo do prenosa prednika virusa DOB na novega gostitelja, prilagoditev pa je povzročila nastanek virusa SAA (Nemirov in sod., 2002).

Poleg zamenjave gostitelja lahko pri hantavirusih opazimo še en pojav in sicer naključno gostiteljstvo (angl. spillover). Naključnega gostiteljstva dolgo časa ni bilo mogoče dokazati, saj protitelesa proti različnim hantavirusom navzkrižno reagirajo. Z uvedbo molekularnih metod, predvsem določanjem nukleotidnega zaporedja, pa to ni več težava. Tako so Klingström in sodelavci (Klingstrom in sod., 2002), z laboratorijskim poskusom, okužili različne vrste glodavcev z virusi PUU, DOB in SAA. Za virus PUU sta bili poleg *C. glareolus* dovzetni še sorodni vrsti *M. agrestis* in *L. sibiricus*. Medtem ko pri laboratorijskih miših (*Mus musculus*), ni prišlo od okužbe. Z virusoma DOB in SAA so okužili oba gostitelja *A. agrarius* in *A. flavicollis* in tudi laboratorijske miši, ki so sorodstveno bližje mišim (*Apodemus* sp.) kot voluharicam (*Clethrionomys* sp.). Pri pregledovanju protiteles pri naravno okuženih glodavcih v Belgiji so odkrili protitelesa proti virusu PUU tudi pri drugih glodavcih (*M. agrestis*, *M. arvalis*, *A. sylvaticus*). Vsi naključni gostitelji, laboratorijsko in naravno okuženi, so imeli nižji titer protiteles. Izkazalo se je, da je šlo za prehodno okužbo, saj so imela protitelesa nevtralizirajoči učinek na virus. Pri naključnem gostiteljstvu tako najverjetneje glavno vlogo igrata dva dejavnika: prekrivajoči se biotop več gostiteljskih vrst, ki so dovzetne za okužbo (sorodnejše vrste) in visoka gostota populacije naravnega gostitelja, ki tako učinkoviteje prenaša virus.

### 2.3.3 Prenos virusa med gostitelji in ohranjevanje v naravi

Glavni rezervoar virusa PUU je gozdna voluharica *C. glareolus*. Ugotovili so, da prevalenca protiteles proti virusu PUU pri voluharicah, ujetih v naravi, narašča s starostjo in maso, kar nakazuje na horizontalni prenos virusa (Niklasson in sod., 1995).

Escutenaire in sodelavci (Escutenaire in sod., 2000; Escutenaire in sod., 2002) so spremljali obnašanje in življenje živali ter merili prevalenco protiteles proti virusu PUU med gozdnimi voluharicami v Belgiji. Ugotovili so, da je glavni epidemiološki dejavnik odgovoren za prenos virusa, gostota populacije voluharic. S tem so potrdili tudi domnevo, da se virus širi predvsem s tesnim stikom. Na učinkovitost prenosa dodatno vplivajo tudi socialni dejavniki in habitat. Med socialnimi dejavniki so izpostavili predvsem agresivno vedenje in skupna gnezdišča. Ugotovili so, da so spolno zrele voluharice bolj prekužene, prav tako je prevalenca znatno višja med težjimi in starejšimi samci. Nasprotno, kot bi lahko pričakovali, samci ne branijo teritorija, ampak ga le označujejo z urinom in fecesom. Tako pogosteje srečujejo druge samce in so zato bolj izpostavljeni okužbi. Samice med seboj tekmujejo pri nabiranju hrane in branijo svoja gnezdišča (Löfgren 1995; Löfgren in sod., 1996). Poleti je gostota populacije voluharic višja. Poleg tega voluharice tudi spolno dozorijo in so zato bolj agresivne, to je tudi najverjetnejši razlog za prenos virusa. Pozimi se virus ohrani zaradi sobivanja in skupnega gnezdenja, ki kljub nižji gostoti populacije glodavcev zagotavlja prenos (Escutenaire in sod., 2000; Escutenaire in sod., 2002; Olsson in sod., 2002).

Virusne antigene so našli v pljučih, jetrih, vranici, ledvicah, v žlezi slinavki in v urinu okuženih živali (Gavrilovskaya in sod., 1983; Yanagihara in sod., 1985). Zanimivo je tudi, da so virusne antigene našli tudi v rjavem maščevju prezimelih voluharic. To verjetno omogoča ohranjanje virusa v gostitelju preko zime, ko je gostota populacije glodavcev prenizka, da bi prišlo do prenosa (Gavrilovskaya in sod., 1983).

Da se lahko virus ohrani tudi v populaciji glodavcev z nizko gostoto, mora biti obstojen tudi zunaj gostitelja. Za virus PUU so ugotovili, da je v naravi obstojen zunaj gostitelja v gnezdiščih od 12-15 dni pri sobni temperaturi. V tem času lahko pride do okužbe novega gostitelja brez tesnega stika. Obstojnost virusa v naravi je odvisna od temperature in vlage

v okolju. Na preživetje virusa zunaj gostitelja vplivajo tudi fizikalni in kemijski dejavniki, ki zmanjšujejo infektivnost virusa. Predpostavljam, da je obstoj virusa v naravi najbolj pomemben v zimskem času, predvsem na severu Evrope, ko gostota voluharic pade pod minimum. Takrat so gnezdišča voluharic pod snegom in le ta zagotavlja konstantno temperaturo in vlago (Kallio in sod., 2006). Obstojnost virusa v naravi verjetno ključno vpliva tudi na očitno razliko v incidenci bolezni med Fenoskandinavijo (nekaj 1000 primerov letno) in toplejšimi deli Evrope (nekaj 100 primerov letno) (Vapalahti in sod., 2003).

#### 2.4 EPIDEMIOLOGIJA HEMORAGIČNE MRZLICE Z RENALNIM SINDROMOM

Epidemiologija HMRS vključuje brezsimptomno okužbo naravnega gostitelja, prenos virusa na človeka in nastanek bolezni.

Virus se iz naravnega gostitelja na človeka prenese z vdihovanjem kužnih aerosolov iz izločkov glodavcev. Opisali so tudi prenos virusa z ugrizom podgane. Do sedaj ni dokazov o prenosu virusa s človeka na človeka, oziroma z matere na otroka (Schmaljohn in Hjelle, 1997). Epidemije HMRS se pojavijo takrat, kadar pride do povečanja gostote populacije naravnih gostiteljev ali kadar se morajo le ti, zaradi okoljskih dejavnikov, umakniti v bližino človeka. Dejavniki tveganja za okužbo so povezani s poklicem in načinom življenja. Najbolj ogroženi so gozdni delavci, kmetovalci, vojaki, mamologi in drugi, ki se pogosto zadržujejo v naravi in živijo v slabših higieniskih razmerah (Plyusnin in sod., 2001).

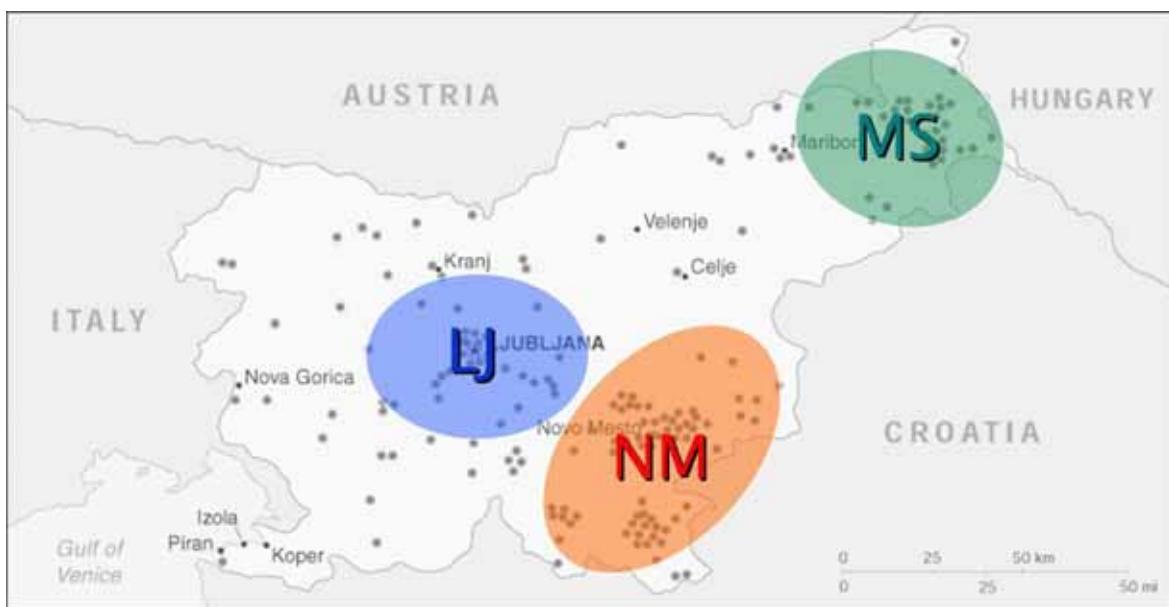
HMRS, ki jo povzročajo virusi HTN, SEO, PUU in DOB se endemično pojavljajo na evroazijski celini. Izbruhe HMRS v Aziji povezujemo predvsem z virusoma HTN in SEO, s to razliko, da je pri slednjem potek bolezni blažji. Virus HTN je endemičen na območju Koreje, Kitajske, Mongolije, Rusije in Burme. Virus SEO povzroča HMRS še na Japonskem in v JV Aziji (Lee H.W. in van der Groen, 1989). V Evropi krožijo virusi PUU, DOB in TUL (Plyusnin in sod., 2001). Virus PUU je endemičen na Švedskem, prisoten je tudi na Finskem, v zahodni Rusiji, Belgiji, Norveškem, Nizozemskem, Nemčiji, Avstriji in Sloveniji ter v drugih zahodnoevropskih državah (Clement in sod., 1997).

Virus DOB je razširjen po celotnem Balkanskem polotoku (Lundkvist in sod., 1997; Avsic-Zupanc in sod., 2000; Plyusnin in sod., 2001). O bolnikih so poročali v Albaniji (Eltari in sod., 1987), Bolgariji (Vasilenko in sod., 1987), Romuniji (Manasia in sod., 1977), Grčiji (Papa in sod., 1998), na Hrvaškem, Bosni in Hercegovini, Srbiji, Črni gori, Makedoniji (Gligic in sod., 1992) in Sloveniji (Avsic-Zupanc in sod., 1992; Avsic-Zupanc in sod., 1999).

#### 2.4.1 HMRS v Sloveniji

V Sloveniji se HMRS pojavlja v dveh oblikah. Prva je blaga oblika bolezni, ki močno spominja na bolezen »nephropathia epidemica«, o kateri poročajo iz Skandinavije in zahodne Rusije (Lahdevirta, 1982; Settergren in sod., 1991). Bolezen povzroča virus PUU, katerega naravni rezervoar je gozdna voluharica (*C. glareolus*), ki je razširjena po vsej Sloveniji. Druga oblika bolezni ima veliko resnejše simptome in doseže tudi do 16 % smrtnost (Avsic-Zupanc in sod., 1999). To obliko HMRS povzroča virus DOB, ki je v naravnem gostitelju rumenogrli miši (*A. flavicollis*). Odkrili so ga v Sloveniji v vasi Dobrava na Dolenjskem (Avsic-Zupanc in sod., 1992). Poleg omenjenih hantavirusov v Sloveniji najdemo še en virus, ki je genetsko podoben virusu DOB. Klinična slika okužbe je pri ljudeh blažja in bolj podobna tisti, ki jo povzroča virus PUU. To je virus SAA (Nemirov in sod., 2002), ki ga najdemo v gostitelju *A. agrarius*. V Sloveniji je dimasta miš (*A. agrarius*) razširjena v Prekmurju. Na istem območju sobiva tudi *A. flavicollis* gostitelj virusa DOB. V Sloveniji so dokazali virus SAA v dimastih miših iz Prekmurja, med tem ko iz bolnikov virusa še niso osamili (Avsic-Zupanc in sod., 2000).

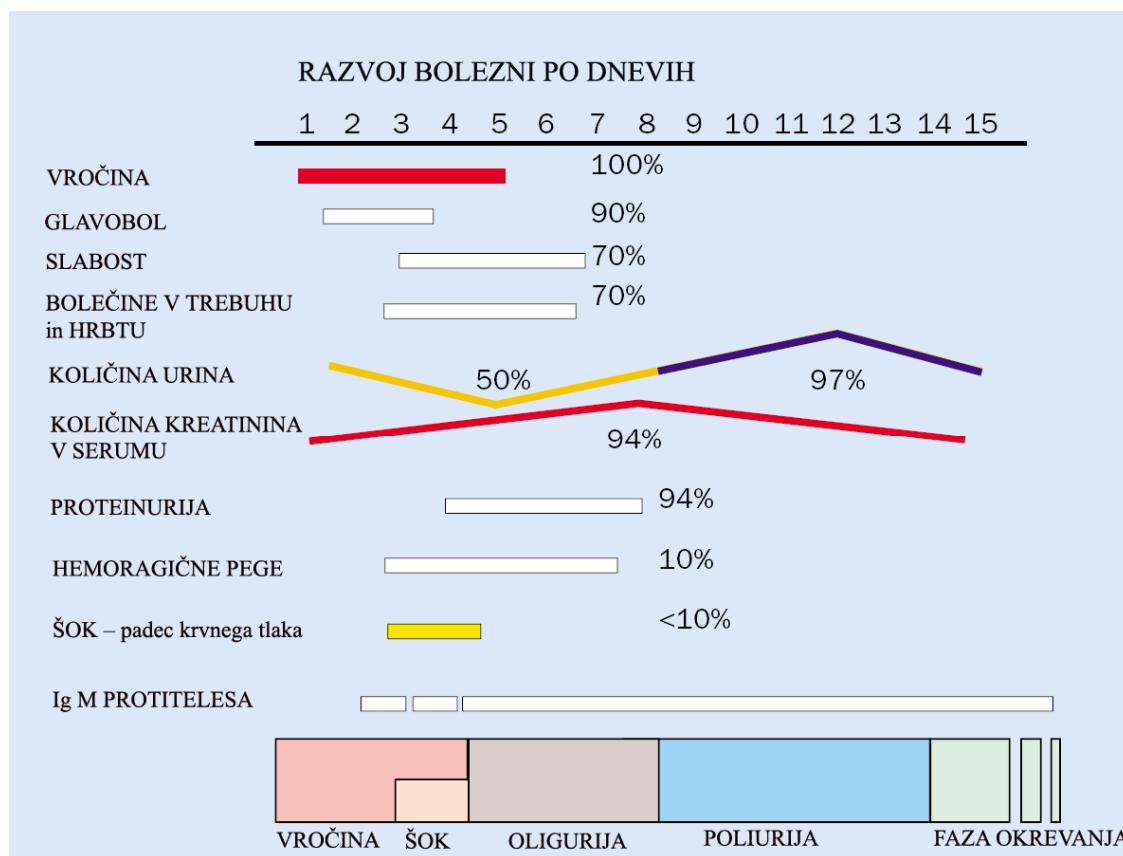
Prvi primer HMRS v Sloveniji so zabeležili že leta 1954 (Radosevic in Mohacek, 1954). Do danes je prijavljenih več kot 230 bolnikov, ki so bili sporadični primeri HMRS ali bolniki v manjših epidemijah (Slika 6).



**Slika 6:** Endemična območja HMRS v Sloveniji

## 2.5 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA HMRS

Hantavirusi se prenašajo preko aerosolov iz okuženih izločkov (urin, feces, slina) glodavcev. Človek je za virus »slepa ulica«, saj se na okužbo odzove z bolezni. Bolezenski potek HMRS niha od zelo težke oblike bolezni, ki je značilna za virusa HTN in DOB, do blažjih oblik, ki so značilne za okužbo z virusom PUU. Klinični simptomi nastopajo po 2-4 tedenski inkubacijski dobi. Potek bolezni lahko razdelimo na štiri faze: vročinsko, hipotenzivno, oligurično, diuretično fazo in fazo okrevanja (Slika 7) (Vapalahti in sod., 2003). Okužba z virusom PUU se začne z vročino, mrzlico, glavobolom in drugimi simptomi, ki spominjajo na gripo. Sledijo težave v prebavilih (slabost, bruhanje, bolečine) in zaspanost, lahko se pojavijo tudi motnje vida (Settergren in sod., 1991). Po 3-4 dneh se pojavijo simptomi odpovedi ledvic (oligurija, anurija) in bolečine v hrbtni strelji. Pri 5 % bolnikov okuženih z virusom PUU pride do akutne odpovedi ledvic in porušitve elektrolitskega ravnotežja v telesu, kar zahteva bolnišnično zdravljenje in dializo (Mustonen in sod., 1994; Rollin in sod., 1994). Pojavijo se tudi manjše krvavitve sluznice v prebavilih, vendar do resnih hemoragičnih zapletov pride le pri 10 % hospitaliziranih bolnikov (Nuutinen in sod., 1992; Alexeyev in sod., 1994). Smrtnost pri okužbi z virusom PUU je do 0,2 % (Kruger in sod., 2001). Stanje bolnika se začne popravljati po drugem tednu od začetka simptomov, vendar lahko popolno okrevanje traja tudi mesec dni.



**Slika 7:** Shematski prikaz kliničnega poteka bolezni »nephropathia epidemica«

(Vapalahti in sod., 2003)

Patogeneza hantavirusov je na celičnem nivoju še dokaj neraziskana. Primarno mesto razmnoževanja so celice žilnega endotelija malih krvnih žil. Virusi se vežejo na beta-3 integrine, površinske receptorje na endotelijskih celicah, in preko njih vstopijo v celico (Mackow in Gavrilovskaya, 2001). Razmnožujejo se v citoplazmi celice in se vežejo na golgijski kompleks, pri tem vzpodbudijo človekov imunski odziv (Schmaljohn, 1996). Hantavirusi lahko okužijo nezrele dendritske celice in sprožijo njihovo dozorevanje. Zrele dendritske celice omogočijo razširitev hantavirusov iz pljuč v limfne vozle in nato po telesu (Raftery in sod., 2002). Med akutno fazo bolezni pride do infiltracije limfocitov, monocitov, eozinofilcev in nevtrofilcev v ledvice (Temonen in sod., 1996). Poveča se izločanje citokinov (IL-6, IL-8), TNF $\alpha$ , endotelijskih adhezijskih molekul in makrofagov. Sledi širjenje kapilar in povečana propustnost žilnega endotelija, kar lahko vodi v okvaro žil in krvavitev notranjih organov (Hart in Bennett, 1999).

### 2.5.1 Patogeneza pri naravnih gostiteljih

Interakcije med naravnimi gostitelji in hantavirusi so slabo raziskane. V splošnem velja, da so glodavci kronično okuženi z virusom, ki ga izločajo v okolico z urinom, fecesom in slino. Navadno so okuženi glodavci serološko pozitivni kar pomeni, da proizvajajo protitelesa, ki virusa očitno ne nevtralizirajo (Lee P.W. in sod., 1986). Patogenezo pri glodavcih so raziskovali tako, da so v laboratoriju okužili gozdne voluharice z virusom PUU in spremljali dogajanje. Ugotovili so, da se 10-14 dni po okužbi pojavi prehodna viremija, ob tem pride do izločanja virusa v orofaringealnih izločkih (14-28 dni) in v fecesu (do 130 dni), pri urinu so rezultati nihali. Ko so voluharice žrtvovali, so virusni antigen našli v pljučih (do 270 dni), vranici, jetrih in črevesju. V nasprotju s pričakovanji, virusnega antiga niso potrdili v ledvicah. Protitelesa proti virusu PUU so se pojavila 18. dan po inokulaciji, titer je naraščal do 5 tedna po okužbi, nato padel, vendar so voluharice ostale serološko pozitivne ves čas opazovanja. Ko so neokužene voluharice izpostavili izločkom okuženih, so tudi te razvile okužbo. S tem so potrdili horizontalen prenos virusa preko izločkov. Opazovali so tudi vertikalni prenos virusa PUU in ugotovili, da do tega ne prihaja. Sesajoče voluharice so zaščitene z materinimi protitelesi do 35 dni po skotitvi. Raziskovalci so zaključili, da gozdne voluharice po okužbi z virusom PUU razvijejo klinično neopazno kronično infekcijo, ki se kaže s prehodno viremijo, izločanjem virusa z izločki ter perzistenco virusa v tkivih, kljub razvoju protiteles. V tkivih niso našli histopatoloških sprememb, ki bi jih lahko povezali z virusno okužbo (Yanagihara in sod., 1985).

Z dolgoročno študio divjih gozdnih voluharic (*C. glareolus*) v Uralu so ugotovitve laboratorijske študije podprtli. Ugotovili so, da je okužba pri gozdnih voluharicah doživljenska, vendar koncentracija virusnega antiga po prvem mesecu po okužbi močno pade – včasih tudi pod mejo zaznavnosti testa ELISA. V prvem mesecu po okužbi je prenos virusa na novega gostitelja najlažji, saj je njegova koncentracija takrat najvišja. Ugotovili so da, okužba ne vpliva na življensko dobo, reprodukcijo ali obnašanje voluharic (Bernshtain in sod., 1999).

## 2.6 DIAGNOSTIKA HMRS

Klinični potek hantavirusne okužbe je zelo raznolik, zato je postavitev diagnoze mogoča le s serološkimi testi (Lee H.W. in sod., 1998). Klinični simptomi, ki zdravniku vzbudijo sum na okužbo s hantavirusi so: visoka vročina, glavobol, trebušne bolečine in bolečine v hrbtni, a brez težav v dihalih (Vapalahti in sod., 2003). Poleg tega je pomembno tudi poudariti, da je v Sloveniji mogoča okužba z različnimi hantavirusi, kar brez laboratorijske potrditve še dodatno onemogoča pravilno diagnostiko (Avšič-Županc in Petrovec, 2003).

### 2.6.1 Laboratorijska diagnostika

Značilni laboratorijski izvidi pri okužbi z virusom PUU so: proteinurija, povečana koncentracija kreatinina v serumu, trombocitopenija, levkocitoza, hematurija in povečana koncentracija C-reaktivnega proteina (Vapalahti in sod., 2003).

S serološkimi metodami običajno dokazujemo specifična protitelesa razreda IgM in IgG. V rutinski diagnostiki najpogosteje uporabljajo metodo posredne imunofluorescence (IFA, angl. immunofluorescent assay) in encimsko imunski test (EIA, angl. enzyme immuno assay) (Avšič Županc in Petrovec, 2003). Diagnostika temelji na porastu titra specifičnih protiteles IgG, zato je potrebno preiskati vsaj dva vzorca seruma bolnika, enega v akutni in drugega v fazi okrevanja (Lundkvist in Niklasson, 1994). Z EIA lahko določimo tudi specifična protitelesa razreda IgM, ki se za razliko od protiteles razreda IgG, pojavijo že v prvih dneh po okužbi. Zvišana raven protiteles IgM ostane prisotna le nekaj tednov, medtem ko protitelesa IgG zaznamo celo življenje (Niklasson in Kjelsson, 1988). Protitelesa proti hantavirusom navzkrižno reagirajo predvsem znotraj skupin HTN/SEO/DOB/SAA in PUU/PH/TUL, zato s temi metodami natančno določanje tipa virusne okužbe znotraj posameznih skupin ni mogoče (Kruger in sod., 2001).

Tip hantavirusne okužbe lahko določimo z nevtralizacijskim testom redukcije plakov (PRNT angl., plaque-reduction neutralization test) (McCormick in sod., 1982; Schmaljohn in sod., 1983) ali z molekularnimi metodami (Bowen in sod., 1997; Chu in sod., 1995). Poleg sveže zamrznjenih biopsijskih vzorcev, je najprimernejši vzorec krvi (z dodanim sredstvom proti strjevanju) bolnika v akutnem stanju. Iz tega izoliramo RNA in jo pomnožimo z metodo RT-PCR. Po končani reakciji pridelke dokažemo na gelski

elekroforezi ali z neposrednim določanjem nukleotidnega zaporedja. Glavna odlika metode RT-PCR je pomnoževanje virusne RNA, saj se ta v vzorcu nahaja ponavadi v zelo nizkih koncentracijah (Avšič-Županc in Petrovec, 2003). V zadnjem času, se predvsem v raziskovalne namene, uporablja novejša metoda s katero specifično dokazujemo virus DOB, HTN, PUU in SEO. Metoda RT-PCR v realnem času omogoča zaznavanje pridelkov z oligonukletidno sondijo že med pomnoževanjem. Sonda se veže na kratko zaporedje segmenta S. Metoda je hitra in enostavna za uporabo, hkrati pa zelo občutljiva in specifična (Aitichou in sod., 2005).

## 2.7 ZDRAVLJENE HMRS

Zdravljenje je odvisno od zgodnje diagnoze in pravočasne hospitalizacije. Pomembno je natančno spremjanje stanja bolnika, podporno zdravljenje in odpravljanje simptomov ter predvsem ohranjanje fiziološkega ravnotesja v telesu, kar prepreči razvoj zapletov (Huggins in sod., 1991).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORCI

Uporabili smo tkiva in serume gozdnih voluharic *C. glareolus*, ki so naravni gostitelji virusa PUU. Vse gozdne voluharice smo ujeli na endemičnih območjih HMRS v Sloveniji v letih od 1993 do 2006, s sodelovanjem Laboratorija za diagnostiko zoonoz in WHO laboratorija ter Prirodoslovnega muzeja Slovenije.

Glodavce smo lovili z živilovkami, nato smo jih v laboratoriju žrtvovali in jim sterilno odvzeli kri in organe (pljuča, jetra, vranico, ledvica, sečni mehur). Organe smo shranili v označene tubice in jih zmrznili pri -80 °C. Kri smo centrifugirali in ločili serum ter ga hranili pri -20 °C do nadaljnje obdelave.

#### 3.2 METODE DELA

##### 3.2.1 Metoda posredne imunofluorescence (IFT)

Z metodo posredne imunofluorescence dokazujemo protivirusna protitelesa v serumu. Specifična protitelesa se vežejo z virusnim antigenom, ki je pritrjen na predmetnik. Dodamo označena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna in tvorijo imunski kompleks, ki ga vidimo pod mikroskopom.

Sekundarna protitelesa so označena z fluorokromi, ki imajo to lastnost, da absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine in oddajo svetlobo druge valovne dolžine. Metoda posredne imunofluorescence je visoko specifična in občutljiva ter sorazmerno hitra, vendar je ocena rezultatov subjektivna, zato je pomembno, da jo izvaja izkušena oseba (Avšič Županc, 2002).

Serume smo v mikrotitracijski ploščici redčili s fosfatnim pufrom (PBS, angl. Phosphate Buffer Saline) v razmerju 1:10 (5 µl seruma in 45 µl PBS). Tako pripravljeno redčino seruma smo nanesli na predmetnike. Predmetniki so shranjeni pri -20 °C, zato smo jih

predhodno odmrznili in posušili. Na vsako polje smo prenesli 15 µl zredčenega seruma in inkubirali v vlažni komori pri sobni temperaturi 30 minut. V tem času se specifična protitelesa, če so prisotna, vežejo na antigene na predmetniku.

Po inkubaciji smo predmetnik sprali s pufrom PBS in pri tem pazili, da curek ne teče direktno na polja z antigenom in serumom. Spiranje je potekalo v 3 fazah:

- prelili smo s PBS,
- prelili smo s PBS in postavili v kadičko, kjer smo inkubirali 5 min (to smo ponovili trikrat),
- prelili smo z destilirano vodo,

predmetnik smo postavili v stojalo in ga posušili pri sobni temperaturi (cca 10 min).

Ko je bil predmetnik suh smo dodali 15 µl sekundarnih protiteles (zajčja protitelesa razreda IgG proti mišjim protitelesom), ki smo ga predhodno razredčili v razmerju 1:128 (600µl PBS, 35µl Evansovega modrila, 5µl sekundarnih protiteles) ter inkubirali v vlažni komori pri sobni temperaturi 30 minut.

Ponovili smo postopek spiranja in predmetnik posušili. Nato smo dodali nekaj kapljic reagenta Mounting Media in ga pokrili s krovnim steklcem tako, da ni bilo ujetih zračnih mehurčkov. Pripravljen predmetnik smo pregledali s fluorescentnimi mikroskopom pod 400 x povečavo.

### 3.2.2 Izolacija RNA iz ledvic glodavcev

Iz ledvic glodavcev smo izolirali celokupno RNA po izboljšani metodi Chomzynski in Sachhi (Chomczynski in Sacchi, 1987), ki jo pri uporabi reagenta TRIZOL® Reagent priporoča podjetje Invitrogen Life Technologies™ (Carsbald, Kalifornija, ZDA). TRIZOL® Reagent je reagent za izolacijo celokupne RNA iz celic in tkiv, saj med izolacijo ohranja neokrnjenost RNA. Izolirana RNA ne vsebuje proteinov in DNA ter je primerna za analizo z različnimi metodami.

Delo smo opravili v biološki komori za varno delo II. stopnje tako da smo uporabljali avtoklavirane pripomočke (secirno orodje, pipetni nastavki) in pogosto menjavali rokavice. Pred delom smo vse pripomočke in biološko komoro obrisali z natrijevim hipokloritom (da odstranimo ostanke predhodnih izolacij) in RNase Free Solution (Qbiogene Inc., Kalifornija, ZDA), ki odstranjuje encime RNAAze. RNAAze so pogosto glavni razlog za neuspelo izolacijo, saj razgradijo RNA.

Košček tkiva (~25 mg) v 200 µl filtriranega PBS smo z avtoklaviranim pestilom ročno homogenizirali v sterilnih tubicah (1,5 ml). Vzorcu smo dodali 600 µl hladnega (4 °C) TRIZOL® Reagenta (raztopina gvanidin izotiocianata in fenola). Vzorce smo premešali s sunkovitim obračanjem in vorteksirali, ter jih inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Tako smo omogočili razgradnjo celic in dokončen razpad nukleoproteinskih kompleksov. Vzorcu smo dodali 120 µl kloroform, ki ga moramo hrani v temi pri sobni temperaturi. Tubice smo premešali s sunkovitim obračanjem in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 4 °C in 14000 obratih/minuto.

Po centrifugiraju smo dobili v tubici tri plasti: zgornjo - vodno plast z raztopljeno RNA, srednjo plast v kateri so beljakovine in lipidi (vidno kot bel obroč) ter spodnjo fenol-kloroformsko plast z raztopljeno DNA. Vodno plast smo previdno prenesli v novo tubico, ne da bi se pri tem dotaknili obroča ali sten tubice. Dodali smo 300 µl izopropanola, ki ga moramo imeti shranjenega pri -20 °C. Vzorec smo premešali in nato centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 14000 obratih/minuto.

Po centrifugiraju se RNA precipitira na dnu in stenah tubice, zato smo odstranili supernatant in RNA sprali z 600 µl ohlajenega (shranjen pri – 20 °C) 75 % etanola. Mešanico smo vorteksirali 1 minuto in centrifugirali 7 minut pri 4 °C in 12000 obratih/minuto.

Previdno smo odstranili supernatant in sušili RNA 20-30 minut na zraku v aseptični komori. Pomembno je, da izhlapi čim več etanola, a da se RNA pri tem ne presuši. Osušeno RNA smo raztopili v 30-50 µl reagenta RNAsure™ Resuspension Solution (Ambion Inc., Applied Biosystems, Foster City, ZDA), ki smo ga predhodno segreli na 60 °C. Raztopljeno RNA smo inkubirali v stresalniku 10 minut pri 60 °C, nato jo ohladili in shranili pri -20 °C.

### 3.2.3 Pomnoževanje izolirane RNA

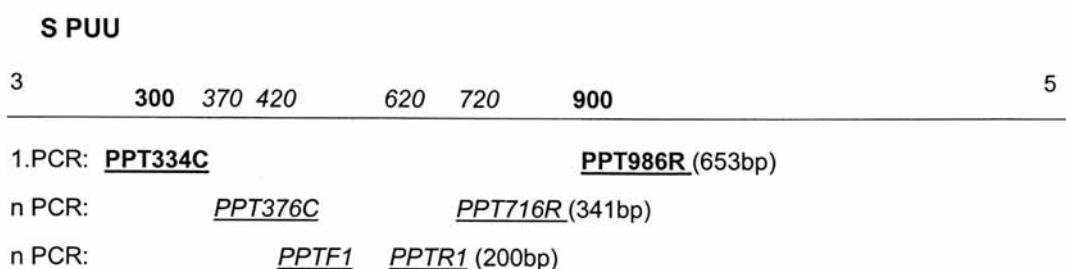
#### 3.2.3.1 Izbira začetnih oligonukleotidov

Izbira začetnih oligonukleotidov določa tudi tarčni odsek, ki bo v reakciji PCR pomnožen, zato je pravilna izbira le teh ključnega pomena za uspeh dokazovanja.

Za dokazovanje virusa PUU smo izbrali začetne oligonukleotide, ki so homologni zaporedju segmenta S virusnega genoma: PPT334C, PPT986R, PPT376C, PPT716R, PPTF1 in PPTR1 (Bowen in sod., 1997).

S parom začetnih oligonukleotidov **PPT334C** (nukleotidno zaporedje: 5'-TATGGIAATGTCCTTGATGT-3', I - inozin) in **PPT986R** (nukleotidno zaporedje: 5'-GCACAIGCAAAIACCCA-3') smo pomnoževali 653 baznih parov dolg tarčni odsek. Začetna oligonukleotida **PPT376C** (nukleotidno zaporedje: 5'-CCIAAGTGGICAIACAGC-3') in **PPT716R** (nukleotidno zaporedje: 5'-AAICCIATIACICCCAT-3') se pripenjata na zaporedje znotraj tračnega dela PPT334C in PPT986R in pomnožujeta 341 baznih parov dolg tarčni odsek (Bowen in sod., 1997). Z začetnima oligonukleotidoma PPT376C in PPT716R smo pomnoževali odsek pridelka PCR, ki smo ga dobili s prvim parom začetnih oligonukleotidov. S tem smo povečali občutljivost in specifičnost reakcije PCR.

Zaradi težav pri pomnoževanju segmenta S pri nekaterih vzorcih smo uporabili še dodatni par začetnih oligonukleotidov. Dodatni par začetnih oligonukleotidov smo oblikovali na podlagi znanih nukleotidnih zaporedij virusa PUU, ki smo jih ugotovili v predhodnih studijah. Začetna oligonukleotida **PPTF1** (nukleotidno zaporedje: 5'-ATCAACACGAGGAAGACAGA-3') in **PPTR1** (nukleotidno zaporedje: 5'-TTGGGAAGAGACCACACACA-3') pomnožujeta znatno krajši odsek, 200 baznih parov, saj se vežeta znotraj zaporedja začetnih oligonukleotidov PPT376C in PPT716R (Slika 8).



**Slika 8:** Shematski prikaz mesta pripenjanja začetnih oligonukleotidov

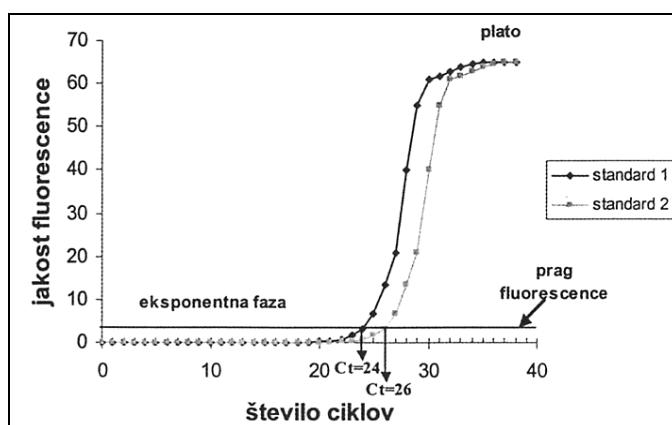
### 3.2.3.2 PCR v realnem času

#### 3.2.3.2.1 Teoretične osnove

Metodo PCR v realnem času so jo 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. Dokaz pridelkov temelji na merjenju fluorescence. Neprerrgano spremeljanje poteka reakcije v vsakem ciklu omogoči, da izmerimo količino pridelka PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazii. To naredimo tako,

da na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (Slika 9) (Klein, 2002; Niesters, 2001).



Slika 9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času

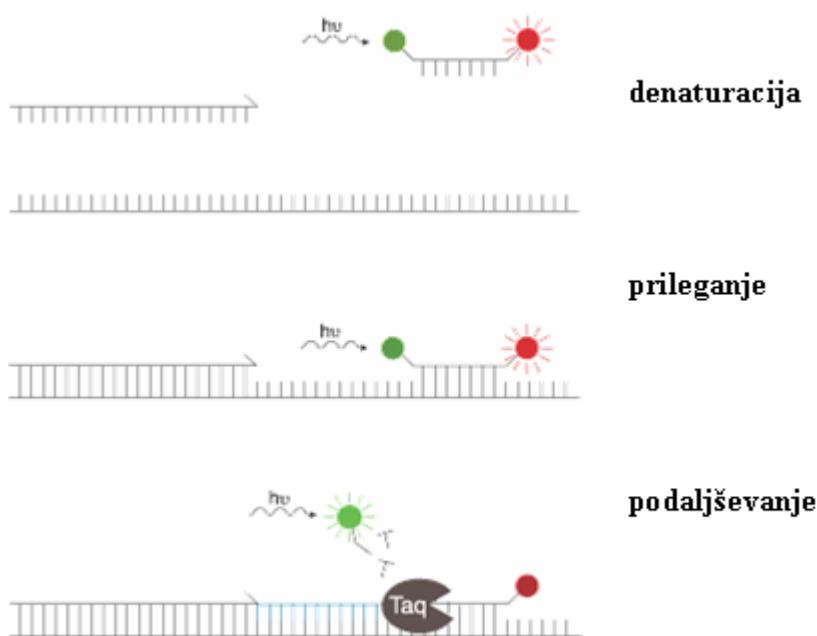
Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko preseže ta prag ( $C_t$ ). Pri večjem začetnem številu kopij matrice, signal prej preseže ta prag in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

Pridelke PCR v realnem času odkrivamo na dva načina:

- **nespecifično odkrivanje** - uporabljamo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvojerižno DNA (npr. SYBR Green I). Slaba lastnost fluorescentnih barvil je v tem, da se vežejo na vsako dvojerižno DNA vključno z nespecifičnimi pridelki reakcije in z oligonukleotidnimi dimeri. Zato je verjetnost lažno pozitivnih pridelkov večja.
- **specifično odkrivanje** – količino nastalih pridelkov odkrivamo 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* sondu (Slika 10) (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. V stopnji prileganja se sonda veže na enoverižne pridelke reakcije za začetnim oligonukleotidom. Ob podaljševanju začetnega oligonukleotida z encimom *Taq* DNA polimeraza, ki ima 5' eksonukleazno aktivnost, pride do hidrolize sonde in na ta način se reporterski fluorofor odcepi. Razdalja med dušilcem in reporterskim fluoroforom se poveča in zato začne fluorofor oddajati fluorescenco (Wilhelm in Pingoud, 2003).



Slika 10: Princip delovanja *TaqMan* sonde

PCR v realnem času ima številne prednosti v primerjavi z običajnimi postopki. Metoda poteka v zaprtem sistemu in odpravlja potrebo po dokazovanju pridelkov PCR po končani reakciji, kar skrajša čas analize in zmanjša možnost kontaminacije (Klein, 2002). Postopki osamitve so postali avtomatizirani za kvantitativno dokazovanje tarčne RNA ali DNA 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. Še posebno uporabna je pri patogenih, ki jih je težko ali nemogoče kultivirati, oziroma v kulturah rastejo počasi. Metoda ima pomembno vlogo pri spremeljanju 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 številu kopij genov, izražanju genov, inverzije, translokacije in točkaste mutacije. Iz sprememb v izražanju genov je mogoče sklepati na njihovo vlogo pri razvoju bolezni. To pa pripomore k razvoju novih diagnostičnih testov in zdravil (Snider in sod., 2001).

### 3.2.3.2.2 Enostopenjski RT-PCR v realnem času za virus PUU

Za dokazovanje virusa PUU smo uporabili par začetnih oligonukleotidov in sondu, ki so homologni segmentu S: začetna oligonukleotida, **PUU D** (nukleotidno zaporedje: 5'-GGAGTAAGCTCTTCTGC-3') in **PUU L** (nukleotidno zaporedje: 5'-ACATCATTGA GGACAT-3') med katerima je tarčno zaporedje dolgo 97 baznih parov. Na to zaporedje se veže tudi sonda **PUU S** (nukleotidno zaporedje: 5'-TCCATGCCAACAGCCCAGTCAAC-3'), ki ima na 5' koncu fluorofor JOE, na 3' koncu pa ima vezan dušilec DABCYL. Uporabili smo komplet reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, ZDA). Reakcija je potekala v aparaturi Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australija).

Volumen reakcijske mešanice je 25 µl, le ta pa je vseboval:

- 12,5 µl 2-krat koncentrirane reakcijske mešanice,
- 0,3 µl začetnega oligonukleotida PUU D (50 µM),
- 0,3 µl začetnega oligonukleotida PUU L (50 µM),
- 0,25 µl sonde PUU S (20 µM),
- 0,5 µl encima SSIII RT/Platinum Taq Mix,
- 6,15 µl sterilizirane in deionizirane vode,
- 5 µl virusne RNA.

Najprej je potekel reverzni prepis RNA v cDNA in sicer 40 minut pri 42 °C. Nato je sledila inaktivacija reverzne transkriptaze ter aktivacija Platinum Taq polimeraze: 4 minute pri 95 °C ter reakcija v 45 temperaturnih ciklih:

- denaturacija: 10 sekund pri 95 °C,
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov in sonde: 15 sekund pri 53 °C,
- podaljševanje tarčnega odseka: 15 sekund pri 72 °C.

Po končani reakciji smo analizo rezultatov opravili na računalniku. Kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linijo fluorescenčnega praga (C<sub>t</sub>).

### **3.2.3.3 Verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT- PCR)**

Hantavirusi imajo enovijačni RNA genom (Schmaljohn in sod., 1983), zato smo morali za pomnoževanje tarčnega zaporedja virusnega genoma uporabiti različico metode PCR, tako imenovano RT-PCR, ki vključuje reverzni prepis virusne RNA v cDNA. Prepis RNA v cDNA poteka v štirih stopnjah: (1) veriga DNA se sintetizira na molekuli RNA z encimom reverzna transkriptaza, nastane hibridna dvovijačna RNA/DNA; (2) encim reverzna transkriptaza ima aktivnost RNase H, ki razgradi RNA verigo; (3) komplementarna veriga DNA se nato sintetizira na predhodni molekuli DNA, nastane dvovijačna cDNA (angl. complementary DNA) in (4) nastala dvovijačna cDNA je nato pomnožena z metodo PCR (Singleton in Sainsbury, 2002).

Reverzni prepis smo izvedli z encimom reverzna transkriptaza, izoliranim iz virusa ptičje mieloblastoze (AMV, angl. Avian Mieloblastosis Virus). Uporabili smo komplet reagentov Accsess RT-PCR System (Promega Corporation, Madison, ZDA).

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

- 10 µl 5-krat koncentriranega reakcijskega pufra AMV/Tfl,
- 1 µl MgSO<sub>4</sub> (25 mM),
- 1 µl 10 mM dNTP mešanice,
- 1 µl začetnega oligonukleotida PPT334C (50 µM),
- 1 µl začetnega oligonukleotida PPT986R (50 µM),

- 1 µl encima AMV reverzna transkriptaza (5 enot/µl),
- 1 µl encima Tfl DNA polimeraze (5 enot/µl),
- 32 µl sterilne deionizirane vode,
- 3 µl vzorca virusne RNA.

Reverzni prepis RNA v cDNA je potekal eno uro pri 42 °C. Nato smo z 2 minutnim segrevanjem pri 94 °C inaktivirali delovanje reverzne transkriptaze in razdvojili nastale dvojne vijačnice RNA-cDNA. Sledilo je 40 ciklov PCR reakcije:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C ,
  - pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuta pri 45 °C,
  - podaljševanje tarčnega odseka: 2 minuti pri 68 °C,
- sledilo je še 7 minutno zaključno podaljševanje pri 68 °C in ohlajevanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

RT-PCR je potekala v aparaturi Perkin Elmer 9700 (Perkin Elmer, Foster City, ZDA).

Pridelke PCR smo do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C.

### **3.2.3.4 PCR z notranjima začetnima oligonukleotidoma**

Pri PCR z notranjimi začetnima oligonukleotidoma (angl. nested PCR) smo pomnoževali pridelke PCR, ki so nastali v prvi reakciji PCR. Vezavna mesta za začetna oligonukleotida se nahajajo znotraj vezavnih mest prvega para začetnih oligonukleotidov. Z uporabo »nested« PCR se specifičnost in občutljivost pomnoževanja DNA močno poveča. Prednost metode je majhna možnost vezave začetnih oligonukleotidov na nespecifično pomnožene odseke v prvi PCR reakciji. Slabost pa je večja občutljivost za kontaminacijo, saj je vzorec kar pridelek PCR, zato je potrebna večja pazljivost pri izvajanju metode (Newton in Graham, 1994).

V »nested« PCR reakciji smo kot matrico uporabili pridelke PCR, ki smo jih dobili z reakcijo RT-PCR. Uporabili smo začetna oligonukleotida PPT376C in PPT716R, ki pomnožujeta 341 baznih parov tarčnega virusnega zaporedja.

Pri sedmih vzorcih (gozdne voluharice ujete leta 1993 na področju Kočevskega roga in Kanalskega vrha) smo uporabili začetna oligonukleotida PPTF1 in PPTR1, ki sta bolj specifična in pomnožujeta le 200 bp tarčnega zaporedja.

Uporabili smo reagente iz reakcijskega kompleta PCR Core Kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Nemčija ).

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

- 5 µl 10-krat koncentriranega PCR pufra z dodanim 15mM MgCl<sub>2</sub>,
- 1 µl 10 mM dNTP mešanice,
- 1 µl začetnega oligonukleotida PPT376C (50 µM) oz. PPTF1 (50 µM),
- 1 µl začetnega oligonukleotida PPT716R (50 µM) oz. PPTR1 (50 µM),
- 0,3 µl encima AmpliTaq® DNA polimeraze (5 enot/µl),
- 40,7 µl sterilne deionizirane vode,
- 1 µl PCR pridelka (pridobljenega s PPT334C, PPT986R)

Reakcije je potekala v 36 temperturnih ciklih:

- denaturacija: 30 sekund pri 94 °C,
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuta pri 49 °C,
- podaljševanje tarčnih odsekov: 2 minuti 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.

### **3.2.4 Elektroforeza pridelkov PCR v agaroznem gelu**

Dokazovanje in ločevanje nukleinskih kislin temelji na potovanju negativno nabitih nukleinskih kislin v električnem polju proti anodi. Hitrost potovanja je odvisna od dolžine nukleotidnega zaporedja.

Prisotnost pridelkov PCR smo ugotavljali z elektroforezo v agaroznem gelu. Molekule DNA smo ločevali v 2 % agaroznem gelu (agarosa NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml 1x koncentriranega pufra TAE (Tris Acetat

EDTA pufer; vsebuje tris bazo, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH = 8,3). Raztopino smo do vrelišča segrevali v mikroovalovni pečici. Raztopljen gel smo ohladili na približno 50 °C in dodali 4,5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml, Promega Corporation, Madison, ZDA). Gel smo nalili v plastičen nosilec in počakali, da se je strdil. Strjeni gel smo na nosilcu prenesli v elektroforezno kadičko, ki smo jo napolnili z 1x koncentriranim pufrom TAE tako, da je bil celoten gel prelit s pufrom. Pufer omogoča tok elektronov od katode na anodo.

V vdolbinice gela smo nanesli 10 µl pridelka PCR in 2 µl nosilne raztopine (0,35 % bromfenol modrilo) Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija). V prvo vdolbinico smo nanesli 5 µl molekularnega označevalca - DNA lestvica 100 bp (1 µg/µl, Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, New York, ZDA).

Elektroforeza je tekla pol ure pri napetosti 80 V pri sobni temperaturi. Gel smo pregledali pri ultravijolični svetlobi in fotografirali s polaroidnim fotoaparatom.

### 3.2.5 Določanje nukleotidnega zaporedja

#### 3.2.5.1 Teoretične osnove sekvenčne reakcije

Z metodo sekveniranja določamo nukleinsko zaporedje molekule DNA ali RNA (posredno preko njene DNA kopije). Določanje nukleinskega zaporedja je tudi edina molekularna metoda, s katero neposredno in nedvomno dokažemo virusno DNA. Izvedba sekveniranja ne bi bila možna brez odkritja restriktičnih endonukleaz, encimov, ki režejo dvojno verigo molekule DNA na specifičnih mestih. Računalniška tehnologija je omogočila analizo zaporedij in shranjevanje v genske baze. Napredek v tehnologiji gelske elektroforeze je omogočil ločevanje fragmentov DNA, ki se razlikujejo le za en nukleotid. Vse te izboljšave so omogočile razvoj dveh različnih metod določanja nukleotidnega zaporedja.

Metoda določanja nukleotidnega zaporedja z rezanjem verige DNA s kemijskimi agensi je dobila ime po odkriteljih, Maxamu in Gilbertu. Pri tej metodi je en konec verige (običajno 5' konec) radioaktivno označen z izotopom  $^{32}\text{P}$ . 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

DNA 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 DNA ločimo na posebnem sekvenčnem gelu in zaporedje preberemo iz autoradiograma (Voet D in Voet JG, 1995).

Pri Sangerjevi metodi ali terminacijski metodi se pri *in vitro* sintezi DNA uporablajo 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 polimeraza DNA za podaljšanje potrebuje -OH skupino. V reakcijski mešanici je razmerje dNTP:ddNTP običajno 100:1. Po sekvenčni reakciji dobimo mešanico različno dolgih odsekov, ki se končajo na vsakem terminacijskem mestu. V sekvenčni reakciji uporabljam polimeraze DNA, ki so manj občutljive na ddNTP in temperaturno obstojne. Tudi pri tej metodi se štiri reakcije izvajajo ločeno, vsaka s specifičnim terminatorjem (ddATP, ddCTP, ddGTP in ddTTP). Pridelke reakcije nanesemo na gel vzporedno in jih ločimo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Zaporedje preberemo iz autoradiograma gela (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 tubici, kjer je vsak terminator označen s svojim barvilm. Odseke DNA avtomatizirano ločujemo s kapilarno gelsko elektroforezo. Laserski čitalec zazna terminalne nukleotide glede na značilen fluorescenten spekter. V nadaljevanju z ustreznim računalniškim programom sekvence analiziramo (Voet D in Voet JG, 1995).

Na osnovi nukleinskega zaporedja je mogoče določiti tudi aminokislinsko zaporedje in predvideti funkcijo beljakovine.

### 3.2.5.2 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,

Madison, ZDA). Čiščenje temelji na vezavi DNA na delce silicijevega dioksida v membrani posebne kolone in spiranju s pufri.

Pridelku PCR smo dodali 40 µl pufra MBS (angl. Membrane Binding Solution) in vorteksirali. Nato smo vse prenesli na membrano in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Centrifugirali smo 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. S tem postopkom se je DNA, ki smo jo s PCR pomnožili, vezala na membrano. Sledilo je spiranje nečistoč, pri tem smo na membrano dali 700 µl pufra MWS (angl. Membrane Wash Solution) ter ponovno centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni tubici smo zavrgli, na membrano pa smo dali 500 µl 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 tubico, saj je sledil korak elucije vezane DNA. Dodali smo 50 µl 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.

### 3.2.5.3 Določanje koncentracije očiščene DNA

Pripravili smo 50 ml 1,6 % agaroznega gela (NuSieve GTG). Ko se je ohladil na približno 50 °C smo dodali 4,5 µl etidijevega bromida. Na gel smo nanašali 3 µl očiščene DNA, raztopljene v 7 µl deionizirane vode, ter 2 µl brom-fenol modrila. Po končani elektroforezi smo glede na jakost fragmenta semi-kvantitativno ocenili koncentracijo DNA. Jakost fragmenta smo ovrednotili z oceno 1 do 5 (1 je najmočnejša jakost) in temu primerno določili količino DNA, ki jo bomo uporabili za sekvenčno reakcijo: pri oceni 1 je bila količina DNA v sekvenčni reakciji 1 µl, pri oceni 5 pa 5 µl.

### 3.2.5.4 Izbira začetnih oligonukleotidov za sekvenčno reakcijo

Za sekvenčno reakcijo je potrebno izbrati najbolj optimalne začetne oligonukleotide, ki so lahko enaki tistim, ki jih uporabljam v reakciji PCR. Mi smo izbrali enake začetne oligonukleotide kot za reakcijo "nested" PCR. Ker smo določali nukleotidno zaporedje

segmenta S virusa PUU, smo uporabili par začetnih oligonukleotidov PPT376C in PPT716R oziroma PPTF1 in PPTR1.

### 3.2.5.5 Sekvenčna reakcija

Uporabili smo komercialni komplet reagentov BigDye® terminator cycle sequencing ready reaction kit (ABI Prism, PE Applied Biosystems, Foster City, California, ZDA). Princip reagentov BigDye® temelji na Sangerjevi metodi sekveniranja, kjer je vsak terminator označen s svojim barvilkom. Za vsak pridelek reakcije »nested« PCR smo naredili dve ločeni sekvenčni reakciji, po eno za vsako verigo v dvojni vijačnici. V vsaki sekvenčni reakciji smo uporabili po en začetni oligonukleotid. Uporabili smo reakcijsko mešanico, ki vsebuje flourescentno označene dideoksi terminatorje, mešanico dNTP-jev in polimerazo FS (različica polimeraze Taq).

20 µl reakcijska mešanica je vsebovala:

- 1-5 µl DNA (glede oceno iz agarognega gela),
- 1,3 µl začetnega oligonukleotida (50 µM),
- 2 µl reakcijske mešanice,
- 3 µl reakcijskega pufra,
- deionizirano vodo do skupnega volumna 20 µl.

Sekvenčna reakcija je potekala v 25 ciklih:

- denaturacija DNA: 20 sekundi pri 96 °C,
  - pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 10 sekund pri 50 °C,
  - podaljševanje tarčnega zaporedja: 3 minute pri 60 °C,
- sledilo je še ohlajevanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

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

### 3.2.5.6 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije

Pred avtomatskim 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 centrifugiraju smo v kolumni dobili gel, odvečno tekočino pa smo zavrgli. Kolumno smo prenesli v čisto 1,5 ml tubico in na gel nanesli pridelek sekvenčne reakcije (20 µl) ter ponovno centrifugirali 3 minute pri 3000 obratih/minuto. Med centrifugiranjem se je očiščena DNA izprala v tubico. DNA smo zaradi slabe obstojnosti v vodi posušili in nato raztopili v formamidu. DNA 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 prestavili na led za 2 minut. Tako obdelani vzorci so bili pripravljeni 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, Norwalk, Connecticut, ZDA), ki ločuje pomnožene odseke v kapilari s polimerom (POP6) z laserskim čitalcem na osnovi značilnega fluorescentnega spektra.

### 3.2.6 Analiza nukleotidnih zaporedij

Podatke, ki smo jih dobili s sekveniranjem smo računalniško obdelali s programskim paketom LaserGene (DnaStar, Wisconsin, ZDA), izdanim leta 1999. Paket vsebuje več programov, ki omogočajo popolno obdelavo podatkov: program za sestavljanje zaporedij (SeqMan), urejanje zaporedij (EditSeq) ter primerjavo in poravnava ter prikaz sorodnosti v obliki filogramov (MegAlign).

S programom SeqMan smo sestavili pare zaporedij v eno soglasno zaporedje. Neberljiv začetek in konec ter zaporedje začetnih oligonukleotidov smo odrezali. Poravnano in

sestavljeni zaporedje smo preverili vzdolž verige zaradi morebitnih neujemanj. Nukleotidna zaporedja smo primerjali s podatki v genski banki preko medmrežnega servisa BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA). Zaporedja vseh analiziranih vzorcev smo poravnali, uredili in analizirali medsebojno sorodnost s programom MegAlign. Filogenetska drevesa smo izrisali tudi s programom TreeCon (Yves Van de Peer, Department of Biochemistry, University of Antwerp, Antwerpen, Belgium), ki omogoča statistično analizo dobljenih dendrogramov z metodo vezanja (angl., bootstrap).

## 4 REZULTATI

V letih od 1993 do 2006 smo v sodelovanju med Laboratorijem za diagnostiko zoonoz in WHO laboratorijem ter Prirodoslovnim muzejem Slovenije, ujeli 317 gozdnih voluharic *C. glareolus*. Lovišča smo izbrali tako, da smo upoštevali razporeditev HMRS bolnikov iz različnih endemičnih območij v Sloveniji. Preglednica 1 prikazuje število ujetih *C. glareolus* glede na leto ulova ter rezultate posredne imunofluorescenčne metode.

### 4.1 REZULTATI POSREDNE IMUNOFLUORESCENČNE METODE

Pri vseh živalih smo v serumih določali protitelesa razreda IgG proti hantavirusom. Pri gozdnih voluharicah smo ugotavljali protitelesa proti virusom HTN, DOB in PUU ter jih glede na imunski odgovor razdelili v tri skupine: močan protitelesni odgovor na virus PUU (40), šibek protitelesni odgovor na virus PUU (18), imunski odgovor le na virus HTN in virus DOB (17) (Preglednica 1).

**Preglednica 1:** Število serološko testiranih gozdnih voluharic, *C. glareolus*, z metodo posredne imunofluorescence ter razdelitev v skupine glede jakosti imunskega odgovora.

LETO	št. preiskanih <i>C. glareolus</i>	močan protitelesni odgovor na virus PUU	šibek protitelesni odgovor na virus PUU	imunski odgovor na virus DOB ali virus HTN
2006	25	2	0	2
2005	3	1	0	0
2004	0	/	/	/
2003	1	0	0	0
2002	9	1	1	0
2001	2	0	0	0
2000	21	0	0	0
1999	29	10	2	1
1998	9	4	2	0
1997	78	2	2	4
1996	21	4	0	1
1995	83	14	9	3
1994	0	/	/	/
1993	36	2	2	2
<b>Σ</b>	<b>317</b>	<b>40 (12,6 %)</b>	<b>18 (5,7 %)</b>	<b>13 (4,1 %)</b>

#### 4.2 REZULTATI POMONOŽEVANJA Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU

Za nadaljnjo analizo smo izolirali celokupno RNA tistih gozdnih voluharic, pri katerih smo z metodo IFA dokazali imunski odgovor na virus PUU. Pri vzorcih iz leta 1993 smo izolirali RNA iz vseh vzorcev, saj zaradi pomanjkanja seruma, pri 25 vzorcih serološke analize nismo opravili. Pri večini vzorcev smo RNA izolirali iz ledvice gozdne voluharice, saj je le ta tarčni organ virusa PUU. Pri 16 vzorcih nismo imeli shranjenih ledvic, zato smo RNA izolirali iz vranice. Izolirano RNA smo pomnožili z metodo RT-PCR v realnem času. Kot pozitivno kontrolo pomnoževanja smo uporabili RNA, ki smo jo izolirali iz virusa PUU, gojenega na celični kulturi celic Vero E6.

Z metodo RT-PCR v realnem času smo pomnoževali 85 vzorcev (Priloga A), od katerih jih je bilo 42 pozitivnih. V prilogi A je natančna tabela vzorcev, ki smo jih vključili v raziskavo. Rezultate dobljene z metodo RT-PCR v realnem času smo primerjali z rezultati metode IFA (Preglednica 2). Metodo IFA smo uporabili kot izključitveno metodo, da smo zmanjšali število vzorcev. To nam je omogočalo dejstvo, da protitelesa pri naravnih gostiteljih nimajo na virus PUU nevtralizirajočega učinka, zato lahko tudi pri serološko pozitivnih glodavcih dokažemo virus z neposredno metodo kot je RT-PCR v realnem času. Ugotovili smo, da je bilo 73 % (29/40) serološko močno pozitivnih vzorcev na virus PUU, pozitivnih tudi z metodo RT-PCR v realnem času. Pri šibko pozitivnih vzorcih, se je pozitiven rezultat ujemal le v 22 % (4/18). Med 27 vzorci, kjer nismo opravili serološkega testiranja, smo virus PUU dokazali v 9 vzorcih (33%).

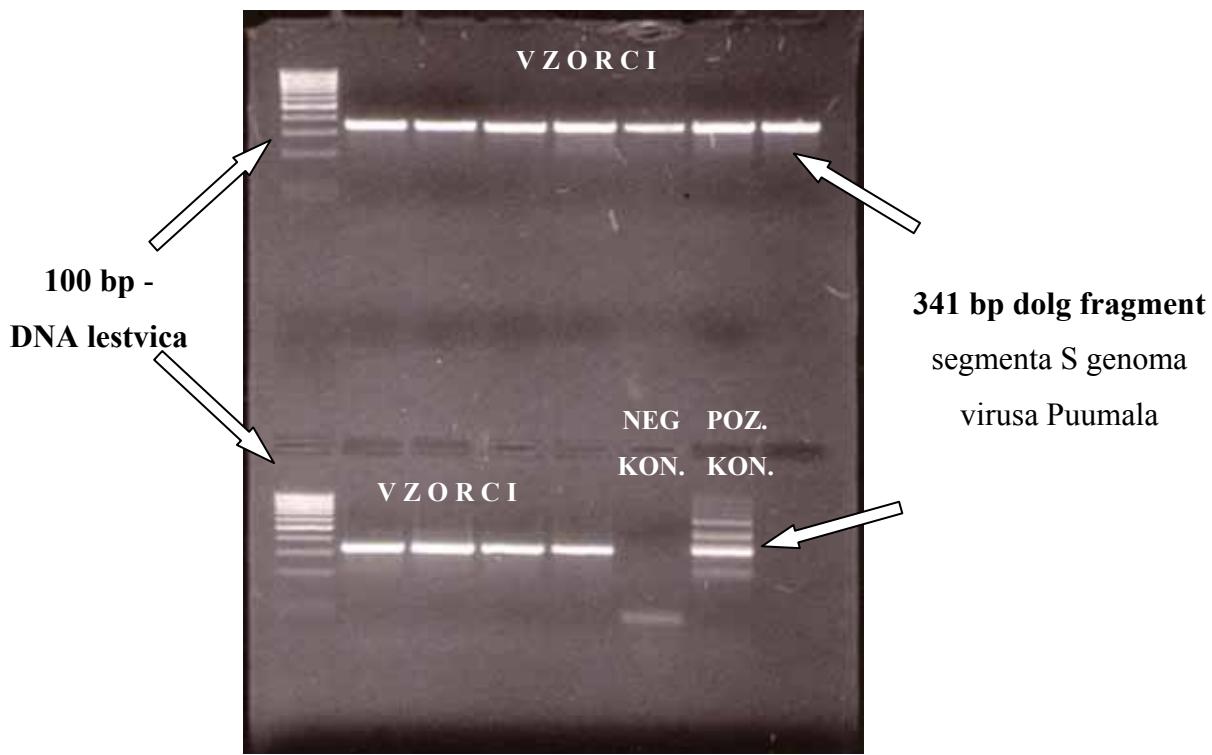
**Preglednica 2:** Prikaz primerjave rezultatov dobljenih s serološko in molekularno metodo ter izračun deleža ujemajočih se vzorcev z metodo IFA in RT-PCR v realnem času.

Posredna imunofluorescenza (IFA)		RT-PCR v realnem času pozitivni	RT-PCR v realnem času negativni	Delež seropozitivnih vzorcev, ki so bili hkrati pozitivni tudi z RT-PCR v realnem času [%]
močan imunski odgovor	40	29	11	73
šibak imunski odgovor	18	4	14	22
ni seruma	27	9	18	33

#### 4.3 REZULTATI POMNOŽEVANJA S KLASIČNIM RT-PCR IN »NESTED« PCR

Pri nadaljnji analizi smo pomnoževali 42 vzorcev, ki so bili pozitivni z metodo RT-PCR v realnem času, s klasičnim RT-PCR in »nested« PCR. Po pomnoževanju smo PCR pridelke (341bp dolge odseke segmenta S) dokazovali z elektroforezo na agaroznem gelu (Slika 11). Pravilnost poteka reakcije smo spremljali s pozitivno in negativno kontrolo.

Med 42 preiskanimi vzorci smo s klasično metodo RT-PCR dokazali 35 vzorcev. 7 negativnih vzorcev je bilo iz voluharic ujetih leta 1993 v Kočevju in na Kanalskem vrhu. Zato smo te vzorce še dodatno pomnožili z notranjimi začetnimi oligonukleotidi PPTF1 in PPTR1. Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih dodatno uporabili za analizo 7 kritičnih vzorcev so specifični za virus PUU, ki je prisoten v Sloveniji. Pridelki PCR so bili veliki 200 bp in smo jih dokazali z gelsko elektroforezo. Med 7 preiskovanimi vzorci, so bili 4 pozitivni.



**Slika 11:** Dokazovanje pridelkov PCR z gelsko elektroforezo

**Obrazložitev slike:** Na sliki je viden 341 bp dolg fragment segmenta S genoma virusa PUU, ki smo ga dobili s pomnoževanjem z notranjimi začetnimi oligonukleotidi PPT376C in PPT716R.

Časovno gledano smo virus PUU dokazali v vzorcih gozdnih voluharic ujetih v letih **1993, 1995, 1996, 1998, 1999, 2005, 2006** (preglednica 3).

**Preglednica 3:** Časovni pregled pozitivnih gozdnih voluharic, *C. glareolus*, na virus Puumala.

LETO	število preiskanih <i>C. glareolus</i>	št. serološko pozitivnih na virus PUU	št. molekularno pozitivnih na virus PUU
<b>2006</b>	25	2	<b>2</b>
<b>2005</b>	3	1	<b>1</b>
<b>2004</b>	0	/	/
<b>2003</b>	1	0	0
<b>2002</b>	9	2	0
<b>2001</b>	2	0	0
<b>2000</b>	21	0	0
<b>1999</b>	29	12	<b>5</b>
<b>1998</b>	9	6	<b>3</b>
<b>1997</b>	78	4	0
<b>1996</b>	21	4	<b>4</b>
<b>1995</b>	83	23	<b>15</b>
<b>1994</b>	0	/	/
<b>1993</b>	36	4	<b>9</b>
<b>Σ</b>	<b>317</b>	<b>58 (18,3 %)</b>	<b>39 (12,3 %)</b>

Glede na območja v Sloveniji smo virus PUU dokazali na **6 lokacijah** (Slika 12), v skupno **39 vzorcih:** **Prekmurje** (12 vzorcev), **Pohorje** (1 vzorec), **Gorjanci** (15 vzorcev), **Kočevski rog** (8 vzorcev), **Kanalski vrh** (1 vzorec) in **Ljubljansko barje** (2 vzorca).



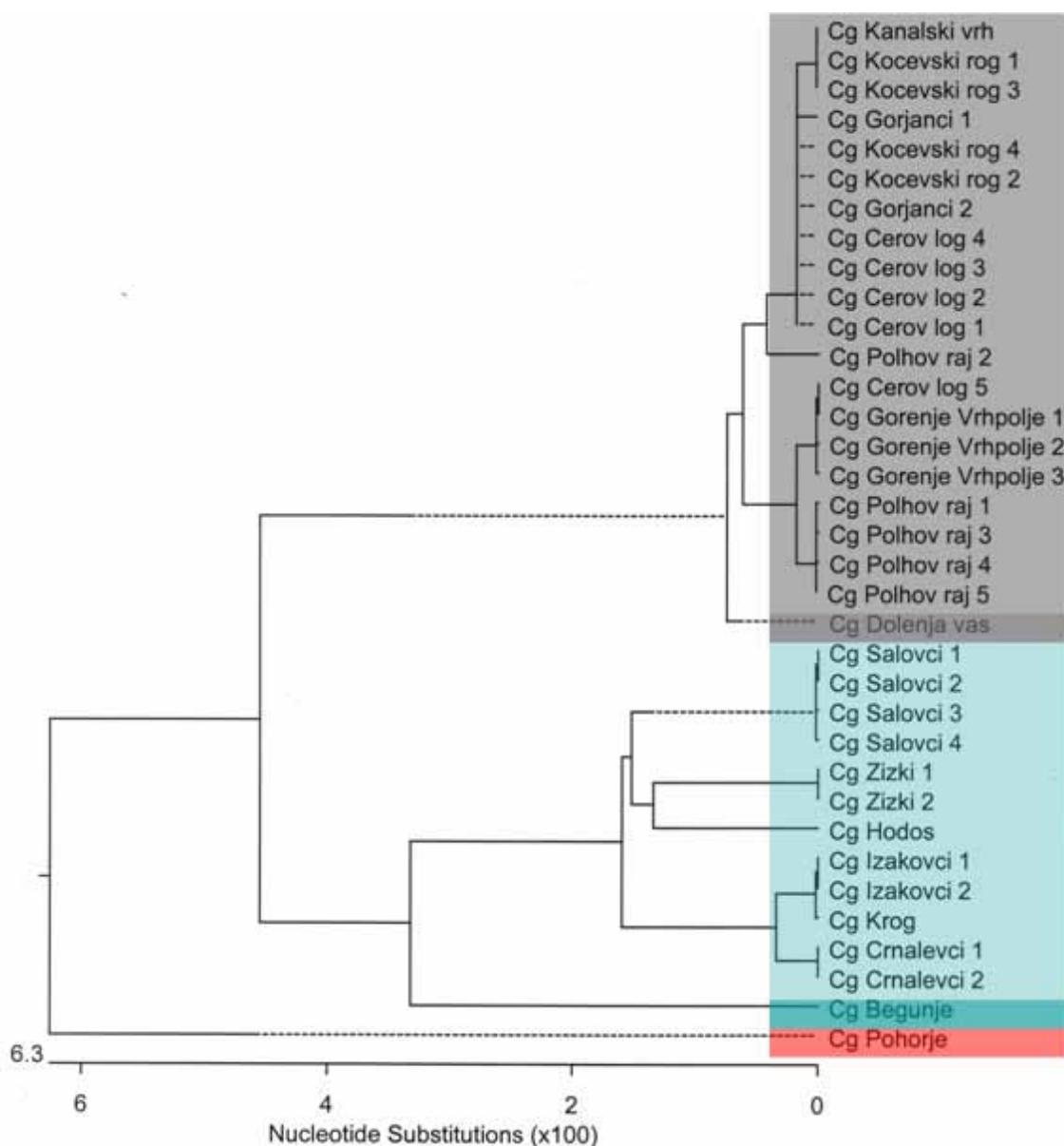
**Slika 12:** Grafični prikaz porazdelitve pozitivnih *C. glareolus* na virus PUU v Sloveniji

#### 4.4 REZULTATI DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

Nukleotidno zaporedje smo določili vsem 39 vzorcem, ki so, po pomnoževanju z »nested« PCR, vsebovali 341 bp oziroma 200 bp dolg odsek segmenta S virusa PUU.

Pri filogenetski analizi smo odstranili zaporedje začetnih oligonukleotidov in dobili zaporedja dolga 307 in 160 bp. Zaporedja smo primerjali z zapisi v genski banki, preko medmrežnega servisa BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA). Ugotovili smo, da so vsa dobljena nukleotidna zaporedja skladna nukleotidnemu zaporedju segmenta S virusa PUU.

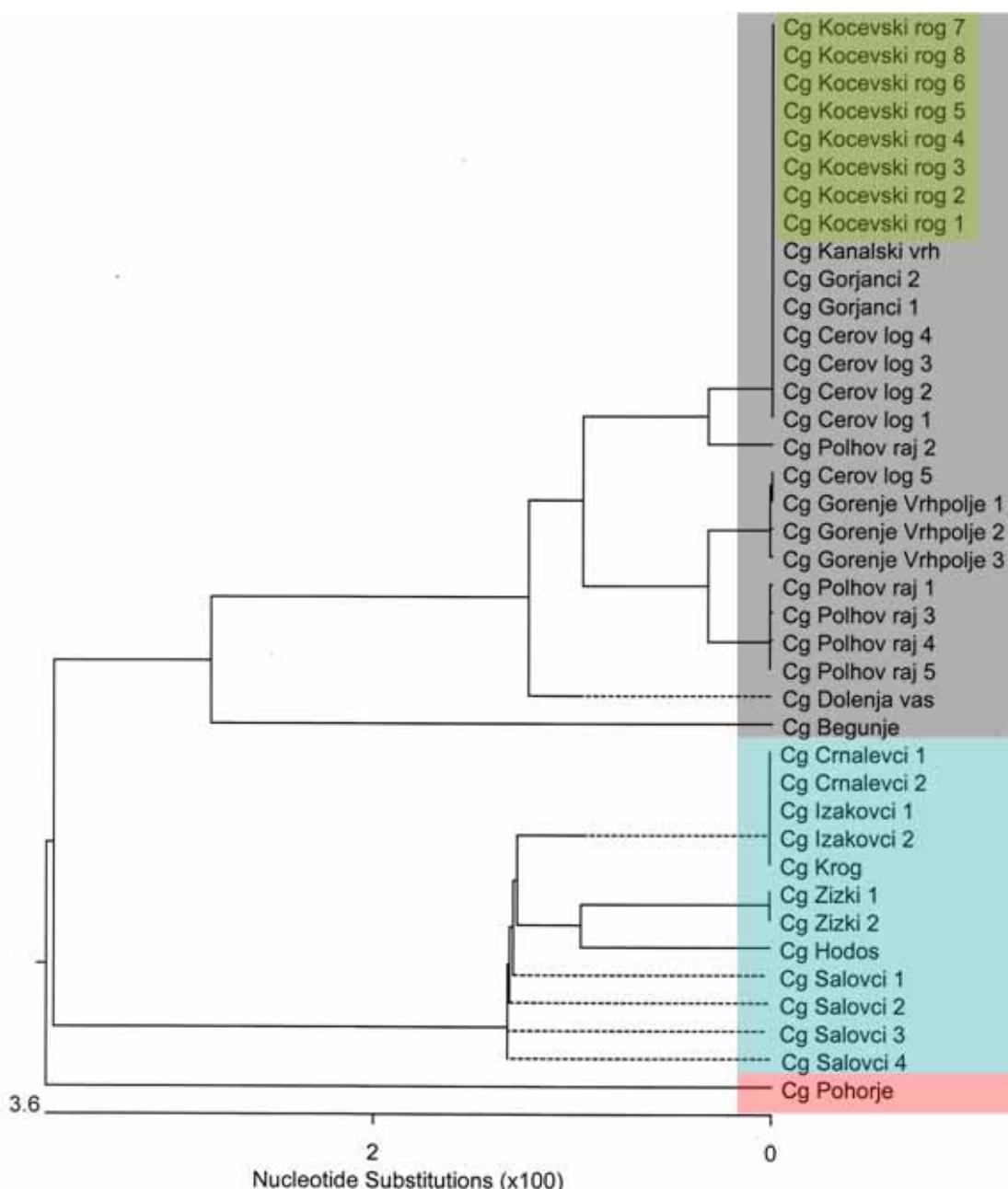
S programom MegAlign (paket LaserGene: DnaStar, Wisconsin, ZDA) smo izrisali filograma nukleotidnih zaporedij virusa PUU izoliranega iz naravnih gostiteljev v Sloveniji (Slika 13 in Slika 14).



**Slika 13:** Filogram nukleotidnih zaporedij virusa PUU izoliranega iz *C. glareolus* ujetih v Sloveniji – zaporedja segmenta S dolga 307 bp

Pri nukleotidnih zaporedjih virusa PUU, dolgih 307 bp, smo ugotovili, da imamo v Sloveniji prisotnih več monofiletskih skupin. V posamezno skupino se združujejo vzorci glede na njihov zemljepisni izvor. Tako se v posamezne gruče združijo vzorci iz Prekmurja, Gorjancev in Kočevskega roga. Posebno monofiletsko skupino tvori vzorec iz Pohorja, ki je najmanj soroden z ostalimi vzorcji. Z ostalimi vzorcji se, po izračunu razdalj med sekvencami, ujema le v 91,2 %. Vzorec iz Kanalskega vrha, je prav nasprotno, 100 %

identičen z vzorci iz Kočevskega roga, kljub temu, da sta območji zemljepisno precej ločeni. Vzorca iz Ljubljanskega barja – »Cg Begunje« in »Cg Dolenja vas« se razdelita vsak v svojo gručo in sicer je vzorec iz Begunj skladnejši s Prekmurskimi vzorcji, vzorec iz Dolenje vasi pa z vzorcji iz Gorjanc.



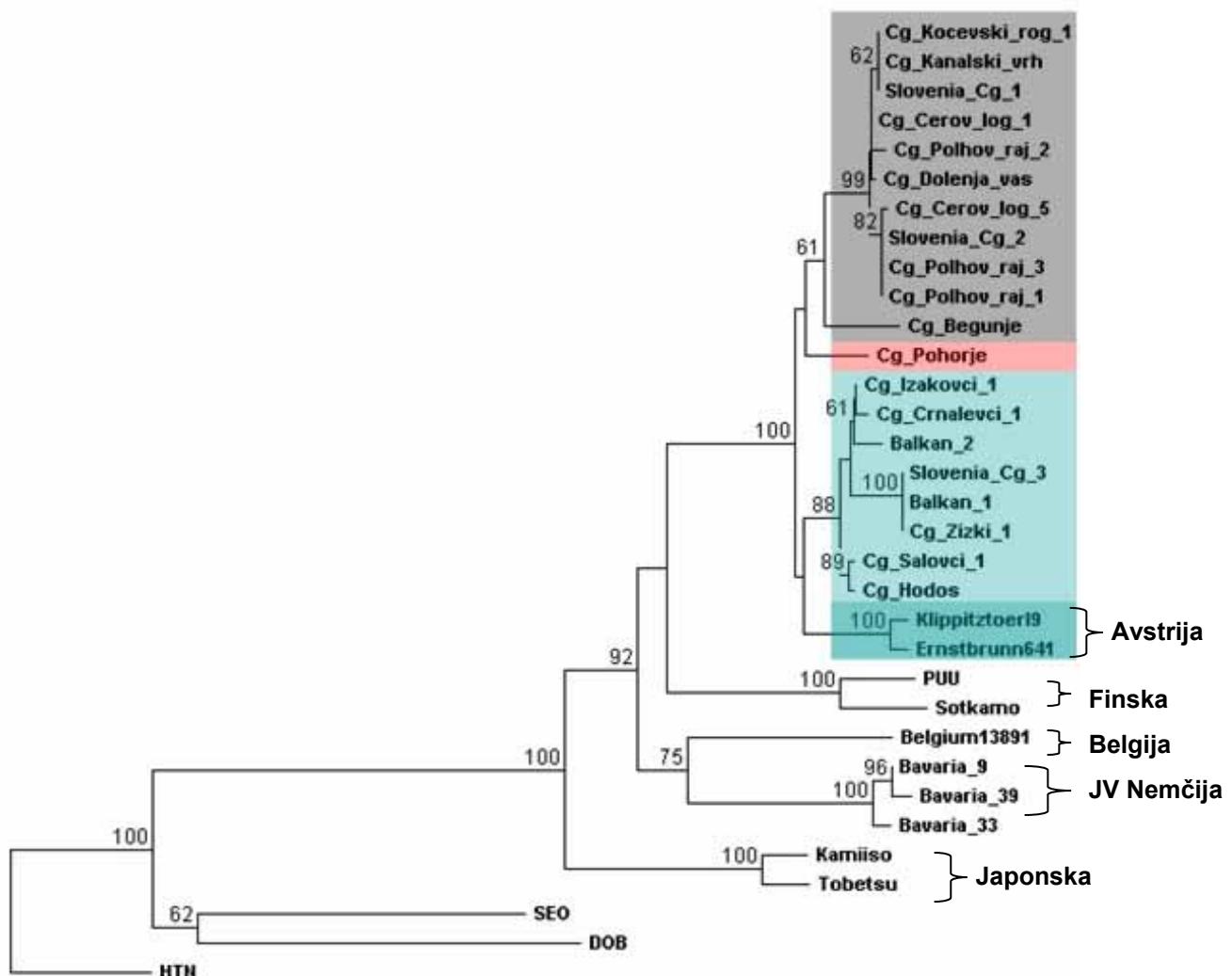
**Slika 14:** Filogram nukleotidnih zaporedij virusa PUU izoliranega iz *C. glareolus* ujetih v Sloveniji – zaporedja segmenta S dolga 160 bp

V analizo sorodnosti na podlagi krajših (160 bp) nukleotidnih sekvenc smo vključili tudi 4 vzorce, ki smo jih pomnožili z začetnima oligonukleotidoma PPTF1 in PPTR1. Kljub težavam pri pomnoževanju, smo pri filogenetski analizi ugotovili, da so zaporedja identična ostalim zaporedjem iz Kočevskega roga.

Nukleotidna zaporedja naših vzorcev smo primerjali tudi z nukleotidnimi zaporedij vzorcev iz drugih evropskih držav. S programom MegAlign smo vsa zaporedja poravnali in izračunali distančno matriko, kar smo prikazali v prilogah: B, C, D in E. S programom TreeCon smo nato analizirali sorodnost vseh sekvenc. Med zaporedji smo izračunali razdalje s Kimurinim dvoparametričnim modelom, ki upošteva neenakomerno hitrost zamenjav na različnih mestih zaporedja. Razdalja, ki jo po izračunu dobimo, odseva število sprememb v zaporedju, in s tem filogenetsko oddaljenost. Po izračunu razdalj smo narisali filogenetsko drevo. Pri tem smo uporabili sosedsko pridružitveno metodo (NJ, angl. neighbor joining), ki izhaja iz zvezdastega drevesa in potem združuje najbolj podobna zaporedja. Dobljeni dendrogram smo tudi statistično ovrednotili z metodo vezanja in sicer s 1000 poskusi (angl. Bootstrap).

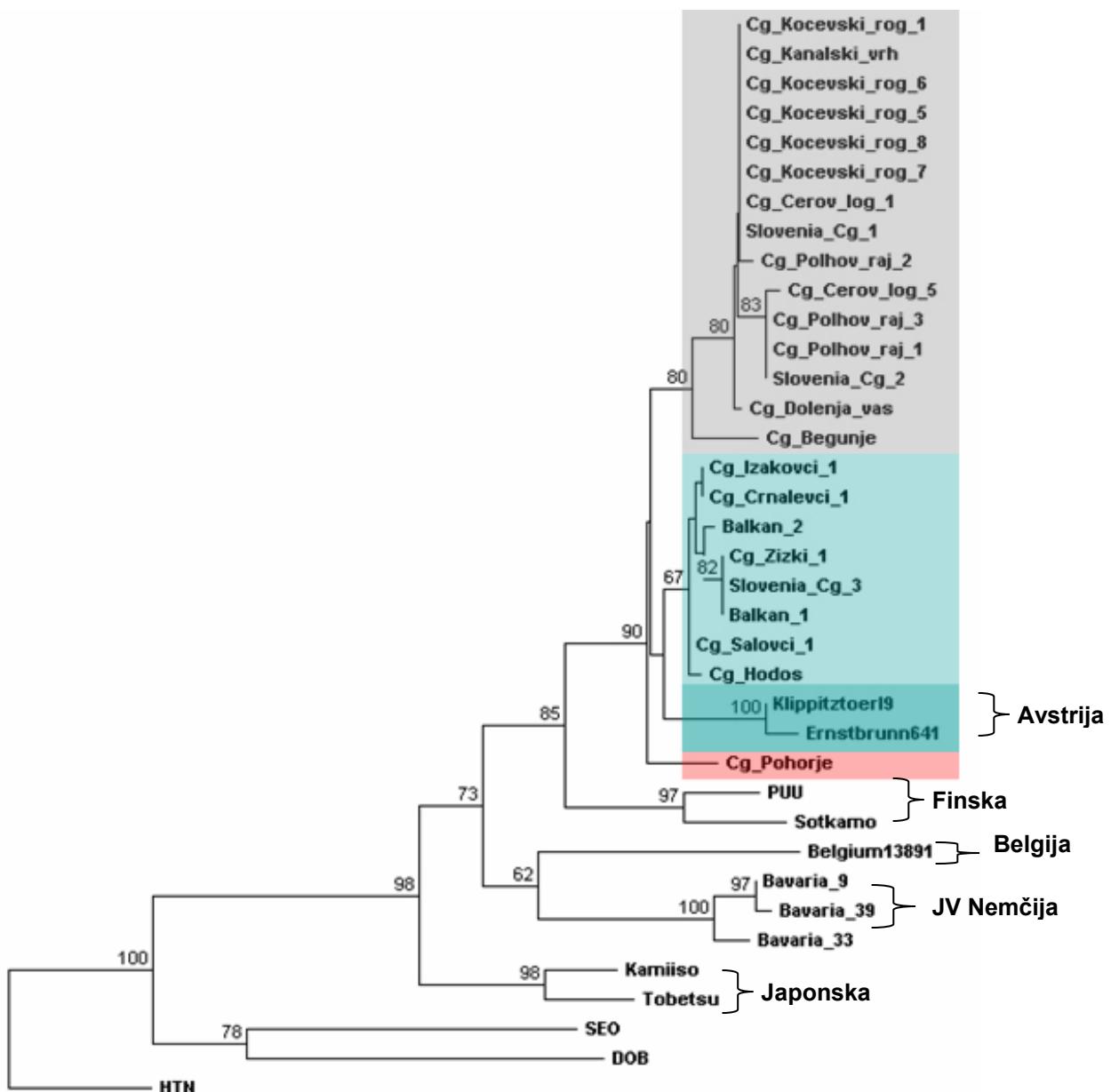
Z dendrogramom nukleotidnih zaporedij virusa PUU dolžine 307 bp (Slika 15) smo dokazali, da sta v Sloveniji prisotni dve genetski liniji virusa PUU. Prvo predstavljajo vzorci iz Prekmurja, drugo vzorci iz Gorjancev. Prekmurski vzorci tvorijo gručo tudi z vzorci iz Avstrije in sodijo v tako imenovano Alpe-Adrijsko linijo. Druga genetska linija, zajema vzorce iz Gorjancev, Kočevskega roga, Kanalskega vrha, Ljubljanskega barja in Pohorja. Znotraj te gruče se od ostalih zaporedij očitno loči vzorec iz Pohorja, ki tvori lastno monofletsko linijo. Vsi ti vzorci so najbolj sorodni finski liniji virusa PUU, ki je tudi tipska linija.

Filogenetska analiza krajših nukleotidnih sekvenc (Slika 16) je dodatno potrdila dokaz dveh genetskih linij virusa PUU v Sloveniji. Potrdila je tudi odstopanje vzorca iz Pohorja, pri katerem je možno, da je nova genetska različica. Dendrogram, z monofletsko linijo, ki jo predstavlja vzorec iz Pohorja, je podprla statistična verjetnost 90%.



**Slika 15:** Dendrogram nukleotidnih zaporedij segmenta S virusa PUU dolžine 307 bp

**Obrazložitev:** poleg nukleotidnih zaporedij segmenta S virusa PUU, ki smo jih izolirali za namen diplomske naloge, smo v dendrogram vključili še nukleotidna zaporedja shranjena v genski banki:  
**SLOVENIJA:** Slovenia Cg1 (AJ888731), Slovenia Cg2 (AJ888732), Slovenia Cg3 (AJ888733), Balkan 1 (AJ314600), Balkan 2 (AJ314601); **AVSTRIJA:** Klippitzörl (AJ888751), Ernstbrunn (AJ888752); **FINSKA:** Sotkamo (X61035); **BELGIJA:** Belgium 13891 (U22423); **JV NEMČIJA:** Bavaria 9 (AY954722), Bavaria 39 (DQ016431), Bavaria 33 (DQ016430); **JAPONSKA:** Kamiiso (AB010730), Tobetsu (AB010731); **TIPSKE LINIJE:** PUU (Z46942), SEO (M34881), DOB (L41916), HTN (M14626).



**Slika 16:** Dendrogram nukleotidnih zaporedij segmenta S virusa PUU dolžine 160 bp

**Obrazložitev:** poleg nukleotidnih zaporedij segmenta S virusa PUU, ki smo jih izolirali za namen diplomske naloge, smo v dendrogram vključili še nukleotidna zaporedja shranjena v genski banki:  
**SLOVENIJA:** Slovenia Cg1 (AJ888731), Slovenia Cg2 (AJ888732), Slovenia Cg3 (AJ888733), Balkan 1 (AJ314600), Balkan 2 (AJ314601); **AVSTRIJA:** Klippitzörl (AJ888751), Ernstbrunn (AJ888752); **FINSKA:** Sotkamo (X61035); **BELGIJA:** Belgium 13891 (U22423); **JV NEMČIJA:** Bavaria 9 (AY954722), Bavaria 39 (DQ016431), Bavaria 33 (DQ016430); **JAPONSKA:** Kamiiso (AB010730), Tobetsu (AB010731); **TIPSKE LINIJE:** PUU (Z46942), SEO (M34881), DOB (L41916), HTN (M14626).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 UVOD

Hantaviruse delimo v dve veliki skupini, glede na zemljepisno razširjenost in glede na bolezen, ki jo povzročajo. Hantavirusi »starega sveta« so razširjeni po Evropi in Aziji ter povzročajo hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS) (Yanagihara in Gajdusek, 1987; Vapalahti in sod., 2003). Hantavirusi »novega sveta« so prisotni v S in J Ameriki in povzročajo hantavirusni pljučni sindrom (HPS) (Nichol in sod., 1993). Iz tega sklepamo, da so hantavirusi razširjeni po vsem svetu in so domnevno prisotni v človekovem okolju že stoletja. Razvijali so se skupaj s svojimi naravnimi gostitelji in se prilagajali spremembam v okolju (Plyusnin in Morzunov, 2001). Danes posledično zaznavamo med njimi veliko genetsko raznolikost.

V Sloveniji poznamo tri naravne gostitelje hantavirusov: rumenogrlo miš (*A. flavigollis*), dimasto miš (*A. agrarius*) in gozdno voluharico (*C. glareolus*). Prav zato, so v našem okolju tudi trije hantavirusi: DOB, SAA in PUU. Še celo več, vsi trije virusi soobstajajo na istih endemičnih območjih in povzročajo HMRS, ki se medsebojno razlikuje po kliničnem poteku bolezni (Avsic-Zupanc in sod., 1992; Avsic-Zupanc in sod., 2000; Avšič-Županc in Petrovec, 2003).

Virus PUU povzroča blago obliko HMRS, imenovano tudi »nephropathia epidemica« in ga najdemo v gozdnih voluharicah *C. glareolus*. Le ta je razširjena po vsej Sloveniji (Kryštufek, 1991), zato smo domnevali, da je v skladu s teorijo o koevoluciji virusa z naravnim gostiteljem (Plyusnin in Morzunov, 2001), pri nas mogoča genetska raznolikost virusa PUU.

### 5.2 ANALIZA REZULTATOV

Z diplomsko nalogo smo želeli potrditi rezultate pilotske raziskave, v kateri so dokazali obstoj dveh genetskih linij virusa PUU v Sloveniji. V pilotsko raziskavo so vključili 5 vzorcev gozdnih voluharic in vzorce 9 bolnikov iz endemičnih območij HMRS. Pri

diplomski nalogi smo število vzorcev povečali tako, da smo zajeli vsa endemična območja HMRS v Sloveniji in časovno pokrili obdobje zadnjih 14 let.

Virus PUU smo dokazali v 39 od 317 (12,3 %) testiranih gozdnih voluharicah. Vzorci so bili iz 6 lokacij po Sloveniji, ki smo jih ujeli v času od leta 1993 do leta 2006. Lokacije so bile razporejene po celi državi, saj smo tako pokrili vse predele, kjer živjo gozdne voluharice (razen alpske regije).

Zaradi velikega števila gozdnih voluharic (317 vzorcev), ki smo jih ujeli v zadnjih 14 letih, smo se morali odločiti za hitro, poceni in učinkovito metodo, s katero smo žeeli izločiti negativne vzorce iz nadaljnje obdelave. Izbrali smo metodo posredne imunofluorescence, s katero dokazujemo protitelesa proti virusu v serumu živali. Dokaz protiteles pri gozdnih voluharicah, v splošnem, velja za dokaz akutne okužbe (Escutenaire in sod., 2000; Escutenaire in sod., 2002; Olsson in sod., 2002). Protitelesa smo dokazali v 85 vzorcih, ki smo jih razdelili v dve skupini: tiste z močnim (40 vzorcev) in tiste s šibkim (18 vzorcev) protitelesnim odgovorom.

Pri obeh skupinah smo skušali virus tudi neposredno dokazati z metodo RT-PCR v realnem času. Virus smo dokazali v 42 vzorcih (29 v skupini z močnim, 4 v skupini s šibkim protitelesnim odgovorom in 9 v skupini, kjer serološkega testiranja, zaradi pomanjkanja serumata nismo opravili).

Pri naravnih gostiteljih protitelesa na virus nimajo nevtralizirajočega učinka, zato lahko dokažemo virus z neposredno metodo tudi po nastanku protiteles proti virusu (Bowen in sod., 1997; Meyer in Schmaljohn, 2000). Prav zato smo lahko primerjali rezultate dobljene z metodo posredne imunofluorescence in neposredno metodo RT-PCR v realnem času. Ugotovili smo, da se pri skupini z močnim protitelesnim odgovorom rezultat ujema v 73 %. Podoben odstotek ujemanja lahko zasledimo tudi pri drugih raziskovalcih (Escutenaire in sod., 2000; Escutenaire in sod., 2002), kar dokazuje, da protitelesa resnično nimajo nevtralizirajočega učinka na virus. Kljub temu popolnega ujemanja ni smiselno pričakovati, saj na obe metodi vpliva več dejavnikov, ki lahko povzročijo odstopanje. Pri metodi posredne imunofluorescence močno vpliva subjektivna ocena raziskovalca. To

podpira tudi rezultat skupine s šibkim protitelesnim odgovorom, saj je bilo tu ujemanje le 22 %. Pri šibki fluorescenci je razmejitev med pozitivnimi in negativnimi vzorci še težja, zato je nižji odstotek ujemanja pričakovani. Poleg tega je za razvoj protiteles potreben čas, zato nedavno okužbo lahko dokažemo le z neposredno metodo kot je RT-PCR v realnem času. Pri metodi RT-PCR v realnem času lahko dobimo lažno negativen rezultat zaradi prisotnosti inhibitorjev polimeraze, kar bi bil lahko še tretji vzrok za odstopanje med obema metodama.

Metoda RT-PCR v realnem času je primerna za pregledovanje večjega števila vzorcev, saj je hitra, občutljiva in specifična metoda, hkrati pa preprečuje možnost kontaminacije, saj nimamo opravka s pridelki PCR. Pridelek RT-PCR v realnem času je kratek (97 bp), zato ni primeren za sekveniranje in nadalnjo analizo nukleotidnega vzorca. Zato smo vseh 42 pozitivnih vzorcev pomožili še z metodo »nested« PCR. Rezultat smo potrdili v 92,9 % (39/42). Pri »nested« PCR uporabljamo dva para notranjih začetnih oligonukleotidov, kar poveča občutljivost in specifičnost metode. Pridelke PCR dokazujemo po poteku reakcije z gelsko elektroforezo, kar poveča možnost kontaminacije.

Pri 7 vzorcih izoliranih iz voluharic, ujetih leta 1993 na območju Kočevskega roga, smo imeli težave pri pomnoževanju z metodo »nested« PCR. Kljub pravilnosti poteka reakcije (to sta pokazali negativna in pozitivna kontrola), vzorci niso bili pozitivni. Težavo povezujemo z morebitnimi razlogi: 1) vzorci imajo spremenjeno nukleotidno zaporedje na mestu vezave začetnih oligonukleotidov in se ti zato ne vežejo na zaporedje, ali 2) v vzorcu tkiva ali RNA je inhibitor, ki deluje na encim Taq polimerazo, ki je pri metodi RT-PCR v realnem času in metodi »nested« PCR, različen. Preverili smo prvo možnost, zato smo metodo »nested« PCR ponovili z bolj specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (PPTF1/PPTR1). Virus PUU smo dodatno dokazali v 4 vzorcih. Specifična začetna oligonukleotida PPTF1 in PPTR1 se vežeta bližje skupaj, zato smo dobili zaporedja dolga 160 bp. Tem vzorcem smo določili nukleotidno zaporedje in jih filogenetsko analizirali z ostalimi vzorci. Ugotovili smo, da se v primerjanih 160 bp, vsa 4 zaporedja med seboj 100% ujemajo, prav tako so identična z drugimi zaporedji vzorcev z območja Kočevskega roga, Kanalskega vrha in Gorjancev. Tako sklepamo, da je verjetno pri teh 4 vzorcih zaporedje delno spremenjeno na mestu, kjer se veže eden ali oba začetna oligonukleotida

PPT376C/PPT716R. Kljub temu inhibicije, vsaj pri 3 vzorcih ne moremo popolnoma ovreči, saj kljub pričakovanju, nismo uspeli pomnožiti vseh vzorcev.

Nukleotidno zaporedje smo določili tudi 35 vzorcem pomnoženim z začetnima oligonukleotidoma PPT376C in PPT716R . Pri filogenetski analizi smo primerjali 307 bp dolga zaporedja segmenta S virusnega genoma. Dokazali smo dve genetski liniji virusa PUU izolirani iz naravnih gostiteljev v Sloveniji. Ena pokriva območje Prekmurja in tvori gručo z vzorci iz Avstrije (Plyusnina in sod., 2006), ki skupaj predstavljajo tako imenovano Alpe-Adrijsko genetsko linijo virusa PUU. Druga genetska linija se razteza čez veliko širše področje in zajema več lokacij: Gorjanci, Kočevski rog, Kanalski vrh in Ljubljansko barje. Ti rezultati so potrdili izsledke pilotne raziskave (Avsic-Zupanc in sod., 2007). Obe genetski liniji sta močno zastopani (39 vzorcev) in sta stalno prisotni že vsaj od leta 1993.

Vzorce iz posameznih genetskih linij smo med seboj primerjali in tudi izračunali razdalje s programom MegAlign ter odstotek ujemanja prikazali v preglednicah v prilogi C in E. Iz zbranih podatkov lahko zaključimo, da se znotraj genetske linije odstotek skladnosti giblje do 94 % do 100%. To nakazuje na manjše genetske mutacije, ki so posledica evolucije. Virus PUU je RNA virus s segmentiranim genomom, zato njegova raznolikost ne preseneča. Zanimivo pa je dejstvo, da je raznolikost tako zelo povezana z zemljepisnim območjem.

Poleg teh dveh genetskih linij, smo odkrili še tretjo genetsko različico virusa PUU na območju Pohorja. Žal, zaradi enega samega vzorca, rezultatov ne moremo potrditi. S filogenetsko analizo segmenta S genoma virusa PUU na podlagi 307 bp smo dokazali, da se ta vzorec razlikuje od vseh ostalih. Iz preglednice C je razvidno, da je skladnost 91,2 % na podlagi 307 bp dolgega nukleotidnega zaporedja. Zato uvršča vzorec iz Pohorja v samostojno monofletsko linijo, ki je pridružena gruči vzorcev iz Gorjancev. Toda na podlagi primerjav krajšega zaporedja (160 bp) tvori vzorec z območja Pohorja prav svojo genetsko linijo (slika 16). Vendar moramo povedati, da primerjava 160 bp dolgega nukleotidnega zaporedja ni zanesljiva, saj gre za prekratek del zaporedja segmenta S virusnega genoma. Nukleotidno zaporedje vzorca z območja Pohorja smo primerjali tudi z

zaporedjem virusa PUU, ki so ga izolirali iz vzorca bolnika iz Maribora (Avšič Županc in sod., 2007, nukleotidno zaporedje je shranjeno v genski banki pod številko: AJ888740). Na primerjanem delu sta se zaporedji 100% ujemali. Vsi omenjeni izsledki kažejo na morebitni obstoj tretje genetske različice virusa PUU v Sloveniji. Ta genetska različica se morda razteza preko Pohorja v Alpsko regijo. Za potrditev domneve, bi potrebovali večje število vzorcev izoliranih iz naravnih gostiteljev s tega območja.

### 5.3 SKLEPI

- Metoda posredne imunofluorescence je dober »izločitveni« kriterij, kadar imamo opravka z velikim številom vzorcev.
- Metoda RT-PCR v realnem času je idealna presejalna metoda za neposreden dokaz virusa, saj je visoko specifična in občutljiva ter, zaradi sočasnega pomnoževanja in dokazovanja, precej »varna« pred kontaminacijo.
- Virus PUU je genetsko variabilen virus, ki se spretno prilagaja naravnemu gostitelju, zato lahko opazimo več genetskih linij virusa, ki tvorijo zemljepisne gruče.
- V Sloveniji med naravnimi gostitelji krožita dve različni genetski liniji, ki sta zemljepisno ločeni. Prva je zastopana na območju Prekmurja in tvori t.i. Alpe-Adrijsko genetsko linijo. V drugo se združujejo vzoreci z območja Gorjancev, Kanalskega vrha, Kočevskega Roga in Ljubljanskega barja.
- Obe genetski liniji smo dokazali na na podlagi 39 vzorcev, ki so se redno pojavljali od leta 1993 pa vse do danes.
- Odkrili smo dodatno genetsko različico virusa PUU, ki jo predstavlja vzorec z območja Pohorja.

## 6 POVZETEK

Bolezen »nephropathia epidemica« je blažja oblika hemoragične mrzlice z renalnim sindromom (HMRS), ki je pogosta v Fenoskandinaviji. O njej so poročali švedski zdravniki že leta 1934 (Myhrman, 1934 cit. po Vapalahti in sod., 2003; Zetterholm, 1934, cit. po Vapalahti in sod., 2003), vendar je povzročitelj ostal neznan vse do leta 1980, ko so odkrili virus v gozdni voluharici (*Clethrionomys glareolus*), ki so jo ujeli v Puumali na Finskem (Brummer-Korvenkontio in sod., 1980).

Naravni gostitelj virusa PUU je gozdna voluharica *C. glareolus*. Virus se iz kronično okuženega naravnega gostitelja na človeka prenaša tako kot med naravnimi gostitelji, z vdihovanjem kužnih aerosolov, iz izločkov glodavcev. Večinoma prihaja do okužb takrat, ko je gostota populacije glodavcev visoka. V Sloveniji je gozdna voluharica razširjena po celinskem delu, od 80 m do 2000 m nadmorske višine. Po JZ pobočjih dinarskih planin se spušča do vznožja in prodira v sosednja submediteranska območja.

Virus PUU je zaradi velike genetske raznolikosti predmet številnih raziskav. Zato ne preseneča, da se osnovnim genetskim linijam pridružujejo vedno nove iz vse Evrope. Z raziskovalno nalogo smo želeli potrditi pilotsko raziskavo, ki je nakazala obstoj dveh genetskih linij virusa PUU v Sloveniji (Avsic-Zupanc in sod., 2007). V ta namen smo pri 317 gozdnih voluharicah, ujetih na endemičnih območjih hemoragične mrzlice z renalnim sindromom, z metodo posredne imunofluorescence ugotavliali protitelesa proti virusu PUU. Celokupno RNA smo izolirali iz ledvic in vranice 85 seroloških pozitivnih gozdnih voluharic. Virus PUU smo dokazali v 39 vzorcih (12,3 %) iz 6 lokacij. Tem vzorcem smo določili nukleotidno zaporedje in opravili filogenetske analize. Na večjem številu vzorcev smo tako potrdili dve genetski liniji virusa PUU v Sloveniji: eno na območju Prekmurja in drugo na območju Gorjancev in Kočevskega roga. Genetska linija iz območja Prekmurja sodi v t.i. Alpe-Adrijsko genetsko linijo virusa PUU skupaj z vzorci iz Avstrije in Balkana. Potrdili smo, da je virus PUU prisoten v našem okolju že dolgo časa, in da so novo odkrite genetske linije posledica povečanega raziskovanja na tem področju in ne hitrejše evolucije virusa.

## 7 VIRI

Aitichou M., Saleh S.S., McElroy A.K., Schmaljohn C., Ibrahim M.S. 2005. Identification of Dobrava, Hantaan, Seoul, and Puumala viruses by one-step real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods, 124: 21-26

Alexeyev O.A., Morozov V.G., Efremov A.G., Settergren B. 1994. A case of haemorrhagic fever with renal syndrome complicated by spleen haemorrhage. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 26: 491-492

Avsic-Zupanc T., Nemirov K., Petrovec M., Trilar T., Poljak M., Vaheri A., Plyusnin A. 2000. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. Journal of General Virology, 81: 1747-1755

Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Duh D., Plyusnina A., Lundkvist A., Plyusnin A. 2007. Puumala hantavirus in Slovenia: analyses of S and M segment sequences recovered from patients and rodents. Virus Research, 123: 204-210

Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Furlan P., Kaps R., Elgh F., Lundkvist A. 1999. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia--a 10-year survey. Clinical Infectious Diseases, 28: 860-865

Avsic-Zupanc T., Xiao S.Y., Stojanovic R., Gligic A., van der Groen G., LeDuc J.W. 1992. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. Journal of Medical Virology, 38: 132-137.

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

Avšič-Županc T., Petrovec M. 2003. Hemoragična mrzlica z reanlnim sindromom; biologija, epidemiologija in laboratorijska diagnostika. Medicinski razgledi, 42, S 1: 147-155

- Bernshtein A.D., Apekina N.S., Mikhailova T.V., Myasnikov Y.A., Khlyap L.A., Korotkov Y.S., Gavrilovskaya I.N. 1999. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). Archives of Virology, 144: 2415-2428
- Bowen M.D., Gelbmann W., Ksiazek T.G., Nichol S.T., Nowotny N. 1997. Puumala virus and two genetic variants of Tula virus are present in Austrian rodents. Journal of Medical Virology, 53: 174-181
- Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A., Hovi T., von Bonsdorff C.H., Vuorimies J., Manni T., Penttinen K., Oker-Blom N., Lahdevirta J. 1980. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. Journal of Infectious Diseases, 141: 131-134
- Casals J., Henderson B.E., Hoogstraal H., Johnson K.M., Shelokov A. 1970. A review of Soviet viral hemorrhagic fevers, 1969. Journal of Infectious Diseases, 122: 437-453
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 162: 156-159
- Chu Y.K., Jennings G.B., Schmaljohn C.S. 1995. A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. Journal of Virology, 69: 6417-6423
- Clement J., Heyman P., McKenna P., Colson P., Avsic-Zupanc T. 1997. The hantaviruses of Europe: from the bedside to the bench. Emerging Infectious Diseases, 3: 205-211
- Cockerill F.R., 3<sup>rd</sup>. 2003. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 127: 1112-1120
- Cvetko L., Markotic A., Plyusnina A., Margaretic J., Miletic-Medved M., Turk N., Milas Z., Avsic-Zupanc T., Plyusnin A. 2005. Puumala virus in Croatia in the 2002 HFRS outbreak. Journal of Medical Virology, 77: 290-294

Elliott R.M., Bouloy M., Calisher C.H., Goldbach R., Moyer J.T., Nichol S.T. Pettersson R., Plyusnin A., Schmaljohn C.S. 2000. *Bunyaviridae*. V: Virus taxonomy. 7<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carsten 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: 599-621

Eltari E., Nuti M., Hasko I., Gina A. 1987. Haemorrhagic fever with renal syndrome in a case in northern Albania. Lancet, 2: 1211-1211

Escutenaire S., Chalon P., De Jaegere F., Karelle-Bui L., Mees G., Brochier B., Rozenfeld F., Pastoret P.P. 2002. Behavioral, physiologic, and habitat influences on the dynamics of Puumala virus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). Emerging Infectious Diseases, 8: 930-936

Escutenaire S., Chalon P., Verhagen R., Heyman P., Thomas I., Karelle-Bui L., Avsic-Zupanc T., Lundkvist A., Plyusnin A., Pastoret P. 2000. Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. Virus Research, 67: 91-107

Essbauer S., Schmidt J., Conraths F.J., Friedrich R., Koch J., Hautmann W., Pfeffer M., Wolfel R., Finke J., Dobler G., Ulrich R. 2006. A new Puumala hantavirus subtype in rodents associated with an outbreak of Nephropathia epidemica in South-East Germany in 2004. Epidemiology and Infection, 134: 1333-1344

Gajdusek D.C. 1962. Virus hemorrhagic fevers. Special reference to hemorrhagic fever with renal syndrome (epidemic hemorrhagic fever). The Journal of Pediatrics, 60: 841-857

Gavrilovskaya I.N., Apekina N.S., Myasnikov Yu A., Bernshtein A.D., Ryltseva E.V., Gorbatchkova E.A., Chumakov M.P. 1983. Features of circulation of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus among small mammals in the European U.S.S.R. Archives of Virology, 75: 313-316

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

- Gligic A., Stojanovic R., Obradovic M., Hlaca D., Dimkovic N., Diglisic G., Lukac V., Ler Z., Bogdanovic R., Antonijevic B. 1992. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: epidemiologic and epizootiologic features of a nationwide outbreak in 1989. European Journal of Epidemiology, 8: 816-825
- Golovljova I., Sjolander K.B., Lindegren G., Vene S., Vasilenko V., Plyusnin A., Lundkvist A. 2002. Hantaviruses in Estonia. Journal of Medical Virology, 68: 589-598
- Hart C.A., Bennett M. 1999. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. Microbes and Infection, 1: 1229-1237
- Heiske A., Anheier B., Pilaski J., Volchkov V.E., Feldmann H. 1999. A new *Clethrionomys*-derived hantavirus from Germany: evidence for distinct genetic sublineages of Puumala viruses in Western Europe. Virus Research, 61: 101-112
- Henderson W.W., Monroe M.C., St Jeor S.C., Thayer W.P., Rowe J.E., Peters C.J., Nichol S.T. 1995. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. Virology, 214: 602-610
- Horling J., Chizhikov V., Lundkvist A., Jonsson M., Ivanov L., Dekonenko A., Niklasson B., Dzagurova T., Peters C.J., Tkachenko E., Nichol S. 1996. Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. Journal of General Virology, 77: 687-694
- Huggins J.W., Hsiang C.M., Cosgriff T.M., Guang M.Y., Smith J.I., Wu Z.O., LeDuc J.W., Zheng Z.M., Meegan J.M., Wang Q.N. 1991. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. Journal of Infectious Diseases, 164: 1119-1127
- Kallio E.R., Klingstrom J., Gustafsson E., Manni T., Vaheri A., Henttonen H., Vapalahti O., Lundkvist A. 2006. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. Journal of General Virology, 87: 2127-2134

- Kallio-Kokko H., Vapalahti O., Hedman K., Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A. 1993. Puumala virus antibody and immunoglobulin G avidity assays based on a recombinant nucleocapsid antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 677-680
- Kariwa H., Yoshizumi S., Arikawa J., Yoshimatsu K., Takahashi K., Takashima I., Hashimoto N. 1995. Evidence for the existence of Puumala-related virus among *Clethrionomys rufocanus* in Hokkaido, Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 222-227
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260
- Klingstrom J., Heyman P., Escutenaire S., Sjolander K.B., De Jaegere F., Henttonen H., Lundkvist A. 2002. Rodent host specificity of European hantaviruses: evidence of Puumala virus interspecific spillover. *Journal of Medical Virology*, 68: 581-588
- Kruger D.H., Ulrich R., Lundkvist A.A. 2001. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes and Infection*, 3: 1129-1144
- Kryštufek B. 1991. Sesalci Slovenije. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 153-159
- Lahdevirta J. 1982. Clinical features of HFRS in Scandinavia as compared with East Asia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36: 93-95
- Lee H.W., Lee P.W., Johnson K.M. 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 137: 298-308
- Lee H.W., Schmaljohn C., Calisher C.H. 1998. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Seoul, Asian Institute for Life Sciences: 13-25
- Lee H.W., van der Groen G. 1989. Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Progress in Medical Virology*, 36: 62-102

- Lee P.W., Gibbs C.J. Jr., Gajdusek D.C., Hsiang C.M., Hsiung GD. 1980. Identification of epidemic haemorrhagic fever with renal syndrome in China with Korean haemorrhagic fever. *Lancet*, 1: 1025-1026
- Lee P.W., Yanagihara R., Gibbs C.J. Jr., Gajdusek D.C. 1986. Pathogenesis of experimental Hantaan virus infection in laboratory rats. *Archives of Virology*, 88: 57-66
- Löfgren O. 1995. Spatial organisation of cyclic *Clethrionomys* females: occupancy of all available space at peak densities?. *Oikos*, 72: 29-35
- Löfgren O., Hörfeldt B., Eklund U. 1996. Effect of supplemental food on a cyclic *Clethrionomys glareolus* population at peak density. *Acta Theriologica*, 4: 383-394
- Lundkvist A., Hukic M., Horling J., Gilljam M., Nichol S., Niklasson B. 1997. Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. *Journal of Medical Virology*, 53: 51-59
- Lundkvist A., Niklasson B. 1994. Haemorrhagic fever with renal syndrome and other hantavirus infections. *Journal of Medical Virology*, 4: 177-184
- Lundkvist A., Wiger D., Horling J., Sjolander K.B., Plyusnina A., Mehl R., Vaheri A., Plyusnin A. 1998. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *The Journal of General Virology*, 79: 2603-2614
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30: 1292-1305
- Mackow E.R., Gavrilovskaya I.N. 2001. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 256: 91-115
- Manasia M., Olinic N., Zagreanu I., Serban A. 1977. Hemorrhagic fever with renal syndrome: report of 11 observations. *International Urology and Nephrology*, 9: 177-184

McCormick J.B., Sasso D.R., Palmer E.L., Kiley M.P. 1982. Morphological identification of the agent of Korean haemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the *Bunyaviridae*. *Lancet*, 1: 765-768

Mertz G.J., Hjelle B.L., Bryan R.T. 1997. Hantavirus infection. *Advances in Internal Medicine*, 42: 369-421

Meyer B.J., Schmaljohn C.S. 2000. Persistent hantavirus infections: characteristic and mechanisms. *Trends in Microbiology*, 8, 2: 61-67

Morzunov S.P., Rowe J.E., Ksiazek T.G., Peters C.J., St Jeor S.C., Nichol S.T. 1998. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. *Journal of Virology*, 72: 57-64

Musser G.G., Carleton M.D. 1993. Family *Muridae*. V: Mammal species of the world. Wilson D.E., Reader D.M. (eds.). New York, Smithsonian Institution Press: 501 -755

Mustonen J., Brummer-Korvenkontio M., Hedman K., Pasternack A., Pietila K., Vaheri A. 1994. Nephropathia epidemica in Finland: a retrospective study of 126 cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 26: 7-13

Myhrman G. 1934. *Nordisk medicin tidsskrift*, 7: 793. cit. po: Vapalahti O., Mustonen J., Lundkvist A., Henttonen H., Plyusnin A., Vaheri A. 2003. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 3: 653-661

Nemirov K., Henttonen H., Vaheri A., Plyusnin A. 2002. Phylogenetic evidence for host switching in the evolution of hantaviruses carried by *Apodemus* mice. *Virus Research*, 90: 207-215

Nemirov K., Vapalahti O., Lundkvist A., Vasilenko V., Golovljova I., Plyusnina A., Niemimaa J., Laakkonen J., Henttonen H., Vaheri A., Plyusnin A. 1999. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *The Journal of General Virology*, 80: 371-379

- 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
- Nichol S.T., Spiropoulou C.F., Morzunov S., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Feldmann H., Sanchez A., Childs J., Zaki S., Peters C.J. 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 262: 914-917
- Niesters H.G.M. 2001. Quantitation of viral load using real-time amplification technics. *Methods*, 25: 419-429
- Niklasson B., Hornfeldt B., Lundkvist A., BJORSTEN S., Leduc J. 1995. Temporal dynamics of Puumala virus antibody prevalence in voles and of nephropathia epidemica incidence in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 134-140
- Niklasson B., Kjelsson T. 1988. Detection of nephropathia epidemica (Puumala virus)-specific immunoglobulin M by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 1519-1523
- Nuutinen H., Vuoristo M., Farkkila M., Kahri A., Seppala K., Valtonen V., Joutsiniemi T., Miettinen T. 1992. Hemorrhagic gastropathy in epidemic nephropathy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 38: 476-480
- Olsson G.E., White N., Ahlm C., Elgh F., Verlemyr A.C., Juto P., Palo R.T. 2002. Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging Infectious Diseases*, 8: 924-929
- Papa A., Johnson A.M., Stockton P.C., Bowen M.D., Spiropoulou C.F., Alexiou-Daniel S., Ksiazek T.G., Nichol S.T., Antoniadis A. 1998. Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. *Journal of Medical Virology*, 55: 321-327
- Parrington M.A., Kang C.Y. 1990. Nucleotide sequence analysis of the S genomic segment of Prospect Hill virus: comparison with the prototype Hantavirus. *Virology*, 175: 167-175

- Parrington M.A., Lee P.W., Kang C.Y. 1991. Molecular characterization of the Prospect Hill virus M RNA segment: a comparison with the M RNA segments of other hantaviruses. *Journal of General Virology*, 72: 1845-1854
- Peters C.J., Simpson G.L., Levy H. 1999. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annual Review of Medicine*, 50: 531-45
- Plyusnin A. 2002. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Archives of Virology*, 147: 665-682
- Plyusnin A., Cheng Y., Lehvaslaiho H., Vaheri A. 1996a. Quasispecies in wild-type tula hantavirus populations. *Journal of Virology*, 70: 9060-9063
- Plyusnin A., Horling J., Kanerva M., Mustonen J., Cheng Y., Partanen J., Vapalahti O., Kukkonen S.K., Niemimaa J., Henttonen H., Niklasson B., Lundkvist A., Vaheri A. 1997. Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral sequences in local rodents. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 1090-1096
- Plyusnin A., Kruger D.H., Lundkvist A. 2001. Hantavirus infections in Europe. *Advances in Virus Research*, 57: 105-136
- Plyusnin A., Morzunov S.P. 2001. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 256: 47-75
- Plyusnin A., Vapalahti O., Lankinen H., Lehvaslaiho H., Apekina N., Myasnikov Y., Kallio-Kokko H., Henttonen H., Lundkvist A., Brummer-Korvenkontio M. 1994a. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *Journal of Virology*, 68: 7833-7839
- Plyusnin A., Vapalahti O., Lehvaslaiho H., Apekina N., Mikhailova T., Gavrilovskaya I., Laakkonen J., Niemimaa J., Henttonen H., Brummer-Korvenkontio M. 1995. Genetic variation of wild Puumala viruses within the serotype, local rodent populations and individual animal. *Virus Research*, 38: 25-41

- Plyusnin A., Vapalahti O., Lundkvist A., Henttonen H., Vaheri A. 1996b. Newly recognised hantavirus in *Siberian lemmings*. Lancet, 347: 1835
- Plyusnin A., Vapalahti O., Ulfves K., Lehvaslaiho H., Apekina N., Gavrilovskaya I., Blinov V., Vaheri A. 1994b. Sequences of wild Puumala virus genes show a correlation of genetic variation with geographic origin of the strains. Journal of General Virology, 75: 405-409
- Plyusnina A., Aberle S.W., Aberle J.H., Plyusnin A. 2006. Genetic analysis of Puumala hantavirus strains from Austria. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 38: 512-519.
- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. Medicinski razgledi, 33: 379-400
- Radosevic Z., Mohacek I. 1954. The problem of nephropathia epidemica Myhrman-Zetterholm in relation to acute interstitial nephritis. Acta Medica Scandinavica, 149: 221-228
- Raftery M.J., Kraus A.A., Ulrich R., Kruger D.H., Schonrich G. 2002. Hantavirus infection of dendritic cells. Journal of Virology, 76: 10724-10733
- Rollin P.E., Coudrier D., Sureau P. 1994. Hantavirus epidemic in Europe, 1993. Lancet, 343: 115-116
- 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: 5463-5467
- Schmaljohn C., Hjelle B. 1997. Hantaviruses: a global disease problem. Emerging Infectious Diseases, 3: 95-104
- Schmaljohn C.S. 1996. Molecular biology of hantaviruses. V: *Bunyaviridae*. Elliott R.M. (ed.). New York, Plenum Press: 63-90
- Schmaljohn C.S., Hasty S.E., Dalrymple J.M., LeDuc J.W., Lee H.W., von Bonsdorff C.H., Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A., Tsai T.F., Regnery H.L. 1985. Antigenic and

genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science*, 227: 1041-1044

Schmaljohn C.S., Hasty S.E., Harrison S.A., Dalrymple J.M. 1983. Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 148: 1005-1012

Settergren B., Leschinskaya E., Zagidullin I., Fazlyeva R., Khunafina D., Niklasson B. 1991. Hemorrhagic fever with renal syndrome: comparison of clinical course in Sweden and in the Western Soviet Union. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 23: 549-552

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

Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. 2001. Molecular evolution of Puumala hantavirus. *Journal of Virology*, 75: 11803-11810

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: 1062-1067

Temonen M., Mustonen J., Helin H., Pasternack A., Vaheri A., Holthofer H. 1996. Cytokines, adhesion molecules, and cellular infiltration in nephropathia epidemica kidneys: an immunohistochemical study. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 78: 47-55

Tsai T.F. 1987. Hemorrhagic fever with renal syndrome: mode of transmission to humans. *Laboratory Animal Science*, 37: 428-430

Vapalahti O., Lundkvist A., Fedorov V., Conroy C.J., Hirvonen S., Plyusnina A., Nemirov K., Fredga K., Cook J.A., Niemimaa J., Kaikusalo A., Henttonen H., Vaheri A., Plyusnin A. 1999. Isolation and characterization of a hantavirus from *Lemmus sibiricus*: evidence for host switch during hantavirus evolution. *Journal of Virology*, 73: 5586-5592

Vapalahti O., Mustonen J., Lundkvist A., Henttonen H., Plyusnin A., Vaheri A. 2003. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 3: 653-661

- Vasilenko V.A., Gavrilovskaia I.N., Apekina N.S., Rezapkin G.V., Tkachenko E.A. 1987. Detection of foci of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Estonian SSR. *Voprosy Virusologii*, 32: 464-467
- Voet D., Voet J.G. 1995. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 882-896
- Wilhelm J., Pingoud A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*, 4: 1120-1128
- Xu Z.Y., Tang Y.W., Kan L.Y., Tsai T.F. 1987. Cats--source of protection or infection? A case-control study of hemorrhagic fever with renal syndrome. *American Journal of Epidemiology*, 126: 942-948
- Yanagihara R., Amyx H.L., Gajdusek D.C. 1985. Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Journal of Virology*, 55: 34-38
- Yanagihara R., Gajdusek D.C. 1987. Hemorrhagic fever with renal syndrome: global epidemiology and ecology of hantavirus infections. V: *Medical virology*. 6<sup>th</sup> ed. de la Maza L.M., Peterson E.M. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 171-214
- Zeier M., Handermann M., Bahr U., Rensch B., Muller S., Kehm R., Muranyi W., Darai G. 2005. New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention--a review. *Virus Genes*, 30: 157-180
- Zetterholm S.G. 1934. *Lakartidningen*, 31: 425-. cit. po: Vapalahti O., Mustonen J., Lundkvist A., Henttonen H., Plyusnin A., Vaheri A. 2003. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 3: 653-661

## ZAHVALA

Zahvalo za pomoč pri izdelavi diplomske naloge dolgujem mnogim.

Najprej bi se rada zahvalila svoji mentorici prof. dr. Tatjani Avšič Županc, ker mi je omogočila delo v svojem laboratoriju in izdelavo diplomske naloge na področju, ki me še posebej veseli.

Zahvalila bi se rada tudi somentorici dr. Darji Duh za vzor, nasvete, pomoč in ideje tako ob praktičnem delu kot tudi pisanju diplomske naloge.

K nastajanju diplomske naloge so veliko pripomogle tudi Ana Saksida, Nataša Knap, Katja Strašek Smrdel in Emina Durmiši, ki so mi pomagale, ko je šlo kaj narobe in se z mano veselile pozitivnih rezultatov. Zagotovo bi bilo brez njih in njihovih nasvetov, delo težje.

Prav posebej bi se rada zahvalila Mateji Jelovšek za njen topel sprejem ob prihodu v Laboratorij za diagnostiko zoonoz in WHO laboratorij ter za pomoč pri mojih prvih laboratorijskih korakih. Prav njena sproščenost in potrežljivost sta mi pomagali preseči začetno nerodnost in tremo ter uživati ob delu, ki sem ga opravljal.

Nazadnje bi se rada zahvalila še moji družini, ki mi ne le ob diplomi, ampak že celo življenje stoji ob strani, verjame vame in v moje sanje.

Najlepša hvala vsem!

## PRILOGE

### Priloga A: Seznam vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času

LETO	OZNAKA VZORCA	LOKACIJA	HTN	PUU	DOB	ŠT. RNA	REAL TIME PCR
2006	TT 23/06	Begunje, Brezje, Velika dolina	++	++	+/-	8911	3932 pozit.
	TT 49/06	Dolenja vas, nad Veliko Kralovico	++	+++	+	8912	3933 pozit.
2005	TT 02/05	Pohoje, Lovrenc	+++	+++	+++	8913	3934 pozit.
2002	TT 65/02	Vareja, Polanc	-	+	-	6713	3942 neg
	TT 46/02	Pobrežje, Spodnji Šturmovci	+/-	+/-	-	6326	3943 neg
1999	TT 06/99	Goričica pod Krimom	-	+/-	-	9069	4448 neg
	TT 24/99	Dolenci, Benkova šuma	-	+	-	8914	3935 neg
	TT 41/99	Otovci, peskovski potok	+/-	+/-	+	7086	3944 neg
	TT 50/99	Šalovci, Mrzla dolina	+	++	+	8915	3936 pozit.
	TT 52/99	Šalovci, Mrzla dolina	+	+	+/-	8916	3937 neg
	TT 66/99	Šalovci, Mrzla dolina	+	+	+	8917	3938 pozit.
	TT 67/99	Šalovci, Mrzla dolina	-	+	+/-	8918	3939 pozit.
	TT 70/99	Šalovci, Mrzla dolina	+	++	+	6323	3945 pozit.
	TT 77/99	Domanjčevci, Novi vrh	+	+	+	8926	3940 neg
	TT 110/99	Hodoš	+	++	+	8935	3991 pozit.
	TT 114/99	Hodoš	-	+	-	8927	3941 neg
	TT 120/99	Hodoš	+	+	+	8928	3946 neg
	TT 74/98	Černalevci, Pušča	-	+/-	-	8929	3947 neg
	TT 75/98	Černalevci, Pušča	-	+	-	8930	3948 pozit.
1998	TT 78/98	Černalevci, Pušča	+/-	+/-	+/-	8931	3949 neg
	TT 79/98	Černalevci, Pušča	+	+	+	6319	3950 neg
	TT 80/98	Černalevci, Pušča	-	+	-	8932	3951 pozit.
	TT 82/98	Krog, ob reki Muri	+	+	+	6320	3952 pozit.
	TT 86/97	Obrež	-	+	-	8933	3953 neg
	TT 117/97	Obrež	-	+	-	8934	3992 neg
1997	TT 130/97	Sora, Rakovnik	-	+/-	+/-	6256	3993 neg
	TT 134/97	Sora, Rakovnik	-	+/-	+/-	6257	3994 neg
	TT 65/96	Žički, Dolnji kraj	-	+	-	8936*	3995 pozit.
	TT 68/96	Žički, Dolnji kraj	-	+	-	8937	3996 pozit.
1996	TT 78/96	Ižakovci	+/-	+	-	8938*	3997 pozit.
	TT 81/96	Ižakovci	+	+	+	8939	3998 pozit.
	TT 33/95	Gorjanci	+	+	-*	8940	3999 pozit.
	TT 37/95	Gorjanci	-*	+	-	8941	4000 pozit.
1995	TT 46/95	Gorjanci	-	+	-	8942	4001 neg
	TT 117/95	Cerov log	+/-	+	-*	8943	4002 pozit.
	TT 118/95	Cerov log	-*	+	-	8944	4003 pozit.
	TT 119/95	Cerov log	+/-	+	-	8962	4004 pozit.
	TT 120/95	Cerov log	-*	+*	-	8963	4005 pozit.
	TT 126/95	Cerov log	+/-	-*	+/-	8964	4006 pozit.
	TT 134/95	Cerov log	-*	-*	-*	8965	4007 neg
	TT 146/95	Gorenje Vrhpolje	-*	+++	-*	8966	4008 pozit.
	TT 147/95	Gorenje Vrhpolje	-*	+	+/-	8967	4009 pozit.
	TT 152/95	Gorenje Vrhpolje	+	+	+	8968	4010 pozit.
	TT 269/95	Kozje, Bistri graben	+/-	+/-	+/-	8969	4011 neg
	TT 277/95	Kozje, Bistri graben	-	+/-	+/-	8970	4012 neg

se nadaljuje

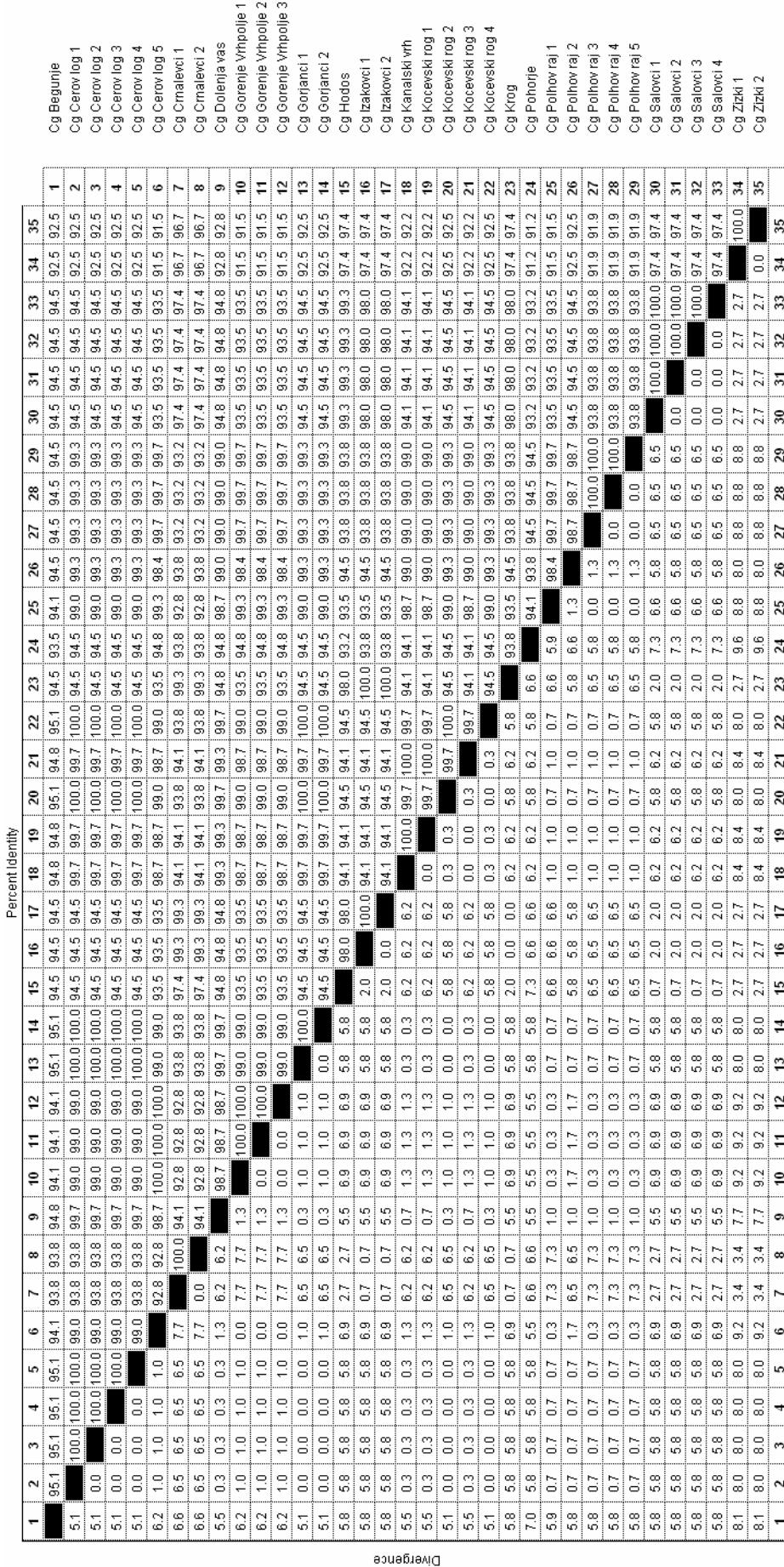
**Priloga A:** Seznam vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času

nadaljevanje

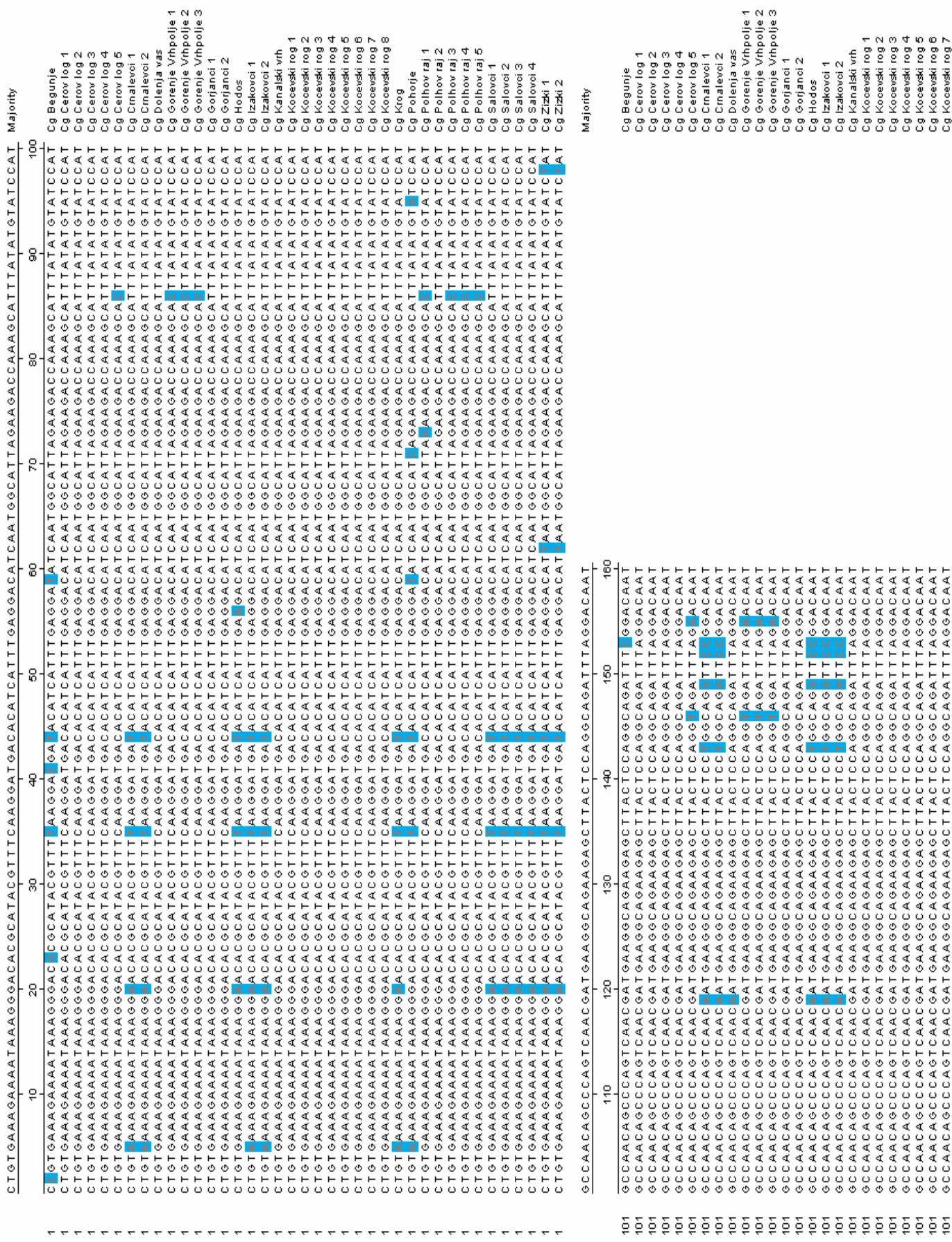
LETO	OZNAKA VZORCA	LOKACIJA	HTN	PUU	DOB	ŠT. RNA	REAL TIME PCR
1995	TT 326/95	Podsreda, Socko	+*	+*	+*	8971	4013 neg
	TT 355/95	Podbočje, Levak	+/-	+/-	-	8972	4014 neg
	<b>TT 360/95</b>	<b>Gorjanci, polhov raj</b>	+	+	+	<b>8973</b>	<b>4015 pozit.</b>
	<b>TT 361/95</b>	<b>Gorjanci, polhov raj</b>	+	+	+	<b>8974</b>	<b>4016 pozit.</b>
	<b>TT 362/95</b>	<b>Gorjanci, polhov raj</b>	+	+	+/-	<b>8975</b>	<b>4017 pozit.</b>
	<b>TT 365/95</b>	<b>Gorjanci, polhov raj</b>	+/-	+	+/-	<b>8976</b>	<b>4018 pozit.</b>
	<b>TT 366/95</b>	<b>Gorjanci, polhov raj</b>	+	+	+	<b>8977</b>	<b>4019 pozit.</b>
	TT 371/95	Gorjanci, Ravna gora	+	-*	-*	8978	4020 neg
	TT 415/95	Zgornje Pirniče, Zavrh	-	+*	-	8979*	4021 neg
1993	BK 10/5-93	Kočevski rog	+	+	-	262, 327, 333	4405, 4468, 4469 neg
	<b>BK 11/5-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	+	+	-	<b>9075</b>	<b>4470 pozit.</b>
	<b>BK 5/4-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	ni seruma			<b>9071</b>	<b>4450 pozit.</b>
	<b>BK 6/4-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	ni seruma			<b>9070</b>	<b>4449 pozit.</b>
	BK 7/4-93	Kočevski rog	ni seruma			270, 330, 366	4407, 4471, 4472 neg
	BK 8/4-93	Kočevski rog	ni seruma			271	4408 neg
	BK 9/4-93	Kočevski rog	ni seruma			272	4409 neg
	BK 10/4-93	Kočevski rog	ni seruma			273	4410 neg
	BK 11/4-93	Kočevski rog	ni seruma			274	4411 neg
	<b>BK 12/4-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	ni seruma			<b>275</b>	<b>4412 pozit.</b>
	BK 13/4-93	Kočevski rog	ni seruma			276	4413 neg
	BK 14/4-93	Kočevski rog	ni seruma			279	4414 neg
	<b>BK 4/6-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	+	+/-	-	<b>9076</b>	<b>4473 pozit.</b>
	BK 9/6-93	Kočevski rog	ni seruma			9084	4501 neg
	BK 10/6-93	Kočevski rog	ni seruma			9085	4502 neg
	<b>BK 13/6-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	+	+/-	-	<b>9077</b>	<b>4474 pozit.</b>
	<b>BK 18/6-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	ni seruma			<b>9086</b>	<b>4503 pozit.</b>
	<b>BK 19/6-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	ni seruma			<b>368</b>	<b>4420 pozit.</b>
	<b>BK 20/6-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	ni seruma			<b>369</b>	<b>4451 pozit.</b>
	BK 24/6-93	Kočevski rog	ni seruma			373	4452 neg
	BK 25/6-93	Kočevski rog	ni seruma			374	4453 neg
	BK 29/6-93	Kočevski rog	ni seruma			377	4454 neg
	<b>BK 41/6-93</b>	<b>Kanalski vrh</b>	ni seruma			<b>388</b>	<b>4455 pozit.</b>
	<b>BK 42/6-93</b>	<b>Kanalski vrh</b>	ni seruma			<b>9087</b>	<b>4504 pozit.</b>
	BK 9/8-93	Kočevski rog	ni seruma			466	4457 neg
	BK 10/8-93	Kočevski rog	ni seruma			437	4458 neg
	<b>BK 11/8-93</b>	<b>Kočevski rog</b>	+/-	-	-	<b>9088</b>	<b>4505 pozit.</b>
	BK 13/8-93	Kočevski rog	ni seruma			446	4460 neg
	BK 15/8-93	Kočevski rog	ni seruma			459	4461 neg
	BK 17/8-93	Kočevski rog	+/-	-	-	9089	4506 neg
	BK 19/8-93	Kočevski rog	ni seruma			435	4463 neg

## **Priloga B:** Poravnava nukleotidnih zaporedij dolžine 307 bp

### **Priloga C:** Preglednica izračunanih razdalj med zaporedji, ki so dolga 307 bp



**Priloga D:** Poravnavo nukleotidnih zaporedij dolžine 160 bp



**Priloga E:** Preglednica izračunanih razdalj med zaporedji, ki so dolga 160 bp