

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nina JAKOPIN

**UGOTAVLJANJE VIRUSNEGA BREMENA IN  
GENETSKE RAZNOLIKOSTI VIRUSA KLOPNEGA  
MENINGOENCEFALITISA V KLINIČNIH VZORCIH  
BOLNIKOV**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nina JAKOPIN

**UGOTAVLJANJE VIRUSNEGA BREMENA IN GENETSKE  
RAZNOLIKOSTI VIRUSA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA  
V KLINIČNIH VZORCIH BOLNIKOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**DETERMINATION OF VIRAL LOAD AND GENETIC VARIABILITY  
OF TICK BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN CLINICAL SAMPLES**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Mikrobiologija. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in laboratoriju WHO na Inštitutu za Mikrobiologijo in Imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Avšič Županc, za somentorico razisk. asist. dr. Ana Saksida, in za recenzenta prof. dr. Maria Poljaka.

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

Somentorica: razisk. asist. dr. Ana Saksida, univ. dipl. mikr.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC, univ. dipl. biol.

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

Članica: razisk. asist. dr. Ana SAKSIDA, univ. dipl. mikr.

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

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

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

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nina Jakopin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2  
 DK UDK 578.7:578.833.2:616.831.9–002(043)=163.6  
 KG virusi/ flavivirusi/ virus klopnega meningoencefalitisa/ klopni meningoencefalitis/ klinični vzorci/ molekularne metode/ qRT-PCR v realnem času/ nukleotidna zaporedja/ sekveniranje/ filogenetska analiza/ genetska raznolikost/ virusno breme  
 AV JAKOPIN, Nina, dipl. mikrobiol. (UN)  
 SA AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentorica) / SAKSIDA, Ana (somentorica) / POLJAK, Mario (recenzent)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije  
 LI 2015  
 IN UGOTAVLJANJE VIRUSNEGA BREMENA IN GENETSKE RAZNOLIKOSTI VIRUSA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA V KLINIČNIH VZORCIH BOLNIKOV  
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)  
 OP XI, 57 str., 2 pregl., 12 sl., 74 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI Virus klopnega meningoencefalitisa (KMEV) je predstavnik rodu *Flavivirus*, ki pri ljudeh povzroča okužbo osrednjega živčevja. V Sloveniji krožijo sevi virusa KME, evropskega podtipa, ki jih prenašajo klopi vrste *Ixodes ricinus*. Z našo raziskavo smo žeeli potrditi, da so molekularne metode smiselne za dokazovanje okužbe s KMEV v zgodnji fazi bolezni, pridobiti podatke o višini virusnega bremena ter dokazati obstoj genetskih različic virusa KME. V raziskavo smo vključili 145 vzorcev telesnih tekočin (serum, plazma) bolnikov, ki so bili odvzeti v prvi fazi bolezni ali na meji z drugo fazo bolezni. Z metodo qRT-PCR v realnem času smo pomnožili virusno RNK in določili virusno breme v 80,9 % vzorcih, ki so bili odvzeti v prvi fazi bolezni in v 22,9 % vzorcih, ki so bili odvzeti na meji z drugo fazo bolezni. Ugotovili smo, da je višina virusnega bremena približno enaka v vzorcih, ki so bili odvzeti v prvi ali na meji z drugo fazo bolezni ( $p=0,1952$ ). Tudi glede na starost bolnikov, se virusno breme ni značilno razlikovalo ( $p=0,4884$ ). Neposredno iz kliničnih vzorcev 60 bolnikov smo z metodo RT-PCR pomnožili del virusnega genoma za beljakovino E (1272 bp). S filogenetsko analizo smo dokazali obstoj šestih genetskih različic virusa KME, ki so značilne za določena zemljepisna območja, med njimi eno novo filogenetsko linijo (S6), ki je najbolj sorodna hrvaškemu izolatu virusa KME - St.Ves. Ugotovili smo, da med seboj sorodni virusi, ki pripadajo določeni filogenetski skupini, v telesnih tekočinah bolnikov ne dosegajo višjega oz. nižjega virusnega bremena ( $p=0,3182$ ).

### KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2  
DC UDC 578.7:578.833.2:616.831.9–002(043)=163.6  
CX viruses/ flaviviruses/ tick-borne encephalitis virus/ tick-borne encephalitis/ clinical samples/ molecular methods/ real-time qRT-PCR/ nucleotide sequences/ sequencing/ phylogenetic analysis/ genetic diversity/ viral load  
AU JAKOPIN, Nina, dipl. mikrobiol. (UN)  
AA AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor) / SAKSIDA, Ana (co-advisor) / POLJAK, Mario (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology  
PY 2015  
TI DETERMINATION OF VIRAL LOAD AND GENETIC VARIABILITY OF TICK BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN CLINICAL SAMPLES  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes Field Microbiology)  
NO XI, 57 p., 2 tab., 12 fig., 74 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Tick-borne encephalitis virus (TBEV), member of the genus *Flavivirus*, is a causative agent of infection of the central nervous system. The European subtype of TBEV is circulating in Slovenia, and is transmitted by ticks *Ixodes ricinus*. The aim of our study was to confirm that molecular methods are useful for the diagnosis of TBEV infection at an early stage of the disease, to obtain data on the viral load concentration, and to prove the existence of different genetic variants of TBEV in Slovenia. In our study, 145 clinical samples (serum, plasma) of patients with TBE were included. Samples were collected in the first phase of the disease or on the border with the second stage of the disease. With real-time qRT-PCR, we amplified viral RNA and determined the viral load in 80.9 % of clinical samples which were collected in the first phase of the disease, and in 22.9 % clinical samples which were taken on the border with the second stage of the disease. We found that the viral load is approximately the same in the samples, which were collected in the first or on the border with the second stage of the disease ( $p=0.1952$ ). Also, depending on the age of patients, the viral load was not significantly different ( $p=0.4884$ ). We amplified 1272 bp long segment of the E protein gene directly from 60 patient samples. With phylogenetic analysis of E protein gene nucleotide sequences, we demonstrated the existence of six genetic variants of the virus TBE that are specific to particular geographical areas, including a new phylogenetic lineage (S6), which is most closely related to Croatian virus isolate KME - St.Ves. We have found that viruses most similar to each other, belonging to a certain phylogenetic group, do not reach significantly higher or lower concentrations of viral load in body fluids of patients ( $p=0.3182$ ).

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORD DOCUMENTATION (KWD) .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA (CILJI, HIPOTEZE).....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 VIRUS KME .....	3
<b>2.1.1 Zgradba virusa.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Virusni genom.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3 Virusne beljakovine.....</b>	<b>4</b>
2.1.3.1 Strukturne beljakovine.....	5
2.1.3.2 Nestruktурne beljakovine.....	5
<b>2.1.4 Razmnoževanje virusa .....</b>	<b>6</b>
2.2 TAKSONOMIJA VIRUSA KME.....	7
<b>2.2.1 Podtipi virusa KME .....</b>	<b>10</b>
2.2.1.1 Genetska raznolikost podtipov virusa KME.....	10
2.3 KROŽENJE VIRUSA V NARAVI .....	11
2.4 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽBE Z VIRUSOM KME .....	13
<b>2.4.1 Naravna žarišča .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.2 Razširjenost KME v svetu .....</b>	<b>13</b>

<b>2.4.3 Razširjenost KME v Sloveniji .....</b>	<b>15</b>
2.5 PATOGENEZA VIRUSNE OKUŽBE .....	16
2.6 KLINIČNA SLIKA.....	17
2.7 DIAGNOSTIKA .....	18
<b>2.7.1 Posredno dokazovanje virusa .....</b>	<b>19</b>
<b>2.7.2 Neposredno dokazovanje virusa .....</b>	<b>20</b>
2.8 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE .....	21
 <b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>23</b>
3.1 MATERIALI .....	23
3.2 METODE .....	23
<b>3.2.1 Izolacija celokupne RNK .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2 Kvantitativni RT-PCR v realnem času za določanje virusnega bremena KMEV.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.3 Pomnoževanje dela genoma virusa KME z metodo RT-PCR .....</b>	<b>26</b>
3.2.3.1 Pomnoževanje tarčnega dela genoma za zapis beljakovine NS5 virusa KME	26
3.2.3.2 Pomnoževanje tarčnega dela genoma za zapis beljakovine E virusa KME ....	27
<b>3.2.4 Elektroforeza pridelkov RT-PCR v agaroznem gelu .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.5 Čiščenje pridelkov PCR .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.7 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.8 Analiza nukleotidnih zaporedij .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.9 Statistična analiza .....</b>	<b>33</b>
 <b>4 REZULTATI.....</b>	<b>34</b>
4.1 DOKAZ GENOMA VIRUSA KME IN DOLOČITEV VIRUSNEGA BREMENA Z METODO qRT-PCR V REALNEM ČASU V VZORCIH BOLNIKOV .....	34
<b>4.1.1 Virusno breme glede na prisotnost protiteles v kliničnih vzorcih bolnikov s KME .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2 Virusno breme glede na starost bolnikov s KME.....</b>	<b>35</b>

4.2 NUKLEOTIDNE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE E VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV BOLNIKOV S KME .....	36
4.2.1 Filogenetska analiza tarčnega odseka beljakovine E .....	36
4.2.2 Povezava filogenetske analize in zemljepisnega porekla vzorcev .....	38
4.2.3 Virusno breme glede na filogenetsko skupino virusov.....	39
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>40</b>
5.1 DOKAZ VIRUSA KME V KLINIČNIH VZORCIH BOLNIKOV S KME..	41
5.2 DOLOČITEV VIRUSNEGA BREMENA IN PRIMERJAVA GLEDE NA PRISOTNOST PROTITELES V KLINIČNIH VZORCIH BOLNIKOV S KME IN STAROST BOLNIKOV S KME .....	42
5.3 GENETSKA RAZNOLIKOST VIRUSA KME IN PRIMERJAVA FILOGENETSKIH SKUPIN GLEDE NA VIRUSNO BREME.....	44
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>46</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>47</b>
<b>8 VIRI .....</b>	<b>49</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## **KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Klopno prenosljivi flavivirusi (Dobler, 2010: 224)..... 9

Preglednica 2: Rezultati qRT-PCR v realnem času – dokaz virusne RNK v vzorcih  
bolnikov, kjer protitelesa so oz. niso bila prisotna ..... 34

## KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba nezrelega in zrelega viriona virusa KME (Lindenbach in sod., 2007: 1105).....	3
Slika 2: Organizacija genoma virusa KME (Avšič-Županc in Saksida, 2011: 160) .....	4
Slika 3: Življenjski cikel virusa KME (Avšič-Županc in Saksida, 2011: 161) .....	7
Slika 4: Kroženje virusa KME v naravi (povzeto po Lindquist in Vapalahti, 2008: 1867; Malovrh in Marc, 1997: 467) .....	12
Slika 5: Razširjenost virusa KME in njegovih prenašalcev (Lindquist in Vapalahti, 2008: 1862).....	15
Slika 6: Povprečna letna incidenca KME po regijah v Sloveniji od leta 2000 do leta 2009 (Grgič-Vitek in Klavs, 2011: 5179).....	16
Slika 7: Diagnostika KME pri dvofaznem poteku bolezni (Holzmann, 2003: 37) .....	20
Slika 8: Primerjava porazdelitev virusnega bremena, glede na prisotnost protiteles v kliničnih vzorcih bolnikov s KME .....	35
Slika 9: Porazdelitev virusnega bremena, glede na starost bolnikov s KME .....	36
Slika 10: Filogenetsko drevo tarčnega odseka beljakovine E (1272 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopovalcev in bolnikov .....	37
Slika 11: Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov .....	38
Slika 12: Porazdelitev virusnega bremena pri bolnikih s KME, glede na filogenetske skupine virusov.....	39

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Filogenetsko drevo tarčnega odseka beljakovine E (1272 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopovalcev in bolnikov

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
cDNK	komplementarna DNK
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimsko imunski test
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
IgG	imunoglobulin razreda G
IgM	imunoglobulin razreda M
KME	klopni meningoencefalitis
KMEV	virus klopnega meningoencefalitisa
KME - Fe	daljnovzhodni podtip virusa klopnega meningoencefalitisa
KME - Eu	evropski podtip virusa klopnega meningoencefalitisa
KME - Sib	sibirski podtip virusa klopnega meningoencefalitisa
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RNK	ribonukleinska kislina
mRNK	sporočilna ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo

## 1 UVOD

Virus klopnega meningoencefalitisa (virus KME, KMEV) je predstavnik rodu *Flavivirus* in ga uvrščamo v družino Flaviviridae. Pri človeku lahko virus povzroči klopní meningoencefalitis - bolezen, ki prizadene predvsem osrednji živčni sistem.

KMEV se v naravi prenaša med prenašalci (klopi), njihovimi gostitelji (mali gozdni sesalci, divjad, domače živali) in naključnimi gostitelji (človek). Glede na serološke in genetske značilnosti ločimo tri podtipe virusa KME: daljnovezhodni, sibirski in evropski tip. Klop *Ixodes ricinus* je prenašalec sevov virusa KME, evropskega podtipa (Dobler in sod., 2012; Mansfield in sod., 2009).

KMEV najdemo le na zemljepisno omejenih področjih, ki jih imenujemo žarišča. V Sloveniji je prisotnih več genetskih različic virusa KME, ki se združujejo v zemljepisno ločene monofiletske skupine. Med prenašalci oziroma gostitelji istega zemljepisnega področja prevladuje enaka genetska različica virusa KME (Fajs in sod., 2012).

Človek se z virusom najpogosteje okuži z vbodom okuženega klopa. Redki so primeri okužb z zaužitjem surovega mleka in mlečnih izdelkov okuženih živali. Večina okužb s KMEV poteka brez simptomov. Pri vsaj dveh tretjinah bolnikov, ki kažejo prizadetost osrednjega živčnega sistema, je potek bolezni dvofazen. Za prvo, viremično fazo bolezni, so značilni nespecifični, gripi podobni znaki. Sledi prosto obdobje brez simptomov. Pri 20 do 30 % obolelih bolezen napreduje v drugo, akutno fazo bolezni z znaki meningitisa, meningoencefalitisa ali meningoencefalomielitisa (vdor virusa v osrednje živčevje) (Lindquist in Vapalahti, 2008; Bogovič in sod., 2010).

Za hitro diagnostiko KME so najprimernejše serološke metode, ki temeljijo na dokazovanju specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumu in likvorju bolnikov (npr. encimsko imunska metoda, imunofluorescenčna metoda). Vendar protiteles v prvi fazi bolezni ne moremo dokazati, lahko pa okužbo potrdimo z neposrednim dokazom virusne RNK v vzorcih bolnika (kri, serum) z molekularnimi metodami (npr. z verižno reakcijo s polimerazo z reverzno transkriptazo v realnem času) (Lindquist in Vapalahti, 2008; Saksida in sod., 2005; Schwaiger in Cassinotti, 2003).

## 1.1 NAMEN DELA (CILJI, HIPOTEZE)

Uporaba molekularnih metod je v rutinski diagnostiki okužb s KMEV omejena, zaradi kratkega trajanja obdobja viremije. Večina bolnikov namreč obiše zdravnika v drugi fazi bolezni, ko se pojavijo nevrološki zapleti in virusa v krvi ni več. Zato so raziskave, ki vključujejo neposredno dokazovanje virusa KME v kliničnih vzorcih izredno redke, podatkov o virusnem bremenu pri bolnikih s KME pa v literaturi še ni zaslediti. Podatki naše raziskave bodo tako omogočili nadaljnje študije o povezanosti viroloških dejavnikov (virusnega bremena in genetske raznolikosti) in patogeneze virusa KME.

Z magistrsko nalogo smo želeli določiti virusno breme v kliničnih vzorcih bolnikov s KME v prvi fazi bolezni ter ugotoviti, v kolikšnem deležu vzorcev smo uspešno pomnožili virus KME. S pomočjo pridobljenih nukleotidnih zaporedij in filogenetske analize smo želeli potrditi obstoj genetskih različic virusa KME, značilnih le za določena zemljepisna območja.

V ta namen smo postavili naslednji hipotezi:

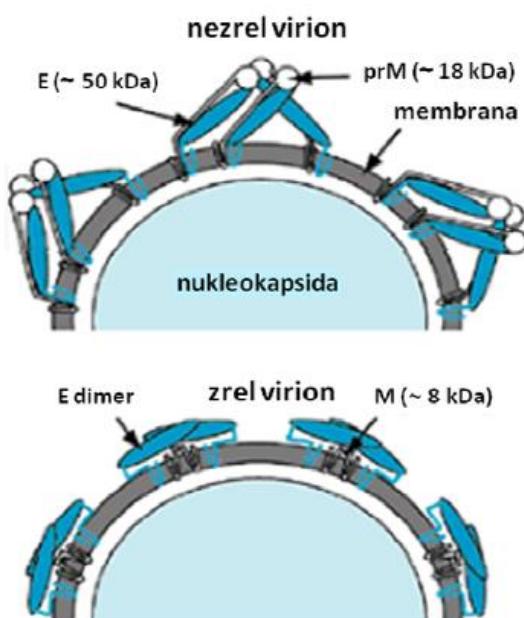
- pri večini kliničnih vzorcev bomo uspešno pomnožili virus KME ter določili virusno breme;
- obstajajo genetske različice virusa KME, značilne za določena zemljepisna območja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VIRUS KME

#### 2.1.1 Zgradba virusa

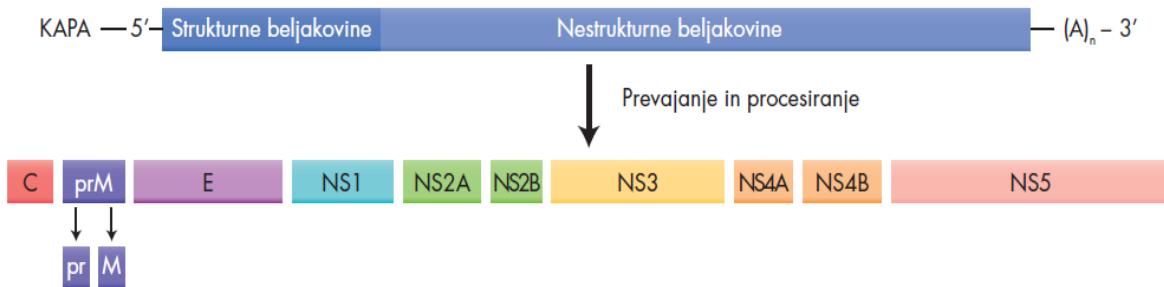
Virusi družine Flaviviridae imajo podobno zgradbo in organizacijo genoma. Virus KME je majhen – v premeru meri od 40 do 60 nm. Sestavljen je iz 6 % ribonukleinskih kislin (RNK), 66 % beljakovin, 17 % lipidov in 9 % ogljikovih hidratov (Avšič-Županc in Saksida, 2011). Virusni delec obdaja lipidna ovojnica gostiteljskega izvora, znotraj katere se nahaja nukleokapsida, ki je sestavljena iz kapsidne beljakovine C (angl. capsid) in virusnega genoma (virusna RNK) (Lindenbach in sod., 2013). Lipidna ovojnica vsebuje dve vrsti beljakovin – razlikujemo zrel in nezrel virusni delec. Tako zreli kot tudi nezreli virusni delci imajo lipidno ovojnico sestavljeno iz beljakovine E (angl. envelope). Pri zrelih virusnih delcih ovojnico sestavlja še beljakovina M (angl. membrane), ki je pri nezrelih virusnih delcih v prekurzorski obliki prM (angl. precursor M) (Slika 1) (Lindquist in Vapalahti, 2008).



Slika 1: Zgradba nezrelega in zrelega viriona virusa KME. Kratice: E, prM in C so strukturne beljakovine viriona (Lindenbach in sod., 2007: 1105)

## 2.1.2 Virusni genom

Genom virusa KME predstavlja enojnovijačna in pozitivno polarna RNK. Virusna RNK je dolga približno 11 000 nukleotidov in je edina virusna mRNK, prisotna v okuženih celicah. Več kot 90 % genoma virusa zavzema odprt bralni okvir (ORF, angl. open reading frame), ki je dolg približno 10 000 nukleotidov (Lindenbach in sod., 2013; Mansfield in sod., 2009). Kratka, nekodirajoča zaporedja ORF se nahajajo na 5'- in 3'- koncu. 5'-kratko nekodirajoče zaporedje vsebuje kapo tipa I, ki je pomembna pri translaciji in stabilnosti mRNA. 3'-kratko nekodirajoče zaporedje nima poliA-repa in vsebuje ohranjena zaporedja, ki so specifična za viruse, ki se prenašajo s klopi in viruse, ki se prenašajo s komarji. Odprt bralni okvir kodira tri strukturne (kapsidno beljakovino C, membransko beljakovino M in veliko ovojnično beljakovino E) in sedem nestruktturnih beljakovin (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5); (Slika 2). Največji del ORF zajemajo nestruktturni geni (75 %), manjšega pa strukturni geni (25 %) (Avšič-Županc in Saksida, 2011; Gritsun in sod., 2003a; Heinz, 2003; Mansfield in sod., 2009).



Slika 2: Organizacija genoma virusa KME (Avšič-Županc in Saksida, 2011: 160)

## 2.1.3 Virusne beljakovine

Virusna RNK se prevede v eno samo polipeptidno verigo, ki jo gostiteljske in virusne proteaze, kotranslacijsko in posttranslacijsko cepijo na specifičnih mestih. Pri tem nastanejo tri strukturne in sedem nestruktturnih beljakovin (Gritsun in sod., 2003a; Lindenbach in sod., 2013).

### 2.1.3.1 Strukturne beljakovine

Stukturne beljakovine (beljakovine C, M in E) so gradbeni elementi viriona.

Beljakovina C je majhna (11 kDa), bazična beljakovina. Dimer beljakovine C tvori osnovno strukturno komponento kapside. Monomer sestavlja štiri različne  $\alpha$ -vijačnice ( $\alpha 1$  do  $\alpha 4$ ), ki so med seboj povezane z zankami.  $\alpha 4$ -vijačnica ima visoko vsebnost pozitivno nabitih aminokislin, zato domnevajo, da se veže z virusno RNK. Po dve hidrofobni  $\alpha 2$ -vijačnici, ki se nahajata na vsakem koncu dimera, vzpostavlja interakcijo z membrano (Lindenbach in sod., 2013; Mandl, 2005; Patkar in sod., 2007).

Beljakovina prM (26 kDa) je glikoziliran prekurzor strukturne beljakovine M, ki pri nezrelih virusnih delcih deluje kot šaperon za pravilno zvijanje beljakovine E. Med potovanjem nezrelega virusnega delca iz celice, gostiteljska proteaza cepi beljakovino prM in pri tem nastane beljakovina M, ki je strukturni del zrelega virusnega delca (Lorenz in sod., 2002; Monath in Tsai, 1997).

Beljakovina E (52 kDa) je glavna ovojnična beljakovina in zato tarča nevtralizirajočih protiteles. Ima pomembno vlogo pri vstopu virusa v celico in iz nje, saj se veže z receptorjem, sodeluje pri zlitju virusne ovojnice z membrano endocitotskega vezikla ter zlitju membran endocitotskih mešičkov in celične membrane (Rey in sod., 1995). Beljakovina E na površini virusa ustvarja vzorec ribje kosti (angl. herringbone pattern). Ima obliko podolgovatega dimera, katerega monomera sta usmerjena nasprotno drug na drugega. Zapis za beljakovino E se uporablja pri filogenetskih analizah, saj je dovolj dolg in dobro ohranjen (Pierson in Diamond, 2013). Mutacije v zapisu za beljakovino E imajo velik vpliv na spremembo virulence virusa (Botha in sod., 2008).

### 2.1.3.2 Nestruktурne beljakovine

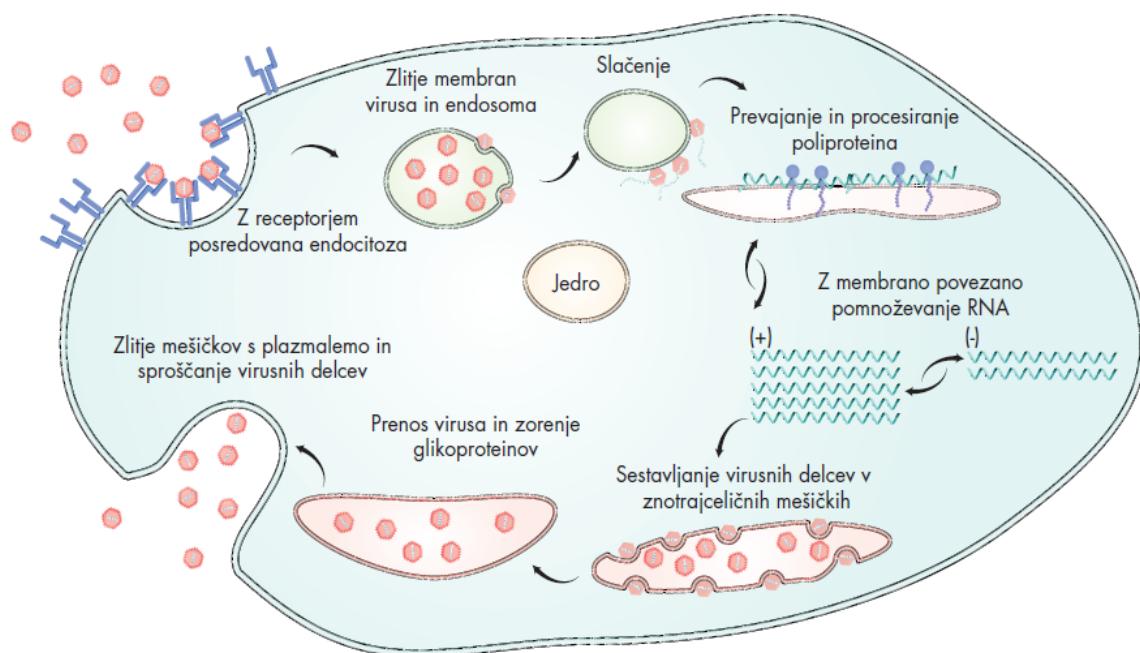
Nestruktурne beljakovine opravlja več različnih funkcij.

Beljakovina NS1 je glikoprotein, ki deluje kot kofaktor pri podvajaju virusne RNK. Interakcija med NS1 in NS4A beljakovino je pomembna za pravilno delovanje replikaze (Lindenbach in sod., 2013). Beljakovina NS2A je hidrofobna beljakovina, ki ima pomembno vlogo pri vezavi matrične RNK na membrano endoplazmatskega retikuluma v kompleks za podvajanje (Mackenzie in sod., 1996). Beljakovina NS2B je vezana na membrano. Z beljakovino NS3 tvori stabilen kompleks in deluje kot kofaktor za serin proteazno aktivnost beljakovine NS3 (Lindenbach in sod., 2013). Beljakovina NS3 je citoplazemska beljakovina, ki se s pomočjo beljakovine NS2B povezuje z membrano. Pri pomnoževanju virusa ima različne vloge: helikazno, RNK trifosfatazno in, skupaj z beljakovino NS2B, serin proteazno aktivnost. Beljakovini NS4A in NS4B sodelujeta pri vsidranju poliproteina, ki nastane pri prevajanju genomske RNK v znotrajcelične membrane (Lindenbach in Rice, 2003). Beljakovina NS5 je največja virusna beljakovina. Predstavlja od RNK odvisno RNK polimerazo, ki ima metiltransferazno aktivnost, pomembno pri podvajaju virusne RNK. Zapis za to beljakovino je najbolj ohranjen del virusnega genoma. Ima pomembno vlogo pri zaviranju imunskega odziva, zato je tudi pomemben virulenčni dejavnik (Best in sod., 2005; Mansfield in sod., 2009).

#### **2.1.4 Razmnoževanje virusa**

Na začetku virusnega cikla je pomembna vezava virusa na gostiteljsko celico s pomočjo virusne ovojnične beljakovine E. Virus vstopi v gostiteljsko celico z receptorsko posredovano endocitozo v prelizosomalnih endocitotskih mešičkih. Zaradi nizkega pH v mešičkih se beljakovina E konformacijsko spremeni, kar omogoči zlitje virusne membrane z membrano endocitotskega mešička. Sledi prehod virusne nukleokapside v citoplazmo gostiteljske celice in sproščanje genomske RNK. Pri prevajanju nastane polipeptidna veriga, ki jo proteaze cepijo tako, da nastanejo strukturne in nestruktурne virusne beljakovine. Pri podvajaju genoma nastanejo negativno polarne kopije genoma, ki služijo kot matrica, na podlagi katere od RNK odvisna RNK polimeraza (replikaza RNK) katalizira prepis pozitivno polarne RNK. Beljakovini prM in E se po prevajanju preneseta v lumen endoplazemskega retikuluma. Na citoplazemski strani endoplazemskega retikuluma več kopij beljakovine C obda genomsko RNK tako, da nastane kapsida, ki se ob

brstenju v lumen endoplazemskega retikuluma obda z virusno ovojnico. V endoplazemskem retikulumu lahko nastanejo tudi sub-virusni delci (SVD), ki jim manjka nukleokapsida in zato tudi po zorenju ostanejo neinfektivni. Zorenje virusa nastopi, ko proteaza gostitelja cepi beljakovino prM, kar povzroči preoblikovanje beljakovine E in zlitje prenosnih mešičkov in gostiteljeve membrane. Zreli, infektivni virusi se z eksocitozo sprostijo iz celice (Slika 3) (Heinz, 2003; Lindenbach in sod., 2013; Mandl, 2005; Mansfield in sod., 2009).



Slika 3: Življenjski cikel virusa KME (Avšič-Županc in Saksida, 2011: 161)

## 2.2 TAKSONOMIJA VIRUSA KME

V družino Flaviviridae uvrščamo rodove *Flavivirus*, *Pestivirus* in *Hepacivirus*. Družina je dobila ime po bolezni rumena mrzlica (lat. *flavus*, ki pomeni rumen), saj je bil povzročitelj te bolezni prvi virus, ki so ga izolirali iz te družine (Monath in Tsai, 1997).

V rod *Flavivirus* uvrščamo 73 virusov (50 vrst in 23 podtipov), ki se od ostalih predstavnikov družine Flaviviridae razlikujejo po antigenskih, ekoloških in epidemioloških lastnostih. Flaviviruse so na podlagi antigenske sorodnosti oziroma antigenskih značilnosti

beljakovine E razdelili v 8 serokomplekov, s pomočjo seroloških testov (test navzkrižne reaktivnosti in nevtralizacijski test). Antigenško razvrstitev so podprli s filogenetskimi študijami nukleotidnih zaporedij genomov (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Večino flavivirusov na vretenčarje prenašajo komarji in klopi, zato jih imenujemo tudi arbovirusi (angl. arthropod-borne). Virusi so razdeljeni v tri skupine: klopo prenosljivi virusi (Preglednica 1), virusi, ki se prenašajo s komarji in skupina brez znanega prenašalca (Gould in sod., 2003; Grard in sod., 2007).

Poznamo klopo prenosljive flaviviruse, katerih gostitelji so sesalci, in tiste, katerih gostitelji so morske ptice. V skupino klopo prenosljivih flavivirusov uvrščamo virus Powassan (POVV), virus Louping ill (LIV), virus Langat (LGT), virus hemoragične mrzlice Omsk (OHFV), virus bolezni gozda Kyasanur (KFDV), virus Alkhumra (ALKV), virus Karshi (KSIV), virus Gutgets Gully (GGTV), virus Royal Farm (RFV) in virus klopnega meningoencefalitisa (virus KME, angl. Tick-borne encephalitis virus, TBEV) (Dobler, 2010; Gritsun in sod., 2003a; Thiel in sod., 2005). Skupina klopo prenosljivih virusov tvori tudi svoj serokompleks (Pierson in Diamond, 2013).

Preglednica 1: Klopno prenosljivi flavivirusi (Dobler, 2010: 224)

<b>Virus</b>	<b>Oznaka</b>	<b>Prenašalec</b>	<b>Zemljepisna razširjenost</b>	<b>Bolezen pri ljudeh</b>
<i>virus Gutgets Gully</i>	GGTV	<i>Ixodes uriae</i>	Australija	ni znana
<i>virus Karshi</i>	KSIV	argasidni klopi	Uzbekistan, Kazahstan	ni znana
<i>virus bolezni gozda Kyasanur</i>	KFDV	<i>Haemaphysalis spinigera</i>	Indija	hemoragična mrzlica, encefalitis
<i>virus Alkhumra</i>	ALKV	ixodidni klopi (?)	Arabski polotok	hemoragična mrzlica, encefalitis
<i>virus Langat</i>	LGTV	ixodidni klopi	Jugovzhodna Azija, Sibirija	mrzlica, encefalitis
<i>virus Louping-ill</i>	LIV	ixodidni klopi		
<b>britanski podtip</b>	LIV-Brit	<i>Ixodes ricinus</i>	Britanski otoki, Norveška	encefalitis
<b>irske podtip</b>	LIV-Ir	<i>Ixodes ricinus</i>	Britanski otoki	encefalitis
<b>španski podtip</b>	LIV-Span	ixodidni klopi	Iberski polotok	ni znana
<b>turški podtip</b>	LIV-Turk	ixodidni klopi	Turčija	ni znana
<i>virus hemoragične mrzlice Omsk</i>	OHFV	<i>Dermacentor spp.</i>	Zahodna Sibirija	hemoragična mrzlica
<i>virus Powassan</i>	POVV	<i>Ixodes cookie,</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	Severna Amerika, daljnovenzhodna Sibirija	encefalitis
<i>virus Royal Farm</i>	RFV	argasidni klopi	Afganistan	ni znana
<i>virus klopnega meningoencefalitisa</i>	<b>KMEV</b>	<b>ixodidni klopi</b>		
<b>evropski podtip</b>	KMEV-Eu	<i>Ixodes ricinus</i>	Evropa	encefalitis
<b>daljnovenzhodni podtip</b>	KMEV-FE	<i>Ixodes persulcatus</i>	Rusija, Japonska, Kitajska	encefalitis
<b>sibirski podtip</b>	KMEV-Sib	<i>Ixodes persulcatus</i>	Finska, evropski del Rusije, Sibirija	encefalitis

## 2.2.1 Podtipi virusa KME

Poznamo tri podtipe virusa KME: evropski (virus KME-Eu), sibirski (virus KME-Sib) in daljnovenzhodni (virus KME-FE) podtip. Podtipi se med seboj razlikujejo po zemljepisni razširjenosti, vrstah prenašalcev, poteku bolezni in smrtnosti pri ljudeh ter genetskih in seroloških lastnostih.

Virus KME-Eu (predhodno znan kot virus centralno evropskega encefalitisa, CEE), katerega prototipni sev je Neudoerfl, je razširjen v osrednji Evropi in na Balkanu. Prenaša ga klop vrste *Ixodes ricinus*. Potek bolezni je običajno dvofazen. Smrtnost je nizka (manj kot 2 %). Najbolj ogrožena skupina so starejši ljudje, redkeje otroci.

Virus KME-Sib (predhodno znan kot zahodno sibirski virus) je razširjen v sibirskem pasu Rusije. Prototipni sev virusa KME-Sib je virus Vasilchenko. Prenaša ga klop vrste *Ixodes persulcatus*. Potek bolezni je enofazen. Smrtnost je največ 5 %. Najbolj ogrožena skupina so otroci.

Virus KME-FE (predhodno znan kot virus ruskega pomladno poletnega encefalitisa, RSSE) je razširjen v vzhodni Evropi, Rusiji in na Japonskem. Prototipni sev virusa KME-FE je virus Sofjin. Prenaša ga klop vrste *Ixodes persulcatus*. Potek bolezni je enofazen. Smrtnost je dokaj visoka (15–20 %). Največ primerov beležijo pri otrocih (Dobler in sod., 2012; Gritsun in sod., 2003b; Lindquist in Vapalahti, 2008; Süss, 2011).

Genetske linije virusa KME, ki se nahajajo znotraj podtipov se med seboj razlikujejo v največ 2 % aminokislin. Podtipi virusa KME pa se med seboj razlikujejo v največ 5–6 % aminokislin (Lindquist in Vapalahti, 2008). Daljnovenzhodni in sibirski podtip virusa KME sta bolj filogenetsko povezana, kot evropski podtip (Grard in sod., 2007).

### 2.2.1.1 Genetska raznolikost podtipov virusa KME

Virus KME se nahaja na omejenih področjih, ki jih imenujemo žarišča. Znotraj žarišč se pojavljajo genetske različice virusa KME. Te trditve potrjujejo različne raziskave. V Latviji, Nemčiji, na Švedskem ter Češkem so na podlagi filogenetskih analiz dokazali

prisotnost genetskih različic virusa KME, ki so značilne za določena zemljepisna območja (Haglund in sod., 2003; Han in sod., 2005; Weidmann in sod., 2011). S pomočjo avstrijskega izolata Neudoerfl in čeških izolatov Hypr ter TBE263 so pri poskusih na miškah kljub visoki sorodnosti sevov (preko 97 %) dokazali različno stopnjo virulence testiranih sevov. Razlogi za razliko v virulenci še niso povsem raziskani (Wallner in sod., 1996). V Estoniji so v izolatih klopor in bolnikov dokazali vse tri podtipe virusa KME, kar potrjuje, da se endemska območja podtipov virusa KME prekrivajo (Golovljova in sod., 2004).

Filogenetske raziskave so izvedli na virusnih izolatih, ki so jih gojili na miškah ali celičnih kulturah. V Sloveniji so bili prvi, ki so analizirali del genoma virusa KME neposredno iz klopor, glodavcev in bolnikov. Potrdili so tudi obstoj genetskih različic virusa KME, ki se združujejo v zemljepisno ločene monofletske linije. Na podlagi genetske raznolikosti virusa KME so določili sedem filogenetskih skupin. Dokazali so tudi, da med prenašalcji oziroma gostitelji prevladuje enaka genetska različica virusa KME ter da pri vzorcih pridobljenih iz klopor in glodavcev obstaja povezava med filogenetskim in zemljepisnim združevanjem (Fajs in sod., 2012).

### 2.3 KROŽENJE VIRUSA V NARAVI

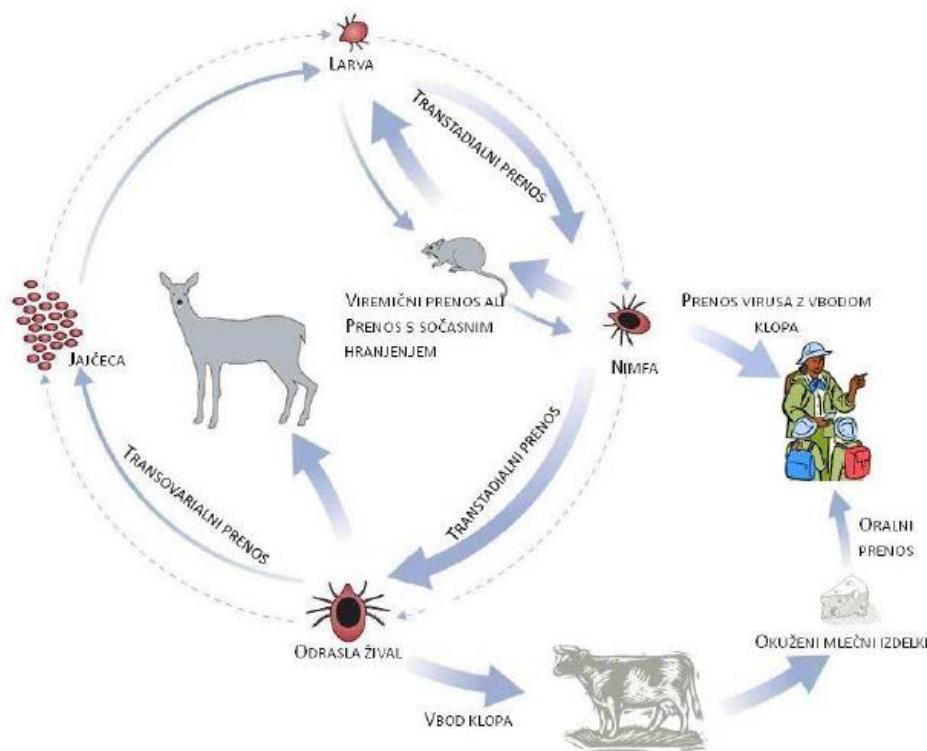
Virus KME v naravi kroži med prenašalcji (klopi), njihovimi gostitelji (mali gozdni sesalci) in naključnimi gostitelji (človek). Gostitelji virusa KME so lahko tudi divjad in domače živali, ki pa ne razvijejo dovolj visoke viremije za nadaljnji prenos virusa. Te živali omogočajo le razmnoževanje klopor in tako pripomorejo k ohranjanju virusa v naravi (Avšič-Županc in Petrovec, 1997).

Klop se lahko okuži na več načinov. Viremičen prenos se zgodi med hranjenjem klopa na viremičnem gostitelju. Prenos virusa je mogoč le pri malih sesalcih, ki razvijejo dovolj visoko viremijo. Človek in veliki sesalci ne razvijejo tako visoke viremije, zato so le-ti končni gostitelji (Avšič-Županc in Petrovec, 1997; Nuttall in Labuda, 1994). Obstaja še neviremičen prenos, ki se zgodi ob sočasnem hranjenju larv in nimf na neviremičnem ali imunem gostitelju. Virus se zaradi neposredne bližine (do 1 cm) prenese iz okuženega

klopa na neokuženega (Randolph in sod., 1996). Vertikalni prenos virusa KME v klopih vključuje spolni (iz okuženega samca na samico), transovarialni (iz samice na jajčeca) in transtadialni (iz ličnike na nimfo, iz nje na odraslo žival) prenos (Slika 4) (Danielova in sod., 2002; Ludwig in Iacono-Connors, 1993).

Ko se klop enkrat okuži, ohrani virus vse življenje. Virus se v klopu razmnožuje v različnih organih, tudi žlezah slinavkah. Virus se pri naslednjem hranjenju klopa s slino prenese na gostitelja, tudi človeka (Avšič-Županc in Petrovec, 1997; Süss, 2003).

Človek se lahko okuži tudi z zaužitjem okuženega nepasteriziranega mleka in mlečnih izdelkov. Virus ostane v mleku do osem dni po okužbi koz, ovac ali goveda (Nuttall in Labuda, 1994).



Slika 4: Kroženje virusa KME v naravi. S črtkano črto je prikazan razvoj klopa. Polna črta označuje prenos virusa (povzeto po Lindquist in Vapalahti, 2008: 1867; Malovrh in Marc, 1997: 467)

## 2.4 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽBE Z VIRUSOM KME

### 2.4.1 Naravna žarišča

Virus KME se pojavlja na omejenih področjih, ki jih imenujemo žarišča. Za nastanek in obstoj naravnih žarišč so potrebne ustrezne podnebne razmere, primerna gostota in stabilnost populacije kloporum ter gostiteljev, dovzetnost gostiteljev, pravšnje trajanje viremije v gostiteljih, ustrezen delež imunih gostiteljev ter lastnosti biotopa (Avšič-Županc in Petrovec, 1997; Heinz in sod., 2007). V aktivnem naravnem žarišču se nahajajo velike in stabilne populacije kloporum, malih sesalcev in žužkojedov, ki imajo sinhrono sezonsko aktivnost (Randolph in sod., 2000). Področje, kjer ugotovimo prisotnost virusa KME v gostiteljih, bolezen pa se pri prebivalstvu ne izraža, imenujemo latentno žarišče (Süss, 2003). Žarišče lahko začasno ali trajno ugasne ob neugodnih spremembah pogojev (Avšič-Županc in Petrovec, 1997; Heinz in sod., 2007).

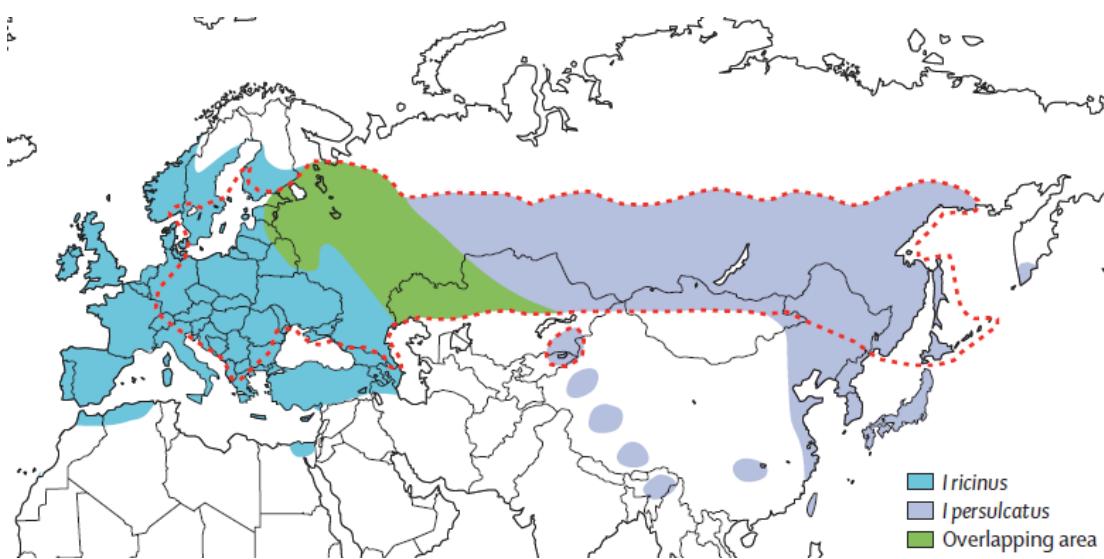
### 2.4.2 Razširjenost KME v svetu

Endemično območje KME sega od severa Kitajske in Japonske preko Rusije v Evropo. Zemljepisna razširjenost podtipov virusa sovpada z razširjenostjo prenašalcev. Klop vrste *I. ricinus* prenaša evropski podtip virusa KME, ki ga najdemo v srednji, vzhodni in severni Evropi. Klop vrste *I. persulcatus* prenaša sibirski (najdemo ga na sibirskej delu Rusije in na severu Finske) in daljnovezhodni (najdemo ga v Rusiji, na severu Kitajske in na Japonskem) podtip virusa KME. Vsi trije podtipi virusa KME se nahajajo v Baltskih državah (Slika 5) (Lindquist in Vapalahti, 2008; Mansfield in sod., 2009).

Po celi svetu vsako leto prijavijo 10 000 do 12 000 primerov KME. V obdobju od leta 1974 do leta 2003 se je obolenost za KME v Evropi povečala za 400 %. Virus KME se je pojavil na območjih, kjer ga prej ni bilo. V obdobju od leta 1976 do leta 1989 so v Evropi in Rusiji zabeležili 2 755 primerov KME, nekaj let kasneje (1990-2007) pa 8 755 primerov KME (Süss, 2003; Süss, 2011). Od leta 2001 do leta 2008 je bilo zabeleženih 43 451 primerov KME v Rusiji in 22 166 primerov KME v Evropi (Arnež in Avšič-Županc, 2009). KME je obvezno prijavljiva bolezen v 16 državah: Avstriji, Češki, Estoniji, Finski,

Nemčiji, Grčiji, Madžarski, Latviji, Litvi, Poljski, Slovaški, Sloveniji, Švedski, Norveški, Švici, in Rusiji (Mansfield in sod., 2009; Süß, 2011). Države z največjo incidenčno stopnjo (število primerov KME na 100 000 prebivalcev na leto) so Latvija (30), Rusija (20,5), Estonija (16,5), Slovenija (14) in Litva (11,2) (Kaiser, 2008). Največjo število primerov KME na svetu so zabeležili v zahodni Sibiriji, leta 1996 in sicer 10 298 (Süss, 2011). Bolnikov s KME zaenkrat ni v Veliki Britaniji, na Irskem, Islandiji, Belgiji, Nizozemskem, Španiji in na Portugalskem (Donoso Mantke in sod., 2008). V nekaterih evropskih državah (predvsem v Avstriji) so v zadnjih nekaj letih zabeležili upad primerov KME, zaradi cepljenja (Süss, 2011).

Število prijavljenih primerov KME se v posameznih državah iz leta v leto spreminja, zaradi sprememb podnebnih razmer, gostote populacije malih sesalcev in gostote populacije okuženih klopo. Podnebne spremembe (zvišanje povprečne temperature in povečevanje količine padavin) omogočajo širjenje klopo v bolj severna področja kot tudi področja z višjo nadmorsko višino. K povišanju incidence obolelih prispevajo tudi politični, ekonomski, ekološki, demografski in socialni dejavniki. Ljudje z veliko prostega časa in željo po zdravem in aktivnem življenju se vse več časa zadržujejo v naravi (sprehodi, nabiranje gob...) in so bolj dovzetni za vbod klopa. Zaradi zmanjševanja obdelovanja zemlje in prepovedi uporabe nevarnih pesticidov se je povečala možnost za bivanje glodavcev. Potovanja so postala zelo priljubljena, zato je narasla možnost okužbe ljudi, ki potujejo na endemična področja (Knap in sod., 2009; Mansfield in sod., 2009; Süß, 2008; Šumilo in sod., 2008).



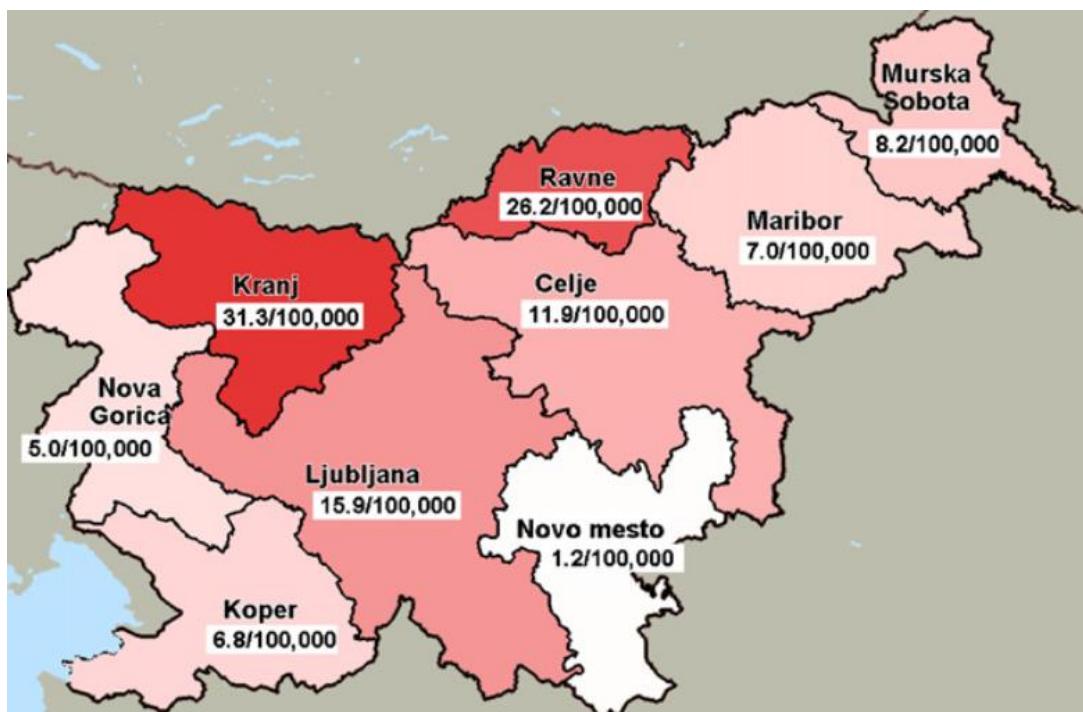
Slika 5: Razširjenost virusa KME in njegovih prenašalcev. Rdeča prekinjena črta označuje mejo, ki obkroža endemično območje (Lindquist in Vapalahti, 2008: 1862)

#### 2.4.3 Razširjenost KME v Sloveniji

Slovenija je del srednjeevropskega endemskega področja KME, ki se razteza od Jesenic do Šentilja, nadaljuje se v Celjski kotline, Savinjski dolini, na Gorenjskem, do Ljubljanske kotline, naprej do Cerknice, Postojne in Kočevja (Avšič-Županc in sod., 2009; Kraigher in sod., 2010). Pojavljanje KME je vezano na naravna žarišča, ki so izredno aktivna (območje Mozirja in Kranja, kjer je možnost okužbe in obolenja velika), manj aktivna (območje Škofje Loke in Ilirske Bistrike) in latenta (okužba in obolenje nista verjetni) (Avšič-Županc in sod., 1995b). Najvišja stopnja obolevanja je na Gorenjskem in Koroškem (Slika 6) (Grgič-Vitek in Klavs, 2011). Slovenija ima na majhni površini številne različne habitate in podnebne razmere (Knap in sod., 2009).

Vsako leto zabeležimo 200 - 300 primerov bolezni. Z virusom KME se lahko okužijo ljudje vseh starostnih skupin. Struktura zbolelih po spolu ostaja iz leta v leto skoraj nespremenjena: delež zbolelih moških je večji kot delež zbolelih žensk (Grgič-Vitek in Klavs, 2011; Kraigher in sod., 2010). KME je v Sloveniji najpogosteji vzrok akutnega encefalitisa pri otrocih, mlajših od 15 let, saj je precepljenost otrok nizka (okoli 4 %) (Arnež in sod., 2003; Arnež in Avšič-Županc, 2009). Ljudje, ki se začasno ali trajno zadržujejo na endemičnih območjih imajo največje tveganje za okužbo. Najbolj ogroženi

so delavci v kmetijstvu, gozdnem gospodarstvu, lesno-predelovalni industriji in gradbeništvu ter ljudje, ki se dlje časa zadržujejo v gozdu zaradi rekreacije, nabiranja gozdnih sadežev ipd. (Kraigher in sod., 2010).



Slika 6: Povprečna letna incidenca KME po regijah v Sloveniji od leta 2000 do leta 2009 (Grgič-Vitek in Klavs, 2011: 5179)

## 2.5 PATOGENEZA VIRUSNE OKUŽBE

Večina okužb z virusom KME nastane zaradi vboda okuženega klopa, redkeje zaradi uživanja okuženega nepasteriziranega mleka. Virus se najprej pomnožuje na mestu vboda klopa, to je v Langerhansovih dendritičnih celicah kože. Te celice prenesejo virus do limfnih vozlov. Virus nato preko limfatičnega sistema vstopa v krvni obtok, od koder se razširi po telesu in okuži različne organe, predvsem retikulo-endoteljski sistem (vranica, jetra in kostni mozeg). Virus se tam pomnožuje in sprošča nazaj v krvni obtok, kar omogoča nekaj dnevno trajanje viremije (Haglund in Günther, 2003; Lindenbach in sod., 2013). Podatkov o višini viremije (virusnem bremenu) pri bolnikih s KME, z izjemo posameznih opisanih primerov, še ni (Schultze in sod., 2007; Schwaiger in Cassinotti, 2003). Ti podatki bodo omogočili nadaljnje raziskave o povezanosti viroloških dejavnikov (virusnega bremena in genetske raznolikosti) in patogeneze virusa KME. V času viremije,

virus preide krvno-možgansko pregrado in okuži osrednji živčni sistem (McMinn, 1997). Za prehod krvno-možganske pregrade je potrebno visoko virusno breme, natančen mehanizem prehoda pa še ni znan (Chambers in Diamond, 2003). Obstajajo štirje možni načini prehoda preko krvno-možganske pregrade: nevronska pot po okužbi perifernih živcev, okužba vohalnih nevronov (po izpostavitvi aerosolom ob laboratorijskem delu), difuzija med endotelijskimi celicami kapilar ali vstop virusa v endotelijske celice možganskih kapilar, čemur sledi transcitoza in sproščanje virusa v možganski parenhim. Pomnoževanje virusa v osrednjem živčevju povzroči nastanek vnetja, lizo in celično disfunkcijo (Dorrbecker in sod., 2010; Haglund in Günther, 2003; Ružek in sod., 2010).

Virus KME je nevroinvaziven. Značilne so nevropatološke spremembe predvsem osrednjega živčevja. Patološke lezije najpogosteje vključujejo sivo snov in leptomeninge. Najbolj prizadeti so podaljšana hrbtenjača, jedra možganskih živcev, možgansko deblo, mali možgani in hrbtenjača. Pojavi se degeneracija, nekroza in nevrafagija nevronov (Haglund in Günther, 2003).

Ni znano, zakaj je pri živalih, ki so se okužile z virusom KME po naravni poti, gostiteljski imunski odziv sposoben preprečiti razvoj bolezni (Mansfield in sod., 2009).

## 2.6 KLINIČNA SLIKA

Klopni meningoencefalitis je ena najnevarnejših virusnih okužb osrednjega živčevja v Evropi in Aziji. Smrtnost zaradi okužbe z daljnovzhodnim podtipom virusa je 20 do 40 %. Okužba z evropskim (1 do 2 % smrtnost) in sibirskim (2 do 3 % smrtnost) podtipom za razliko od daljnovzhodnega podtipa povzroča bolezen s precej nižjo stopnjo smrtnosti (Gritsun in sod., 2003a).

Serološke študije nakazujejo, da pri 70 do 95 % obolelih okužbe z virusom KME ne prepoznamo, saj poteka asimptomatsko (tj. brez bolezenskih znakov in simptomov) (Bogovič in sod., 2010). Potek bolezni je blažji pri otrocih. Resnost bolezni narašča s starostjo bolnika in je najvišja pri starejših od 60 let (Arnež in Avšič-Županc, 2009; Logar in sod., 2006).

Klinično izražena okužba z evropskim podtipom običajno povzroča bolezen z dvofaznim potekom, katere inkubacijska doba traja 7–14 dni. Prva, viremična faza bolezni traja 2–7 dni. Zanjo so značilni gripi podobni znaki: povišana telesna temperatura, utrujenost, slabo počutje, bolečine v trebuhu in glavobol (Bogovič in sod., 2010; Mansfield in sod., 2009). Sledi obdobje brez simptomov, ki traja približno en teden, nato bolezen napreduje v drugo, akutno fazo bolezni z znaki meningitisa (vnetje možganskih ovojnici), encefalitisa (vnetje možganskega tkiva), mielitisa (vnetje hrbtenjače) ali radikulitisa (vnetje korenin živcev). V tej fazi se pojavi povišana telesna temperatura, glavobol, vrtoglavica, bruhanje in otrdelost vratu. Najpogostejsa klinična oblika KME je meningitis, najhujša pa meningoencefalomielitis. Pri bolnikih s hudo prizadetostjo živčevja se lahko pojavijo motnje v spanju, zavesti, koncentraciji in spominu, zmedenost, razdražljivost, pareze, ohlapne paralize udov in vratnih mišic. Nekateri bolniki si po preboleli bolezni popolnoma opomorejo, drugi pa lahko čutijo posledice (npr. motnje v zaznavanju, koncentraciji, spominu, koordinaciji, ravnotežju in sluhu, glavobol, ohlapne paralize udov, trajne pareze obraznih mišic in depresija) (Arnež in Avšič-Županc, 2009; Bogovič in sod., 2010; Ružek in sod., 2010).

Bolezen, povzročena z evropskim podtipom virusa KME, lahko redko poteka tudi v abortivni oziroma febrilni obliki, kjer se pojavi le prva faza bolezni, ni pa druge faze z znaki meningitisa (Lotrič-Furlan in sod., 2002).

Po zaužitju okuženega mleka je potek bolezni dvofazen, brez težjih nevroloških zapletov, inkubacijska doba je krajsa (2–3 dni), bolnik popolnoma ozdravi (Hudopisk in sod., 2013; Ružek in sod., 2010).

## 2.7 DIAGNOSTIKA

Natančna in hitra diagnostika je zelo pomembna, saj incidenca okužb z virusom KME narašča, endemična območja pa se nenehno širijo. Ker so klinični znaki bolezni neznačilni, lahko okužbo s KMEV potrdimo le z mikrobiološko diagnostiko. Laboratorijska diagnostika temelji na neposrednem (osamitev virusa iz kužnin bolnika in dokazovanje

virusne RNK z molekularnimi metodami) in posrednem (dokazovanje specifičnih protiteles s serološkimi metodami) dokazovanju virusa KME. Pri ugotavljanju morebitne okužbe s KMEV lahko uporabimo vzorce, ki so bili odvzeti pred (serum, likvor) ali po smrti (tkivo) bolnika (Mansfield in sod., 2009; Arnež in Avšič-Županc, 2009). Pri diagnostiki KME je pomembno vedeti, ali je bolnik obiskal kraj, ki je endemičen, ali se spominja vboda klopa pred pojavom simptomov, ali je užival nepasterizirano mleko oziroma mlečne izdelke in, če je bil cepljen proti KME ali proti kateri drugi bolezni, ki jo povzročajo flavivirusi (virus japonskega encefalitisa, virus rumene mrzlice) in kdaj (Holzmann, 2003).

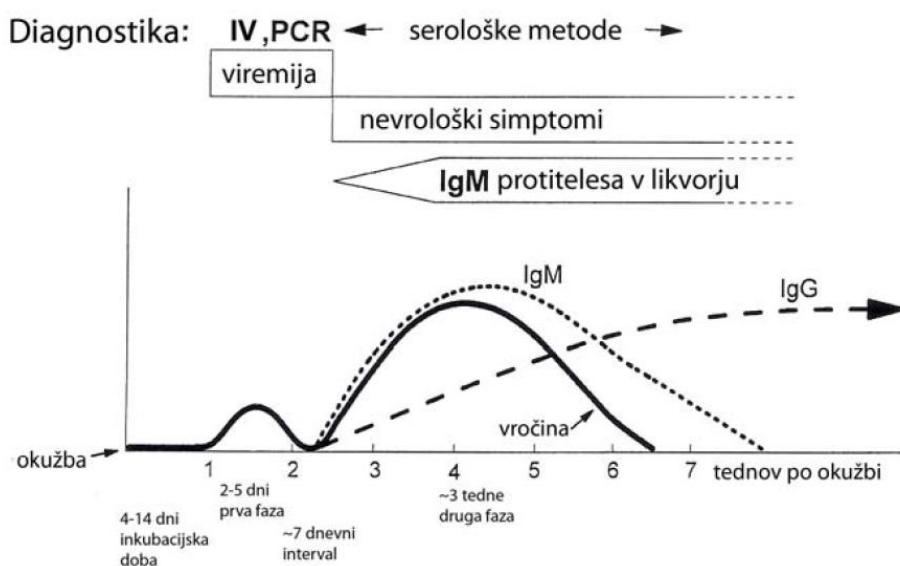
### **2.7.1 Posredno dokazovanje virusa**

V rutinski diagnostiki se najpogosteje uporablja posredno dokazovanje virusa, ki temelji na dokazovanju specifičnih protiteles razreda IgM in IgG. Protiteesa dokazujemo v drugi, akutni fazì bolezni, ko se pojavijo nevrološki zapleti. Najpogosteje se uporablja encimsko imunska metoda (ELISA, angl. enzyme linked immunosorbent assay), ki je hitra, specifična in občutljiva (Mansfield in sod., 2009; Lindquist in Vapalahti, 2008). Tvorbo specifičnih protiteles dokazujemo v serumu bolnika, lahko pa tudi v likvorju, vendar kasneje in v nižjih koncentracijah kot v serumu (Arnež in Avšič-Županc, 2009).

Protiteesa razreda IgM lahko zaznamo v serumu med 1 in 6 dnem po pojavu nevroloških simptomov in znakov, njihova vrednost začne upadati 6 tednov po okužbi, ko protiteesa razreda IgG dosežejo najvišjo vrednost (Slika 7). Protiteesa razreda IgM lahko s testi dokažemo še nekaj mesecev po okužbi, protiteesa razreda IgG pa vztrajajo celo življenje in preprečujejo ponovno okužbo. Za postavitev diagnoze je pomembno, da dokažemo tako protiteesa razreda IgM, kot tudi IgG. Če najprej dokažemo protiteesa razreda IgM, moramo testiranje ponoviti čez 1-2 tedna, da dokažemo še protiteesa razreda IgG (Mansfield in sod., 2009; Holzmann, 2003).

Glavna slabost seroloških metod je ta, da protiteles v prvi fazì bolezni ni mogoče dokazati. Pri osebah, ki so se cepile proti KME lahko v serumu zasledimo protiteesa razreda IgM še nekaj mesecev po cepljenju, zato je zelo pomembno, da za potrditev okužbe dokažemo še

značilen porast titra protiteles razreda IgG oz. prisotnost protiteles v likvorju. Oviro pri posrednem dokazovanju KMEV predstavljajo navzkrižno reaktivna protitelesa, ki so lahko posledica okužbe ali cepljenja proti drugim flavivirusom (npr. virus Zahodnega Nila) (Holzmann, 2003).



Slika 7: Diagnostika KME pri dvofaznem poteku bolezni. Kratice: IV - izolacija virusa, PCR - verižna reakcija s polimerazo (Holzmann, 2003: 37)

### 2.7.2 Neposredno dokazovanje virusa

Osamitev virusa iz kužnin bolnika še danes predstavlja zlati standard neposrednega dokazovanja virusa, vendar je časovno zamudno, tehnično zahtevno in nevarno, zato za hitro diagnostiko ni primerno (Holzmann, 2003).

Zato za neposredno dokazovanje virusne RNK v krvi bolnikov uporabljamo molekularne metode, predvsem verižno reakcijo s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR, angl. reverse transcription polymerase chain reaction). S to metodo lahko dokažemo virusno RNK v vzorcih krvi oz. serumov bolnikov, ki so bili odvzeti v prvi fazni bolezni, še pred pojavom specifičnih protiteles. Pri redkih bolnikih, lahko virusno RNK dokažemo tudi na začetku druge faze bolezni. Vzorci likvorja se v preteklih raziskavah niso pokazali kot primerna kužnina za neposredno dokazovanje okužbe z virusom KME z molekularnimi metodami. RT-PCR je uporabna metoda tudi v diferencialni diagnostiki različnih

vročinskih bolezni po vbodu klopa na področjih, kjer je endemičnih več klopnih prenosljivih povzročiteljev bolezni (Lindquist in Vapalahti, 2008; Saksida in sod., 2005; Schwaiger in Cassinotti, 2003). Za neposredno dokazovanje virusa sta primerni tudi metodi RT-PCR v realnem času in kvantitativni RT-PCR. Glavna prednost vseh metod je ta, da lahko virusno RNK dokažemo v kužninah bolnikov, brez predhodne osamitve (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

Problem pri uporabi molekularnih metod v rutinski diagnostiki je kratko trajanje obdobja viremije. Večina bolnikov namreč obišče zdravnika v drugi fazi bolezni, ko se pojavijo nevrološki zapleti in virusa v krvi ni več (Saksida in sod., 2005).

## 2.8 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Za zdravljenje KME ne poznamo specifičnega zdravila. Zdravljenje je simptomatsko in podporno ter je odvisno od izraženih simptomov pri posameznem bolniku. Bolnika je potrebno stalno nadzirati, saj se lahko pojavita koma in živčno mišična paraliza (Dumpis in sod., 1999; Mansfield in sod., 2009).

Pred boleznijo se lahko najučinkoviteje zaščitimo z aktivno imunizacijo s cepljenjem. V Sloveniji je cepljenje obvezno od leta 1986 za ljudi, ki so pri svojem delu ali terenskih vajah izpostavljeni nevarnosti okužbe. Od leta 1991 je cepljenje priporočeno vsem, ki bivajo na okuženih območjih ali nameravajo na teh območjih bivati krajsi čas (Grgič-Vitek in Klavs, 2011; Kraigher in sod., 2008).

V Evropi sta na voljo dve cepivi, ki sta pripravljeni iz virusa, gojenega na celicah piščančjih fibroblastov in inaktiviranega s formalinom. Cepivo FSME-Immun® podjetja Baxter je narejeno na podlagi avstrijskega seva virusa KME - Neudorfl, cepivo Encepur® podjetja Novartis pa je narejeno na podlagi nemškega seva virua KME - Karlsruhe. Kljub temu, da sta obe cepivi narejeni s sevi virusov, ki sodijo v evropski podtip virusa KME, zaradi navzkrižne reaktivnosti nudita zaščito proti vsem trem podtipom virusa KME. V Sloveniji se največ uporablja cepivo FSME - Immun® (Grgič-Vitek in sod., 2010a; Hayasaka in sod., 2001; Holzmann in sod., 1992; Leonova in sod., 2007).

Za popolno zaščito so potrebni trije odmerki cepiva. Cepljenje s prvim odmerkom je priporočljivo v zimskih mesecih, da dosežemo zaščito pred začetkom sezone aktivnosti klopoval. Z razmakom 1-3 mesecev po prvem odmerku sledi drugi odmerek in tretji 9-12 mesecev po prvem odmerku. Oživitveni odmerek je priporočen po treh in nato po petih letih. Po 60. letu starosti je oživitveni odmerek priporočljiv na tri leta (Heinz in sod., 2007; Lindquist in Vapalahti, 2008).

V Sloveniji poraba cepiva proti klopnemu meningoencefalitisu narašča a je precepljenost še vedno zelo nizka (približno 10 %) (Grgič-Vitek in sod., 2010b). V Avstriji so s promocijo cepljenja uspeli dvigniti delež cepljenih na več kot 90 % (leta 1980 je bilo cepljenih 6 % ljudi), kar se odraža s padcem incidence KME v zadnjih letih (Kunz, 2003).

Za zaščito pred KME je zelo pomembna osveščenost ljudi o možnostih za zavarovanje pred boleznijo. Pomembno je, da zmanjšamo možnost vboda klopa na področjih, kjer je virus KME prisoten. To možnost lahko zmanjšamo z nošenjem svetlih oblačil (dolgi rokavi in dolge hlače zataknjene v nogavice), uporabo repellentov, tuširanjem in pregledovanjem telesa po obisku rizičnih območij. Pritrjenega klopa je potrebno čim hitreje odstraniti (Grgič-Vitek in Klavs, 2011). Pomembno je, da mleko pred zaužitjem toplotno obdelamo, saj se lahko z virusom KME okužimo tudi z zaužitjem surovega mleka (Ružek in sod., 2010).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

V raziskavo smo vključili vzorce serumov in plazme bolnikov, ki so bili med leti 2003 in 2013 zdravljeni zaradi okužbe z virusom KME, v različnih slovenskih bolnišnicah. Uporabili smo ostanke prvotnih vzorcev, ki so bili na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani poslani za laboratorijsko potrditev okužbe z virusom KME. Vzorce v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in WHO laboratoriju hranijo na -20 °C. Izbrali smo tiste vzorce bolnikov, ki so bili odvzeti v prvi viremični fazи KME. To pomeni, da v vzorcu po seroloških preiskavah ni bilo prisotnih protiteles proti virusu KME ali pa je vseboval specifična protitelesa razreda IgM.

#### 3.2 METODE

##### 3.2.1 Izolacija celokupne RNK

Iz kliničnih vzorcev serumov in plazme bolnikov s KME smo osamili celokupno RNK s kompletom QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Delo smo opravljali v biološki komori za varno delo II. stopnje (laminarij), pri sobni temperaturi. Pri delu smo uporabljali avtoklavirane pripomočke (epruvetke in pipetne nastavke) ter si med delom večkrat zamenjali rokavice.

Delovno površino in pipete smo pred začetkom dela obrisali z reagentom RNaseZap® (Life Technologies™, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki inaktivira morebitne prisotne ribonukleaze (RNaze).

Klinične vzorce smo pred začetkom izolacije odmrznili in na kratko vorteksirali. Pripravili smo 1,5 ml epruvetko in vanjo odpipetirali 560 µl pripravljenega pufra za lizo AVL, ki hkrati tudi inaktivira RNaze v vzorcu in tako zagotovi izolacijo intaktne virusne RNK. Dodali smo 5,6 µl nosilca RNK, ki je bil predhodno pripravljen in shranjen pri -20 °C. Nosilec RNK izboljša vezavo RNK na membrano. V epruvetko smo dodali 140 µl vzorca

in jo na kratko vorteksirali. Inkubirali smo pri sobni temperaturi 10 minut in nato kratko centrifugirali. Dodali smo 560 µl etanola (96 – 100 %) ter tako zagotovili optimalne razmere, za vezavo RNK na membrano. Vsebino smo 15 sekund vorteksirali in na kratko centrifugirali. 630 µl lizata smo prenesli v kolumno z membrano, kjer se je RNK med centrifugiranjem adsorbirala na membrano iz silika-gela. Centrifugirali smo 1 minuto pri 8000 obratih/minuto. Kolumno z membrano smo prenesli v novo zbiralno epruvetko, staro zbiralno epruvetko pa smo zavrgli. Ponovno smo odvzeli 630 µl lizata (preostanek), ga prenesli v kolumno z membrano, centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/minuto ter kolumno z membrano prenesli v novo zbiralno epruvetko (staro zbiralno epruvetko smo zavrgli). Na membrano smo nanesli 500 µl pufra AW1 za spiranje in centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/minuto. Kolumno z membrano smo prenesli v novo zbiralno epruvetko, staro zbiralno epruvetko smo zavrgli. Na membrano smo nanesli 500 µl pufra za spiranje AW2 in centrifugirali 3 minute pri 14000 obratih/minuto. Kolumno z membrano smo prenesli v novo 1,5 ml epruvetko. Pufra AW1 in AW2 odstranita nečistoče, ki bi lahko inhibirale reakcijo PCR. Nato smo dodali 60 µl elucijskega pufra AVE, s katerim smo eluirali izolirano, čisto RNK (brez prisotnih beljakovin, nukleaz, inhibitorjev in drugih nečistoč) ter inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi in centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/minuto. Kolumno z membrano smo zavrgli in izolirano RNK shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

Po končanem delu smo komoro in pripomočke, ki smo jih uporabljali razkužili s 5 % natrijevim hipokloridom in sterilizirali z UV svetlobo.

### **3.2.2 Kvantitativni RT-PCR v realnem času za določanje virusnega bremena KMEV**

Za dokazovanje virusne RNK in ugotavljanje virusnega bremena virusa KME v kliničnih vzorcih bolnikov smo uporabili enostopenjski kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR) v realnem času. S parom začetnih oligonukleotidov F-TBE 1 (nukleotidno zaporedje: 5'-GGGCGGTTCTTGTCTCC-3') in R-TBE 1 (nukleotidno zaporedje: 5'-ACACATCACCTCCTTGTCAAGACT-3'), ki sta homologna zaporedju nekodirajoče regije, na 3' koncu virusnega genoma smo pomnožili 67 bp dolg odsek virusnega genoma. Kot

sondo smo uporabili TBE-probe-WT (nukleotidno zaporedje: 5'-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-3'), ki se veže na tarčno zaporedje med začetnima oligonukleotidoma. Ta je na 5' koncu označena s fluoroforom FAM, na 3' koncu pa ima vezan dušilec TAMRA. Da bi preprečili lažno negativne rezultate (prisotnost inhibitorjev), smo v vsaki reakciji PCR preverjali možnost inhibicije. V ta namen smo uporabili interno kontrolo, sintetični RNK transkript, ki se je od tarčnega zaporedja divjega tipa virusa KME razlikovala le v zaporedju, kamor nalega sonda. Za interno kontrolo smo uporabili sondu YFP3 (nukleotidno zaporedje: 5'-ACACAGACCCACTACCACCGAGTGG-3'), ki je na 5' koncu označena s fluoroforom JOE, na 3' koncu pa ima vezan dušilec TAMRA (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

Uporabili smo komplet reagentov TaqMan®Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems®, Life Technologies, Carlsbad, California, ZDA). Reakcija je potekala v aparaturi Applied Biosystems® 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems® Life Technologies, Carlsbad, California, ZDA).

V vsako reakcijo smo vključili standarde z znanimi koncentracijami virusne RNK: STD 5:  $10^{-8}$  ( $4 \times 10^5$  kopij/reakcijo), STD 4:  $10^{-9}$  ( $4 \times 10^4$  kopij/reakcijo), STD 3:  $10^{-10}$  ( $4 \times 10^3$  kopij/reakcijo), STD 2:  $10^{-11}$  ( $4 \times 10^2$  kopij/reakcijo), STD 1:  $10^{-12}$  ( $4 \times 10^1$  kopij/reakcijo). Kot negativno kontrolo smo uporabili vodo.

Reakcijska mešanica je vsebovala:

5 µl 4-krat koncentrirane reakcijske mešanice, ki vsebuje ustrezni puferski sistem, MgSO<sub>4</sub>, dNTP-je in stabilizatorje (TaqMan®Fast Virus 1-Step Master Mix);  
0,4 µl začetnega oligonukleotida F-TBE1 (50 µM);  
0,4 µl začetnega oligonukleotida R-TBE1 (50 µM);  
0,3 µl sonde TBE-probe-WT (20 µM);  
0,3 µl sonde YFP3 (20 µM);  
2 µl interne kontrole TBE IC ( $5 \times 10^3$  kopij/reakcijo= $10^{-10}$ );  
6,6 µl sterilne deionizirane vode;  
5 µl virusne RNK.

Končni volumen reakcijske mešanice je bil 20 µl.

Reakcija je bila sestavljena iz različnih temperaturnih ciklov: najprej je potekal reverzni prepis virusne RNK v cDNK, 5 minut pri 50 °C. Sledila je reakcija v 40 temperaturnih ciklih:

- inaktivacija reverzne transkriptaze ter aktivacija polimeraze: 20 sekund pri 95 °C;
- denaturacija hibridne dvojnovijačne RNA/cDNK: 3 sekunde pri 95 °C;
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov in sonde ter podaljševanje tarčnega odseka: 30 sekund pri 60 °C.

Po končani reakciji smo opravili analizo rezultatov z računalniškim programom. Le-ta je na podlagi uporabljenih standardov izrisal umeritveno krivuljo, določil fluorescenčni prag in izračunal koncentracijo virusne RNK v reakcijski mešanici. Kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linijo fluorescenčnega praga ( $C_t$ ). Za izračun izhodne količine virusne RNK v vzorcu (virusno breme) smo uporabili spodnjo formulo (1).

$$\frac{\text{kopij RNK}}{\text{ml}} = \frac{(\text{kopij RNK}/\text{reakcijo}) \times \text{elucijski volumen} (\mu\text{l})}{\text{volumen RNK v reakciji} (\mu\text{l}) \times \text{delovni volumen vzorca} (\text{ml})}$$

...(1)

### **3.2.3 Pomnoževanje dela genoma virusa KME z metodo RT-PCR**

V vzorcih celokupne RNK smo dokazali prisotnost RNK virusa KME z metodo qRT-PCR. Le-te vzorce smo uporabili za pomnoževanje dveh delov genoma virusa KME z zapisi za beljakovini NS5 in E. Za sekveniranje smo potrebovali ustrezeno velike pridelke PCR, zato smo izvedli enostopenjski RT-PCR.

#### **3.2.3.1 Pomnoževanje tarčnega dela genoma za zapis beljakovine NS5 virusa KME**

Za pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine NS5 smo uporabili začetna oligonukleotida: TBE-7547 (nukleotidno zaporedje: 5'-CTGACACGTTGTGGACGATG-3') in TBE-c8732 (nukleotidno zaporedje: 5'-AACACTCTGCTGTCCGAAAG-3'), ki pomnožujeta 1165 bp dolg tarčni odsek genoma virusa KME.

Uporabili smo komercialni komplet reagentov SuperScript®III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Pomnoževanje je potekalo v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Reakcijska mešanica je vsebovala:

25 µl 2-krat koncentriranega reakcijskega pufra;  
1 µl začetnega oligonukleotida TBE-7547 (20 µM);  
1 µl začetnega oligonukleotida TBE-c8732 (20 µM);  
2 µl encimske mešanice SSIII RT/Platinum®Taq Mix;  
16 µl sterilne deionizirane vode;  
5 µl virusne RNK.

Končni volumen reakcijske mešanice je bil 50 µl.

Reverzni prepis RNK v cDNK je potekal 45 minut pri 50 °C. Pet minut pri 94 °C je potekala inaktivacija reverzne transkriptaze in ločevanje nastale RNK-cDNA dvojnovijačnice. Sledila je reakcija v 40 temperaturnih ciklih:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C;
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 55 °C;
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuto pri 68 °C.

Končno podaljševanje začetnih oligonukleotidov je potekalo 10 minut pri 68 °C. Na koncu se je reakcijska mešanica ohladila na 4 °C.

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

### 3.2.3.2 Pomnoževanje tarčnega dela genoma za zapis beljakovine E virusa KME

Za pomnoževanje dela genoma za zapis beljakovine E smo uporabili začetna oligonukleotida ENV-3F (nukleotidno zaporedje: 5'-TGAGGGGAAGCCTTCAAT-3') in ENV-3R (nukleotidno zaporedje: 5'-TCATGTTCAGGCCAACCA-3'), ki pomnožujeta 1309 bp dolg tarčni odsek genoma virusa KME.

Uporabili smo komercialni komplet reagentov SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Pomnoževanje je potekalo v aparaturi Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Reakcijska mešanica je vsebovala:

25 µl 2-krat koncentriranega reakcijskega pufra;  
1 µl začetnega oligonukleotida ENV-3F (50 pM);  
1 µl začetnega oligonukleotida ENV-3R (50 pM);  
1 µl encimske mešanice RT/Platinum®Taq Mix;  
12 µl sterilne deionizirane vode;  
10 µl virusne RNK.

Končni volumen reakcijske mešanice je bil 50 µl.

Reverzni prepis RNK v cDNK je potekal 30 minut pri 50 °C. Dve minuti pri 94 °C je potekala inaktivacija reverzne transkriptaze in ločevanje nastale RNK-cDNA dvojnovijačnice. Sledila je reakcija v 45 temperaturnih ciklih:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C;
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuto pri 56 °C;
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 1 minuto 30 sekund pri 68 °C.

Končno podaljševanje začetnih oligonukleotidov je potekalo 5 minut pri 68 °C. Na koncu se je reakcijska mešanica ohladila na 4 °C.

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

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

Pridelke PCR smo dokazali z vodoravno elektroforezo v 2 % agaroznem gelu (agarosa GellyPhor®LE, Euroclone, Milano, Italija). Gel smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico zatehtali 1 gram agaroze in dodali 50 ml 1-krat koncentriranega TAE pufra (Tris acetat EDTA pufer, ki vsebuje Tris bazo, natrijev acetat, natrijev klorid in EDTA; pH

je 8,3). Raztopini smo dodali 5 µl barvila SYBR® Safe DNK Gel Stain (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki nam je omogočal zaznavanje DNK v agaroznem gelu. Sledilo je segrevanje raztopine do vrelišča v mikrovalovni pečici. Raztopljen gel smo prelili v plastičen nosilec z nameščenimi glavnički in odstranili zračne mehurčke. Ko se je gel strdil smo ga prenesli v elektroforezno kad, ki smo jo napolnili z 1-krat koncentriranim TAE pufrom tako, da je bil celoten gel prekrit s pufrom.

V prvo vdolbinico gela smo nanesli 2 µl molekularnega označevalca - 100 bp Plus DNA Ladder (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Nemčija), ki smo ga izbrali glede na velikost pridelkov PCR. V preostale vdolbinice gela smo nanesli po 10 µl pridelka PCR, katerim smo dodali 2 µl nosilne raztopine Loading Dye Solution (6x brom-fenol modrilo) (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Nemčija), ki je povečala težo pridelka in mu omogočila, da se je posedel na dno vdolbinice. Elektroforeza je potekala 45 minut pri napetosti 80 V, pri sobni temperaturi. Gel smo pregledali na ultravijoličnem presvetljevalniku in fotografirali z aparaturom GelDoc-It® TS Imaging System (Ultra-Violet Products, Upland, Kalifornija, ZDA).

### **3.2.5 Čiščenje pridelkov PCR**

Pridelkom PCR smo odstranili ostanke polimeraze Taq, začetnih oligonukleotidov in deoksiribonukleotidov, saj ovirajo normalen potek sekvenčne reakcije. Za čiščenje pridelkov PCR smo uporabili komercialni komplet reagentov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA). Čiščenje temelji na vezavi DNK na delce silicijevega dioksida v membrani posebne kolone in spiranju s pufri različnih ionskih jakosti.

Pri elektroforezi pridelkov PCR na agaroznem gelu smo pri nekaterih vzorcih opazili nespecifične pridelke reakcije PCR, zato smo jih nanesli na 2 % agarozni gel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Elektroforeza je potekala 40 minut pri napetosti 80 V, pri sobni temperaturi. Nato smo iz agaroznega gela pod modro lučjo izrezali želen pridelek PCR, ga prenesli v 1,5 ml epruvetko in stehtali. Na

ta način smo v proces čiščenja pridelkov PCR prenesli le specifične pridelke in se znebili nespecifičnih.

V epruvetko smo dodali enako količino pufra MBS (angl. Membrane Binding Solution) (10 µl pufra MBS na 10 mg gelčka), kot je bila teža izrezanega gela in segrevali pri 56 °C, dokler se gel ni popolnoma raztopil. Pridelkom PCR brez nespecifičnih pridelkov, smo dodali enako količino pufra MBS neposredno v epruvetko s pridelkom PCR. Nato smo celotno vsebino prenesli v epruvetko z membrano in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje pri 14000 obratih/minuto - DNK, ki smo jo s PCR pomnožili, se je vezala na membrano. Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni epruvetki smo zavrgli.

Sledilo je spiranje nečistoč. Na membrano smo nanesli 700 µl pufra MWS (angl. Membrane Wash Solution) ter centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni epruvetki smo zavrgli. Na membrano smo nanesli 500 µl pufra MWS ter centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih/minuto. Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni epruvetki smo zavrgli. Ponovno smo centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto, brez notranjega pokrova centrifuge, kar je omogočilo odstranjevanje alkoholnih hlapov. Nato smo membrano prenesli v označeno, čisto 1,5 ml epruvetko. Elucijo vezane DNK smo dosegli tako, da smo dodali 50 µl nukleaze proste vode (angl. Nuclease-Free Water), inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Očiščene pridelke PCR smo shranili v hladilniku pri 4 °C do nadaljnje uporabe oz. pri -20 °C za dolgotrajno shranjevanje.

### **3.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR**

Pri sekvenčni reakciji smo za vsak pridelek reakcije PCR uporabili en začetni oligonukleotid tako, da smo dobili nukleotidno zaporedje prepisa obeh verig pridelkov PCR. Reakcijska mešanica je vsebovala fluorescentno označene dideoksi terminatorje, mešanico neoznačenih dNTP-jev in Taq polimerazo.

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili komercialni komplet reagentov BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Reakcija je potekala v aparaturi Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Life Technologies, Carlsbad, California, ZDA).

Reakcijska mešanica je vsebovala:

5,7 µl dvakrat destilirane vode;  
2 µl reakcijskega pufra (pri vzorcih slabše kvalitete nismo dodali reakcijskega pufra);  
1,3 µl začetnega oligonukleotida;  
5 µl DNK;  
4 µl BigDye Terminator v3.1 (pri vzorcih slabše kvalitete smo uporabili 8 µl BigDye Terminator v3.1).

Končni volumen reakcijske mešanice je bil 18 µl.

Sekvenčna reakcija je potekala v 40 temperaturnih ciklih, ki so si sledili:

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

Sledilo je ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

Pridelke sekvenčne reakcije smo shranili pri 4 °C.

### **3.2.7 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije**

Za čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije smo uporabili komercialni komplet reagentov BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Čiščenje temelji na vezavi ostankov reakcije (ioni, nevezana barvila, dNTP-ji) na silikatne delce, ki se med centrifugiranjem posedejo na dno epruvetke.

Pred uporabo smo reagente BigDye® XTerminator™ segreli na sobno temperaturo. V vsako luknjico mikrotitrsko ploščico z vzorcem smo dodali 90 µl raztopine SAM™, ki izboljša delovanje reagenta XTerminator. Reagent XTerminator smo pred uporabo

vorteksirali 10 sekund ter pri pipetiranju pazili, da se silikatni delci v raztopini niso posedli. Med pipetiranjem smo reagent XTerminator večkrat vorteksirali. Nato smo v vsako luknjico z vzorcem dodali 20 µl reagenta XTerminator, ki je vezal nevezane ostanke reakcije in tako preprečil nespecifično vezavo barvil na pridelke sekvenčne reakcije.

Mikrotitrsko ploščico smo zlepili s PCR-folijo in stresali 30 minut pri 2000 obratih/minuto in nato centrifugirali 2 minuti pri 1000 obratih/minuto. Tako pripravljene vzorce za sekveniranje smo shranili pri 4 °C.

Pridelkom sekvenčne reakcije smo določili nukleotidno zaporedje z avtomatskim sekvenatorjem 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

### **3.2.8 Analiza nukleotidnih zaporedij**

Nukleotidna zaporedja smo uredili s programskim orodje CLC Main Workbench (Promega, Madison, ZDA) ter analizirali s programskim orodjem MEGA 6.

Najprej smo uporabili podatke s končnico .ab1, ki vsebujejo informacijo za fluorescenčne signale pri posameznih nukleotidih. S programom CLC Main Workbench smo sestavili nukleotidna zaporedja, ki smo jih dobili s sekvenčno reakcijo (zaporedja vseh verig DNK iz enega vzorca). Izrezali smo neberljiv začetek in konec. Nato smo preverili kvaliteto sekvenčne analize posameznih baz nukleotidnega zaporedja in upoštevali del zaporedja z jasnimi vrhovi fluorescenčnega signala. Poravnano in sestavljeni zaporedje smo preverili vzdolž verige zaradi morebitnih neujemanj.

Zaporedja smo shranili v formatu fasta.

Poravnavo nukleotidnih zaporedij (angl. alignment) in filogenetsko analizo smo naredili v programu Mega 6. Poravnavo smo izvedli z algoritmom Muscle, filogenetsko analizo pa z algoritmom Maximum likelihood, pri čemer smo izbrali GTR+G (angl. Generalised time-reversible + Gamma) model nukleotidne zamenjave in statistično analizo bootstrap s 1000

ponovitvami. Enakost nukleotidnih in prevedenih aminokislinskih zaporedij smo izračunali z algoritmom Maximum Composite Likelihood.

Pogoje filogenetske analize ter ločevanja v filogenetske podskupine smo določili glede na predhodno objavo Fajs in sod. (2012).

### **3.2.9 Statistična analiza**

Analizo rezultatov smo opravili s programskim paketom GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, ZDA) in SPSS 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ZDA). Za osnovni opis značilnosti smo uporabili aritmetično sredino in standardni odklon. Za testiranje razlik med dvema skupinama smo za numerične spremenljivke uporabili t-test oz. Mann-Whitneyev test. Za ugotavljanje razlik med več kot dvema skupinama numeričnih spremenljivk smo uporabili Kruskal-Wallisov test. Za primerjalno analizo nominalnih spremenljivk smo uporabili  $\chi^2$ -test. Kot statistično značilne smo upoštevali razlike z vrednostmi  $p < 0,05$ . Rezultate smo grafično prikazali z okvirji z ročaji; vodoravne črte znotraj okvirjev predstavljajo mediano. Pri analizi rezultatov smo uporabili desetiški logaritem ( $\log_{10}$ ) izmerjenih vrednosti virusnega bremena.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOKAZ GENOMA VIRUSA KME IN DOLOČITEV VIRUSNEGA BREMENA Z METODO qRT-PCR V REALNEM ČASU V VZORCIH BOLNIKOV

V raziskavo smo vključili 145 kliničnih vzorcev bolnikov s KME. Izbrali smo vzorce prve faze bolezni, kjer še niso bila prisotna protitelesa proti virusu KME (110 vzorcev) ali pa so bila prisotna le specifična protitelesa razreda IgM (35 vzorcev). Pregledali smo 145 vzorcev telesnih tekočin in sicer: 129 vzorcev serumov in 16 vzorcev plazme. Z metodo qRT-PCR v realnem času smo pomnožili virusno RNK in določili virusno breme (Preglednica 2).

Preglednica 2: Rezultati qRT-PCR v realnem času – dokaz virusne RNK v vzorcih bolnikov, kjer protitelesa so oz. niso bila prisotna (IgM -, IgG - ali IgM +, IgG -)

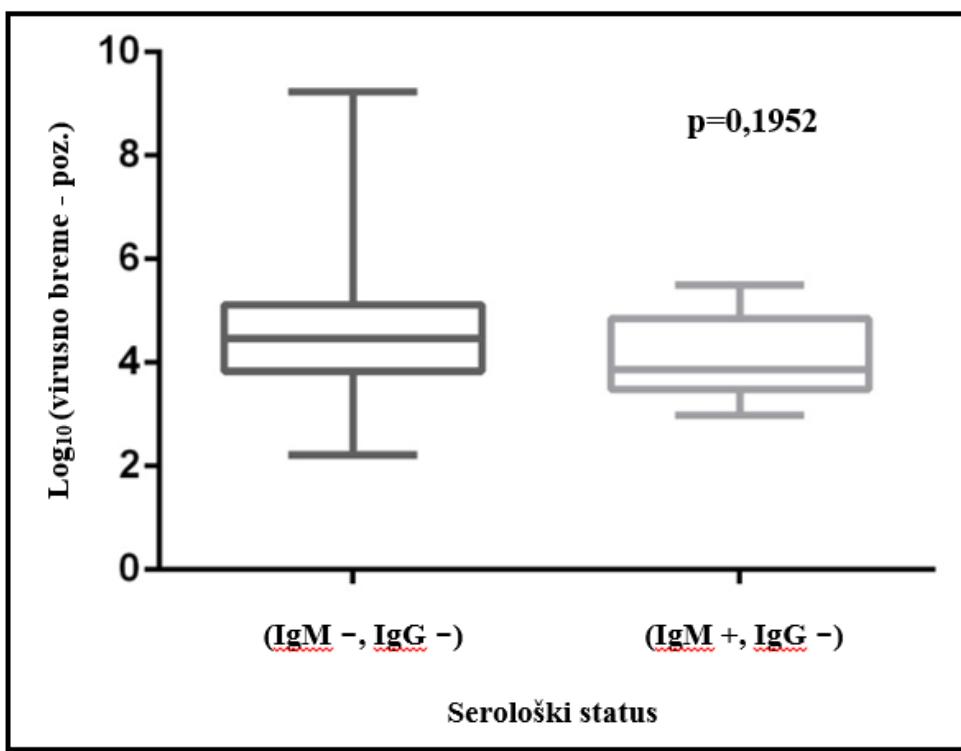
RT-PCR	št. vzorcev (IgM -, IgG -) (%)	št. vzorcev (IgM +, IgG -) (%)	skupaj
<b>poz.</b>	89 (80,9 %)	8 (22,9 %)	97 (66,9 %)
<b>neg.</b>	21 (19,1 %)	27 (77,1 %)	48 (33,1 %)
<b>skupno št. vzorcev</b>	110	35	145

#### 4.1.1 Virusno breme glede na prisotnost protiteles v kliničnih vzorcih bolnikov s KME

Virus smo dokazali v 89 (80,9 %) vzorcih bolnikov, kjer protitelesa proti virusu KME niso bila prisotna, in 8 (22,9 %) vzorcih bolnikov, kjer so bila prisotna specifična protitelesa razreda IgM. Razlika v številu pozitivnih vzorcev je statistično značilna ( $p > 0,001$ ).

Virusno breme je višje v vzorcih, kjer protitelesa proti virusu KME niso bila prisotna ( $7,33 \pm 8,25 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon  $2,21\text{--}9,22 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca) v primerjavi z vzorci, kjer so bila prisotna protitelesa razreda IgM ( $4,77 \pm 5,03 \log_{10}$  kopij

RNK/ml vzorca, razpon 2,97–5,50  $\log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca), vendar razlika ni statistično značilna ( $p=0,1952$ ) (slika 8).



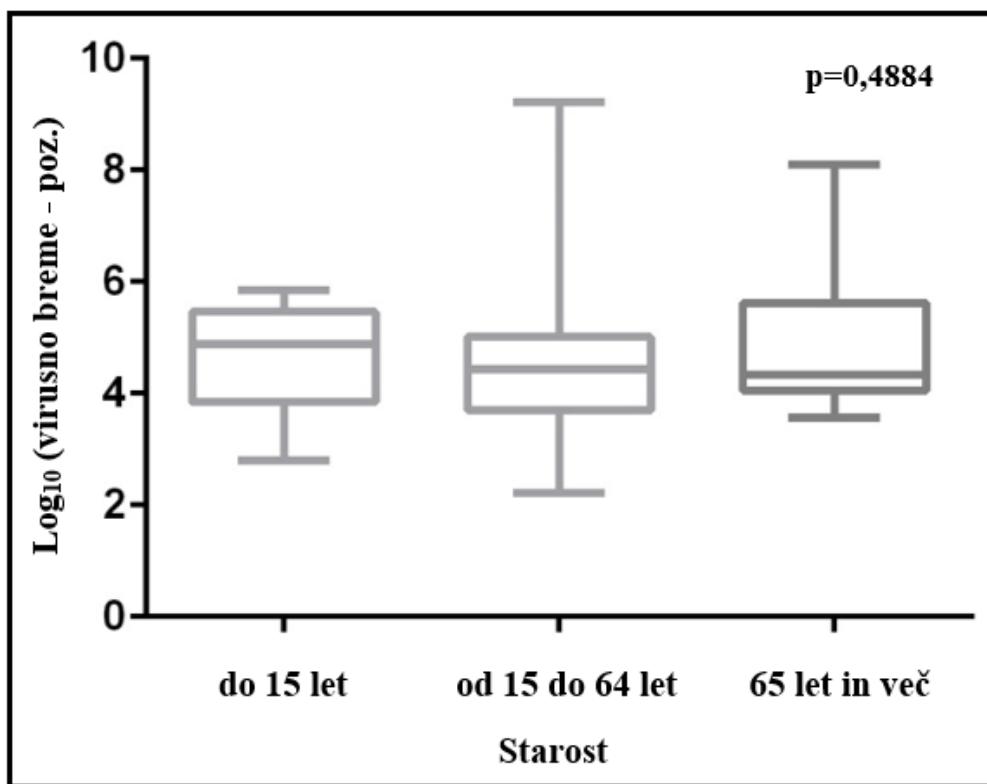
Slika 8: Primerjava porazdelitev virusnega bremena, glede na prisotnost protiteles v kliničnih vzorcih bolnikov s KME

#### 4.1.2 Virusno breme glede na starost bolnikov s KME

Virusno breme smo primerjali glede na starostne skupine bolnikov okuženih z virusom KME. Bolnike smo razdelili v 3 starostne skupine in sicer: bolniki stari do 15 let, bolniki stari od 15 do 64 let in bolniki stari 65 let in več. Virusno RNK smo dokazali v 12 (100 %) vzorcih bolnikov, ki so bili stari do 15 let, v 69 (62,7 %) vzorcih bolnikov, ki so bili stari od 15 do 64 let in 16 (50 %) vzorcih bolnikov, ki so bili stari 65 let ali več.

Virusno breme je nekoliko višje pri bolnikih starih od 15 do 64 let ( $7,41 \pm 8,30 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon 2,21–9,22  $\log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca) v primerjavi z bolniki starimi do 15 let ( $5,26 \pm 5,42 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon 2,80–5,85  $\log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca) ter bolniki, ki so stari 65 let ali več ( $6,91 \pm 7,50 \log_{10}$  kopij RNK/ml

vzorca, razpon 3,56–8,10  $\log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca), vendar razlika ni statistično značilna ( $p=0,4884$ ) (Slika 9).



Slika 9: Porazdelitev virusnega bremena, glede na starost bolnikov s KME

## 4.2 NUKLEOTIDNE ZNAČILNOSTI TARČNEGA ODSEKA BELJAKOVINE E VIRUSA KME, POMNOŽENEGA NEPOSREDNO IZ VZORCEV BOLNIKOV S KME

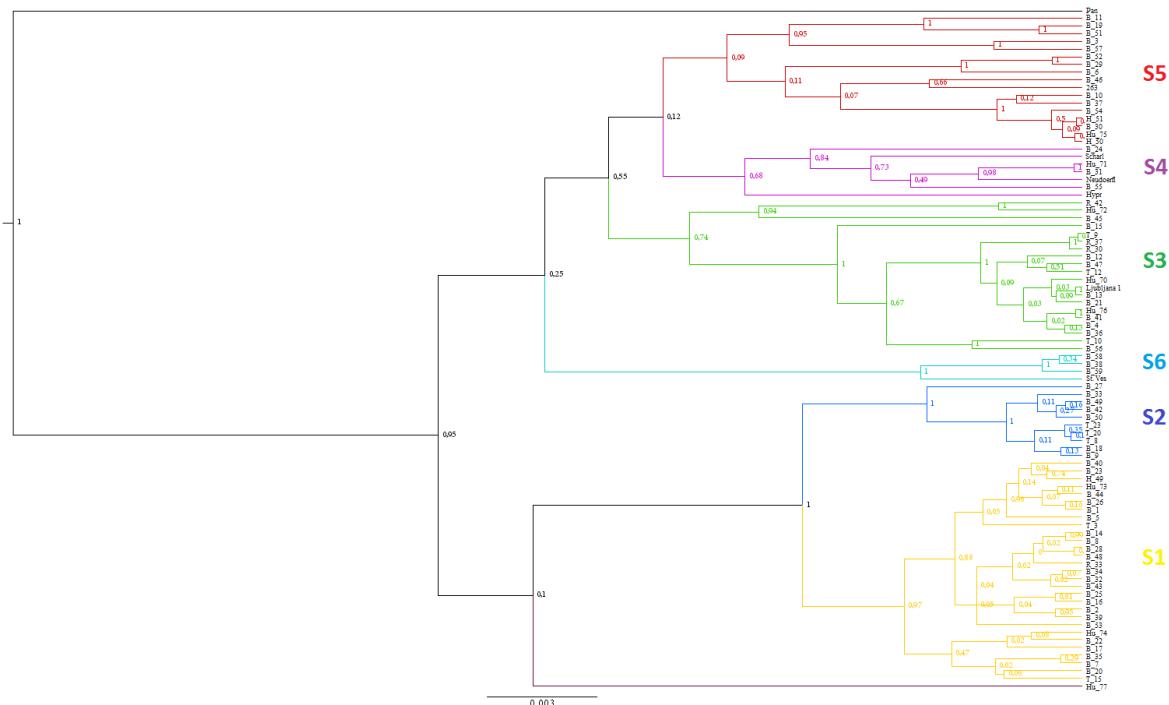
### 4.2.1 Filogenetska analiza tarčnega odseka beljakovine E

Tarčni odsek genoma virusa KME, ki kodira beljakovino E (dolžina 1272 bp), smo pomnožili neposredno iz kliničnih vzorcev 60 bolnikov, tarčni odsek beljakovine NS5 pa iz vzorcev 50 bolnikov. Ker smo pridobili več zaporedij, ki kodirajo beljakovino E in, ker so v preteklih študijah dokazali, da ni bistvene razlike v informativni vrednosti zaporedij za beljakovini E in NS5 (Fajs in sod., 2012) smo v nadaljne filogenetske analize vključili le nukleotidna zaporedja beljakovine E. Iz poravnav 60 nukleotidnih zaporedij tarčnega

odseka beljakovine E smo izrisali filogenetsko drevo z metodo Maximum Likelihood in modelom substitucije GTR+G.

Podobnost nukleotidnih zaporedij, ki kodirajo beljakovino E, je bila med 95,8 – 100 % medtem ko je bila podobnost aminokislinskih zaporedij med 98,1 – 100 %. Med zaporedji, ki so bila identična, smo izbrali po enega predstavnika za nadaljnje filogenetske analize.

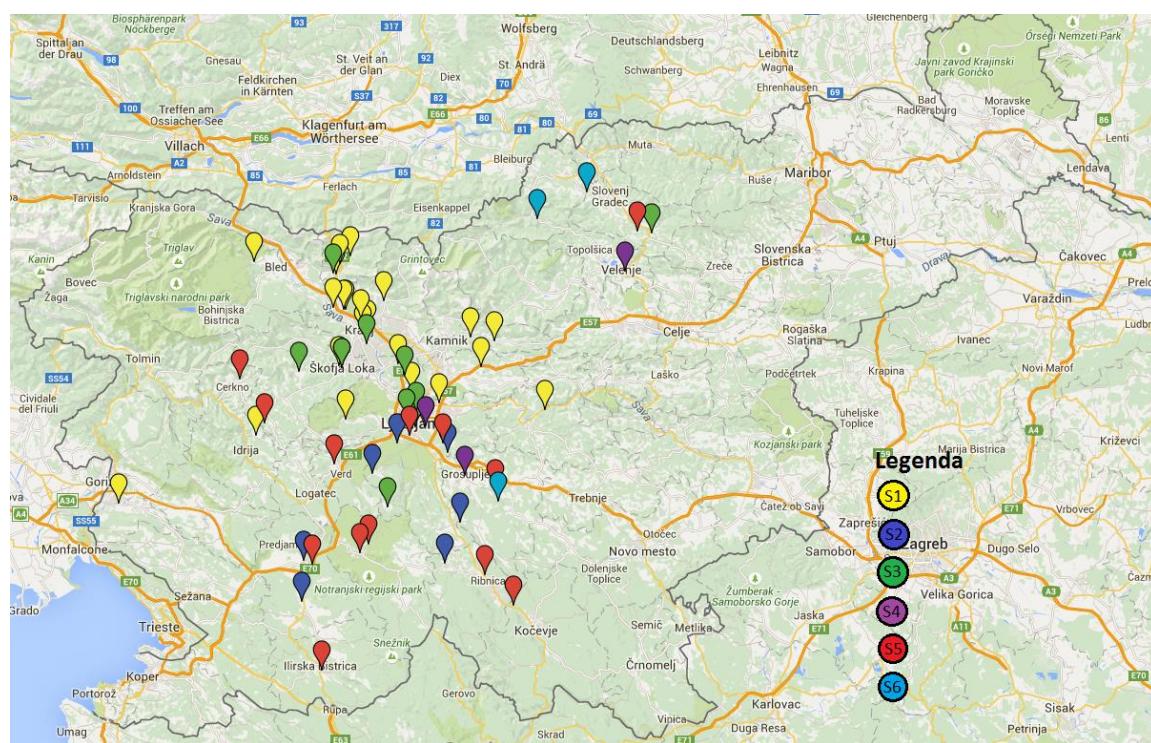
S filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij smo ugotovili, da se zaporedja združujejo v šest različnih skupin S1-S6. Skupine smo označili z različnimi barvami (Slika 10).



Slika 10: Filogenetsko drevo tarčnega odseka beljakovine E (1272 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopor, glodavcev in bolnikov. Oznaka T predstavlja vzorec klopor, R vzorec glodavca, B vzorec bolnika iz naše raziskave in H vzorec bolnika iz predhodnjih raziskav (pred letom 2003). Številke poleg oznak T, R, B in H pomenijo številko izolata. Kot referenčne seve virusa KME smo uporabili zaporedja iz genske banke GenBank: Pan – ruski izolat virusa KME (AF091015), 263 – češki izolat virusa KME (TEU27491), Scharl – avstrijski izolat virusa KME (AF091017), Ljubljana 1 – slovenski izolat virusa KME (AF091012), Neudoerfl – prototipni sev evropskega podtipa virusa KME (TEU27495), Hypr – slovaški izolat virusa KME (TEU39292), St.Ves – hrvaški izolat virusa KME (AF091018). Oznake na vejah predstavljajo posteriorne verjetnosti (večja slika: priloga A)

#### 4.2.2 Povezava filogenetske analize in zemljepisnega porekla vzorcev

Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med razlikami v nukleotidnih zaporedjih in zemljepisnim poreklom vzorcev, iz katerih smo uspešno pomnožili tarčni odsek beljakovine E, smo na zemljevidu Republike Slovenije označili mesto stalnega prebivališča bolnika z barvo, ki ustreza filogenetski skupini, označeni na filogenetskem drevesu. Ugotovili smo, da se večina vzorcev združuje v skupine glede na njihov zemljepisni izvor. Skupini S1 in S3 sestavljajo predvsem zapisi, ki smo jih pridobili iz vzorcev z zemljepisnim izvorom iz severnega in osrednjega dela Slovenije. Skupine S2, S4 in S5 so sestavljene iz zapisov, ki smo jih pridobili predvsem iz vzorcev z zemljepisnim izvorom iz osrednjega in južnega dela Slovenije. Skupino S6, kjer smo dobili 3 izolate, sestavljata dva zapisa iz severnega področja Slovenije (Koroška) in en zapis iz osrednjega področja Slovenije (Grosuplje) (Slika 11).

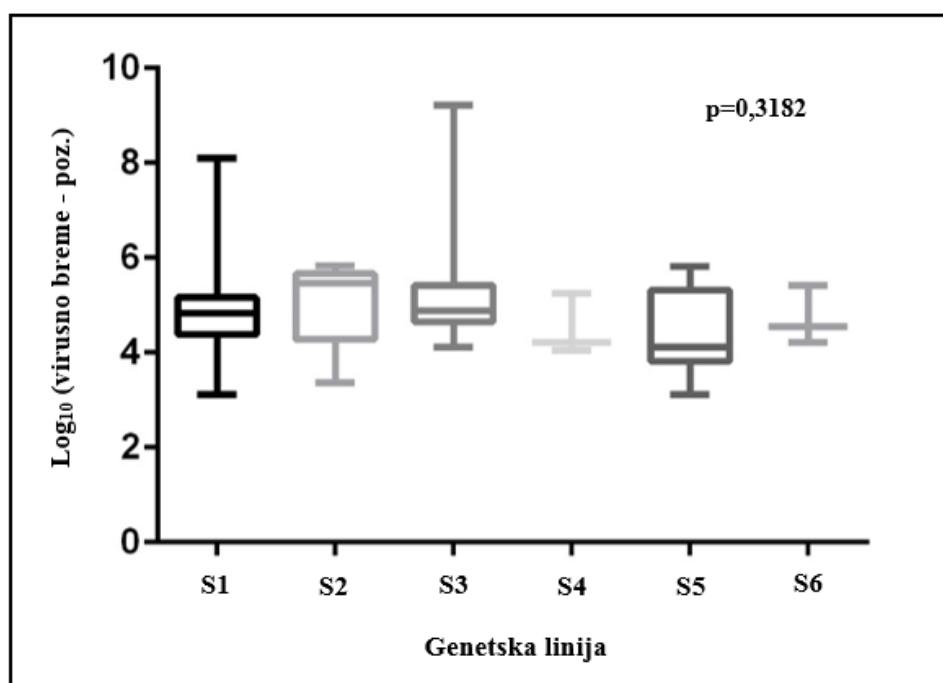


Slika 11: Povezava med zemljepisno razporeditvijo vzorcev in filogenetskimi skupinami, ki temelji na tarčnem odseku beljakovine E virusa KME, pomnoženega neposredno iz vzorcev bolnikov. Legenda prikazuje barvo izolatov iz različnih filogenetskih skupin

#### 4.2.3 Virusno breme glede na filogenetsko skupino virusov

Zanimalo nas je ali med seboj najbolj sorodni virusi, ki pripadajo določeni filogenetski skupini, v telesnih tekočinah bolnikov dosegajo višje oz. nižje virusno breme. Dokazali smo 24 virusnih RNK, ki pripadajo skupini S1; 7 virusnih RNK, ki pripadajo skupini S2; 10 virusnih RNK, ki pripadajo skupini S3; 3 virusne RNK, ki pripadajo skupini S4; 13 virusnih RNK, ki pripadajo skupini S5 in 3 virusne RNK, ki pripadajo skupini S6.

Virusno breme je nekoliko višje pri filogenetski skupini virusov S3 ( $5,36 \pm 1,52 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon  $4,11\text{--}9,22 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca) v primerjavi s filogenetskimi skupinami virusov S1 ( $4,94 \pm 1,00 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon  $3,12\text{--}8,11 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca), S2 ( $5,03 \pm 0,90 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon  $3,36\text{--}5,83 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca), S4 ( $4,51 \pm 0,65 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon  $4,06\text{--}5,25 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca), S5 ( $4,93 \pm 0,83 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon  $3,12\text{--}5,82 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca) in S6 ( $4,73 \pm 0,62 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca, razpon  $4,22\text{--}5,42 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca), vendar razlika ni statistično značilna ( $p=0,3182$ ) (Slika 12).



Slika 12: Porazdelitev virusnega bremena pri bolnikih s KME, glede na filogenetske skupine virusov

## 5 RAZPRAVA

Virus klopnega meningoencefalitisa (KMEV) je predstavnik rodu *Flavivirus*, ki pri ljudeh povzroči vnetje osrednjega živčevja. Virus se v naravi prenaša med prenašalci, njihovimi gostitelji in naključnimi gostitelji. Poznamo tri podtipe virusa KME: daljnovenzhodni, sibirski in evropski. V Sloveniji je klop vrste *Ixodes ricinus* prenašalec sevov virusa KME, evropskega podtipa (Dobler in sod., 2012; Mansfield in sod., 2009). Fajs in sod. (2012) so dokazali, da je v Sloveniji prisotnih več genetskih različic virusa KME, značilnih za določena zemljepisna območja. Potrdili so obstoj sedmih filogenetskih skupin in ugotovili, da med prenašalci oziroma gostitelji istega zemljepisnega območja prevladuje enaka genetska različica virusa KME (Fajs in sod., 2012). Človek se z virusom najpogosteje okuži z vbodom okuženega klopa, redkeje z zaužitjem surovega mleka in mlečnih izdelkov okuženih živali (Lindquist in Vapalahti, 2008). Po okužbi z evropskim podtipom virusa KME je potek bolezni dvofazen. V prvi, viremični fazì bolezni se pojavijo gripi podobni znaki. Sledi prosto obdobje brez simptomov. Za drugo, akutno fazò bolezni so značilni nevrološki zapleti (meningitis, meningoencefalitis, meningoencefalomielitis) (Lindquist in Vapalahti, 2008; Bogovič in sod., 2010). Bolezen, ki jo povzroči evropski podtip virusa KME, lahko poteka tudi v abortivni oziroma febrilni oblikì, kjer se pojavi le prva faza bolezni (Hudopisk in sod., 2013; Ružek in sod., 2010). Za diagnostiko KME so najprimernejše serološke metode, s katerimi dokazujemo specifična protitelesa razreda IgM in IgG v telesnih tekočinah bolnikov. V prvi fazì bolezni protitelesa ne moremo dokazati, lahko pa okužbo potrdimo z neposrednim dokazom virusne RNK v vzorcih krvi oz. seruma bolnika z molekularnimi metodami. Saksida in sod. (2005) so ugotovili, da je neposredno dokazovanje virusnega genoma s PCR uporabna diagnostična metoda za dokazovanje okužbe z virusom KME v vzorcih krvi in serumov, ki so bili odvzeti v prvi fazì bolezni, ko protitelesa še niso prisotna. Metoda qRT-PCR v realnem času se sicer v rutinski diagnostiki uporablja redko, saj večina bolnikov obišče zdravnika v drugi fazì bolezni, ko se že pojavijo nevrološki zapleti in virusa v telesnih tekočinah ni več, prisotna pa so specifična protitelesa v serumu in likvorju bolnikov (Lindquist in Vapalahti, 2008; Saksida in sod., 2005; Schwaiger in Cassinotti, 2003).

## 5.1 DOKAZ VIRUSA KME V KLINIČNIH VZORCIH BOLNIKOV S KME

Z magistrsko nalogo smo želeli dokazati virus KME v kliničnih vzorcih bolnikov in določiti virusno breme. V raziskavo smo vključili vzorce bolnikov, pri katerih smo okužbo z virusom KME dokazali v letih 2003 do 2013. Uporabili smo vzorce telesnih tekočin (serum in plazma) bolnikov, ki so obiskali zdravnika še pred pojavom nevroloških zapletov, v prvi fazi bolezni. V našo raziskavo smo vključili 110 kliničnih vzorcev, kjer protitelesa proti virusu KME še niso bila prisotna, ter 35 vzorcev, kjer so bila prisotna protitelesa razreda IgM, ne pa tudi razreda IgG. Virus KME smo v kliničnih vzorcih bolnikov dokazali z molekularno metodo qRT-PCR v realnem času. Virus KME smo uspešno pomnožili v 89 (80,9 %) vzorcih, kjer protitelesa niso bila prisotna. S tem smo potrdili našo hipotezo, da bomo pri večini vzorcev dokazali virus KME. Virus KME smo dokazali le v 8 (22,9 %) vzorcih, kjer so bila protitelesa že prisotna. S to študijo smo potrdili ugotovitve raziskave, ki so jo izvedli Saksida in sod. (2005), ter dokazali, da je metoda qRT-PCR v realnem času uspešna za dokazovanje virusa v zgodnji, prvi fazi bolezni. V omenjeni študiji so sicer z molekularnimi metodami virusno RNK dokazali v vseh vzorcih, ki so bili odvzeti pred pojavom protiteles, po pojavu specifičnih protiteles razreda IgM pa je število pozitivnih vzorcev upadlo vsaj za tretjino. Razlogov za nekoliko manjšo uspešnost naše raziskave pri pomnoževanju virusne RNK je lahko več. V naši raziskavi smo za dokazovanje virusne RNK uporabili enostopenjski RT-PCR v realnem času, v raziskavi, ki so jo izvedli Saksida in sod., pa so uporabili klasično različico RT-PCR z naknadnim vgnezdenim PCR, s katerim so še povečali občutljivost metode. Poleg tega so v omenjeni raziskavi uporabili vzorce, ki so bili odvzeti v krajšem časovnem intervalu (2000-2003) in s tem zmanjšali vpliv razpada RNK v času shranjevanja. Vzorci, uporabljeni v naši raziskavi, so bili večinoma shranjeni pri -20 °C. Nekateri vzorci so bili tudi že večkrat odtajani in ponovno zamrzjeni, kar bi lahko povzročilo razpad virusne RNK. Ker podatkov o kliničnem poteku bolezni in poteku zdravljenja nimamo, tudi ne vemo, ali so bili klinični vzorci bolnikov s KME, vključeni v našo raziskavo, odvzeti v prvi fazi bolezni, ali morda že na meji z drugo fazo bolezni, ko viremija ni bila več prisotna oziroma so bile koncentracije virusne RNK prenizke, da bi jih lahko dokazali z uporabljeno metodo. Na uspešnost neposrednega dokazovanja virusne RNK v kliničnih vzorcih pomembno vpliva tudi čas, ki preteče od odvzema vzorca do transporta vzorca v

laboratorij in ustreznega shranjevanja vzorca v laboratoriju. Vse to lahko podaljša čas delovanja ribonukleaz in prispeva k večji razgradnji virusne RNK. Razlog za manjšo uspešnost pri pomnoževanju virusne RNK je lahko tudi nepazljivost pri izolaciji celokupne RNK, kjer niso/nismo uspešno odstranili vseh ribonukleaz. Vse omenjene pomanjkljivosti so lahko vplivale na uspešnost dokazovanja virusne RNK in samo koncentracijo, ki smo jo izmerili v naši raziskavi. Kljub temu menimo, da bi se večini navedenih pomanjkljivosti težko izognili. Raziskavo smo namreč izvedli retrospektivno, saj smo vključili vzorce zbrane v obdobju 11 let (2003 do vključno 2013), da smo pridobili zadostno število vzorcev. Čeravno, je to prva raziskava, ki proučuje virusno breme pri večjem številu vzorcev bolnikov s KME in ne zgolj pri posameznih kliničnih primerih. Nekaterim omenjenim pomanjkljivostim bi se lahko izognili, če bi raziskavo izvedli prospektivno, kar pa je, vsaj v primeru bolezni kot je KME, časovno zamudno in težko izvedljivo. Potrebno bi bilo izredno usklajeno delovanje s kliniki infektologi, da bi pridobili primerno število vzorcev krvi, odvzetih v prvi fazi bolezni, ko so klinični znaki še zelo neznačilni. Takšen načrt raziskave bi zahteval tudi veliko finančnih sredstev, saj bi relativno draga metodo uporabili za testiranje potencialno okuženih bolnikov, ki so le v majhnem številu dejansko okuženi z virusom KME. Poleg tega, je Slovenija endemično območje za več klopnoprenosljivih povzročiteljev bolezni, ki se v začetku izrazijo s precej podobno klinično sliko – neznačilnim vročinskim stanjem po vbodu klopa (Avšič-Županc in sod., 1995a; Avšič-Županc in sod., 2009).

Menimo, da je metoda RT-PCR v realnem času primerna in uporabna v diferencialni diagnostiki vročinskih bolezni po vbodu klopa, še posebej na področjih, ki so endemična za več klopnoprenosljivih bolezni (Saksida in sod., 2005). To je največja raziskava dokazovanja virusa KME neposredno v kliničnih vzorcih do sedaj.

## 5.2 DOLOČITEV VIRUSNEGA BREMENA IN PRIMERJAVA GLEDE NA PRISOTNOST PROTITELES V KLINIČNIH VZORCIH BOLNIKOV S KME IN STAROST BOLNIKOV S KME

Skupno smo virusno RNK pomnožili pri 97 (66,9 %) vzorcih in določili virusno breme. Rezultate o virusnem bremenu smo računalniško obdelali ter primerjali virusno breme

glede na prisotnost protiteles v kliničnih vzorcih bolnikov s KME in starost bolnikov s KME. Višje virusno breme smo dokazali v vzorcih, kjer protitelesa proti virusu KME niso bila prisotna ( $7,33 \pm 8,25 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca) v primerjavi z vzorci, kjer so bila prisotna protitelesa razreda IgM ( $4,77 \pm 5,03 \log_{10}$  kopij RNK/ml vzorca), vendar razlika ni statistično značilna ( $p=0,1952$ ).

Rezultati naše raziskave kažejo tudi na to, da med višino virusnega bremena in starostjo bolnikov s KME ni značilne povezave. Virusno breme je nekoliko višje pri bolnikih starih od 15 do 64 let v primerjavi z bolniki starimi do 15 let ter bolniki, ki so stari 65 let ali več, vendar razlika ni statistično značilna ( $p=0,4884$ ). Zanimivo je, da smo v naši raziskavi virusno RNK dokazali v vseh vzorcih bolnikov, ki so bili stari do 15 let, medtem ko je v drugih dveh starostnih skupinah nismo dokazali v vseh vzorcih (virusno RNK smo dokazali v 62,7 % vzorcih bolnikov, ki so bili stari od 15 do 64 let in v 50 % vzorcih bolnikov, ki so bili stari 65 let ali več). Da bi potrdili statistično značilnost te ugotovitve in njen pomen, bi bilo potrebno testirati še večje število vzorcev bolnikov različnih starostnih skupin ter pridobiti podatke o trajanju bolezni do odvzema vzorca in samem poteku bolezni.

Pomanjkljivosti naše študije lahko vplivajo na virusno breme, ki je lahko nižje kot bi bilo sicer in so zato tudi razlike manjše oziroma neznačilne. Kljub temu, da nismo ugotovili značilnih povezav med virusnim bremenom in prisotnostjo protiteles v kliničnih vzorcih bolnikov s KME ter starostjo bolnikov s KME, so to zelo pomembni podatki. Informacij o višini virusnega bremena pri bolnikih s KME v literaturi namreč še ni zaslediti, zato bodo le-te v povezavi s kliničnimi podatki o poteku bolezni omogočile nadaljnje študije o povezanosti viroloških dejavnikov in patogeneze virusa KME. Naši rezultati bodo tako v povezavi s kliničnimi podatki v veliko pomoč pri ugotavljanju do katerega dneva bolezni je virus prisoten v telesnih tekočinah in ali virusno breme vpliva na sam potek ter obliko bolezni, morda tudi na dolžino prostega intervala med prvo in drugo fazo bolezni.

### 5.3 GENETSKA RAZNOLIKOST VIRUSA KME IN PRIMERJAVA FILOGENETSKIH SKUPIN GLEDE NA VIRUSNO BREME

Ker smo tudi v naši raziskavi želeli ugotoviti ali obstajajo genetske različice virusa KME, značilne za določena zemljepisna območja, smo pomnožili 1272 bp dolg tarčni odsek beljakovine E neposredno iz 60 vzorcev bolnikov s KME, ki smo jih pridobili od leta 2003 do leta 2013.

V preteklih raziskavah navajajo podatke o kroženju različnih podtipov virusa KME na enem območju, malo pa je informacij o kroženju genetskih različic virusa KME, enega podtipa znotraj posameznega območja (Han in sod., 2001; Haglund in sod., 2003). Fajs in sod. (2012) so pokazali, da v Sloveniji kroži več genetskih različic virusa KME istega podtipa. Genetska raznolikost virusa KME je zemljepisno razporejena. V svoji raziskavi so ugotavljali sedem filogenetskih skupin virusa KME. Pokazali so, da med prenašalcji in gostitelji prevladuje enaka genetska različica virusa KME, ki je značilna za določena zemljepisna območja (Fajs in sod., 2012).

V naši raziskavi smo s filogenetsko analizo ugotovili, da se izolati iz kliničnih vzorcev bolnikov združujejo v šest različnih skupin – S1-S6. Podobnost nukleotidnih zaporedij, ki kodirajo beljakovino E, je bila med 95,8 – 100 % medtem ko je bila podobnost aminokislinskih zaporedij med 98,1 – 100 %. Rezultati sovpadajo z rezultati, ki so jih v raziskavi na manjšem številu slovenskih bolnikov s KME pridobili Fajs in sod. (2012) (95,6 – 100 % enakost nukleotidnih zaporedij in 98,4 – 100 % enakost aminokislinskih zaporedij). Potrdili smo, da v Sloveniji obstaja velika genetska raznolikost virusa KME.

Opazili smo, da se zapisi, pridobljeni iz vzorcev iz severnega dela Slovenije združujejo v filogenetski skupini S1 in S3, medtem ko se zapisi, pridobljeni iz vzorcev iz južnega dela Slovenije združujejo v skupini S2 in S5. Na takšno razporeditev genetskih različic virusa KME vplivajo različni dejavniki, kot so: naravni biotop, razporeditev ekoloških niš (gozdovi, travniki, reke) in človek, ki z izgradnjo cest ter avtocest onemogoča prosto selitev gostiteljev s severa na jug države in obratno (Fajs in sod., 2012). V skupino S4 se združujejo zapisi, pridobljeni iz vzorcev iz osrednjega dela Slovenije.

V naši raziskavi ugotavljamo tudi novo filogenetsko skupino, S6. Skupina S6 vključuje tri vzorce bolnikov, ki smo jih pridobili iz severnega (2 vzorca bolnikov iz Koroške) in osrednjega (1 vzorec bolnika iz Grosuplja) dela Slovenije. Ta zaporedja so najbolj sorodna hrvaškemu izolatu virusa KME - St.Ves (AF091018), ki smo ga našli v genski banki GenBank.

Na filogenetskem drevesu smo opazili, da nekateri bolniki glede na zemljepisni izvor vzorca ne sodijo v isto genetsko linijo. To si razlagamo z dejstvom, da kraj stalnega bivališča bolnika, ki smo ga v naši raziskavi upoštevali kot zemljepisni izvor vzorca, ni nujno tudi mesto, kjer se je bolnik okužil z virusom KME.

Da bi ugotovili, ali morda katera izmed genetskih različic virusa kaže višjo virulentnost in s tem večji patogenetski potencial, smo preverili tudi povezavo med višino virusnega bremena in filogenetskimi skupinami virusov. V naši raziskavi takšne povezave nismo uspeli potrditi - med seboj sorodni virusi, ki pripadajo določeni filogenetski skupini, v telesnih tekočinah bolnikov ne dosegajo višjega oz. nižjega virusnega bremena. Virusno breme je sicer nekoliko višje pri filogenetski skupini virusov S3 v primerjavi s filogenetskimi skupinami virusov S1, S2, S4, S5, S6, vendar razlika ni statistično značilna ( $p=0,3182$ ). S tem smo dokazali tudi, da uporabljeni metoda qRT-PCR v realnem času z izbranimi oligonukleotidi omogoča uspešno pomnoževanje virusne RNK vseh genetskih linij, dokazanih v Sloveniji. V nadaljevanju bi bilo smiselno narediti primerjavo med filogenetskimi skupinami virusov in potekom bolezni ter ugotoviti, ali obstaja genetska različica virusa, ki je za človeka bolj patogena.

V naši raziskavi smo pridobili največje število nukleotidnih zaporedij virusa, neposredno iz kliničnih vzorcev bolnikov s KME, brez predhodne izolacije virusa KME na celičnih kulturah ali sesajočih miškah. Do sedaj objavljene raziskave so namreč vključevale analizo nukleotidnih zaporedij izolatov virusa KME iz vzorcev, ki so bili predhodno inokulirani v sesajoče miši ali na celične kulture (Gritsun in sod., 2003b; Haglund in sod., 2003; Lundkvist in sod., 2001).

## 6 SKLEPI

- Molekularna metoda qRT-PCR v realnem času je uporabna za neposredno dokazovanje okužbe z virusom KME in določanje virusnega bremena v zgodnji fazi bolezni, ko protitelesa proti virusu še niso prisotna.
- S pojavom specifičnih protiteles razreda IgM v serumu bolnikov, se možnost neposrednega dokazovanja virusne okužbe, in s tem tudi določanja virusnega bremena, močno zmanjša.
- Pojav specifičnih protiteles razreda IgM proti virusu KME v serumu bolnikov ne vpliva na višino virusnega bremena.
- Med virusnim bremenom v različnih starostnih skupinah bolnikov ni pomembnih razlik.
- Genetska raznolikost virusa KME je razmeroma visoka. Zаписи pridobljeni iz vzorcev bolnikov s KME se združujejo v 6 filogenetskih skupin, ki kažejo povezavo z zemljepisnim izvorom vzorca.
- Ugotovili smo novo genetsko linijo virusa KME, ki jo predstavljata 2 vzorca bolnikov s Koroške in en vzorec bolnika iz osrednje Slovenije.
- Med virusnim bremenom v različnih filogenetskih skupinah nismo dokazali značilnih razlik, ki bi nakazovale višjo virulentnost določene genetske linije.

## 7 POVZETEK

Virus KME je RNK virus, ki pri ljudeh povzroči klopni meningoencefalitis. Poznamo tri podtipe virusa KME: daljnovezhodni, sibirski in evropski. V Sloveniji kroži evropski podtip virusa KME, prisotnih pa je več genetskih različic virusa, ki so značilne za določena zemljepisna območja. V rutinski diagnostiki se za dokazovanje okužb s KMEV najpogosteje uporablajo serološke metode (dokazovanje specifičnih protiteles). Uporaba molekularnih metod (dokazovanje virusne RNK) je omejena, zaradi kratkega trajanja obdobja viremije. Z našo raziskavo smo želeli potrditi, da je uporaba molekularnih metod za dokazovanje okužbe z virusom KME smiselna v prvi fazì bolezni in pridobiti podatke o višini virusnega bremena, ki jih v literaturi še ni zaslediti.

V raziskavo smo vključili 145 vzorcev telesnih tekočin (serum, plazma) bolnikov, ki so bili odvzeti v prvi fazì bolezni (ni prisotnih protiteles) ali na meji z drugo fazo bolezni (prisotna specifična protitelesa razreda IgM). Izolirali smo RNK ter z molekularno metodo qRT-PCR v realnem času pomnožili virusno RNK in določili virusno breme. Virusno RNK smo pomnožili v 80,9 % vzorcev bolnikov, ki so bili odvzeti v prvi fazì bolezni in v 22,9 % vzorcev bolnikov, ki so bili odvzeti na meji z drugo fazo bolezni. Ugotovili smo, da je višina virusnega bremena približno enaka v vzorcih, ki so bili odvzeti v prvi ali na meji z drugo fazo bolezni ( $p=0,1952$ ). Tudi glede na starost bolnikov, se virusno breme ni značilno razlikovalo ( $p=0,4884$ ).

Neposredno iz kliničnih vzorcev 60 bolnikov smo z metodo RT-PCR pomnožili tarčni odsek genoma virusa KME, ki kodira beljakovino E (1272 bp) in naredili filogenetsko analizo. Dokazali smo obstoj šestih genetskih različic virusa KME, ki so značilne za določena zemljepisna območja, med njimi eno novo filogenetsko linijo (S6), ki je najbolj sorodna hrvaškemu izolatu virusa KME - St.Ves. Ugotovili smo, da med filogenetsko skupino, ki ji pripadajo izolati in višino virusnega bremena v vzorcu, iz katerega smo pridobili izolat, ni značilne povezave ( $p=0,3182$ ).

Informacij o višini virusnega bremena pri bolnikih s KME v literaturi še ni zaslediti. Rezultati naše raziskave, ki vključuje, po podatkih iz literature, največje število kliničnih

vzorcev bolnikov s KME do sedaj, bodo tako v povezavi s kliničnimi podatki o poteku in obliku bolezni omogočili nadaljnje študije povezanosti viroloških dejavnikov in patogeneze virusa KME.

Naša raziskava vključuje tudi do sedaj največje število nukleotidnih zaporedij virusa KME, pridobljenih neposredno iz kliničnih vzorcev bolnikov s KME, brez predhodne izolacije virusa KME na celičnih kulturah ali sesajočih miškah.

## 8 VIRI

Arnež M., Lužnik-Bufon T., Avšič-Županc T., Ružić-Sabljić E., Petrovec M., Lotrič-Furlan S., Strle F. 2003. Etiology of tick-borne febrile illnesses in Slovenian children. Annals of the New York Academy of Sciences, 990: 353-354

Arnež M., Avšič-Županc T. 2009. Tick borne encephalitis in children: an update on epidemiology and diagnosis. Expert Review of Anti-infective Therapy, 7: 1251-1260

Avšič-Županc T., Petrovec M., Jelovšek M, Strle F. 1995a. Medicinsko pomembni arbovirusi v Sloveniji. Zdravniški vestnik, 64: 15-19

Avšič-Županc T., Poljak M., Maticič M., Radsel-Medvescek A., LeDuc J.W., Stiasny K., Kunz C., Heinz F.X. 1995b. Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. Clinical and Diagnostic Virology, 4: 51-59

Avšič-Županc T., Petrovec M. 1997. Epidemiology of tick-borne encephalitis. V: Factors in the emergence of arbovirus diseases: emergency diseases. Saluzzo J.F., Dodet B. (eds.). Paris, Elsevier: 215-222

Avšič-Županc T., Knap N., Korva M., Lotrič Furlan S. 2009. Z vektorji preneseni virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja. Medicinski razgledi, 48: 61-65

Avšič-Županc T., Saksida A. 2011. Medicinska virologija. V: Flavivirusi. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 159-175

Best S.M., Morris K.L., Shannon J.G., Robertson S.J., Mitzel D.N., Park G.S., Boer P.E., Wolfenbarger J.B., Bloom M.E. 2005. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. Journal of Virology, 79: 12828-12839

Bogovič P., Lotrič-Furlan S., Strle F. 2010. What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms. *Travel Medicine and Infectious Diseases*, 8: 246-250

Botha E.M., Markotter W., Wolfaardt M., Paweska J.T., Swanepoel R., Palacios G., NelL.H., Venter M. 2008. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 222-230

Chambers T.J., Diamond M.S. 2003. Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in Virus Research*, 60: 273-342

Danielova V., Holubova J., Pejcoch M., Daniel M. 2002. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitologica*, 49: 323-325

Dobler G. 2010. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Veterinary Microbiology*, 140: 221-228

Dobler G., Gniel D., Petermann R., Pfeffer M. 2012. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 162: 230-238

Donoso Mantke O., Schadler R., Niedrig M. 2008. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Eurosurveillance*, 13, 4/6: 9 str.

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18848> (februar 2015)

Dorrbecker B., Dobler G., Spiegel M., Hufert F.T. 2010. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Diseases*, 8: 213-222

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

Fajs L., Durmiši E., Knap N., Strle F., Avšič-Županc T. 2012. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. PloS ONE, 7 11: e48420, doi: 10.1371/journal.pone.0048420: 8 str.

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

Gould E.A., de Lamballerie X., Zanotto P.M., Holmes E.C. 2003. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus. Advances in Virus Research, 59: 277-314

Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A. 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. Virology, 361: 80-92

Grgič-Vitek M., Avšič-Županc T., Klavs I. 2010a. Tick-borne encephalitis after vaccination: Vaccine failure or misdiagnosis. Vaccine, 28: 7396-7400

Grgič-Vitek M., Učakar V., Sevljak Jurjevec M., Jeraj I., Kraigher A. 2010b. Analiza izvajanja cepljenja v Sloveniji v letu 2009. Letno poročilo. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 94 str.

<http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/publikacije-datoteke/357-2410.pdf> (marec 2015)

Grgič-Vitek M., Klavs I. 2011. High burden of tick-borne encephalitis in Slovenia – challenge for vaccination policy. Vaccine, 29: 5178-5183

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

Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P., Pogodina V.V., Lashkevich V.A. 2003b. Characterization of a Siberian virus isolated

from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *Journal of Virology*, 77: 25-36

Haglund M., Günther G. 2003. Tick-borne encephalitis-pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*, 21, Suppl. 1: S11-S18

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

Han X., Aho M., Vene S., Peltomaa M., Vaheri A., Vapalahti O. 2001. Prevalence of tick borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *Journal of Medical Virology*, 64: 21-28

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

Hayasaka D., Goto A., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. 2001. Evaluation of European tick-borne encephalitis virus vaccine against recent Siberian and far-eastern subtype strains. *Vaccine*, 19: 4774-4779

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

Heinz F.X., Holzmann H., Essl A., Kundi M. 2007. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 25: 7559-7567

Holzmann H., Vorobyova M.S., Ladyzhenskaya I.P., Ferenczi E., Kundi M., Kunz C., Heinz F.X. 1992. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine*, 10: 345-349

Holzmann H. 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. Vaccine, 21, Suppl. 1: S36-S40

Hudopisk N., Korva M., Janet E., Simentinger M., Grgič-Vitek M., Gubenšek J., Natek V., Kraigher A., Strle F., Avšič-Županc T. 2013. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. Emerging Infectious Diseases, 5: 806-808

Kaiser R. 2008. Tick-borne encephalitis. Infectious Disease Clinics of North America, 22: 561-575

Knap N., Durmiši E., Saksida A., Korva M., Petrovec M., Avšič-Županc T. 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. Veterinary Parasitology, 164: 275-281

Kraigher A., Grilc E., Blaško M., Praprotnik M., Klavs I., Kastelic Z., Kustec T., Bergant N., Grgič-Vitek M., Učakar V., Sočan M., Paragi M., Prosenc K., Berginc N., Šubelj V., Koren N., Pokrajac T. 2008. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2007. Letno poročilo. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 60-67

[http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko\\_spremljanje\\_nalezljivih\\_bolezni\\_2007.pdf](http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2007.pdf) (marec 2015)

Kraigher A., Grilc E., Sočan M., Klavs I., Grgič-Vitek M., Čakš Jager N., Blaško Markič M., Praprotnik M., Kustec T., Bergant N., Kastelic Z., Paragi M., Prosenc K., Berginc N., Šubelj V., Svetičič J. 2010. Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezni v Sloveniji 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 59-66

[http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko\\_spremljanje\\_nalezljivih\\_bolezni\\_2009.pdf](http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2009.pdf) (marec 2015)

Kunz C. 2003. TBE vaccination and the Austrian experience. Vaccine, 21: 50-55

Leonova G.N., Ternovoi V.A., Pavlenko E.V., Maistrovskaya O.S., Protopopova E.V., Loktev V.B. 2007. Evaluation of vaccine Encepur Adult for induction of human

neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*, 25: 895-901

Lindenbach B.D., Rice C.M. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 59: 23-61

Lindenbach B.D., Thiel H., Rice C.M. 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. V: *Fields virology*. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 1102-1152

Lindenbach B.D., Murray C.L., Thiel H., Rice C.M. 2013. Flaviviridae. V: *Fields virology*. Vol. 1. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 712-746

Lindquist L., Vapalahti O. 2008. Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 371: 1861-1871

Logar M., Bogovič P., Cerar D., Avšič-Županc T., Strle F. 2006. Tick-borne encephalitis in Slovenia from 2000 to 2004: comparison of the course in adult and elderly patients. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 118: 702-707

Lorenz I.C., Allison S.L., Henz F.X., Helenius A. 2002. Folding and dimerization of tickborne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 76: 5480-5491

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

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

Lundkvist Å., Vene S., Golovljova I., Mavtchoutko V., Forsgren M., Kalnina V., Plyusnin A. 2001. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: Evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *Journal of Medical Virology*, 65: 730-735

Mackenzie J.M., Jones M.K., Young P.R. 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*, 220: 232-240

Malovrh T., Marc M. 1997. Proučevanje naravnih gostiteljev virusa klopnega meningoencefalitisa v aktivnih in latentnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Medicinski razgledi*, 36: 465-478

Mandl C.W. 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research*, 111: 161-174

Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. 2009. Tick borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 90: 1781-1794

McMinn P.C.I. 1997. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *Journal of General Virology*, 78, Pt 11: 2711-2722

Monath T.P., Tsai T.F. 1997. Flaviviruses. V: *Clinical virology*. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (eds.). New York, Churchill Livingstone Inc.: 1133-1185

Nuttall P., Labuda M. 1994. Tick-borne encephalitis subgroup. V: *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. Sonenshine D., Mather T. (eds.). New York/Oxford, Oxford Univ. Press, 351-391

Patkar C.G., Jones C.T., Chang Y., Warrier R., Kuhn R. 2007. Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. *Journal of Virology*, 81: 6471-6481

Pierson T.C., Diamond M.S. 2013. Flaviviruses. V: Fields virology. Vol. 1. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 747-794

Randolph S.E., Gern L., Nuttall P.A. 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, 12: 472-479

Randolph S.E., Green R.M., Peacey M.F., Rogers D.J. 2000. Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology*, 121, Pt 1: 15-23

Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison C.S. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375: 291-298

Ružek D., Dobler G., Donoso Mantke O. 2010. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Diseases*, 8: 223-232

Saksida A., Duh D., Lotrič-Furlan S., Strle F., Avšič-Županc T. 2005. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick borne encephalitis. *Journal of Clinical Virology*, 33: 331-335

Schultze D., Dollenmaier G., Rohner A., Guidi T., Cassinotti P. 2007. Benefit of detecting tick-borne encephalitis viremia in the first phase of illness. *Journal of Clinical Virology*, 38, 2: 172-175

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

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

Süss J. 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance*, 13, 4/6: 8 str.

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18916> (februar 2015)

Süss J. 2011. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—an overview. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2: 2-15

Šumilo D., Bormane A., Asokliene L., Vasilenko V., Golovljova I., Avšič-Županc T., Hubalek Z., Randolph S.E. 2008. Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe. *Reviews in Medical Virology*, 18: 81-95

Thiel H.J., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Meyers G., Purcell R.H., Rice C.M., Houghton M. 2005. Flaviviridae. V: Virus taxonomy. 8<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (eds.). San Diego, Academic Press: 981-998

Wallner G., Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H., Stiasny K., Kunz C., Heinz F.X. 1996. Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 77: 1035-1042

Weidmann M., Ružek D., Krivanec K., Zöller G., Essbauer S., Pfeffer M., Zanotto P.M. deA., Hufert F.T., Dobler G. 2011. Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *Journal of General Virology*, 92: 1906-1916

## ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila svoji mentorici prof. dr. Tatjani Avšič Županc, ker mi je omogočila izdelavo magistrske naloge iz področja, ki me zanima.

Iskreno se zahvaljujem delovni mentorici asist. razisk. dr. Ani Saksida in dr. Luki Fajsu za uvajanje v laboratorijsko delo, prijaznost, spodbudne besede, nasvete, prijetno vzdušje, pomoč in potrpežljivost pri popravljanju pisnega dela. Najlepša hvala Katarini Resman za prijaznost, pomoč pri laboratorijskem delu in statistični obdelavi podatkov. Hvala, ker ste ogromno pripomogli k nastanku mojega magistrskega dela!

Hvala Mateji Jelovšek, Nataši Knap, Miši Korva, Martinu Sagadinu in Katji Strašek Smrdel za vso prijaznost, koristne nasvete in pomoč pri laboratorijskem delu.

Za objektiven pregled pisnega dela se najlepše zahvaljujem prof. dr. Mariu Poljaku.

Zahvalila bi se tudi svoji družini, očetu Robertu, mami Lidiji in sestri Evi, ki so me vsa leta študija podpirali!

Najlepša hvala dragi Mihael! Vedno si mi stal ob strani in mi pomagal na poti do cilja.

Najlepša hvala vsem!

## PRILOGE

Priloge A: Filogenetsko drevo tarčnega odseka beljakovine E (1272 bp), pomnoženega neposredno iz vzorcev klopovalcev, glodavcev in bolnikov

