

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Monika KOZLEVČAR

**SPREMLJANJE DINAMIKE VIRUSNEGA
BREMENA IN IMUNSKEGA ODZIVA PRI
BOLNIKIH S HMRS**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Monika KOZLEVČAR

**SPREMLJANJE DINAMIKE VIRUSNEGA BREMENA IN
IMUNSKEGA ODZIVA PRI BOLNIKIH S HMRS**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**MONITORING THE DYNAMICS OF VIRAL LOAD AND IMMUNE
RESPONSE IN PATIENTS WITH HMRS**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. 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 znan. sod. dr. Mišo Korva in za recenzenta izr. prof. dr. Ivana Toplaka.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc

Somentorica: znan. sod. dr. Miša Korva

Recenzent: izr. prof. dr. Ivan Toplak

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Miroslav PETROVEC, dr. med.

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

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

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

Članica: znan. sod. dr. Miša KORVA, univ. dipl. mikr.

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

Član: izr. prof. dr. Ivan TOPLAK, dr. vet. med.

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

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.

Monika Kozlevčar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
 DK UDK 578.76.083:616.9:577.27(043)=163.6
 KG virusi/hantavirusi/Puumala/Dobrava/hemoragična mrzlica z renalnim sindromom /HMRS/patogeneza/qRT-PCR v realnem času/virusno breme/imunološki test/citokini/dinamika/imunski odziv
 AV KOZLEVČAR, Monika, dipl. mikrobiol. (UN)
 SA AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (mentorica) /KORVA, Miša (somentorica) / TOPLAK, Ivan (recenzent)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
 LI 2016
 IN SPREMLJANJE DINAMIKE VIRUSNEGA BREMENA IN IMUNSKEGA ODZIVA PRI BOLNIKIH S HMRS
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
 OP XII, 70 str., 10 pregl., 58 sl., 106 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (HMRS) je skupina klinično podobnih bolezni, ki jih povzročajo hantavirusi. V Sloveniji HMRS povzročajo hantavirusni tipi Dobrava, Dobrava-Kurkino in Puumala. HMRS ima širok razpon kliničnih znakov: lahko poteka kot blaga vročina, v težjih primerih pa pride do krvavitev, akutne odpovedi ledvic in šoka. Težavo za razvoj zdravila predstavlja pomanjkanje razumevanja patogeneze hantavirusnih okužb. Klinične raziskave kažejo, da na različen potek HMRS vpliva tip virusne okužbe (virus Puumala (PUU) vs. virus Dobrava (DOB) in imunski odziv posameznika. Z magistrsko nalogo smo želeli najti povezavo med dinamiko virusnega bremena in citokinim odzivom s težo poteka bolezni pri bolnikih s HMRS. Nadalje smo želeli ugotoviti, kakšne so razlike glede na tip virusa, ki povzroča okužbo. V retrospektivno analizo bolnikov s HMRS smo vključili 16 bolnikov. Skupno smo analizirali 139 vzorcev plazme (50 od 7 bolnikov okuženih z virusom PUU in 89 od 9 bolnikov okuženih z DOB), iz katerih smo izolirali virusno RNA in naredili qRT-PCR za določanje virusnega bremena. Postopek določanja koncentracije citokinov je temeljal na Luminex xMAP tehnologiji. Virusno breme smo uspeli dokazati pri vseh obravnavanih bolnikih. Razlik med skupino, ki je okužena z virusom DOB in PUU, nismo dokazali. Določene razlike smo dokazali v primeru nekaterih citokinov (IL-10, VEGF, IL-6). Menimo, da je patogeneza obravnavanih bolnikov s HMRS lahko posledica neustreznega imunskega odziva, ko je ravnovesje med prirojeno in pridobljeno imunostjo porušeno, saj lahko tako prešibek kot tudi premočan imunski odziv vodi v težek potek HMRS.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 578.76.083:616.9:577.27(043)=163.6
CX viruses/hantaviruses/Puumala/Dobrava/hemorrhagic fever with renal syndrome/
HFRS/pathogenesis/real time qRT-PCR/viral load/immunologic test/cytokines/
dynamics/immune response
AU KOZLEVČAR, Monika
AA AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor) / KORVA, Miša (co-advisor) / TOPLAK,
Ivan (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TY MONITORING THE DYNAMICS OF VIRAL LOAD AND IMMUNE
RESPONSE IN PATIENTS WITH HMRS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 70 p., 10 tab., 58 fig., 106 ref.
LA sl
AI sl/en
AB Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is a group of clinically similar
illnesses caused by hantaviruses. In Slovenia HFRS is caused by hantavirus types:
Dobrava, Dobrava-Kurkino and Puumala. HFRS has a broad spectrum of clinical
manifestations: it can be carried out as a mild fever or in severe cases as
hemorrhages, acute kidney injury and shock. Problem for the development of a cure
is a lack of understanding of pathogenesis of hantavirus infections. Clinical studies
show that different clinical course of HFRS is associated with different hantavirus
type (Dobrava virus (DOB) vs. Puumala virus (PUU) and individual's immune
response. In this master thesis the correlation between viral load dynamics,
cytokine response and severity of clinical course of the disease in patients with
HFRS was studied. Furthermore the differences in respect to virus type, which
caused an infection, were investigated. In retrospective analysis 16 patients with
HFRS were included. Altogether 139 plasma samples were analyzed (50 from
patients infected with PUU virus and 89 from patients infected with DOB) by
isolation of viral RNA and qRT-PCR viral load determination. The method to
measure cytokines was based on novel Luminex xMAP technology. Viral load was
demonstrated in all analyzed patients, but the difference in its concentration and
dynamic between PUU and DOB virus infected patients was not found. However
differences were demonstrated in case of some measured cytokines (IL-10, VEGF,
IL-6). We believe that pathogenesis can be caused by inadequate immune response,
when there is imbalance between innate and adaptive immunity, because either too
weak or too strong immune response can lead to severe clinical course of HFRS.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED HANTAVIRUSNIH OKUŽB	3
2.2 ZNAČILNOSTI HANTAVIRUSOV	5
2.3 EKOLOGIJA HMRS	8
2.3.1 Kroženje hantavirusov v naravi.....	9
2.4 EPIDEMIOLOGIJA HMRS	9
2.5 KLINIČNA SLIKA	10
2.6 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA.....	12
2.6.1 Serološki testi	12
2.6.2 Molekularna diagnostika	13
2.7 PATOGENEZA IN IMUNOST HMRS	13
2.7.1 Protivirusni imunski mehanizmi.....	13
2.7.2 Vloga celičnega imunskega odziva v imunopatogenezi HMRS	14
2.7.3 Vloga citokinov v imunopatogenezi HMRS	15
2.7.4 Vloga virusnega bremena v imunopatogenezi HMRS	16
3 PREISKOVANCI IN METODE	18
3.1 PREISKOVANCI	18
3.2 METODE DELA	19
3.2.1 Določanje koncentracije serumskih citokinov in kemokinov z MILLIPLEX MAP kompletom.....	19

3.2.1.1	Princip delovanja xMAP tehnologije	19
3.2.1.2	Postopek imunološkega Luminex testa	20
3.2.1.3	Priprava reagentov.....	21
3.2.1.4	Potek imunološkega testa	23
3.2.2	Določanje virusnega bremena	23
3.2.2.1	Osamitev virusne RNA iz vzorcev krvi bolnikov s HMRS	24
3.2.2.2	Enostopenjska kvantitativna verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo v realnem času (qRT-PCR).....	24
3.2.3	Statistična analiza.....	26
4	REZULTATI.....	27
4.1	PRIMERJAVA VIRUSNEGA BREMENA PRI BOLNIKIH S HMRS.....	27
4.2	PRIMERJAVA DINAMIKE CITOKINOV PRI BOLNIKIH S HMRS	29
4.2.1	Dinamika citokina IL-10 pri bolnikih s HMRS	30
4.2.2	Dinamika citokina VEGF pri bolnikih s HMRS	32
4.2.3	Dinamika citokina IL-6 pri bolnikih s HMRS	34
4.2.4	Dinamika citokina TNF-α pri bolnikih s HMRS	36
4.2.5	Dinamika citokina IL-17a pri bolnikih s HMRS	38
4.2.6	Dinamika citokina IFNγ pri bolnikih s HMRS.....	40
4.2.7	Dinamika citokina IL-2 pri bolnikih s HMRS	42
4.2.8	Dinamika citokina IFNα2 pri bolnikih s HMRS	44
4.2.9	Dinamika citokina IL-12p40 pri bolnikih s HMRS.....	46
4.2.10	Dinamika citokina IL-12p70 pri bolnikih s HMRS.....	49
4.2.11	Dinamika citokina TNF-β pri bolnikih s HMRS	50
4.2.12	Dinamika citokina IP-10 pri bolnikih s HMRS	53
5	RAZPRAVA.....	55
5.1	VPLIV VIRUSNEGA BREMENA NA POTEK HMRS	55
5.2	VPLIV CITOKINOV NA POTEK HMRS	55
6	SKLEPI	60
7	POVZETEK	61
8	VIRI	62
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz patogenih hantavirusov, njihovih naravnih gostiteljev, bolezenskega sindroma in zemljepisne razširjenosti (Jonsson in sod., 2010)	4
Preglednica 2: Pogostost različnih kliničnih in laboratorijskih kazalcev pri HMRS bolnikih, okuženih z virusom Puumala in Dobrava (Vapalahti in sod., 2003).....	12
Preglednica 3: Seznam preiskovancev, potek bolezni in število dni zdravljenja.....	19
Preglednica 4: Seznam magnetnih kroglic z imobiliziranimi človeškimi protitelesi proti citokinom	22
Preglednica 5: Priprava standarda človeških citokinov.	23
Preglednica 6: Nukleotidna zaporedja izbranih začetnih nukleotidov in sond za določanje virusnega bremena virusov DOB in PUU.	25
Preglednica 7: Reakcijska mešanica za enostopenjski RT-PCR v realnem času za virus PUU in DOB.....	25
Preglednica 8: Prikaz stopanj reakcije enostopenjskega RT-PCR v realnem času za virus DOB.....	26
Preglednica 9: Prikaz stopanj reakcije enostopenjskega RT-PCR v realnem času za virus PUU.	26
Preglednica 10: Območja normalnih vrednosti za merjene citokine.	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Posnetek virusa DOB pod elektronskim mikroskopom (IMI, 2011).....	6
Slika 2: Shematski prikaz zgradbe hantavirusnega viriona (Saksida, 2011)	7
Slika 3: Razmnoževanje hantavirusov (Vaheri in sod., 2013).....	8
Slika 4: Kroženje hantavirusov v naravi (povzeto po Pincelli in sod., 2003).....	9
Slika 5: Grafičen prikaz števila HMRS primerov v Sloveniji v času od leta 1985 do 2014 (IMI, 2014)	10
Slika 6: Shematski prikaz kliničnega poteka HMRS (Vapalahti in sod., 2003)	11
Slika 7: Shematski prikaz poteka imunološkega testa, ki temelji na Luminex xMAP tehnologiji (Bio-Rad Laboratories Inc., 2016)	21
Slika 8: Dinamika virusnega bremena pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	27
Slika 9: Dinamika virusnega bremena pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	28
Slika 10: Primerjava koncentracij virusnega bremena pri bolnikih s HMRS, okuženimi z virusom PUU in DOB.	28
Slika 11: Primerjava koncentracij virusnega bremena pri bolnikih z blagim in težkim potekom HMRS, okuženimi z virusom PUU in DOB.	29
Slika 12: Dinamika IL-10 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	30
Slika 13: Dinamika IL-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	31
Slika 14: Primerjava koncentracije IL-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	31
Slika 15: Primerjava koncentracije IL-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	32
Slika 16: Dinamika VEGF pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	32
Slika 17: Dinamika VEGF pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	33
Slika 18: Primerjava koncentracije VEGF pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	33
Slika 19: Primerjava koncentracije VEGF pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	34
Slika 20: Dinamika IL-6 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	34
Slika 21: Dinamika IL-6 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	35
Slika 22: Primerjava koncentracije IL-6 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	35
Slika 23: Primerjava koncentracije IL-6 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	36
Slika 24: Dinamika TNF- α pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	36
Slika 25: Dinamika TNF- α pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	37
Slika 26: Primerjava koncentracije TNF- α pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	37
Slika 27: Primerjava koncentracije TNF- α pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU glede na različen potek HMRS.....	38

Slika 28: Dinamika IL-17a pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	38
Slika 29: Dinamika IL-17a pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	39
Slika 30: Primerjava koncentracije IL-17a pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	39
Slika 31: Primerjava koncentracije IL-17a pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	40
Slika 32: Dinamika IFN γ pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	40
Slika 33: Dinamika IFN γ pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	41
Slika 34: Primerjava koncentracije IFN γ pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	41
Slika 35: Primerjava koncentracije IFN γ pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	42
Slika 36: Dinamika IL-2 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	43
Slika 37: Dinamika IL-2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	43
Slika 38: Primerjava koncentracije IL-2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	44
Slika 39: Primerjava koncentracije IL-2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	44
Slika 40: Dinamika IFN α 2 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	45
Slika 41: Dinamika IFN α 2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	45
Slika 42: Primerjava koncentracije IFN α 2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	46
Slika 43: Primerjava koncentracije IFN α 2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	46
Slika 44: Dinamika IL-12p40 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	47
Slika 45: Dinamika IL-12p40 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	47
Slika 46: Primerjava koncentracije IL-12p40 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	48
Slika 47: Primerjava koncentracije IL-12p40 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	48
Slika 48: Dinamika IL-12p70 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	49
Slika 49: Dinamika IL-12p70 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	49
Slika 50: Primerjava koncentracije IL-12p70 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	50
Slika 51: Primerjava koncentracije IL-12p70 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	50
Slika 52: Dinamika TNF- β pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.....	51
Slika 53: Dinamika TNF- β pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	51
Slika 54: Primerjava koncentracije TNF- β pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini.....	52

Slika 55: Primerjava koncentracije TNF-β pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS.....	52
Slika 56: Dinamika IP-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.....	53
Slika 57: Primerjava koncentracije IP-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in kontrolno skupino.....	53
Slika 58: Primerjava koncentracije IP-10 bolnikih, okuženih z virusom DOB glede na različen potek HMRS.	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AND	Andes
APC	antigen predstavljoča celica
bp	bazni par
DC	dendritična delica
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DOB	Dobrava
ELISA	encimsko imunska metoda
HCPS	hantavirusni srčno pljučni sindrom
HMRS	hemoragična mrzlica z renalnin sindromom
IFA	metoda posredne imunofluorescence
IFN	interferon
IL	interlevkin
IP	IFN- γ inducibilni protein
NE	nephropathia epidemica
NK	naravne celice ubijalke (ang. natural killer cells)
PAMP	patogen pridruženi molekularni vzorci (ang. pathogen associated molecular patters)
PE	fikoeritrin
PRR	vzorčno prepoznavni receptor (ang. pattern recognition receptor)
PUU	Puumala
qRT-PCR	kvantitativna erižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo
RNA	ribonukleinska kislina
SNV	virus Sin Nombre
TGF	transformirajoči rastni faktor
Th	celice T pomagalke (ang. T helper cells)
TNF	tumorje nekrotizirajoči faktor
Treg	regulatorne celice T
VEGF	vaskularni endotelijski rastni faktor

1 UVOD

Hantavirusi povzročajo dva klinična sindroma: hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS) v Aziji in Evropi in hantavirusni srčno-pljučni sindrom (HCPS) v Ameriki (Schmaljohn in Nichol, 2007). Letno je zabeleženih 150,000 do 200,000 novih primerov hantavirusnih okužb, večinsko v Aziji. Ljudje se lahko z virusom okužimo z vdihavanjem aerosolov kužnih izločkov naravnih gostiteljev, klinična slika pa se razlikuje med različnimi tipi hantavirusov (Manigold in Vial, 2014).

Slovenija je za hantaviruse endemično področje, saj kroži kar pet različnih hantavirusnih tipov: virus Puumala (PUU), virus Dobrava (DOB-Dobrava), virus Dobrava-Kurkino (DOB-Kurkino), virus Tula in virus Seewis. Med njimi povzročata HMRS le virus PUU in DOB (oba virusna tipa), ki se v naravi ohranjata v naravnih gostiteljih, glodavcih. Rezervoar virusa PUU je gozdna voluharica, *Myodes glareolus*, virus DOB pa najdemo v dveh vrstah miši: tip DOB-Dobrava v rumenogrlji miši, *Apodemus flavicollis* in tip DOB-Kurkino v dimasti miši, *Apodemus agrarius* (Korva in sod., 2013a).

Virus PUU povzroča blažjo obliko bolezni, medtem ko je za bolnike, okužene z virusom DOB (predvsem tip Dobrava), značilen težji potek HMRS s krvavitvami, šokom in 16 % smrtnostjo (Avšič-Županc in sod., 1999). Razumevanje patogeneze HMRS je omejeno zaradi redkih *in vitro* kliničnih raziskav, odsotnosti ustreznega živalskega modela ter oteženega dela v laboratorijih tretje stopnje biološke varnosti (Schountz in Prescott, 2014).

Dosedanje raziskave kažejo na to, da na različen potek klinične slike HMRS vplivajo razlike v imunskega odziva bolnika in koncentraciji virusa ter mediatorjev vnetja. Virus DOB dosega višje virusno breme ter povzroča dolgotrajnejšo viremijo kot virus PUU, med njima je opazna tudi razlika v kinetiki citokinskega in protitelesnega odziva bolnika (Korva in sod., 2013b).

1.1 NAMEN DELA

V patogenezi HMRS ima pomembno vlogo imunski odziv posameznika. Z magistrsko nalogo smo želeli ugotoviti povezavo med dinamiko virusnega bremena in citokinskega odziva s težo poteka bolezni pri bolnikih s HMRS. S spremeljanjem sprememb v koncentraciji določenih citokinov pri bolnikih okuženih z virusom DOB in PUU smo skušali ugotoviti ali dinamika izločanja citokinov vpliva na klinični potek bolezni in kakšne so razlike v le-tej glede na tip virusa, ki povzroča okužbo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Bolniki s težjim potekom bolezni imajo višje virusno breme.
- Bolniki okuženi z virusom PUU imajo drugačno dinamiko izločanja citokinov kot bolniki okuženi z virusom DOB.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED HANTAVIRUSNIH OKUŽB

Opisi virusne bolezni, ki jo danes poznamo kot hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS), obstajajo že iz leta 1913 iz ruskih kliničnih popisov zdravljenja iz vzhodne Sibirije (Casals in sod., 1970). Dr. Ho Wang Lee (1982) je našel najstarejše medicinske zapise o podobni bolezni, ki datirajo v daljno leto 960 pr.n.št. Japonski zdravniki so se prvič srečali s HMRS v Mandžuriji leta 1934, ko so se pojavljali manjši izbruhi med vojaki na terenu. Predvidevali so, da so možni rezervoar glodavci in do leta 1940 zaključili podrobne klinično-patološke opise sindroma. V Evropi je bila prepoznana podobna, vendar milejša oblika bolezni v 30. letih prejšnjega stoletja, in sicer v Skandinaviji ter osrednji Rusiji (Myhrman, 1951). Rusi so bolezen poimenovali hemoragični nefrozo-nefritis, v Skandinaviji pa so uporabili izraz »nephropathia epidemica« (NE). Za bolezen NE, ki je bila opisana v letu 1930 na Švedskem, je bilo kasneje dokazano, da je posledica okužbe z virusom Puumala (PUU). Med prvo svetovno vojno je v Evropi med britanskimi, nemškimi in francoskimi vojaki prišlo do večjih epidemij NE podobni bolezni. V vojaških medicinskih zapisih so bolezen poimenovali »vojni nefritis«. Prav tako se je več tisoč primerov vojnega nefritisa pojavilo v drugi svetovni vojni med nemškimi enotami na severu Finske (Brummer-Korvenkontio in sod., 1980). Gajdusek je že leta 1962 domneval, da so bile te bolezni povzročene z eno vrsto povzročitelja ali pa skupino tesno sorodnih povzročiteljev (Gajdusek, 1962). V času Korejske vojne, med letom 1950 in 1953, je virus Hantaan povzročil HMRS pri več kot 3000 ameriških vojakih. Bolezen so imenovali korejska hemoragična mrzlica, zanje pa so bili značilni klinični znaki: vročina, krvavitve, šok, odpoved ledvic in 15 % smrtnost (Schmaljohn in sod., 1997). Kljub prizadevanju znanstvenikov etiološki vzrok bolezni ni bil znan. V letu 1976, več kot 25 let po Korejski vojni, je korejski znanstvenik Lee s sodelavci uspel osamiti povzročitelja iz pljuč dimaste miši (*Apodemus agrarius*) in ga poimenoval virus Hantaan po bližnji reki (Lee in sod., 1978). Prvi serološko potrjen primer HMRS izven Skandinavije ali vzhodne Azije je bil opisan leta 1983 v Belgiji (Desmyter in sod., 1983). Kmalu je postalo jasno, da HMRS povzročajo tesno sorodnimi virusi, iz rodu Hantavirus, znotraj virusne družine Bunyaviridae. Leta 1983 so uradno poimenovali bolezen, ki jo povzročajo hantavirusi kot hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (HMRS) (Schmaljohn in Nichol, 2007).

Do leta 1993 je veljalo, da so hantavirusi prisotni le na območju »starega sveta«. Leta 1993 pa je prišlo do izbruha v ZDA in s tem do odkritja novega hantavirusa - virusa Sin Nombre (SNV). SNV je povzročil bolezen, ki se je razlikovala od HMRS predvsem po tem, da so bila namesto ledvic prizadeta pljuča in srčno-žilni sistem, zato so bolezen poimenovali hantavirusni srčno-pljučni sindrom (HCPS, angl. Hantavirus Cardio-Pulmonary Syndrome). Naravni rezervoar virusa je miš, *Peromyscus maniculatus* (Nichol in sod.,

1993). Leta 1995 so sorodne hantaviruse odkrili tudi v Južni Ameriki (López in sod., 1996). O primerih HCPS so nadalje poročali še iz Argentine, Brazilije, Kanade, Čila, Paname, Paragvaja, Urugvaja in ZDA, s stopnjo smrtnosti od 40 do 50 % (Schmaljohn in sod., 1997). Najbolj patogen je virus Andes (AND), ki je endemičen v Argentini in Čilu. Je edini hantavirus, za katerega so opisali možen prenos s človeka na človeka (Enria in sod., 1996; Wells in sod., 1997).

Hantavirusi in njihova zemljepisna razširjenost je tesno povezana z njihovimi naravnimi gostitelji: glodavci in žužkojedi. Desetletja je obstajalo prepričanje, da so naravni rezervoar hantavirusov le glodavci. Leta 2007, ob odkritju virusa Tanganya v Teresini rovki, *Crocidura theresae* (Klempa in sod., 2007), pa so odkrili, da so naravni rezervoar hantavirusov poleg glodavcev tudi žužkojedi. Pravzaprav je bil prvi odkriti hantavirus, virus Thottapalayam izoliran že leta 1964 v Indiji iz rovke (*Suncus murinus*). Vendar so ga uvrstili med hantaviruse šele mnogo kasneje in je dolgo veljal za izjemo (Carey in sod., 1971; Song in sod., 2007a). Šele leta 2009 so odkrili več genetsko raznolikih hantavirusov v različnih vrstah rovk povsod po svetu ter tudi v krtih in netopirjih (Kang in sod., 2009; Sumibcay in sod., 2012; Weiss in sod., 2012). V Sloveniji so hantaviruse v žužkojedem gostitelju odkrili leta 2013, in sicer virus Seewis v tkivih gozdne rovke, *Sorex araneus* (Resman in sod., 2013). Noben izmed hantavirusov odkritih v žužkojedih gostiteljih do sedaj še ni dokazan kot človeški patogen (Yashina in sod., 2010). Populacije žužkojedih sesalcev so precej manjše od populacij glodavcev, zato je možno, da je verjetnost stika človeka z izločki žužkojedega gostitelja prenizka, da bi lahko prišlo do učinkovitega prenosa virusa (Song in sod., 2007b).

Danes poznamo že več kot 20 hantavirusov, ki lahko povzročijo bolezen pri človeku (HMRS ali HCPS) (Preglednica 1). Verjetno pa je še kar nekaj neodkritih hantavirusov ter veliko hantavirusnih okužb, ki ostanejo neprepoznane predvsem v Afriki, na Srednjem Vzhodu in v Indiji (Schountz in Prescott, 2014; Jonsson in sod., 2010).

Preglednica 1: Prikaz patogenih hantavirusov, njihovih naravnih gostiteljev, bolezenskega sindroma in zemljepisne razširjenosti (Jonsson in sod., 2010).

	Virus	Naravni gostitelj	Bolezen	Zemljepisna razširjenost
Hantavirusi starega sveta	virus Hantaan	<i>Apodemus agrarius</i>	HMRS	Kitajska, Južna Koreja, Rusija
	virus Dobrava	<i>Apodemus flavicollis</i>	HMRS	Balkan, srednja Evropa, Rusija
	virus Seoul	<i>Rattus rattus</i>	HMRS	Koreja, Japonska, Kitajska, Egipt
	virus Saaremaa	<i>Apodemus agrarius</i>	HMRS	Estonija, Rusija, Slovenija, Slovaška, Madžarska

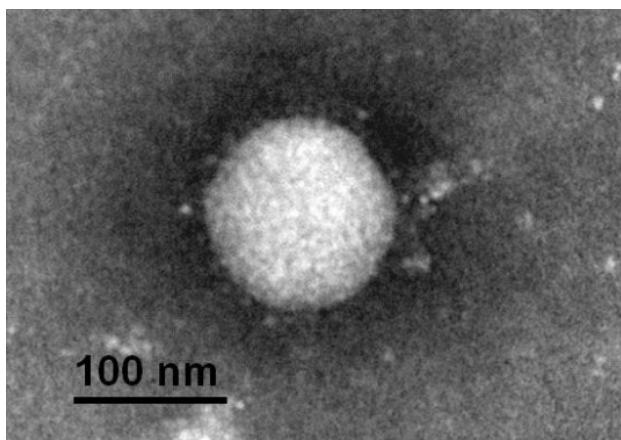
»se nadaljuje«

Nadaljevanje preglednice 1: Prikaz patogenih hantavirusov, njihovih naravnih gostiteljev, bolezenskega sindroma in zemljepisne razširjenosti (Jonsson in sod., 2010).

	Virus	Naravni gostitelj	Bolezen	Zemljepisna razširjenost
Hantavirusi starega sveta	virus Amur	<i>Apodemus peninsulae</i>	HMRS	Rusija
	virus Puumala	<i>Myodes glareolus</i>	HMRS	Skandinavija, Evropa
	virus Tula	<i>Mictotus arvalis</i>	HMRS	Srednja Evropa, Rusija
	virus Topografov	<i>Lemmus sibericus</i>	HMRS	Sibirija
	virus Thailand	<i>Bandicota indica</i>	HMRS	JV Azija
	virus Khabarovsk	<i>Microtus fortis</i>	HMRS	Rusija
Hantavirusi novega sveta	virus Sin Nombre	<i>Peromyscus maniculatus</i>	HCPS	ZDA, Mehika
	virus New York-1	<i>Peromyscus leucopus</i>	HCPS	ZDA, Kanada, Mehika
	virus Monongahela	<i>Peromyscus leucopus</i>	HCPS	ZDA, Kanada
	virus Bayou	<i>Oryzomys palustris</i>	HCPS	vzhod ZDA
	virus Black Creek Canal	<i>Sigmodon hispidus</i>	HCPS	ZDA, Mehika, centralna Amerika
	virus Andes	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	HCPS	Argentina, Čile
	virus Laguna Negra	<i>Calomys laucha</i>	HCPS	Bolivija, Argentina, Paragvaj
	virus Araraquara	<i>Bolomys lasiurus</i>	HCPS	Brazilija
	virus Choclo	<i>Oligoryzomys fulvenscens</i>	HCPS	Panama
	virus Juquitiba	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	HCPS	Brazilija
	virus Isla Vista	<i>Microtus californicus</i>	HCPS	ZDA
	virus Bermejo	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	HCPS	Argentina
	virus Lechiguanas	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	HCPS	Argentina
	virus Rio Mamore	<i>Oligoryzomys microtis</i>	HCPS	Bolivija, Peru, Paragvaj, Argentina
	virus Rio Segundo	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	HCPS	Kostarika
	virus Prospect Hill	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	HCPS	ZDA, Kanada
	virus Seoul	<i>Rattus rattus</i>	HMRS	ZDA, Brazilija
	virus El Moro Canyon	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	HCPS	ZDA, Kanada, Mehika
	virus Muleshoe	<i>Suncus hispidus</i>	HCPS	ZDA, Mehika, centralna Amerika

2.2 ZNAČILNOSTI HANTAVIRUSOV

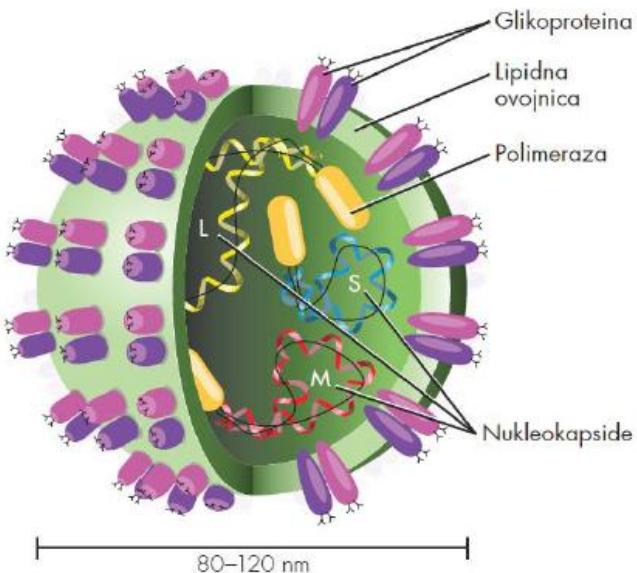
Hantavirusi spadajo v družino Bunyaviridae skupaj s še štirimi drugimi rodovi: Bunyavirus, Nairovirus, Phlebovirus in Tospovirus. Za njih je značilno, da so ovalne oblike in v premeru velikosti od 80 do 120 nm. Obdani so z lipidno ovojnico, ki ima na površini glikoproteine, ki tvorijo heksamerno strukturo (Plyusnin, 2002).



Slika 1: Posnetek virusa DOB pod elektronskim mikroskopom (IMI, 2011).

Hantavirusi imajo negativno polaren genom iz enovijačne ribonukleinske kisline (RNA, ang. ribonucleic acid), ki je razdeljena na tri segmente: velik (L, ang. large), srednji (M, ang. medium) in majhen (S, ang. small). Segment L (6,5-6,6 kb) nosi zapis za od RNA odvisno RNA polimerazo in ima vsaj trojno vlogo: replikaze, transkriptaze in endonukleaze. Srednji segment M (3,7-3,8 kb) nosi zapis za glikoproteinski prekurzor, ki je med translacijo proteolitsko cepljen v beljakovini površinske ovojnice: glikoproteina Gn in Gc. Ti dve beljakovini sta potrebni za prepoznavanje hantavirusnih receptorjev na tarčnih celicah. Segment S (1,8–2,1 kb) pa ima zapis za nukleokapsidni protein (Hepojoki in sod., 2012) (Slika 2).

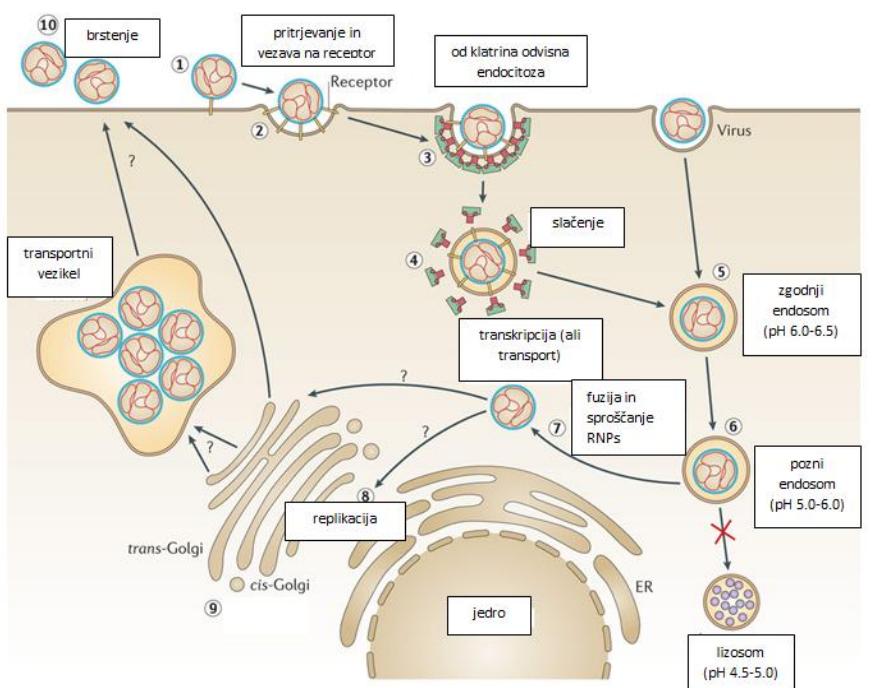
Pri hantavirusih, ki se ohranjajo v glodavcih iz poddružin Arvicolinae (virus PUU, Tula, Prospect Hill), Neotominae in Sigmodontinae (virus New-York, SNV, ANDV), so dokazali tudi visoko ohranjen sekundarni bralni okvir, ki kodira nestruktturni protein in naj bi imel vlogo pri izmikanju protivirusnem imunskega odgovoru gostitelja ali pri prilagoditvi virusa na gostitelja. Dokazali so tudi, da lahko nestruktturni protein pri nekaterih hantavirusih, deluje kot blag zaviralec interferonov (Jääskeläinen in sod., 2007).



Slika 2: Shematski prikaz zgradbe hantavirusnega viriona (Saksida, 2011).

Hantavirusi vstopijo v celico preko integrinov. Patogeni hantavirusi vstopajo v celico skozi integrinske receptorje $\beta 3$, ki so izraženi na endotelijskih, epitelijskih, dendritičnih celicah in limfocitih. Nepatogeni hantavirusi pa vstopijo v celico skozi integrinske receptorje $\beta 1$. Motiv RGD (tripeptid: arginin-glicin-asparaginska kislina), ki je prisoten na naravnih ligandih, ni potreben za vezavo hantavirusov (tako v primeru integrinov $\beta 1$ kot tudi $\beta 3$). To opažanje ni značilno le za hantaviruse, temveč tudi za rotaviruse in virus Zahodnega Nila, kjer so ugotovili, da vstopijo v celice neodvisno od motiva RGD. Kot koreceptor pri vstopu virusa Hantaan in PUU so identificirali faktor DAF/CD55 (DAF, angl. decay accelerating factor) (Schönrich in sod., 2008).

Razmnoževanje hantavirusov v gostiteljski celici poteka tako, da se virus najprej pritrdi na celično površino preko interakcije med receptorjem na površini gostiteljske celice in virusnim glikoproteinom. Vezava sproži endocitozo, s katero virus vstopi v celico. Navadno vstop poteka z od klatrina odvisno endocitozo, kjer se klatrinski plašč razstavi, vezikli z virionom vstopijo v zgodnji endosom, ki dozori v pozni endosom. Zaradi znižanja pH v pozinem endosому pride do konformacijskih sprememb v fuzijskih virusnih proteinih. Posledično pride do fuzije med virusno in endosomalno membrano. Nato se sprostijo virusni ribonukleinski proteini in začne se primarna transkripcija ter produkcija virusnih proteinov. Transkripcija lahko poteka na mestu sproščanja ali na ER-Golgi (ER: endoplazemske retikulum) intermediarnemu kompartimentu. Virus se lahko tudi neposredno transportira v Golgijev kompleks iz poznegata endosoma pred ali po fuziji. Razmnoževanje virusa poteka v ER-Golgi intermediarnemu kompartimentu ali cis-Golgi. Virus brsti v citoplazemske mešičke Golgijevega aparata, ki nato potujejo do citoplazemske membrane, se z njim zlijejo in sprostijo viruse (Vaheri in sod., 2013) (Slika 3).



Slika 3: Razmnoževanje hantavirusov (Vaheri in sod., 2013).

2.3 EKOLOGIJA HMRS

Ekologija hantavirusov je kompleksna, saj so za njihovo ohranjanje v naravi pomembni različni dejavniki, kot sta podnebje in pokrajina/habitat. Številčnost naravnih gostiteljev, malih sesalcev, je namreč povezana z dostopnostjo hrane v okolici in poletnimi ter jesenskimi temperaturami, ki vplivajo na letino plodov (Jonsson in sod., 2010). Epidemije HMRS navadno sovpadajo s povečano gostoto glodavcev. Poleg podnebnih dejavnikov je verjetnost prenosa virusa na ljudi odvisna od strukture človeških naselij ter je povezana z aktivnostjo človeka v naravi (poklic in način življenja) (Jonsson in sod., 2010). Večje tveganje za okužbo s hantavirusi je pri vojakih, gozdarjih, kmetih in ljudeh, ki živijo v neposredni bližini gozdov (Reusken in Heyman, 2013).

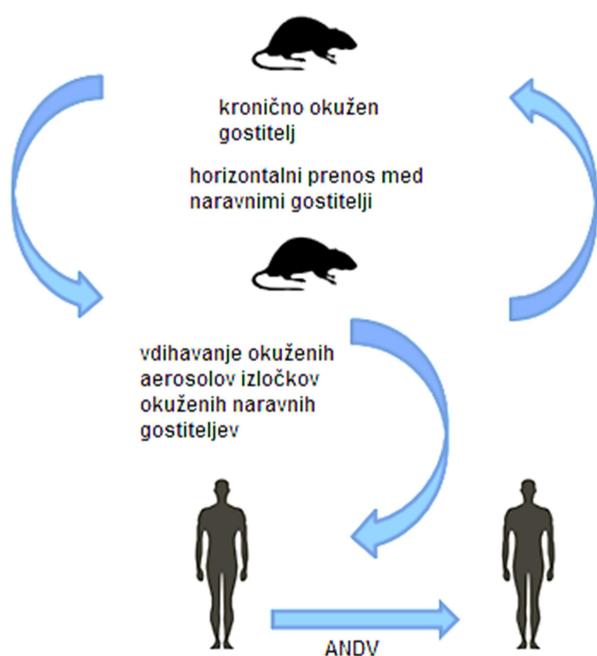
V Sloveniji kroži pet hantavirusov: virus Puumala, virus Dobrava (DOB-Dobrava), virus Dobrava-Kurkino (DOB-Kurkino), virus Tula in virus Seewis, med katerimi povzročata HMRS le virus PUU in oba tipa virusa DOB. Naravni gostitelj virusa DOB, je rumenogrla miš (*Apodemus flavicollis*). Tem glodavcem ustreza zreli listnatni gozd v območju, kjer je ustrezna raznolikost rastlin, ki vsako leto zagotavlja zadostno zalogu hrane (Kryštufek, 1991; Vukićević-Radić in sod., 2006). Po nekaj klinično težkih primerih HMRS v jugovzhodnem delu Slovenije, so leta 1988 izolirali virus DOB iz pljuč rumenogrle miši, ki je bila ujeta v vasi z imenom Dobrava (Avšič-Županc in sod., 1992). Naravni gostitelj virusa DOB-Kurkino je dimasta miš (*A. agrarius*), ki jo lahko najdemo na področjih travnatih polj, naseljenih območij in gozdov (Kryštufek, 1991; Vukićević-Radić in sod., 2006). Virus DOB-Kurkino povzroča blažjo obliko HMRS v osrednji Evropi (Klempa in sod., 2013) in na območju Balkana (Korva in sod., 2013a). V Sloveniji je približno 70 %

primerov HMRS zaradi okužbe z virusom PUU. Naravni gostitelj virusa PUU je *Myodes glareolus* ali gozdna voluharica, ki jo najdemo v vlažnih iglastih in mešanih do listnatih gozdovih ter na močvirnatih področjih in bregovih rek (Kryštufek, 1991).

2.3.1 Kroženje hantavirusov v naravi

Naravni rezervoar hantavirusov so glodavci, rovke in krti, pri katerih hantavirusi ne povzročajo vidnih patoloških sprememb. Med naravnimi gostitelji se virus prenaša horizontalno. Do okužbe prihaja preko ugriza zaradi nasilnega vedenja glodavcev (tekmovalnost za hrano, teritorialnost) (Pincelli in sod., 2003) ali z vdihovanjem okuženih izločkov živali.

Pri kroženju hantavirusov v naravi (Slika 4) predstavlja človek le naključnega gostitelja. Ljudje se s hantavirusi okužijo z vdihavanjem aerosolov kužnih izločkov glodavcev (urin, iztrebki, slina) (Schmaljohn in Hjelle, 1997). Hantavirusne okužbe se ne prenašajo s človeka na človeka, kljub temu je bil opisan en primer tovrstne okužbe z virusom AND, ki povzroča HCPS v Argentini in Čilu (Enria in sod., 1996; Wells in sod., 1997).

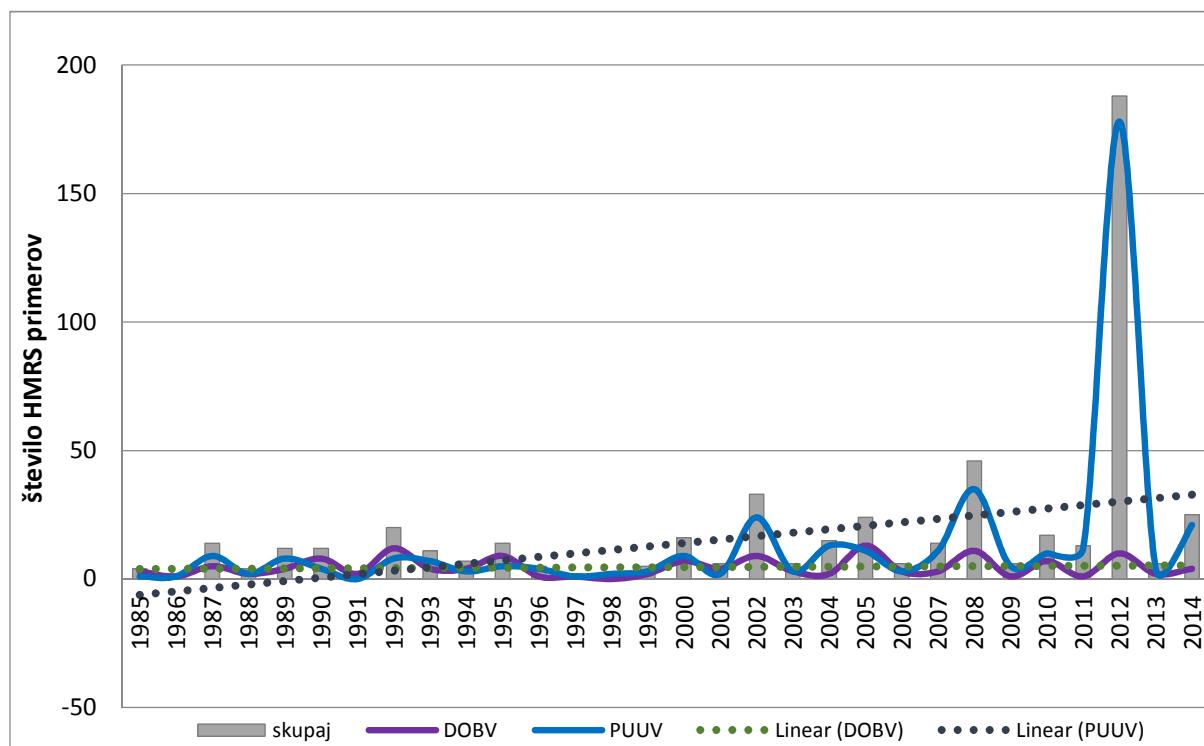


Slika 4: Kroženje hantavirusov v naravi (povzeto po Pincelli in sod., 2003).

2.4 EPIDEMIOLOGIJA HMRS

V Evropi število primerov HMRS narašča, prav tako pa se povečuje tudi število izbruhov. Letno je dokazanih okoli 10,000 primerov okužb. Primeri bolezni se pojavljajo sporadično ali v manjših epidemijah. Večina okužb se pojavi poleti, saj so takrat ljudje bolj aktivni v naravi (Reusken in Heyman, 2013).

O primerih HMRS v Sloveniji so prvič poročali že leta 1954 (Radosevic in Mohacek, 1954). Ko so izolirali in opredelili virus DOB, je bilo jasno, da je le-ta odgovoren za težke, celo smrtnne primere HMRS v Sloveniji (Avšič-Županc in sod., 1992). Od leta 1985 do 2014 so laboratorijsko potrdili 537 primerov HMRS (Slika 5). V 138 primerih so potrdili okužbo z virusom DOB, v 399 pa okužbo z virusom PUU (IMI, 2014). Bolniki izhajajo iz celotne Slovenije, največ jih je iz Ljubljane z okolico, Dolenjske in Štajerske regije. Povprečna stopnja smrtnosti je 4,5 %, če pa obravnavamo le okužbe z virusom DOB pa je le-ta 9,8 % (Avšič-Županc in sod., 1999; Kraigher in sod., 2012).

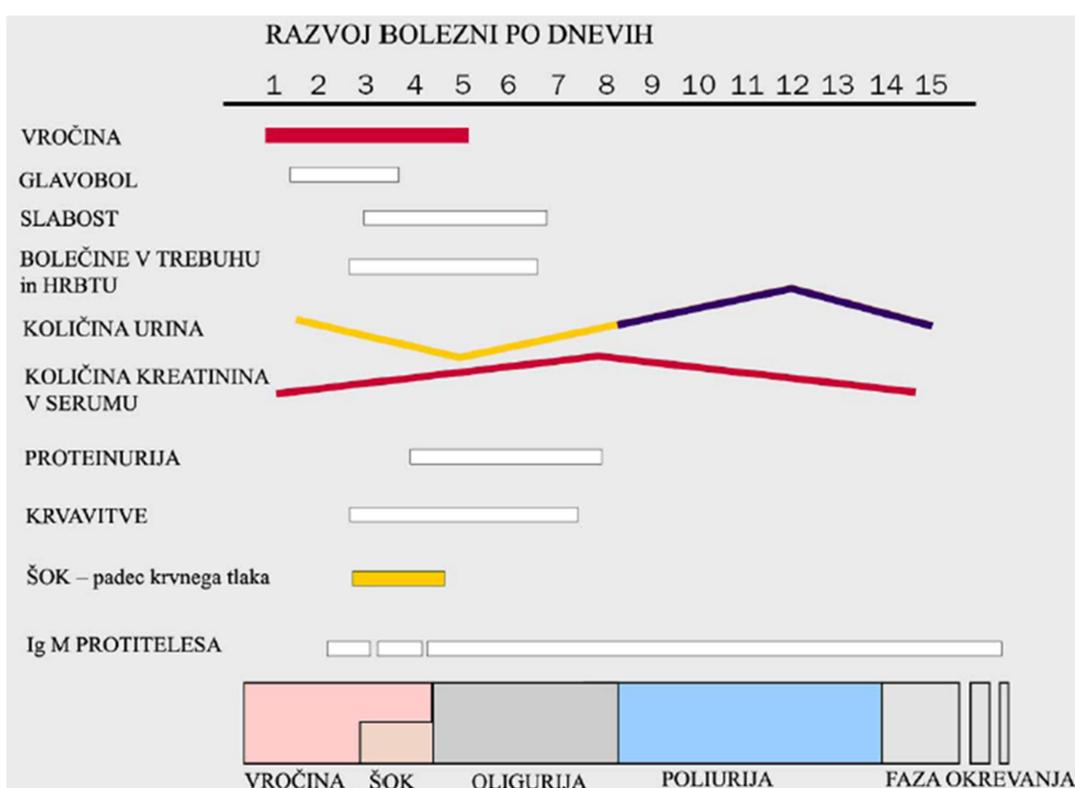


Slika 5: Grafičen prikaz števila HMRS primerov v Sloveniji v času od leta 1985 do 2014 (IMI, 2014).

2.5 KLINIČNA SLIKA

V Sloveniji HMRS povzročata virus DOB in PUU. Bolezen se kaže v različno težkem poteku. Okužbe z virusom PUU potekajo v 65 % v blagi oblikih, 24 % srednjih, 8 % v težkih in 3 % v zelo težkih oblikah. Okužbe z virusom DOB pa navadno potekajo pri 44 % bolnikov v blagi oblikih, v 40 % v srednje težki oblikah, medtem ko težko obliko bolezni vidimo pri 12 % in zelo hudo pri 4 % bolnikov (Avšič-Županc in sod., 2014).

Inkubacijska doba je 2-3 tedne. Bolezen poteka v petih fazah: vročinska, hipotenzivna, oligurična, diuretična faza in faza okrevanja (Slika 6). Te faze niso vedno klinično opredeljive, saj so meje med njimi lahko zbrisane, predvsem pri blažjem poteku bolezni. Potek okužbe variira od brezsimptomne okužbe do okužbe s smrtnim izidom (Vapalahti in sod., 2003).



Slika 6: Shematski prikaz kliničnega poteka HMRS (Vapalahti in sod., 2003)

Prva faza bolezni je vročinska faza, ki se običajno prične z nenadno vročino in glavobolom. Po dveh dneh sledijo gastrointestinalne težave, slabost, bruhanje in bolečine v trebuhu. V zgodnji fazi bolezni je pogosta tudi zaspanost. Pomemben klinični znak je prehodna motnja vida ali miopija, ki nastopi pri več kot tretjini bolnikov zaradi odebilitve leče. Pri težkem poteku bolezni lahko hitro pride do hipotenzije ali celo šoka. Znaki okvare ledvic in bolečine v križu se pojavijo pri polovici bolnikov z oligurijo oz. anurijo. Akutna odpoved ledvic z močnim elektrolitskim neravnovesjem je prisotna pri redkih bolnikih. Krvavitve se izrazijo kot petehije, hematurije, melene in so prisotne v približno 10 % bolnikov okuženih z virusom PUU. Klinična slika okužb z virusom DOB je v osnovi podobna okužbam z virusom PUU, le simptomi so navadno v bolj hudi obliki: krvavitve (26-59 %), trombocitopenija, šok (21-28 %), odpoved ledvic, ki zahteva dializno zdravljenje (30-47 %), plevralski izliv, pogoste so tudi gastrointestinalne in EKG motnje. Okrevanje se navadno prične v drugem tednu okužbe, ko pride do izboljšanja v izločanju urina. Popolno okrevanje lahko traja več tednov.

Za HMRS so značilni laboratorijski kazalci: proteinurija (100 %), povečane vrednosti serumskega kreatinina (95-100 %), trombocitopenija (50-75 %), levkocitoza (50 %), hematurija (58-85 %), povečane vrednosti C-reaktivnega proteina (do 96 %) in povišane serumske transaminaze (41-68 %) (Preglednica 2) (Vapalahti in sod., 2003).

Preglednica 2: Pogostost različnih kliničnih in laboratorijskih kazalcev pri HMRS bolnikih, okuženih z virusom Puumala in Dobrava (Vapalahti in sod., 2003).

Kazalci	Puumala*	Dobrava*
vročina	97-100	84-100
glavobol	62-90	62-75
abdominalne bolečine	64-75	74-85
bolečine v križu	63-82	59-84
slabost/bruhanje	33-83	50-85
vrtočavica	12-25	30
petehije	12	59
konjunktivitis	14	50-63
notranje krvavitve/ zapleti zaradi krvavitev	2	9-26
hipotenzija (<90/40 mmHg)	1-2	44-49
miopija/ motnje vida	10-36	42-62
oliguria (<0,5 L/dan)	54-70	47-78
poliurija (>2 L/dan)	97-100	75
levkocitoza (>10x10 ⁹ /L)	23-57	44-53
trombocitopenija 52-75	56-68	78
proteinurija	84-100	94-100
hematurija	58-85	100
serumski kreatinin (>150 µmol/L)	90	94-100
povišane transaminaze	41-60	28-68
dializno zdravljenje	5-7	30-47
smrtnost	0	9-12

*Odstotki simptomov in kazalcev pri HMRS bolnikih, okuženih z virusom PUU, na Finskem (n = 126), v Franciji (n = 320), na Hrvaškem (n = 21) in Švedskem (n = 74) ter bolnikih, okuženih z virusom DOB, v Sloveniji (n = 19), na Hrvaškem (n = 8) in v Grčiji (n = 138).

Pri zdravljenju HMRS je ključnega pomena ohranjanje tekočinskega ravnovesja v telesu. V primeru hudega zastajanja tekočin zaradi oslabljene funkcije ledvic je potrebno dializno zdravljenje. V primeru zelo nizkega števila trombocitov in krvavitev je potrebna transfuzija trombocitov (Vapalahti in sod., 2003).

2.6 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

2.6.1 Serološki testi

Okužbo s hantavirusi dokazujemo s serološkimi testi, s katerimi dokazujemo protivirusna protitelesa razreda IgM in IgG v serumu bolnika. Običajno imajo bolniki ob pojavu kliničnih znakov tudi specifična protitelesa v serumu (Kruger in sod., 2001). Za dokazovanje okužb s hantavirusi se uporablja test posredne imunofluorescence (IFA, ang. indirect immunofluorescence assay) in encimskoimunski test (EIA, ang. immunoenzymatic assay, ELISA ang., Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Vapalahti in sod., 1996; Kruger in sod., 2001). Za dokaz protiteles IgM se uporablja tudi hitri imunokromatografski testi (Hujakka in sod., 2003).

2.6.2 Molekularna diagnostika

Za diagnostiko lahko uporabimo tudi molekularne metode, ki so hitre, občutljive ter omogočajo kvantifikacijo virusne RNA v kliničnih vzorcih bolnikov. Najpogostejsa metoda je verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo v realnem času (RT-PCR, angl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) (Avšič-Županc in Petrovec, 2003). Poleg določevanja koncentracije virusnega bremena ta metoda omogoča tudi razlikovanje med hantavirusnimi tipi in je uporabna za genotipizacijo (Evander in sod., 2007).

2.7 PATOGENEZA IN IMUNOST HMRS

Patogeneza HMRS je podobno kot pri drugih hemoragičnih mrzlicah slabo poznana. Ker ni primernih živalskih modelov, smo omejeni na *in vitro* raziskave in redke klinične raziskave. V nasprotju z drugimi hemoragičnimi virusi kot je na primer virus Ebola, ki so citopatski in neposredno povzročijo žilno popuščanje endotelijskih celic, hantavirusi nimajo neposrednega citopatskega učinka na gostiteljske celice. To nakazuje na vpletene imunskega odziva gostitelja v virusni patogenezi. Imunski odziv na hantavirusno okužbo pri ljudeh ne zagotavlja le obrambe pred hantavirusi, temveč lahko tudi prispeva k razsoju virusa po telesu. Kako se virus razširja v telesu po okužbi ni znano, vendar imajo pri tem ključno vlogo nezrele dendritične celice (DC), ki izražajo integrinski receptor β 3 in koreceptor DAF/CD55. V dihalnih poteh in pljučnih alveolih je mreža nezrelih DC, ki so lokalizirane v bližini epitelijskih celic, ki prevzamejo virus. Hantavirusi lahko okužijo DC, ne da bi pri tem povzročili njihovo propadanje. S hantavirusi okužene DC bi tako lahko služile kot transport virionov preko limfnih žil do regionalnih limfnih vozlov, kjer nato okužijo druge imunske celice, kot so makrofagi in monociti. Po podvojevanju celično vezani ali prosti virioni dosežejo endotelijskie celice, ki predstavljajo glavne tarčne celice (Schönrich in sod., 2008).

2.7.1 Protivirusni imunski mehanizmi

Razumevanje interakcije med imunskim sistemom in hantavirusi je pomembno za razumevanje poteka HMRS, saj številne raziskave kažejo, da posameznikov imunski sistem vpliva na potek in izhod bolezni.

Protivirusni imunski odziv lahko razdelimo na prirojeno in pridobljeno imunost. Pridobljen imunski odziv zajema specifično prepoznavanje patogena s klonalno distribuiranimi celičnimi receptorji T in B, ki nastajajo naključno in tvorijo ogromno množico med seboj različnih limfocitov. Preden lahko le-ti prispevajo k obrambi gostitelja, mora priti do klonske ekspanzije in diferenciacije specifičnih celičnih klonov T in B v efektorske celice, kar zakasni celično posredovan imunski odziv za 5-7 dni. V zgodnji fazi mora torej priti do nadzora hantavirusne okužbe z mehanizmi naravne odpornosti, ki je evolucijsko starejša in bolj univerzalna od pridobljene imunosti. Celice prirojenega imunskega odziva imajo na

svoji površini receptorje, s katerimi prepoznajo tujek (PRR, angl. pattern recognition receptors). Ti se vežejo z molekulskimi vzorci na različnih patogenih (PAMP, angl. pathogen-associated molecular patterns). Obstajajo štirje tipi z virusom povezanih PAMP: glikoproteini ovojnice, dvoverižna RNA, enoverižna RNA in nemetilirana CpG DNA. Dendritične celice (DC) povezujejo odzive naravne in pridobljene imunosti s prepoznavanjem patogena preko PRR in diferenciacije v najbolj efektivne celice imunskega odziva: antigen predstavitevne celice (APC). Te so pomembne za aktivacijo efektorskih komponent pridobljene imunosti: celic T-pomagalk CD4+ (Th, angl. T helper cells), citotoksičnih limfocitov T in limfocitov B. DC prevzamejo antigen, ga predelajo in predstavijo njegove peptide preko svoje površine v sklopu kompleksa tkivne skladnosti (MHC, ang. major histocompatibility complex) razreda I in II. Virusne antigene nato prepoznajo limfociti T preko T-celičnih receptorjev. DC ne določajo le moči ampak tudi kvaliteto imunskega odziva. Preko izločanja različnih citokinov (odvisno od stimulusa tekom diferenciacije), DC usmerjajo razvoj antigen specifičnih limfocitov T v različne tipe celic T pomagalk: Th1, Th2, Th17 ali regulatorne T (Treg) celice, ki so ključne za razplet virusne okužbe. Treg celice so pomembne za ohranjanje homeostaze gostitelja preko nadzora vnetnih reakcij, saj tako preprečijo imunopatologijo tekom protivirusnega imunskega odziva. Po drugi strani pa supresija gostiteljevega imunskega odziva s Treg lahko pomaga virusu, da ostane perzistenten (Schönrich in sod., 2008).

2.7.2 Vloga celičnega imunskega odziva v imunopatogenezi HMRS

Akutna faza bolezni HMRS je povezana z močnim odzivom celic T, pri katerem sodelujejo tako limfociti CD4+ kot tudi CD8+. Največji odziv je navadno že v času predstavitev tekom vročinske faze bolezni (Mustonen in sod., 2013). Pri bolnikih je večina podatkov za limfocite T pridobljena iz analize limfocitov iz periferne krvi, malo pa je znanega o njihovi lokalni funkciji na mestu okužbe. Po biopsiji ledvic bolnikov z akutno odpovedjo ledvic zaradi okužbe z virusom PUU so na mestu poškodbe tkiva našli zlasti infiltrate limfocitov T (Temonen in sod., 1996; Terajima in sod., 2004). Citotoksični limfociti T bi lahko prispevali h kapilarnemu popuščanju tekom HMRS s produkcijo vnetnih citokinov ali direktno z ubijanjem z virusom PUU okuženih endotelijskih celic (Klingström in sod., 2006). Koncentracija limfocitov T upade, ko viremije ni več mogoče dokazati. Celice T že na začetku izražajo zaviralne molekule, ki so povezane z negativno regulacijo odziva celic T (Lindgren in sod., 2011). Spominske limfocite, specifične za nukleokapsidni protein N, so dokazali 15 let po akutni okužbi, kar kaže na dolgotrajen imunski spomin limfocitov T (Van Epps in sod., 2002). V celični imunski odziv so vpletene tudi naravne celice ubijalke (NK, ang. natural killer cells). Björkström s sod. (2011) je v raziskavi pokazal, da se celice NK v akutni okužbi hitro namnožijo in ostanejo v povečanem številu več kot dva meseca.

V akutni fazi sodelujejo v odzivu celic T tudi Treg, ki imajo zaviralne učinke na efektorske celice. To bi bilo lahko pomembno za zamejevanje vnetnega odziva in tako preprečevanje poškodbe ožilja (Zhu in sod., 2009). Po drugi strani pa lahko na ta način zavirajo učinkovit

izbris virusa s citotoksičnimi celicami T in tako podaljšajo viremijo (Easterbrook in sod., 2007; Schountz in sod., 2007). Vloga Treg v patogenezi HMRS še ni popolnoma jasna (Mustonen in sod., 2013).

2.7.3 Vloga citokinov v imunopatogenezi HMRS

Kot posledica aktivacije signalne poti preko PRR nastajajo citokini, ki so ključni za začetek različnih protivirusnih mehanizmov, preko katerih lahko gostitelj zameji širjenje virusa. Citokini so pomembni za imunski sistem, ker uravnavajo ravnotežje med protitelesnim in celičnim imunskim odzivom z aktivacijo in regulacijo zorenja, rasti in odzivnosti določene populacije imunskih celic. Nekateri citokini lahko tudi ojačajo ali inhibirajo delovanje drugih citokinov. Poznamo več skupin citokinov: interlevkine (IL), interferone (IFN), rastne faktorje (RF), kemokine in dejavnike tumorske nekroze (TNF). Na splošno jih delimo v dve večji skupini, na citokine naravne (IL-1, TNF- α , IL-12, IL-6, IFNa, IP-10, VEGF, TNF β , ...) in pridobljene (IL-2, IL-17, IL-10, TGF- β , IFN γ , ...) imunosti (Abbas in sod., 2007). Vnetni citokini in kemokini lahko po eni strani pripomorejo k odstranitvi virusa z aktivacijo celic naravne imunosti (npr. celic NK), po drugi strani pa lahko z ustrezno regulacijo povzročijo imunopatološki proces (Schönrich in sod., 2008). V patogenezi HMRS je verjetno pomembno neravnovesje med vnetnimi in regulatornimi citokini (Borges in sod., 2008; Saksida in sod., 2011). V nemški raziskavi so pri bolnikih s HMRS po okužbi z virusom PUU dokazali povišane vrednosti IL-2, IL-6, IL-8, TGF- β 1 in TNF- α . Po akutni fazи so opazili upad koncentracije IL-6, IL-10 in TNF- α , medtem ko se je nivo imunosupresivnega TGF- β 1 povečal. Ugotovili so, da teža in potek bolezni sovpadata z visokim nivojem vnetnih citokinov IL-6 in TNF- α ter nizko koncentracijo protivnetnega citokina TGF- β . Sadeghi in sod. (2011) v raziskavi predvidevajo, da zakasnjena aktivacija zaščitnega imunskega mehanizma, ki negativno regulira močan vnetni odziv v zgodnji fazи, prispeva k patogenezi hantavirusne okužbe. Podobne rezultate so dobili tudi raziskovalci, ki so preučevali bolnike s HCPS v Braziliji. Opazili so povezavo med visokimi koncentracijami IL-6 in smrtnim izidom bolezni. Predvidevajo, da Th1 odziv efektorskih citokinov sovpada s težo poteka bolezni. Odsotnost regulacije prekomernega imunskega odziva povezujejo z nizkimi koncentracijami TGF- β (Borges in sod., 2008). Tudi v drugih raziskavah so pokazali pomembno vlogo citokinov v patogenezi HMRS, saj so dokazali povišano koncentracijo serumskih citokinov: TNF- α , IL-6, IL-2, IL-1, IL-12 in IL-10 (Linderholm in sod., 1996; Mäkelä in sod., 2004; Outinen in sod., 2010; Sadeghi in sod., 2011; Saksida in sod., 2011; Takala in sod., 2000; Temonen in sod., 1996; Krakauer in sod. 1995; Markotic in sod., 2002). Analiza citokinov pri slovenskih bolnikih je pokazala, da imajo bolniki okuženi z virusom DOB, ki imajo težji potek HMRS, višje vrednosti regulatornega citokina IL-10 in vnetnega citokina TNF- α kot bolniki, okuženi z virusom PUU, ki imajo višje vrednosti vnetnega citokina IL-12 (Saksida in sod., 2011). Za TNF- α je znano, da poveča prepustnost ožilja (Niikura in sod., 2004; Raftery in sod., 2002; Schönrich in sod., 2015). Poleg vnetnega TNF- α bi lahko imel pomembno vlogo pri poškodbi žilnega endotelija in povečani prepustnosti kapilar tudi

kemokin VEGF. V normalnih pogojih VEGF usmerja disociacijo celičnih povezav, ko je potrebno popravilo poškodovanega ožilja (Lampugnani in sod., 2007). Hantavirusi se vežejo na integrine $\alpha v\beta 3$, ki običajno tvorijo kompleks z receptorji VEGF in tako onemogočijo normalno regulacijo prepustnosti preko VEGF. Kot posledica so s hantavirusi okužene endotelijalne celice hiperpermeabilne (Gavrilovskaya in sod., 2008). Vlogo VEGF so pri okužbi s hantavirusi pokazali Gavrilovskaya in sod. (2012) saj so najvišje koncentracije VEGF izmerili pri bolnikih s HCPS, ki so imeli težji potek bolezni. Podobne rezultate opisujejo tudi Ma in sod. (2012) pri grških bolnikih s HMRS, pri katerih so opazili močan porast serumskega VEGF od vročinske do oligurične faze bolezni ter pozitivno korelacijo med nivojem VEGF in težo poteka bolezni. Znanstveniki z izgubo integritete endotelija povezujejo tudi komplement, ki je del naravne imunosti (Mustonen in sod., 2013; Tsukada in sod., 1995; Morgan, 1999). Končni produkt kaskade komplementa, citolitičen kompleks MAC (ang. membrane attack complex), lahko vzpodbudi celične reakcije in nastajanje vnetnih citokinov, ki spremenijo funkcijo endotelija (Morgan in sod., 1999). Aktivacija komplementa sovpada s težo kliničnega poteka bolezni HMRS in bi lahko posredno ali neposredno inducirala povečano prepustnost žilnega endotelija (Sane in sod., 2012; Vaheri in sod., 2013). Ne-litični topni končni kompleks komplementa, SC5b-9, lahko veže integrin $\beta 3$, kar se odraža v povečani prepustnosti endotelija (Tsukada in sod., 1995).

2.7.4 Vloga virusnega bremena v imunopatogenezi HMRS

Povezavo med višino virusnega bremena in potekom bolezni so preučevali v več raziskavah (Evander in sod., 2007; Ferres in sod., 2007; Terajima in sod., 1999; Korva in sod., 2013b). Pri bolnikih s HMRS in HCPS so ugotovili, da obstaja povezava med višjim virusnim bremenom in težjo klinično sliko (Saksida in sod., 2008; Xiao in sod., 2006).

Pri preučevanju bolnikov okuženih s SNV, so ugotovili, da je visoko virusno breme v krvi povezano s težjim potekom bolezni (Terajima in sod., 1999). Prav tako, so tudi Xiao in sod. (2006) v raziskavi pokazali povezavo med težjim potekom bolezni in višino viremije ter predlagali, da bi virusno breme lahko služilo kot napovedni kazalec izhoda HCPS. Evander in sod. so leta 2007 objavili raziskavo, v kateri so preučevali kinetiko titra protiteles in viremijo pri bolnikih okuženih z virusom PUU. Pokazali so, da postopen upad viremije sovpada s porastom nivoja protiteles. Pri bolniku s smrtnim izidom bolezni so dokazali konstantno visok nivo viremije ter šibek protitelesni odziv IgM in odsotnost odziva IgG. Pri ostalih bolnikih pa je virusno breme padlo ali ni bilo več dokazljivo po štirih do devetih dneh hospitalizacije, titer IgM in IgG protiteles pa je narastel.

V raziskavi, ki so jo izvedli Korva in sod. (2013b), so ugotovili razliko v višini virusnega bremena med bolniki okuženimi z virusom PUU in DOB. Bolniki okuženi z DOB imajo precej višje virusno breme kot bolniki okuženi s PUU. Ta ugotovitev se ujema s predhodnimi raziskavami (Saksida in sod., 2008; Xiao in sod., 2006), ki kažejo na to, da

bolj patogeni hantavirusi (DOB in SNV) dosegajo višje virusno breme. V obeh skupinah bolnikov so opazili tudi razliko v virusni kinetiki. Pri bolnikih okuženih z virusom DOB pride do začetnega upada virusnega bremena po nekaj dneh hospitalizacije, nato pa se virusno breme stabilizira. Pri bolnikih okuženih z virusom PUU pa virusno breme tekom hospitalizacije upada (Korva in sod., 2013b).

Pri HMRS je značilen zelo različen kliničen potek bolezni, h kateremu prispevajo tudi razlike v dinamiki imunskega odziva med bolniki s HMRS okuženimi z virusom DOB ali PUU. Virusno breme je lahko dodaten faktor, ki prispeva k raznolikem napredovanju bolezni (Korva in sod., 2013b).

3 PREISKOVANCI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili vzorce bolnikov s HMRS, ki so se med leti 2008 in 2010 bolnišnično zdravili v Sloveniji in so bili že predhodno zbrani in obravnavani v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in laboratoriju WHO, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Skupno smo v raziskavo vključili 16 bolnikov: 7 okuženih z virusom PUU in 9 okuženih z virusom DOB.

Pogoji za vključitev v magistrsko naložo so bili:

- bolniki s HMRS, pri katerih smo imeli na voljo več zaporedno odvzetih vzorcev (od sprejema v bolnišnico do odpusta)
- na voljo je bilo dovolj vzorca za izolacijo virusne RNA in določitev virusnega bremena
- na voljo je bilo dovolj plazme za določitev koncentracije citokinov in kemokinov
- na voljo so bili klinični podatki o poteku in teži bolezni.

Obravnavane bolnike so raziskovalci razdelili v skupine v predhodni raziskavi (Saksida, 2008). Pri tem so upoštevali točkovno lestvico za oceno poteka bolezni, ki so jo leta 2002 predlagali Kuzman in sodelavci, v kateri so vrednotili različne laboratorijske in klinične kazalce (Kuzman in sod., 2003).

Obravnavani bolniki so bili razvrščeni v dve skupini: na bolnike z blagim potekom bolezni in na bolnike s težkim potekom bolezni (Preglednica 3). V raziskavo smo vključili 7 bolnikov okuženih z virusom PUU, med katerimi so imeli 3 blag in 4 težek potek HMRS ter 9 bolnikov okuženih z virusom DOB, med katerimi jih je imelo 6 blag in 3 težek potek bolezni (od tega 1 bolnik s smrtnim izidom bolezni). Bolniki so bili bolnišnično zdravljeni med 7 do 19 dni, v povprečju 11 dni (bolniki, okuženi z virusom PUU v povprečju 10 dni; bolniki, okuženi z virusom DOB pa 12 dni).

Skupno smo testirali 139 vzorcev plazme, od tega 50 vzorcev bolnikov okuženih z virusom PUU in 89 z virusom DOB.

V raziskavo smo vključili tudi vzorce plazme 52 zdravih prostovoljcev, ki so se po spolu in starosti ujemali s preiskovanimi bolniki. Ta skupina je predstavljala kontrolno skupino v raziskavi.

Preglednica 3: Seznam preiskovancev, potek bolezni in število dni zdravljenja.

Virus	ID bolnika	Potek bolezni	Število dni zdravljenja
PUU	P_250	blag	14
	P_251	blag	9
	P_258	težek	14
	P_284	blag	7
	P_293	težek	9
	P_295	težek	7
	P_296	težek	9
DOB	P_239	blag	14
	P_256	blag	8
	P_261	težek	12
	P_268	smrtni	15
	P_273	blag	10
	P_274	blag	8
	P_297	blag	16
	P_299	blag	7
	P_301	težek	19

3.2 METODE DELA

3.2.1 Določanje koncentracije serumskih citokinov in kemokinov z MILLIPLEX MAP kompletom

Koncentracije citokinov in kemokinov v plazmah bolnikov smo določali s komercialnim kvantitativnim kompletom MilliplexMAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, ZDA) po navodilih proizvajalca.

3.2.1.1 Princip delovanja xMAP tehnologije

Postopek določanja koncentracije citokinov je temeljal na Luminex xMAP tehnologiji (MAP- angl. multi-analyte profiling). Ta omogoča kvantitativno, sočasno zaznavanje več analitov v istem vzorcu, kar omogoča veliko izboljšanje v produktivnosti in kapaciteti biotestov.

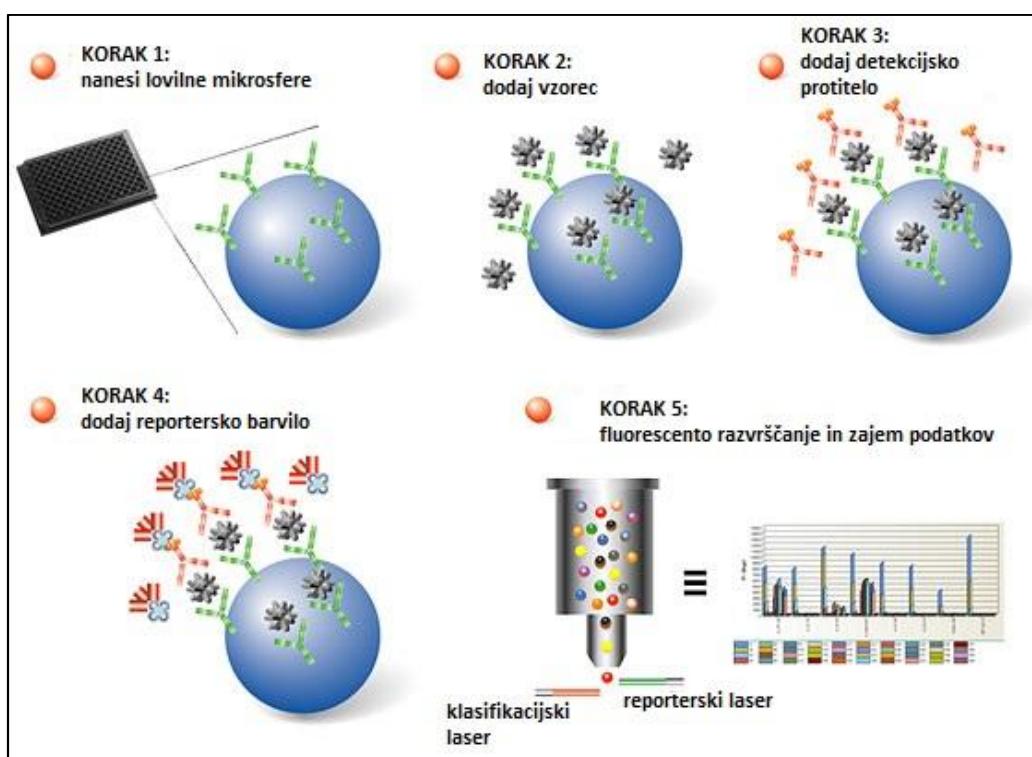
Luminex xMAP tehnologija uporablja 5,6 µm velike polistirenske magnetne kroglice, ki so notranje pobarvane z rdečim in infrardečim fluoroforom. Z uporabo točno določenih koncentracij teh dveh barvil lahko dobimo serijo različnih setov magnetnih kroglic (do 500 različnih setov). Vsak set ima edinstven spektralni podpis, ki je določen z ustreznim razmerjem rdeče in infrardeče mešanice. Različne magnetne kroglice so lahko združene v istem testu, saj vsaka kroglica nosi svoj edinstven podpis, tako da lahko xMAP detekcijski

sistem identificira, kateremu setu le-ta pripada. Zato je mogoče sočasno testiranje do 500 različnih analitov v enem samem reakcijskem volumnu. Površinska kemija magnetnih kroglic omogoča imobilizacijo lovilnih reagentov, ki so lahko lovilna protitela, oligonukleotidi, peptidi, receptorji. Testi potekajo na mikrotiterski ploščici s 96 luknjicami. xMAP tehnologija v osnovi izhaja iz principa pretočne citometrije. Pretok suspenzije magnetnih kroglic poteka v tako tankem curku, da gredo skozi detektorsko komoro posamezne kroglice ena za drugo. Ko le-te potujejo skozi detekcijsko komoro, rdeči laser (klasifikacijski laser) vzbudi notranje rdeče in infrardeče barvilo. To omogoča ustrezno klasifikacijo magnetne kroglice v enega izmed 500 setov. Zeleni laser (reporterski laser) pa vzbudi reportersko barvilo, oranžno fluorescenco, ki je povezana z vezavo analita. Ker potekata obenem klasifikacija magnetne kroglice in zaznavanje reporterja, lahko Luminex natančno določi rezultate multipleks testa.

Na podlagi Luminex osnove lahko izvedemo različne teste, kot so encimski testi, imunski testi, receptor-ligand testi in DNA testi. Opisana tehnologija je zelo primerna predvsem za odkrivjanje zdravil in v diagnostiki. Prednost metode sočasnega dokazovanja je tudi, da je za reakcijo potreben zelo majhen volumen vzorca in je iz ene reakcije pridobljenih več rezultatov. To je večjega pomena predvsem v primeru težko pridobljenih kliničnih vzorcih (Bio-Rad Laboratories Inc., 2016)

3.2.1.2 Postopek imunološkega Luminex testa

Luminex barvno-kodirane majhne magnetne kroglice so bile pri naši raziskavi imobilizirane s specifičnimi protitelesi proti merjenim citokinom. Med izvedbo testa se magnetne kroglice najprej vežejo na analit v vzorcu. Nato smo dodali detekcijsko protitelo z biotinom. Reakcijsko mešanico smo inkubirali s streptavidinom PE (fikoeritrin), reportersko molekulo, ki zaključi reakcijo na površini vsake magnetne kroglice. Magnetne kroglice hitro prehajajo preko laserja, ki vzbudi notranje barvilo. Drugi laser pa vzbudi PE, fluorescentno barvilo na reporterski molekuli. Na koncu digitalni-signalni procesor prepozna vsako posamezno magnetno kroglico in kvantificira rezultat biotesta, ki temelji na fluorescentnih reporterskih signalih (Merck Millipore Corporation, 2016).



Slika 7: Shematski prikaz poteka imunološkega testa, ki temelji na Luminex xMAP tehnologiji (Bio-Rad Laboratories Inc., 2016).

3.2.1.3 Priprava reagentov

a) Priprava magnetnih kroglic z imobiliziranimi protitelesi

Naše vzorce smo analizirali z 12 različnimi seti kroglic, na katerih so bila imobilizirana protitelesa proti človeškim citokinom. V preglednici 4 so navedeni analiti, ki smo jih dokazovali z ustreznimi seti kroglic. Mikrocentrifugirke z magnetnimi kroglicami smo pred uporabo sonificirali 30 sekund ter mešali na vibracijskem mešalniku 1 minuto. Nato smo dodali 60 µl vsakega seta kroglic v skupno posodico in jim dodali razredčevalec kroglic do volumna 3 ml. Nato smo mešanico kroglic premešali in jo do uporabe hranili v hladilniku na 4 °C.

b) Priprava kontrol kakovosti

Kontroli kakovosti (angl. Quality control 1 in 2) smo najprej raztopili v 250 µl deionizirane vode, mikrocentrifugirko večkrat obrnili in premešali na vibracijskem mešalniku. Po 5-10 minutah, ko se je vsebina posedla, smo kontroli prenesli v polipropilenski mikrocentrifugirki.

Preglednica 4: Seznam magnetnih kroglic z imobiliziranimi človeškimi protitelesi proti citokinom.

Kroglica z imobiliziranim človeškim protitelesom proti citokinom	Luminex regija magnetne kroglice
IFN α 2	22
IFN γ	25
IL-10	27
IL-12p40	29
IL-12P70	33
IL-17A	39
IL-2	48
IL-6	57
IP-10	65
TNF- α	75
TNF β	76
VEGF	78

c) Priprava pufra za spiranje

10x pufer za spiranje smo imeli na sobni temperaturi dokler se soli niso dobro raztopile. Nato smo 30 μ l 10x pufra razredčili z 270 μ l deionizirane vode.

d) Priprava serumskega matriksa

V stekleničko z liofiliziranim serumskim matriksom smo dodali 1 ml deionizirane vode, dobro premešali in pustili 10 minut, da se je liofilizat popolnoma rehidriral.

e) Priprava standarda

Standard smo pred uporabo rehidrirali v 250 μ l deionizirane vode in tako dobili koncentracijo 10,000 pg/ml standarda za vse analite. Mikrocentrifugirko smo nekajkrat obrnili in nato mešali 10 sekund. Po 5-10 minutah, ko se je vsebina posedla, smo standard prenesli v polipropilenski mikrocentrifugirki. Nato smo pripravili serijo redčitev. Ozadje oziroma 0 pg/ml standard je predstavljal pufer (angl. assay buffer). Priprava delovnega standarda je prikazana v spodnji preglednici (Preglednica 5).

f) Priprava vzorca

Uporabljali smo predhodno pripravljene zmrznjene vzorce plazme, zato smo jih pred uporabo v testu najprej v celoti odmrznili, dobro premešali in centrifugirali, da smo odstranili delce, ki bi lahko motili potek testa.

Preglednica 5: Priprava standarda človeških citokinov.

Koncentracija standarda	Volumen dodane dH ₂ O	Volumen dodanega standarda
10,000 pg/ml	250 µl	0
Koncentracija standarda	Volumen dodanega pufra	Volumen dodanega standarda
2,000 pg/ml	200 µl	50 µl 10,000 pg/ml
400 pg/ml	200 µl	50 µl 2000 pg/ml
80 pg/ml	200 µl	50 µl 400 pg/ml
16 pg/ml	200 µl	50 µl 80 pg/ml
3,2 pg/ml	200 µl	50 µl 16 pg/ml

3.2.1.4 Potek imunološkega testa

Pred začetkom smo pripravljene reagente pustili, da se segrejejo na sobno temperaturo in izdelali načrt postavitve standarda, kontrol in vzorcev na mikrotiterski ploščici. V vsako luknjico na mikrotiterski ploščici smo z multikanalno pipeto dodali 200 µl pufra za spiranje. Mikrotitrsko ploščo smo zaprli in 10 minut stresali na stresalniku za mikrotitrsko ploščo pri sobni temperaturi. Nato smo spiralni pufer odlili in ostanek odcedili tako, da smo mikrotitrsko ploščo obrnili na glavo in jo pritisnili na absorpcijske brisačke. V ustrezne luknjice smo odpipetirali 25 µl vsakega standarda, kontrole in ozadja (pufer). Nato smo v te luknjice odpipetirali še 25 µl raztopine serum matriksa. V luknjice za vzorec pa smo odpipetirali 25 µl pufra in nato dodali 25 µl vzorca. Mešanico pripravljenih magnetnih kroglic smo dobro premešali in v vsako luknjico odpipetirali 25 µl te mešanice. Nato smo mikrotitrsko ploščo zlepili in jo ovili z alu-folijo in inkubirali na stresalniku preko noči pri 4 °C. Naslednji dan smo mikrotitersko ploščo sprali na magnetnem držalu. Vpeli smo jo na magnetno držalo in jo pustili 1 minuto, da so se magnetne kroglice posedle. Nato smo odlili vsebino iz jamic. Mikrotitrsko ploščo smo sneli z magnetnega držala, dodali 200 µl pufra za spiranje in stresali 30 sekund. Nato smo jo ponovno vpeli v magnetno stojalo, pustili 1 minuto, da so se kroglice posedle in odstranili vsebino. Korak spiranja smo naredili 2x. Potem smo dodali 25 µl detekcijskih protiteles v vsako luknjico. Mikrotitrsko ploščo smo zlepili, pokrili s folijo in inkubirali s stresanjem 1 uro pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo v vsako luknjico dodali 25 µl streptavidin-fikoeritrina. Sledila je 30 minutna inkubacija pri sobni temperaturi. Nato smo odlili vsebino iz jamic in 2x sprali s pufrom za spiranje, kot že prej opisano. Na koncu smo dodali v vse luknjice 150 µl »tekočine za pogon« (angl. drive fluid). Kroglice smo mešali na stresalniku 5 minut in nato mikrotitrsko ploščo vstavili v Luminex napravo, kjer je potekala meritev vzorcev. Po končanem merjenju smo podatke obdelali s programom MilliplexAnalyst in jih nato izvozili v Excel, kjer smo nadalje obdelali podatke ter izdelali preglednice.

3.2.2 Določanje virusnega bremena

Koncentracijo virusnega bremena virusov PUU in DOB smo določali z osamitvijo celokupne RNA iz vzorcev bolnikov in metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qRT-PCR, angl. quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).

3.2.2.1 Osamitev virusne RNA iz vzorcev krvi bolnikov s HMRS

Osamitev RNA iz krvi bolnikov s HMRS je potekala v varnostni komori v laboratoriju druge stopnje biološke varnosti po postopku Chomzynskega in Sacchija (Chomczynski in Sacchi, 1987), ki temelji na fenol-kloroform-alkoholni osamitvi. Uporabili smo reagent TRIZOL-LS (raztopina gvanidin izotiocianata in fenola) podjetja Invitrogen Life Technologies™ (Carlsbad, Kalifornija, ZDA). TRIZOL-LS inaktivira virus, zato je osamljena RNA, ki jo uporabljamo v nadalnjih postopkih, neinfektivna. Reagent lizira celice in celične komponente, ohranja pa integriteto RNA ter jo ščiti pred RNAAzami. Postopek metode izolacije RNA smo izvedli po internem protokolu. Izolacija RNA je potekala pri sobni temperaturi, centrifugiranje pa pri +4 °C. Pred pričetkom dela smo delovno površino (mikrobiološka varnostna komora), centrifugo, pipete in stojala obrisali z Rnase Free Solution. Vzorcu smo dodali Trizol LS reagent v ustreznom razmerju (3:1 glede na vzorec). Mikrocentrifugirko smo 5x sunkovito obrnili in na kratko premešali. Vzorce smo nadalje inkubirali pri sobni temperaturi 5 minut in na kratko centrifugirali. Nato smo dodali kloroform za 1/5 volumna Trizola LS, mikrocentrifugirko 15x sunkovito obrnili in na kratko premešali. Sledila je inkubacija za 10 minut pri sobni temperaturi (vmes še enkrat premešamo). Po končani inkubaciji smo vzorec centrifugirali 15 minut na 15000 obrati/min v predhodno ohlajeni centrifuggi (+4 °C). Po dodatku kloroforma in centrifugiranju se je raztopina ločila v dve fazи, vodno in organsko, med njima pa je nastal bel obroč proteinov. V nove 1,5 ml mikrocentrifugirke smo previdno prenesli zgornjo, vodno fazo, v kateri se je nahajala RNA, ne da bi se pri tem dotaknili stene mikrocentrifugirke ali proteinov. Nato smo dodali izpopropanol, da smo vodno fazo oborili. Izpopropanola smo dodali za ½ volumna Trizola LS, mikrocentrifugirko 5x sunkovito obrnili in ponovno centrifugirali kot v prejšnjem koraku. Nato smo odstranili supernatant ter spirali tako, da smo dodali 75 % etanol v razmerju s Trizolom LS 1:1. To smo mešali 1 minuto in ponovno centrifugirali (tokrat 7 minut pri 12000 obrati/min). Potem smo odstranili čim več supernatanta ter RNA posušili v aseptični komori (15-30 minut). Nazadnje smo pelet (osamljeno RNA) raztopili v 50 µl RNase-free vodi (avtoklavirana, deionizirana, ultrafiltrirana, RNaz prosta destilirana voda) in jo shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.2.2 Enostopenjska kvantitativna verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo v realnem času (qRT-PCR)

Za enostopenjski RT-PCR v realnem času smo uporabili komplet reagentov SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Life Technologies™, Carlsbad, California, ZDA). Reagent vsebuje encima reverzno transkriptazo in Taq DNA-polimerazo v eni encimski mešanici, kar omogoča enostopenjski RT-PCR, saj reverzni prepis (sinteza cDNA) in nadalje PCR potekata v eni sami zaprti reakciji. Za zaznavanje pridelkov PCR v realnem času smo uporabili Taqman sondu, ki je oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezan reporterski fluorofor, na 3' koncu pa dušilec. Sonda se veže na enoverižne pridelke PCR reakcije za začetnim oligonukleotidom. Ob podaljševanju

tarčnega odseka z encimom Taq DNA polimerazo, ki ima 5' eksonukleazno aktivnost, pride do hidrolize sonde in odcepitve reporterskega fluorofora, ki začne oddajati fluorescenco. Prej je dušilec absorbiral njegovo fluorescenco in jo oddajal v obliki toplotne, nato pa je razdalja med njima prevelika, zato začne fluorofor oddajati fluorescenco, ki jo meri detektor v aparaturi (Saksida, 2008; Wilhelm in Pingoud, 2003).

Za dokazovanje virusa DOB smo uporabili začetna oligonukleotida DOB L in DOB D, med katerima je tarčno zaporedje, ki je dolgo 183 baznih parov. Sonda, ki smo jo uporabili, je homologna segmentu M virusa DOB. Na 5' koncu ima reporterski fluorofor FAM, na 3' koncu pa dušilec DABCYL. Za dokazovanje virusa PUU smo uporabili začetna oligonukleotida PUU L in PUU D, med katerima je tarčno zaporedje, ki je dolgo 97 baznih parov. Sonda, ki smo jo uporabili, je homologna segmentu S virusa PUU. Na 5' koncu ima reporterski fluorofor JOE, na 3' koncu pa dušilec DABCYL (Preglednica 6).

Preglednica 6: Nukleotidna zaporedja izbranih začetnih nukleotidov in sond za določanje virusnega bremena virusov DOB in PUU.

Oznaka oligonukleotidnega zaporedja	Nukleotidno zaporedje	Mesto naleganja	Dolžina tarčnega odseka (bp)
DOB L	5'-gggCAgTgTATTATTCAg-3'	1388-1406	97
DOB D	5'-ACTTTAAgACAACCAATA -3'	1554-1571	
DOB S	5'-6FAM-TTCCATggCTgggCAACTgCT-DB-3'	1475-1495	
PUU L	5'-ACATCATTTgAggACAT-3'	529-545	
PUU D	5'-ggAgTAAgCTCTTCTgC-3'	610-626	
PUU S	5'-6JOE-TTCATgCCAACAgCCCAgTCAAC-DB-3'	580-602	

Pripravili smo reakcijsko mešanico z volumnom 25 µl. Sestava je navedena v spodnji preglednici (Preglednica 7). 2x reakcijski pufer vsebuje 6mM MgSO₄ in 0,4 mM vsakega od dNTP-jev. Reakcijsko mešanico smo pripravili v čistem prostoru, ki je namenjen samo pripravi mešanic za PCR reakcije. Zunaj čistega prostora smo dodali še virusno RNA in celotno mešanico nežno premešali, nato pa jo na kratko centrifugirali, da smo na dnu vdolbinice zbrali vso tekočino in odstranili mehurčke. Kot negativno kontrolo smo uporabili demineralizirano destilirano vodo.

Preglednica 7: Reakcijska mešanica za enostopenjski RT-PCR v realnem času za virus PUU in DOB.

Sestavina	Količina za 1 reakcijo
2x koncentriran reakcijski pufer	12,5 µl
Začetni oligonukleotid D (50 µM)	0,25 µl
Začetni oligonukleotid L (50 µM)	0,25 µl
Encimska mešanica SSIII RT/Platinum Taq Mix	1 µl
Sterilna in deionizirana voda	6 µl
Virusna RNA	5 µl
Skupaj	25 µl

Reakcija qRT-PCR je potekala v aparaturi RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Avstralija). Posamezne stopnje reakcije za virus DOB so navedene v Preglednici 8, za virus PUU pa v Preglednici 9. Potek reakcije smo lahko spremljali v realnem času na računalniku. Po končani reakciji pa smo rezultate analizirali na računalniku s programsko opremo Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Avstralija). Pozitivni so bili tisti vzorci, kjer je bila presežena linija fluorescentnega praga (Ct). Primerjali smo vrednosti Ct naših vzorcev z vrednostmi Ct standarda, kjer smo imeli znano število kopij matrice ter tako dobili absolutno število tarčne nukleinske kisline v našem vzorcu. Opisana metoda enostopenjske kvantitativne RT-PCR v realnem času za določanja virusnega bremena pri bolnikih okuženih z virusom PUU in DOB je bila že predhodno vpeljana v laboratoriju (Saksida in sod., 2008; Korva in sod., 2009).

Preglednica 8: Prikaz stopenj reakcije enostopenjskega RT-PCR v realnem času za virus DOB.

Proces	Čas	Temperatura	Število ciklov
Reverzni prepis	40 minut	50 °C	1
Inaktivacija reverzne transkriptaze ter aktivacija Taq DNA-polimeraze	4 minut	95 °C	1
Denaturacija	10 sekund	95 °C	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	15 sekund	55 °C	45
Podaljševanje tarčnega odseka	15 sekund	72 °C	

Preglednica 9: Prikaz stopenj reakcije enostopenjskega RT-PCR v realnem času za virus PUU.

Proces	Čas	Temperatura	Število ciklov
Reverzni prepis	40 minut	50 °C	1
Inaktivacija reverzne transkriptaze ter aktivacija Taq DNA-polimeraze	4 minut	95 °C	1
Denaturacija	10 sekund	95 °C	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	15 sekund	53 °C	45
Podaljševanje tarčnega odseka	15 sekund	72 °C	

3.2.3 Statistična analiza

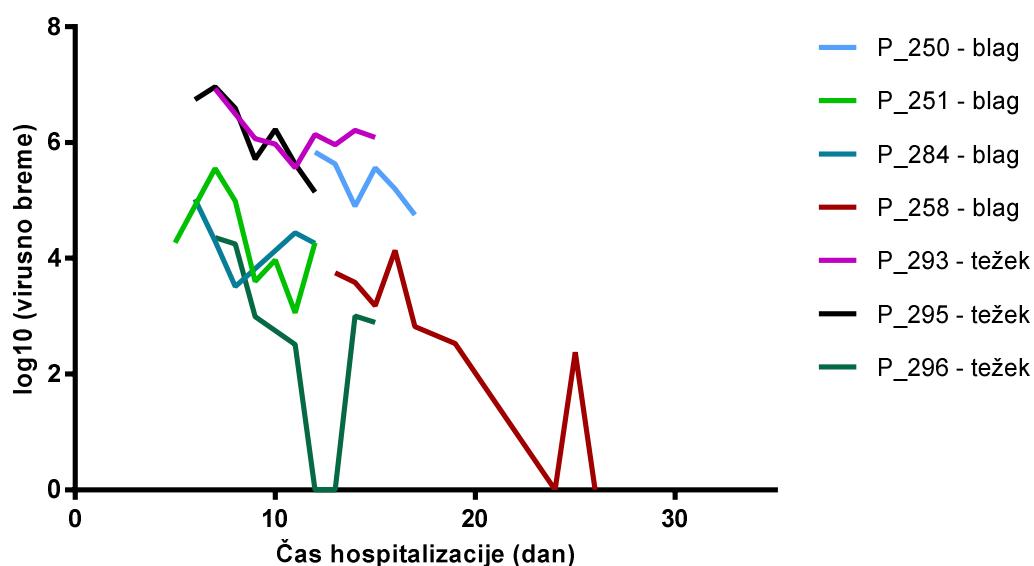
Rezultate analize citokinov smo delno obdelali s programom MilliplexAnalyst. Analiza in izris grafov za virusno breme in citokine sta potekala v programu GraphPad Prism 6. Za primerjalno analizo razlik med dvema skupinama smo uporabili t-test oz. Mann-Whitneyev test. Za analizo razlik med več kot dvema skupinama pa smo uporabili Kruskal-Wallisov test. Kot statistično značilne smo upoštevali razlike z vrednostjo $p < 0,05$.

4 REZULTATI

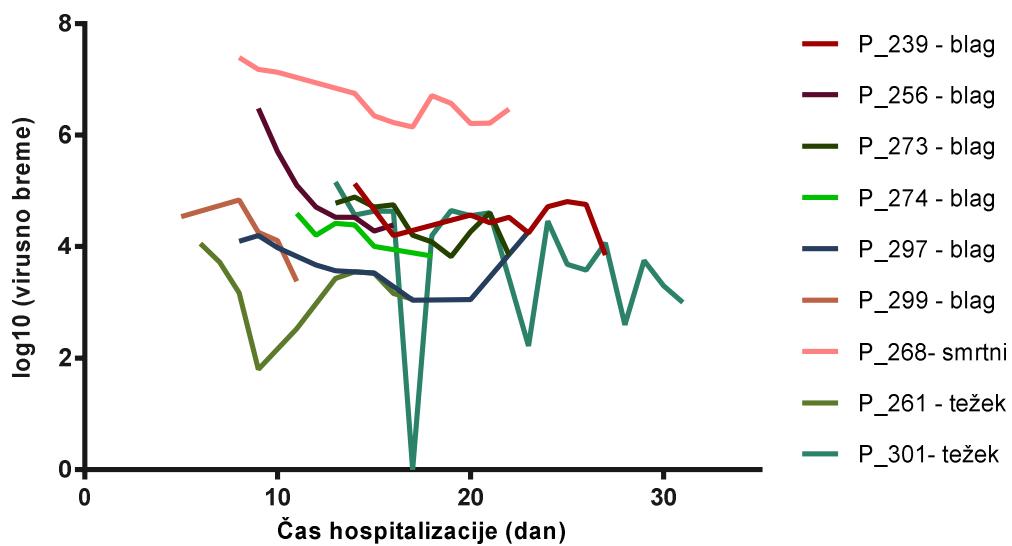
4.1 PRIMERJAVA VIRUSNEGA BREMENA PRI BOLNIKIH S HMRS

Virusno breme smo merili v zaporednih vzorcih bolnikov s HMRS, odvzetih od prvega dne hospitalizacije do odpusta iz bolnišnice. Virus smo dokazali pri vseh 16 bolnikih, 7 okuženih z virusom PUU in 9 z virusom DOB. V analizah rezultatov smo uporabili desetiški logaritem (\log_{10}) izmerjenih vrednosti virusnega bremena zaradi preglednejšega prikaza podatkov. Razpon virusnega bremena pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, je bil med 0,00 in 24.480.000 kopij RNA/ml vzorca. Razpon virusnega bremena pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, pa je bil med 0,00 in kopij 9.100.000 kopij RNA/ml vzorca.

Spodnja grafa (Slika 8 in 9) prikazuje dinamiko virusnega bremena pri bolnikih, okuženih z virusom PUU in DOB. Pri večini bolnikov opazimo spreminjanje virusne koncentracije s časom hospitalizacije. Ugotovili smo, da so bile koncentracije virusne RNA ob odpustu iz bolnišnice v večini primerov nižje, kot ob prvem dnevu hospitalizacije. Pri obeh skupinah bolnikov je opazen trend upadanja virusne koncentracije, vendar le-ta ni linearen. Med bolniki z blagim in težkim potekom bolezni ne vidimo značilnih razlik v poteku spreminjanja virusnega bremena, prav tako tudi ne med skupino okuženo z enim ali drugim tipom virusa (PUU vs. DOB).

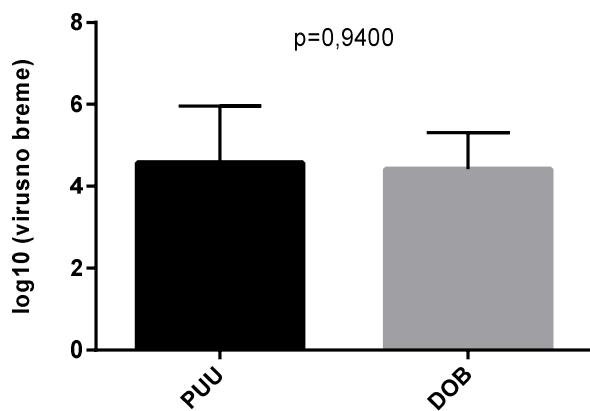


Slika 8: Dinamika virusnega bremena pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.



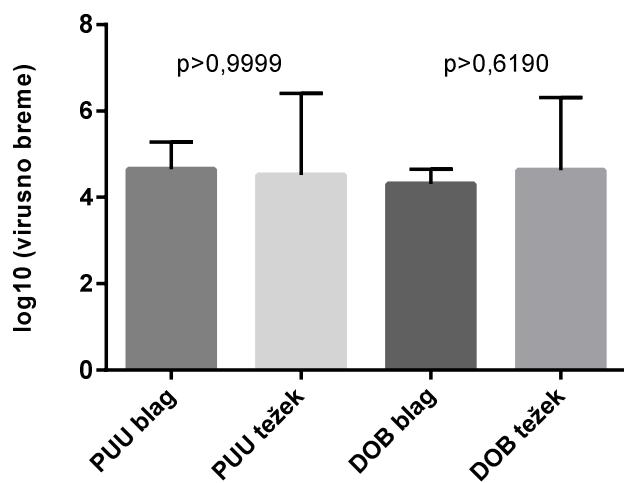
Slika 9: Dinamika virusnega bremena pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.

Za primerjavo virusnega bremena med bolniki okuženimi z virusom PUU in DOB smo izračunali mediano vrednosti posameznika in izrisali spodnji graf (slika 10). Koncentracija virusnega bremena se med skupinama bolnikov ne razlikuje značilno ($p=0,9400$).



Slika 10: Primerjava koncentracij virusnega bremena pri bolnikih s HMRS, okuženimi z virusom PUU in DOB. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Zanimalo nas je tudi, ali se virusno breme razlikuje glede na težo poteka bolezni pri bolnikih okuženih z istim tipom virusa. Ugotovili smo, da se bolniki, okuženi z virusom PUU oz. DOB ne razlikujejo značilno v koncentraciji virusne RNA glede na potek HMRS (PUU: $p>0,9999$; DOB: $p>0,6190$; slika 11).



Slika 11: Primerjava koncentracij virusnega bremena pri bolnikih z blagim in težkim potekom HMRS, okuženimi z virusom PUU in DOB. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

4.2 PRIMERJAVA DINAMIKE CITOKINOV PRI BOLNIKIH S HMRS

S komercialnim kompletom MilliplexMAP, ki temelji na Luminex X-map tehnologiji, smo merili citokine v vzorcih plazme bolnikov s HMRS. Zanimal nas je citokinski odziv tekom akutne faze pri bolnikih okuženih z virusom DOB in PUU. Dinamiko smo spremljali na dnevno odvzetih vzorcih hospitaliziranih bolnikov. Spremljali smo 12 vnetnih in protivnetnih citokinov: IFN α 2, IFN γ , IL-12p40, IL-12p70, IL-17A, IL-2, IL-6, IL-10, IP-10, TNF- α , TNF- β in VEGF.

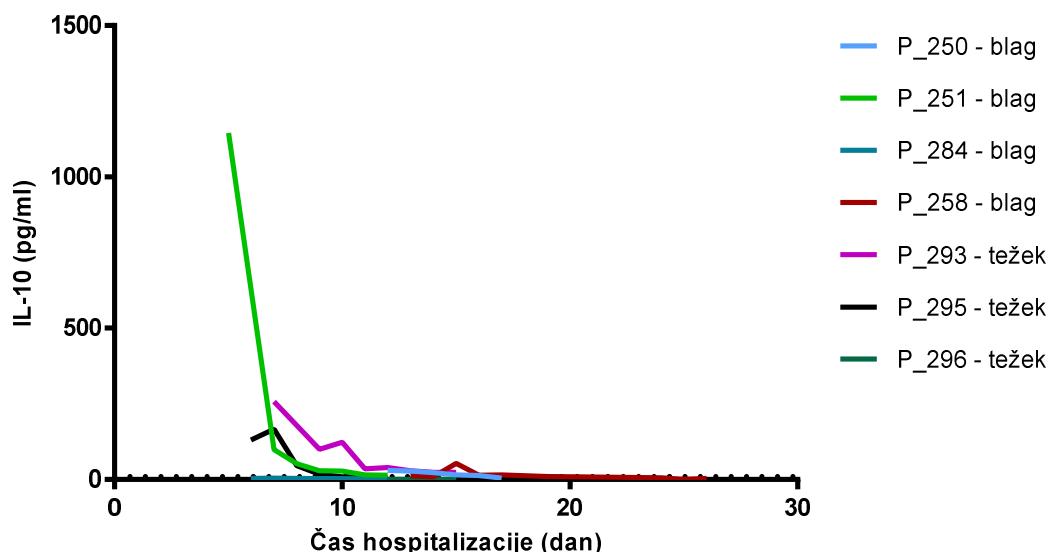
Preglednica 10: Območja normalnih vrednosti za merjene citokine.

Citokin	Normalne vrednosti (pg/ml)
IFN α 2	42
IFN γ	90
IL-12p40	115
IL-12P70	11
IL-17a	8
IL-2	0
IL-6	0
IL-10	13
IP-10	325
TNF- α	0
TNF- β	0
VEGF	8

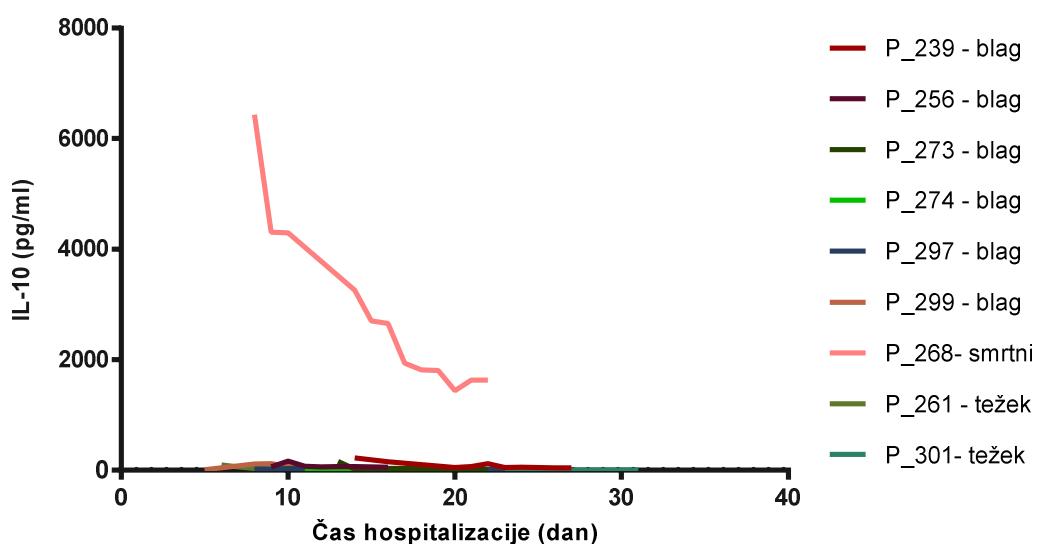
Zanimala so nas odstopanja od normalnih vrednosti (Preglednica 10) in potencialna vloga merjenih citokinov v patogenezi HMRS ter razlike v dinamiki med skupino bolnikov, okuženih z virusom DOB in skupino bolnikov, okuženih z virusom PUU glede na težo klinične slike.

4.2.1 Dinamika citokina IL-10 pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IL-10 v plazmi zdravega posameznika je 13 pg/ml, kar predstavlja normalno vrednost. Pri obravnavanih bolnikih, okuženih z virusom PUU in DOB, opazimo dinamiko merjenega citokina. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, imata bolnika z blagim potekom bolezni: P_250 in P_251 in tudi bolniki P_258, P_293 in P_295 s težkim potekom HMRS, povišano vrednost citokina IL-10. Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, imajo vsi razen bolnika P_274 povišano vrednost merjenega citokina. V primeru vseh bolnikov je opazen trend upadanja koncentracije merjenega citokina z dnevi hospitalizacije. Pri večini bolnikov gre zgolj za blago povišanje, v primeru bolnika P_268, pri katerem je bil izid okužbe smrten, pa je koncentracija IL-10 močno nad območjem normalne vrednosti (kar 250x višja).

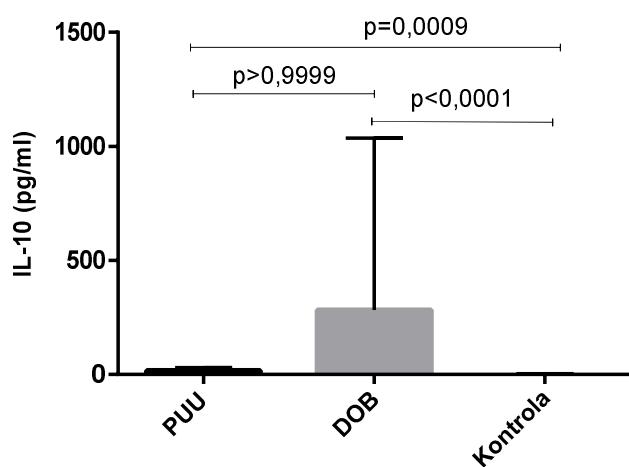


Slika 12: Dinamika IL-10 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.



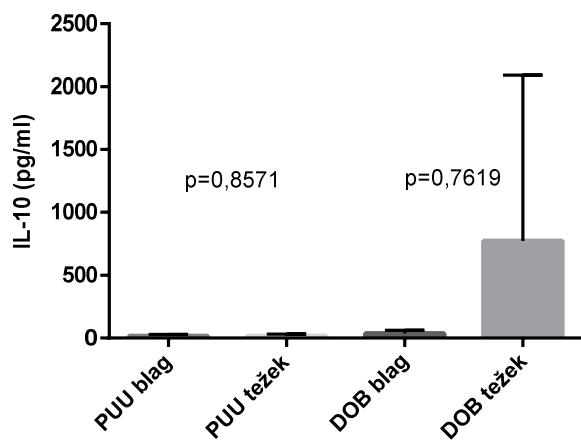
Slika 13: Dinamika IL-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.

Spodnji graf (Slika 14) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino, ki jo predstavljajo zdravi posamezniki. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika. S spodnjega grafa je razvidno, da so vrednosti povprečne koncentracije citokina IL-10 najvišje v primeru bolnikov, okuženih z virusom DOB ($281,9 \pm 755,5$ pg/ml), nižje pri bolnikih s PUU okužbo ($16,39 \pm 13,26$ pg/ml), pri zdravih posameznikih pa analita skoraj ni bilo moč zaznati ($1,04 \pm 1,55$ pg/ml). Ugotavljam, da so izmerjene vrednosti IL-10 pri bolnikih s HMRS značilno višje od normalnih vrednosti (kontrolna skupina) ($p < 0,0001$ in $p = 0,0009$); med skupinama bolnikov pa razlika ni značilna ($p > 0,9999$).



Slika 14: Primerjava koncentracije IL-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

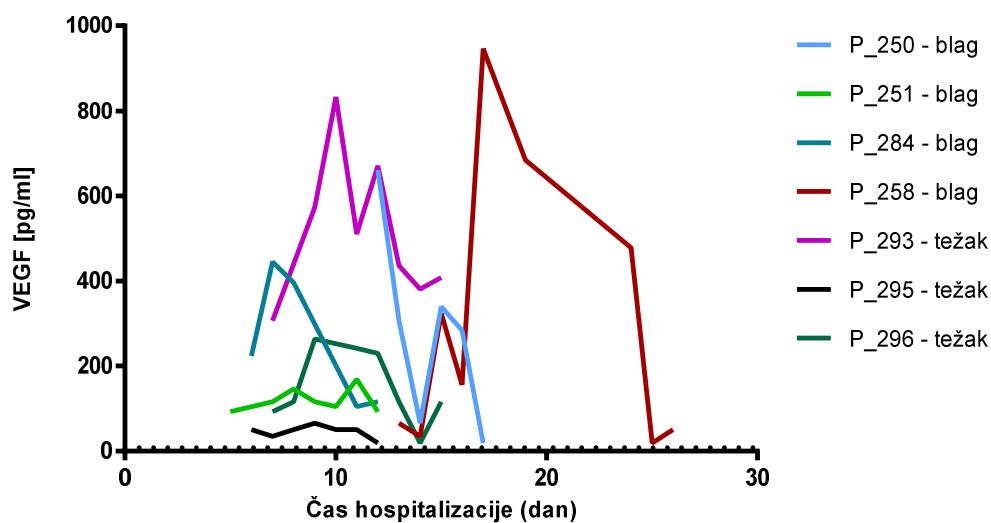
Spodnji graf (Slika 15) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov, ki so okuženi z istim tipom virusa DOB ali PUU, a se razlikujejo v poteku HMRS: blag vs. težek potek bolezni. Ugotovili smo, da se bolniki, okuženi z virusom PUU oz. DOB, ne razlikujejo značilno v koncentraciji citokina IL-10 glede na potek HMRS (PUU blag: $16,85 \pm 12,97$ pg/ml vs. PUU težek: $16,04 \pm 15,46$ pg/ml; $p=0,8571$; DOB blag: $36,66 \pm 24,54$ pg/ml vs. DOB težek: $722,3 \pm 1319$ pg/ml, $p=0,7619$).



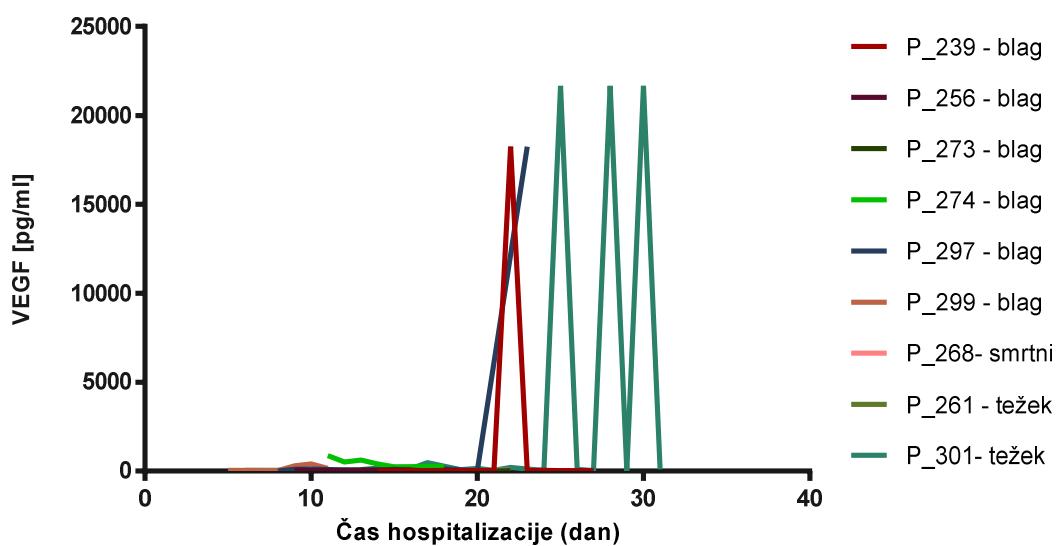
Slika 15: Primerjava koncentracije IL-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

4.2.2 Dinamika citokina VEGF pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina VEGF v plazmi zdravega posameznika je 8 pg/ml, kar predstavlja normalno vrednost. Pri vseh obravnavanih bolnikih je vrednost VEGF povišana, koncentracija citokina pa se tekom bolnišničnega zdravljenja spreminja. Najbolj izrazito to opazimo pri bolnikih, okuženih z virusom DOB v primeru bolnikov: P_297, P_239 in P_301, kjer so izraziti skoki v koncentraciji VEGF.

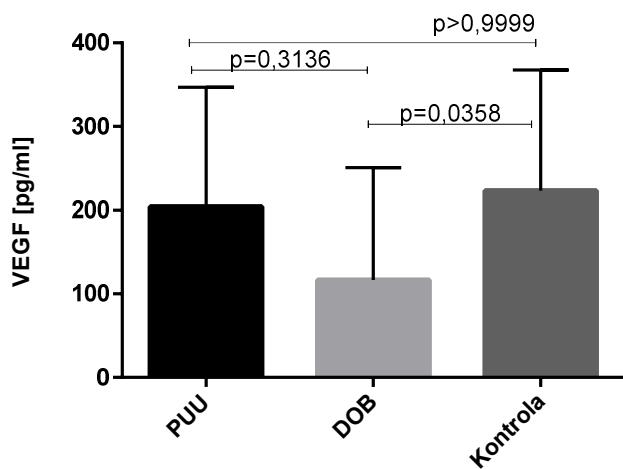


Slika 16: Dinamika VEGF pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.



Slika 17: Dinamika VEGF pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.

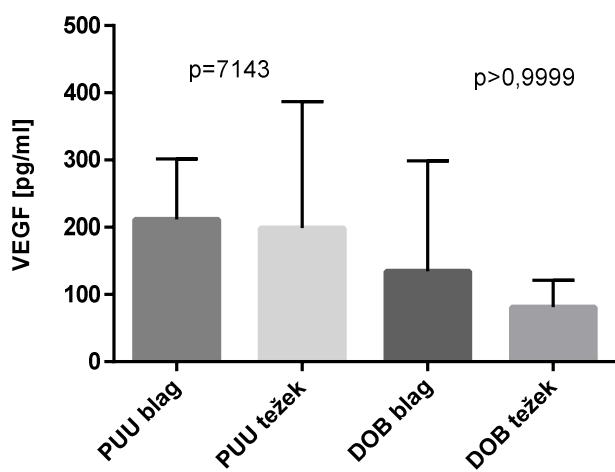
Spodnji graf (Slika 18) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino. Mediana VEGF v kontrolni skupini je 223,5 pg/ml, pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, 116,6 pg/ml in pri s PUU okuženimi bolniki 204,2 pg/ml. Koncentracija VEGF se med bolniki okuženimi z virusom DOB in kontrolo značilno razlikuje ($p=0,0421$). Razlika med PUU bolniki in kontrolo ter med skupinama bolnikov (PUU vs DOB) ni statistično značilna ($p>0,9999$; $p=0,3136$).



Slika 18: Primerjava koncentracije VEGF pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Spodnji graf (Slika 19) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov, ki so okuženi z istim tipom virusa (DOB ali PUU), a se razlikujejo v poteku HMRS: blag vs. težek potek bolezni. Ugotovili smo, da se bolniki, okuženi z virusom PUU oz. DOB, ne razlikujejo v koncentraciji citokina VEGF glede na potek HMRS (PUU blag: $211,4 \pm 90,22$ pg/ml vs.

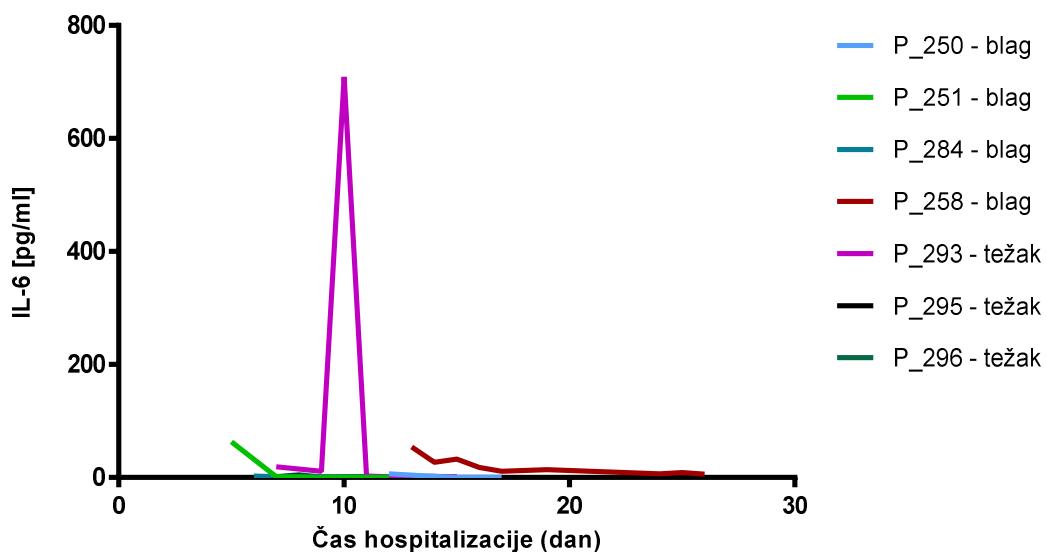
PUU težek: $198,7 \pm 187,9$ pg/ml, $p=0,7143$; DOB blag: $134,4 \pm 164,5$ pg/ml vs. DOB težek: $81,10 \pm 39,85$ pg/ml, $p>0,9999$.



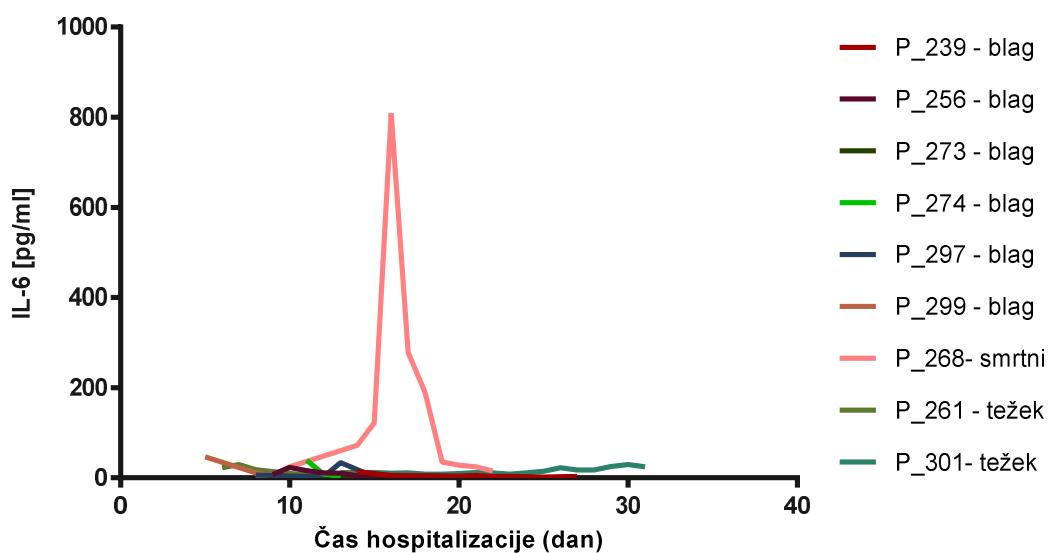
Slika 19: Primerjava koncentracije VEGF pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

4.2.3 Dinamika citokina IL-6 pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IL-6 je v plazmi zdravega posameznika pod mejo detekcije. Pri nekaterih bolnikih, okuženih z virusom PUU in DOB, smo povišanje v koncentraciji IL-6 zaznali le v majhnem obsegu. V primeru P_293 (težek potek, PUU okužba) in P_268 (smrtni izid, DOB okužba) so vrednosti močno povišane. V obeh primerih so vrednosti IL-6 ob začetku hospitalizacije nizke, v sredini hospitalizacije pride do močnega skoka v koncentraciji in nato v nekaj dneh do močnega upada na skoraj normalno vrednost.

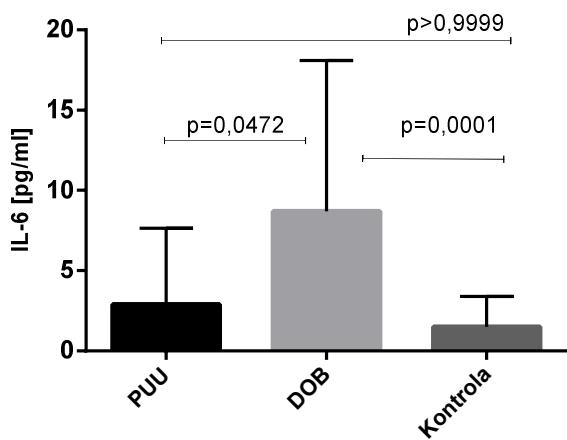


Slika 20: Dinamika IL-6 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.



Slika 21: Dinamika IL-6 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.

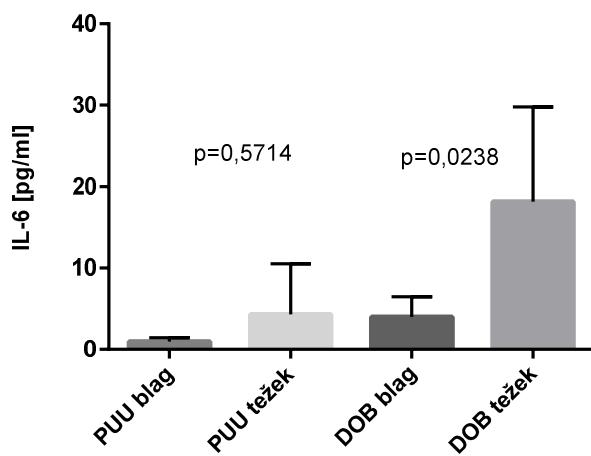
Tudi v primeru citokina IL-6 smo določili mediano vrednosti pri posameznem bolniku in naredili primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino. S spodnjega grafa (Slika 22) je razvidno, da je koncentracija IL-6 najvišja pri bolnikih okuženih z virusom DOB ($8,71 \pm 9,38$ pg/ml), nižja pri bolnikih s PUU okužbo ($2,9 \pm 4,74$ pg/ml), pri zdravih posameznikih pa citokina skoraj ni bilo moč zaznati ($1,5 \pm 1,9$ pg/ml). Ugotavljamo, da so izmerjene vrednosti IL-6 pri bolnikih okuženih z virusom DOB značilno višje od normalnih vrednosti in od PUU skupine ($p=0,0001$; $p=0,0472$). Skupini PUU bolnikov in kontrola pa se ne razlikujejo značilno ($p>0,9999$).



Slika 22: Primerjava koncentracije IL-6 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Spodnji graf (Slika 23) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov, ki so okuženi z istim tipom virusa (DOB ali PUU), a se razlikujejo v poteku HMRS: blag vs. težek potek bolezni. Ugotovili smo, da se bolniki, okuženi z virusom PUU ne razlikujejo v

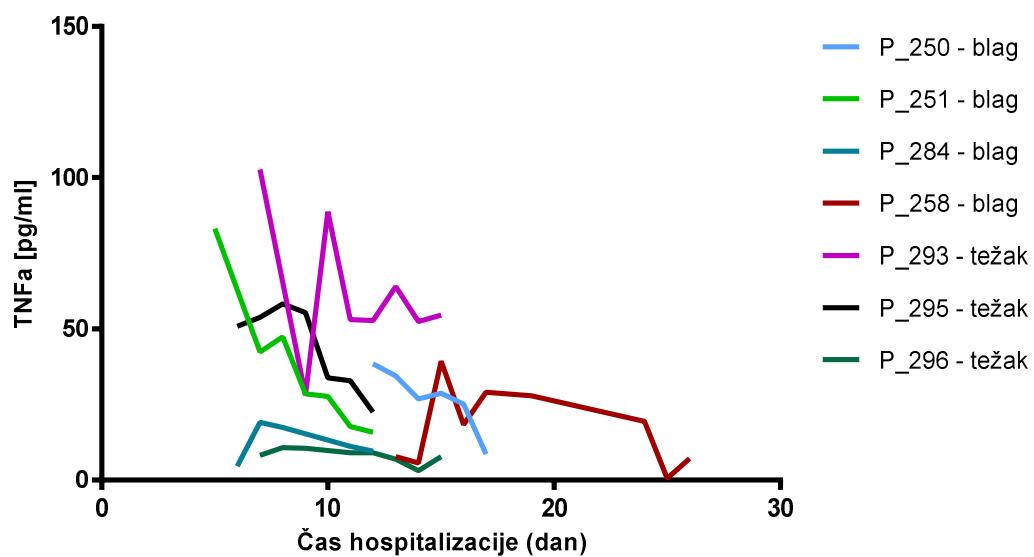
koncentraciji citokina IL-6 glede na potek HMRS (PUU blag: $0,98 \pm 9,45$ pg/ml vs PUU težek: $4,33 \pm 6,2$ pg/ml; $p=0,5714$). Bolniki, okuženi z virusom DOB z blagim in težkim potekom HMRS, pa se značilno razlikujejo (DOB blag: $3,99 \pm 2,4$ pg/ml vs DOB težek: $18,16 \pm 11,63$ pg/ml; $p=0,0238$).



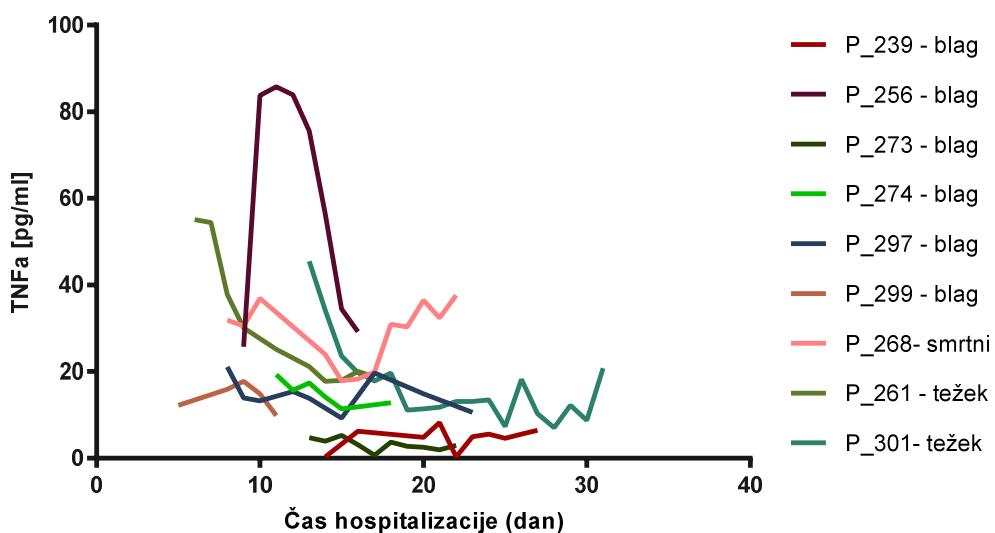
Slika 23: Primerjava koncentracije IL-6 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

4.2.4 Dinamika citokina TNF- α pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina TNF- α je v plazmi zdravega posameznika pod mejo detekcije. Tako v primeru z virusom PUU kot tudi z DOB virus okuženimi bolniki vidimo dinamiko citokina TNF- α . Pri večini bolnikov se koncentracija citokina proti koncu zdravljenja znižuje, vendar je vseeno povisana glede na normalne vrednosti.

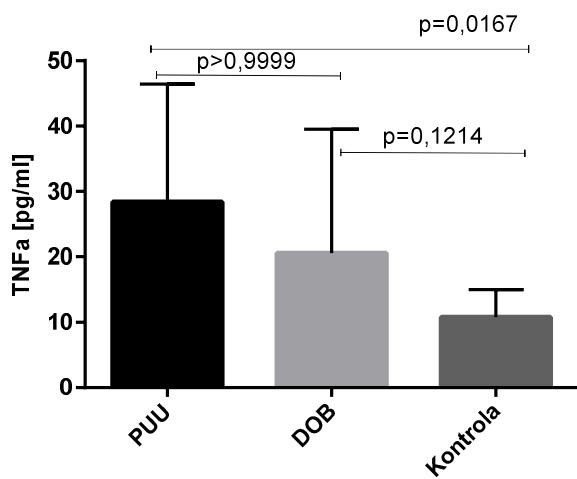


Slika 24: Dinamika TNF- α pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.



Slika 25: Dinamika TNF- α pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.

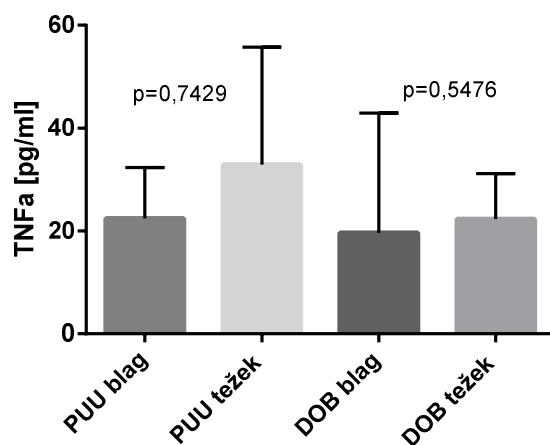
Ko smo primerjali skupine bolnikov okuženih z virusom PUU ali z virusom DOB in kontrolno skupino, smo ugotovili, da je bila mediana koncentracije TNF- α najvišja v primeru bolnikov, okuženih z virusom PUU ($28,44 \pm 18,00$ pg/ml), sledijo bolniki okuženi z virusom DOB ($20,55 \pm 18,96$ pg/ml), najnižja koncentracija pa je bila izmerjena v primeru zdravih posameznikov (kontrola) ($10,83 \pm 4,18$ pg/ml). Koncentracija TNF- α se med skupino PUU in DOB bolnikov ne razlikuje značilno ($p > 0,9999$), skupina bolnikov okužena z virusom PUU pa se statistično značilno razlikuje od kontrole ($p = 0,0167$).



Slika 26: Primerjava koncentracije TNF- α pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Spodnji graf (slika 27) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov, ki so okuženi z istim tipom virusa DOB ali PUU, a se razlikujejo v poteku HMRS: blag vs. težek potek bolezni. Ugotovili smo, da se bolniki, okuženi z virusom PUU oz. DOB, ne razlikujejo značilno v

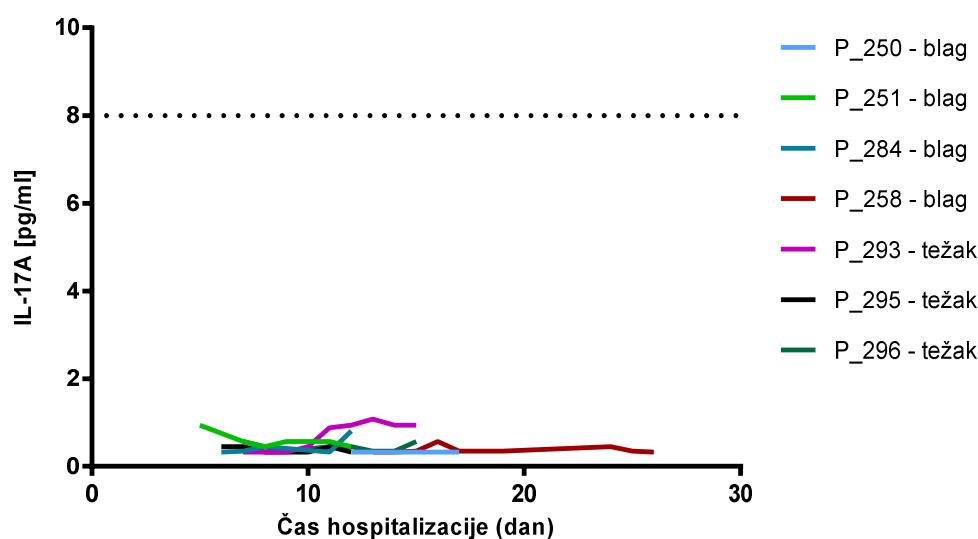
koncentraciji citokina TNF- α glede na potek HMRS (PUU blag: $22,47 \pm 9,85$ pg/ml vs PUU težek: $32,93 \pm 22,83$ pg/ml, $p=0,7429$; DOB blag: $19,67 \pm 23,26$ pg/ml vs DOB težek: $22,32 \pm 8,84$ pg/ml, $p=0,5476$).



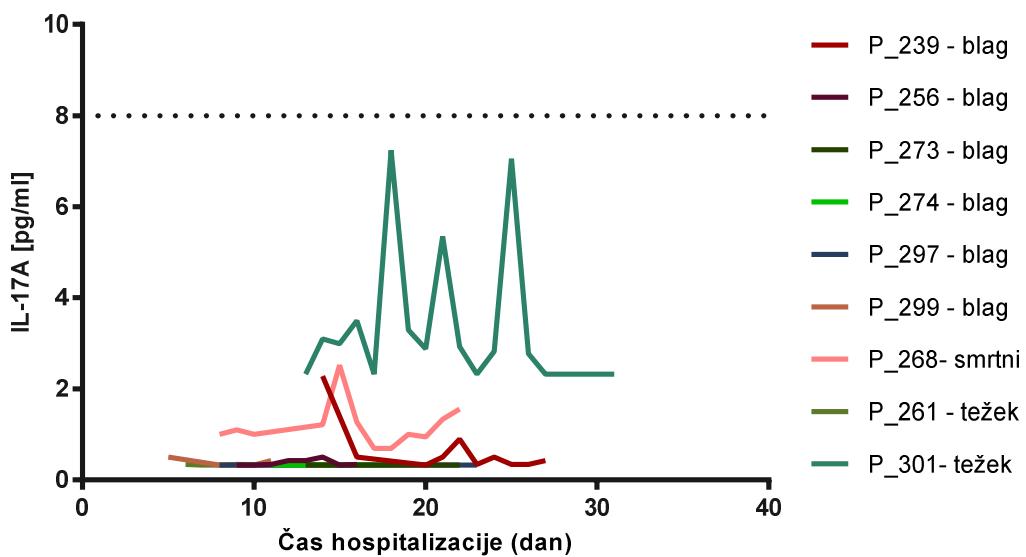
Slika 27: Primerjava koncentracije TNF- α pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

4.2.5 Dinamika citokina IL-17a pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IL-17a v plazmi zdravega posameznika je 8 pg/ml, kar predstavlja normalno vrednost, ponazorjeno s črtkano črto na spodnjih grafih (Slika 28 in 29). Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, ni opazne dinamike citokina IL-17a. Koncentracija ostaja pod mejo normalne vrednosti tekom celotnega bolnišničnega zdravljenja. To velja tudi za bolnike, okužene z virusom DOB. Pri nekaterih je sicer malo večja dinamika merjenega citokina, vendar vrednosti ravno tako kot pri bolnikih, okuženih z virusom PUU ostajajo nizke oziroma v normalnem območju.

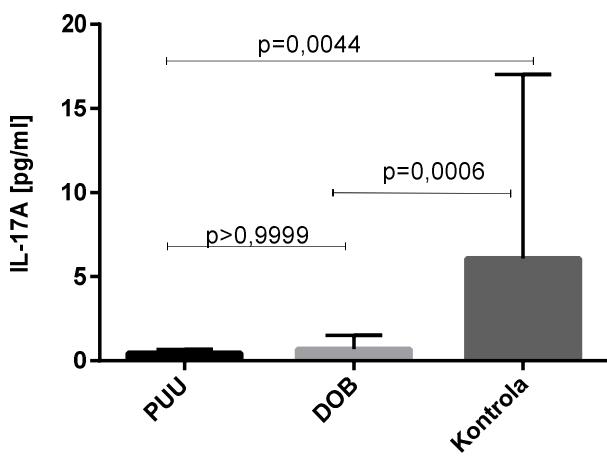


Slika 28: Dinamika IL-17a pri bolnikih, okuženih z virusom PUU. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.



Slika 29: Dinamika IL-17a pri bolnikih, okuženih z virusom DOB. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.

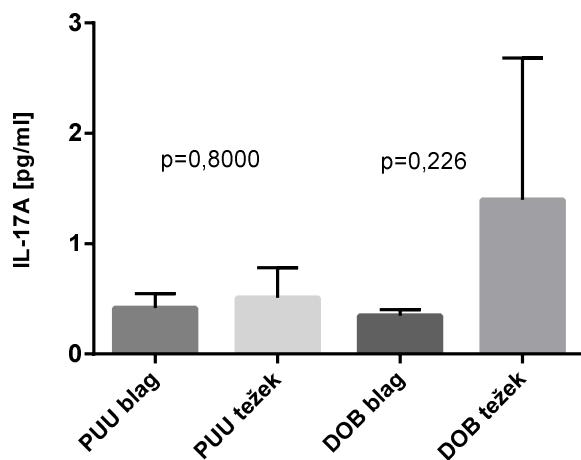
Spodnji graf (Slika 30) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino, ki jo predstavljajo zdravi posamezniki. Mediane koncentracije IL-17a so bile najvišje v primeru kontrolne skupine ($6,08 \pm 10,94$ pg/ml), sledijo bolniki okuženi z virusom DOB ($0,69 \pm 0,83$ pg/ml), najnižja koncentracijo smo izmerili pri bolnikih okuženih z virusom PUU ($0,47 \pm 0,21$ pg/ml). Večje razlike v vrednosti mediane IL-17a med skupinama bolnikov ni ($p > 0,9999$), značilno pa se razlikujeta od skupine zdravih posameznikov ($p = 0,0044$ in $p = 0,0006$).



Slika 30: Primerjava koncentracije IL-17a pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Spodnji graf (Slika 31) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov, ki so okuženi z istim tipom virusa DOB ali PUU, a se razlikujejo v poteku bolezni. Ugotovili smo, da se bolniki,

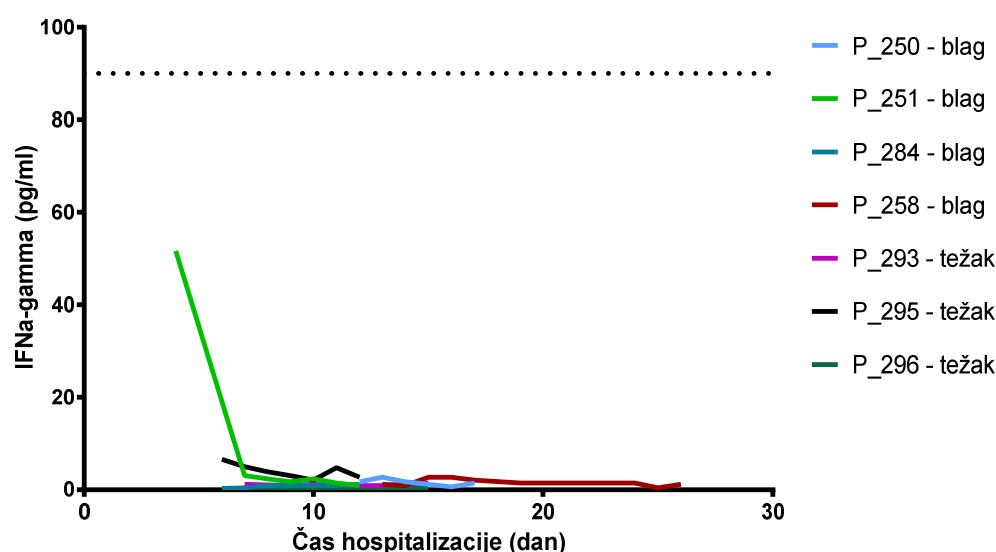
okuženi z virusom PUU oz. DOB, ne razlikujejo značilno v koncentraciji citokina IL-17a glede na potek bolezni (PUU: $p=0,8000$; DOB: $p=0,2262$).



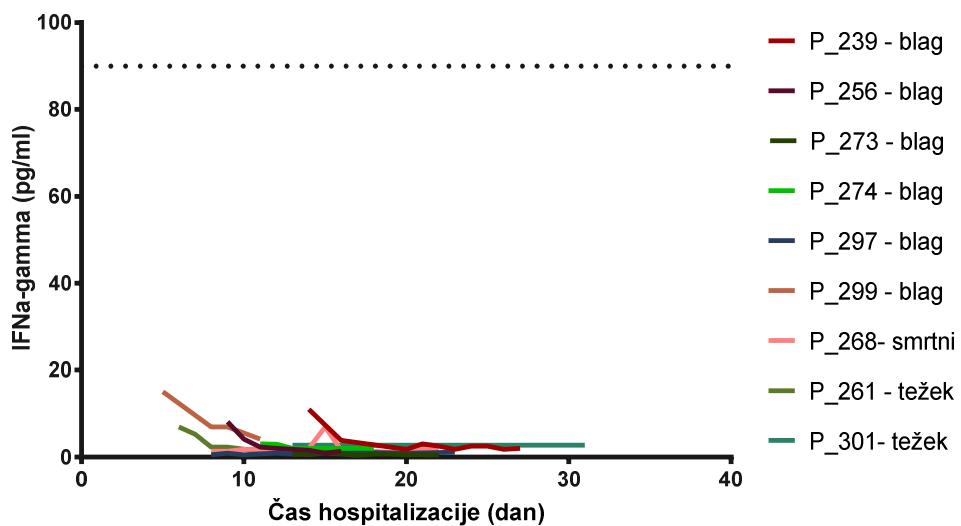
Slika 31: Primerjava koncentracije IL-17a pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

4.2.6 Dinamika citokina IFN γ pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IFN γ v plazmi zdravega posameznika je 90 pg/ml, kar predstavlja normalno vrednost. Pri obravnavanih bolnikih, okuženih z virusom PUU in DOB, ne opazimo dinamike merjenega citokina. Pri vseh bolnikih izmerjene koncentracije IFN γ ne presegajo meje normalne vrednosti, ki je na spodnjih grafih označena s črtkano črto (Slika 32 in 33).

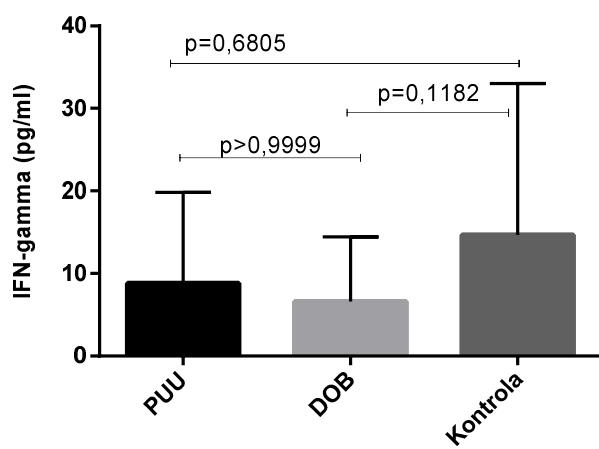


Slika 32: Dinamika IFN γ pri bolnikih, okuženih z virusom PUU. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.



Slika 33: Dinamika IFN γ pri bolnikih, okuženih z virusom DOB. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.

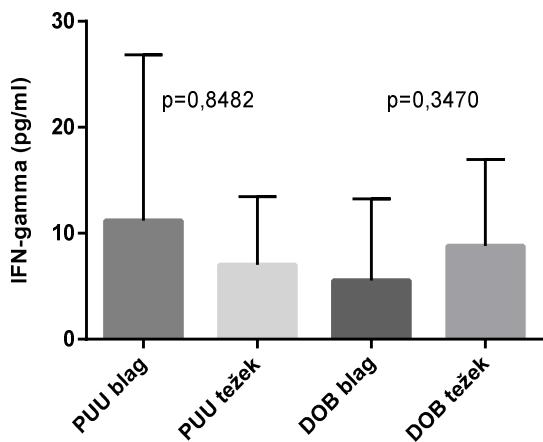
Ko smo primerjali skupine bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino, smo ugotovili, da je bila mediana IFN γ najvišja v primeru kontrolne skupine ($14,68 \pm 18,34$ pg/ml), sledijo bolniki okuženi z virusom PUU ($8,81 \pm 11,00$ pg/ml), malo nižja koncentracija pa je bila izmerjena v primeru z virusom DOB okuženih bolnikov ($6,626 \pm 7,78$ pg/ml). Razlike med primerjanimi skupinami so zelo majhne in niso statistično značilne ($p > 0,05$).



Slika 34: Primerjava koncentracije IFN γ pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Ko smo primerjali skupine bolnikov glede na potek bolezni, smo ugotovili, da so najvišje vrednosti citokina IFN γ pri bolnikih z virusom PUU in blagem poteku bolezni (PUU blag: $11,19 \pm 15,64$ vs. PUU težek: $7,02 \pm 6,45$ pg/ml). Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in težkem poteku bolezni (DOB težek: $8,82 \pm 8,14$ pg/ml vs. DOB blag: $5,53 \pm 7,72$ pg/ml). Na podlagi statistične analize ugotavljamo, da so te razlike zanemarljive, saj se bolniki,

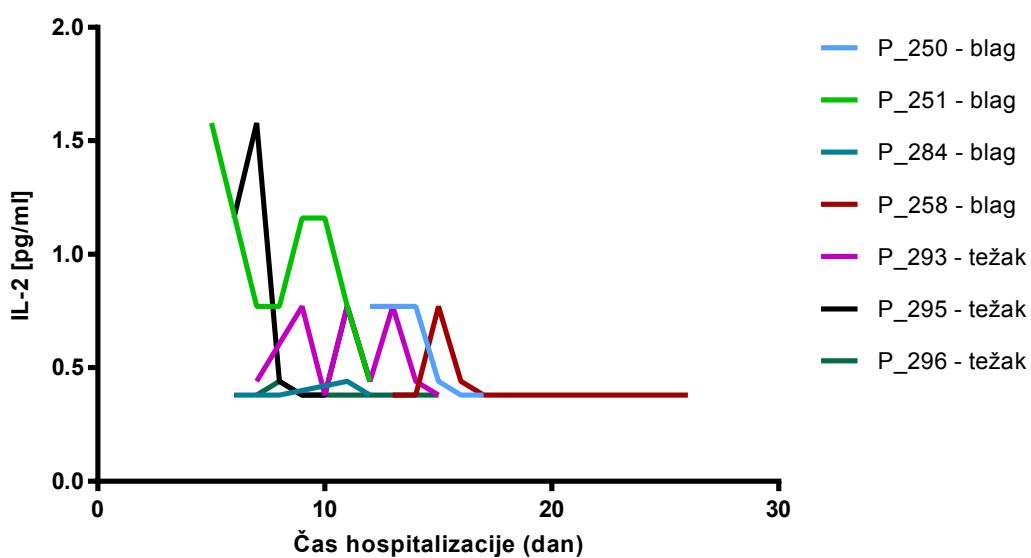
okuženi z virusom PUU oz. DOB, ne razlikujejo značilno v koncentraciji merjenega citokina (PUU: $p=0,8482$; DOB: $p=0,3470$; slika 35).



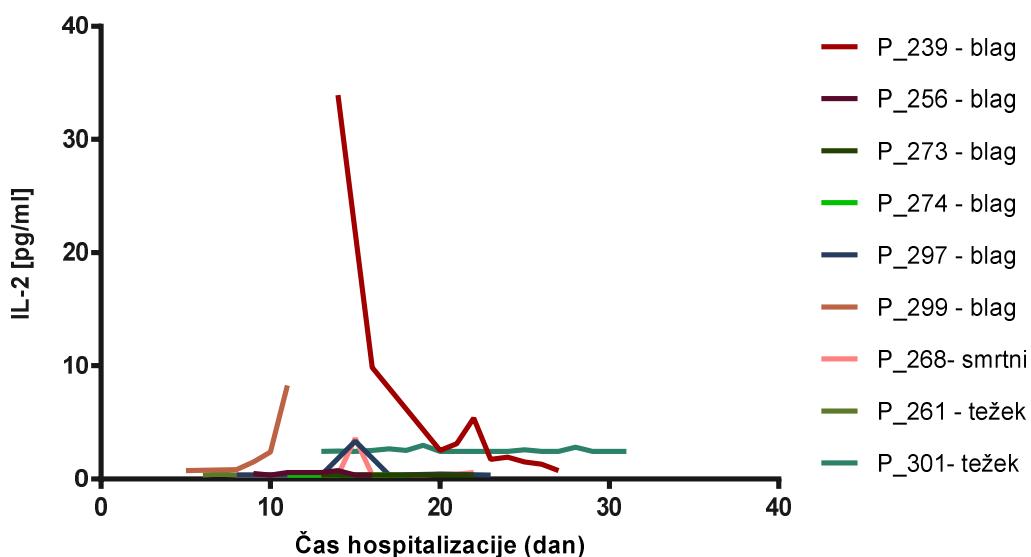
Slika 35: Primerjava koncentracije IFN γ pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

4.2.7 Dinamika citokina IL-2 pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IL-2 je v plazmi zdravega posameznika pod mejo detekcije. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU in DOB, je opazna majhna dinamika citokina IL-2. Koncentracija ostaja malo nad mejo normalne vrednosti tekom celotnega bolnišničnega zdravljenja pri vseh bolnikih. Med hospitalizacijo se izmerjene vrednosti IL-2 znižujejo. Najvišja koncentracija IL-2 je v prvem dnevu zdravljenja pri bolniku P_239, okuženemu z virusom DOB in blagem poteku HMRS, ki nato po dveh dneh strmo upade. Pri vseh ostalih bolnikih pa so koncentracije nizke. Če upoštevamo vrednosti kontrole (Slika 38), lahko rečemo, da so koncentracije IL-2 v območju normalnih vrednosti pri vseh bolnikih, razen P_239.

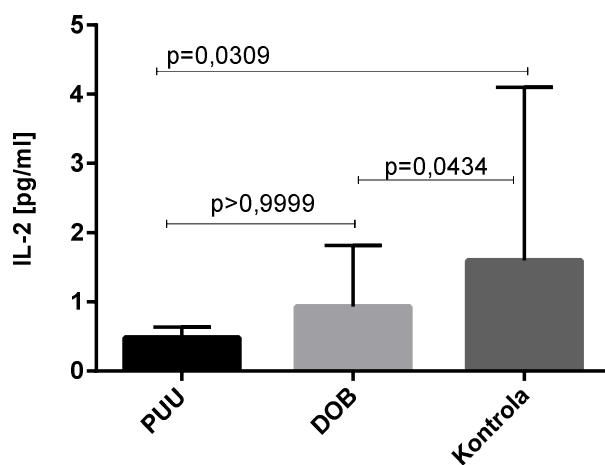


Slika 36: Dinamika IL-2 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.



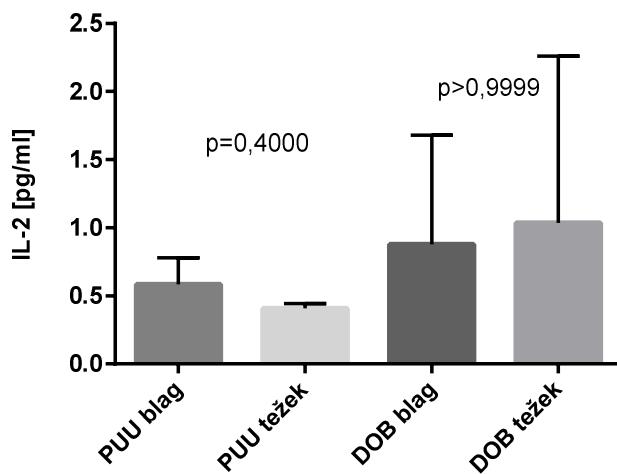
Slika 37: Dinamika IL-2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.

Spodnji graf (Slika 38) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino. Mediane IL-2 so bile v vseh primerih zelo nizke (PUU: $0,49 \pm 0,15$ pg/ml; DOB: $0,93 \pm 0,89$ pg/ml; kontrola: $1,6 \pm 2,5$ pg/ml). Koncentracija IL-2 se med skupinama bolnikov in kontrolo razlikuje značilno ($p=0,0309$ in $p=0,0434$), le med skupinama bolnikov pa ta razlika ni značilna ($p>0,9999$).



Slika 38: Primerjava koncentracije IL-2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Ko smo naredili primerjavo med potekom bolezni, smo ugotovili, da se bolniki, okuženi z virusom PUU oz. DOB, ne razlikujejo značilno v koncentraciji citokina IL-2 glede na potek HMRS (PUU: $p=0,4000$; DOB: $p>0,9999$).

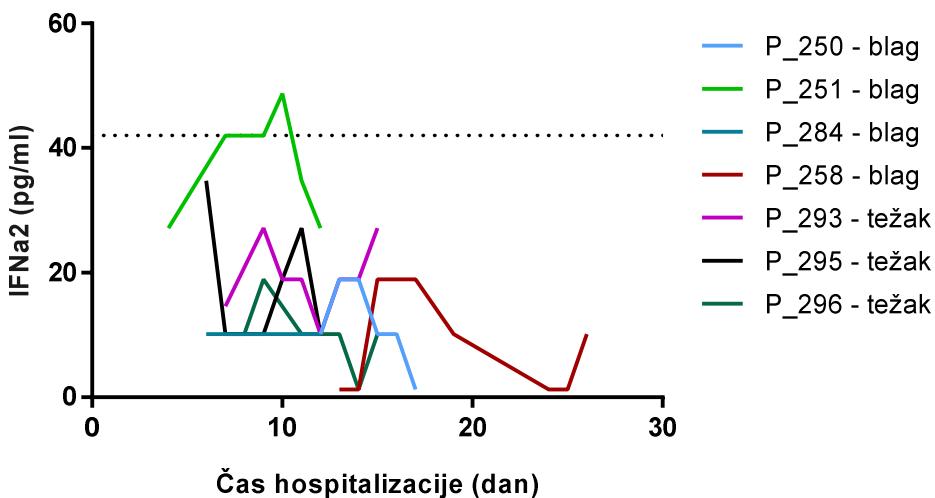


Slika 39: Primerjava koncentracije IL-2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

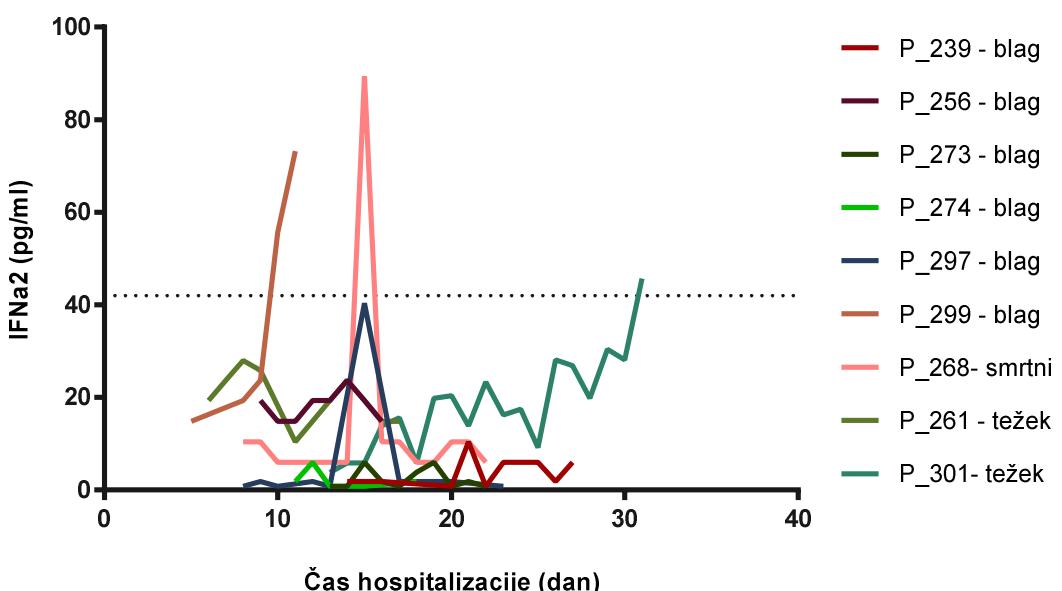
4.2.8 Dinamika citokina IFN α 2 pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IFN α 2 v plazmi zdravega posameznika je 42 pg/ml, kar predstavlja normalno vrednost. Pri obravnavanih bolnikih opazimo dinamiko citokina, vendar izmerjene koncentracije v večini primerov ne presegajo meje normalne vrednosti. Povišana vrednost je v primeru bolnika P_299, ki je okužen z virusom DOB in ima blag potek bolezni in pri bolniku P_268, ki je imel smrtni izid bolezni. Pri slednjem opazimo porast in

hiter upad v koncentraciji IFN α 2 v sredini časa hospitalizacije (vrh v 15. dnevnu bolezni). V večini primerov se koncentracija citokina s časom hospitalizacije zmanjšuje.

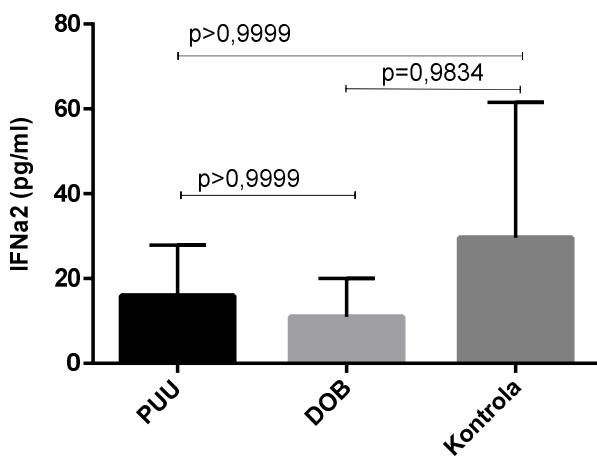


Slika 40: Dinamika IFN α 2 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.



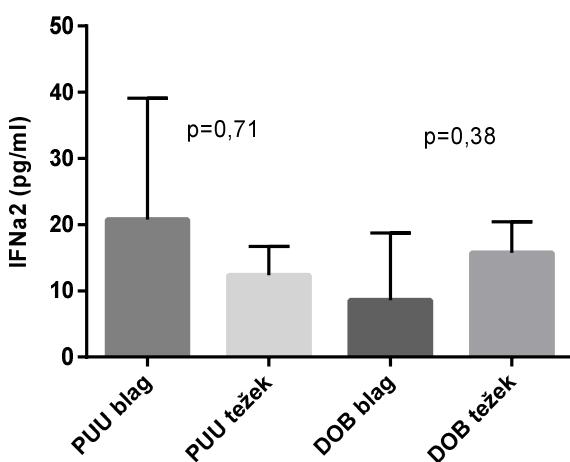
Slika 41: Dinamika IFN α 2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.

Spodnji graf (Slika 42) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino. Mediane IFN α 2 so bile najvišje v primeru kontrolne skupine ($29,61 \pm 31,98$ pg/ml), sledijo bolniki okuženi z virusom PUU ($15,95 \pm 11,92$ pg/ml), najnižja koncentracijo smo izmerili v primeru z virusom DOB okuženih bolnikov ($10,97 \pm 9,09$ pg/ml). Razlika v koncentraciji IFN α 2 se med skupinami bolnikov in kontrolo ne razlikuje značilno (p je v vseh primerih $>0,05$).



Slika 42: Primerjava koncentracije IFN α 2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Spodnji graf (Slika 43) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov, ki so okuženi z istim tipom virusa. Mediana izmerjenih koncentracij IFN α 2 je bila v primeru bolnikov, okuženih z virusom PUU z blagim potekom malo višja od bolnikov s težkim potekom bolezni ($20,75 \pm 18,36$ pg/ml vs. $12,34 \pm 4,39$ pg/ml). Pri bolnikih, ki so okuženi z virusom DOB, pa je bila mediana citokina višja pri bolnikih s težjim potekom (DOB blag: $8,593 \pm 10,15$ pg/ml vs. DOB težek: $15,72 \pm 4,69$ pg/ml). Bolniki, okuženi z virusom PUU oz. DOB, se ne razlikujejo značilno v koncentraciji citokina IFN α 2 glede na potek bolezni (PUU: $p=0,71$; DOB: $p=0,38$).

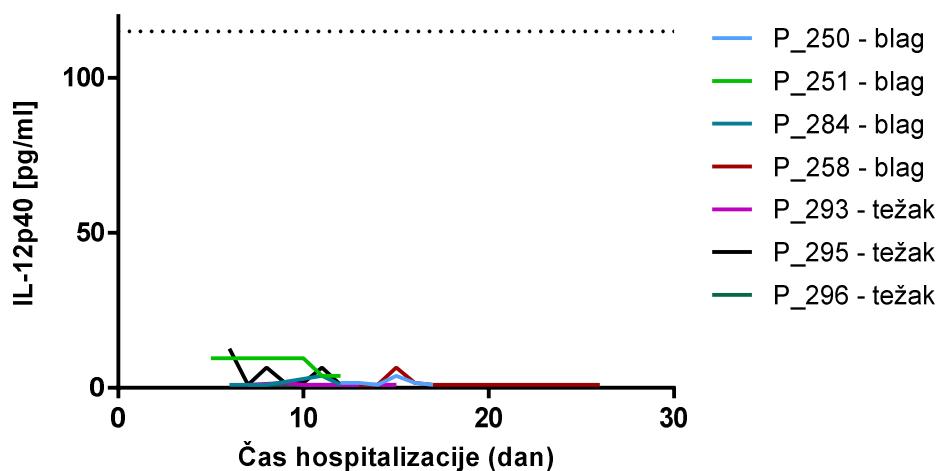


Slika 43: Primerjava koncentracije IFN α 2 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

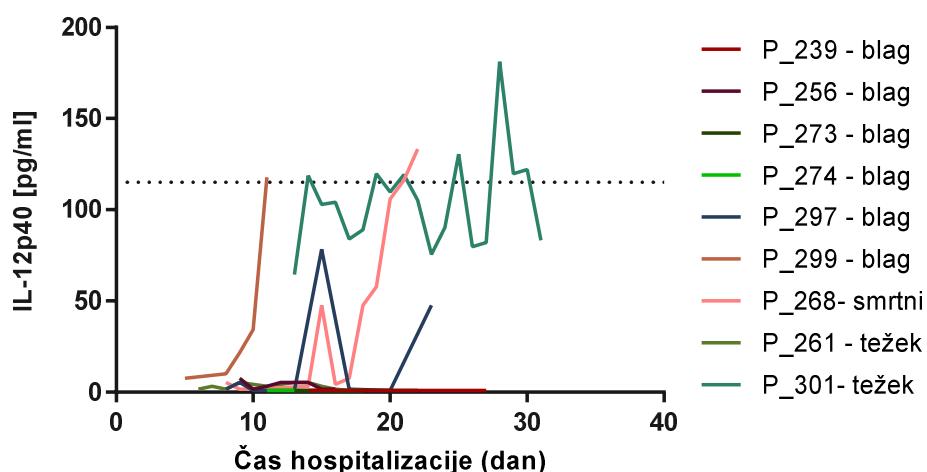
4.2.9 Dinamika citokina IL-12p40 pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IL-12p40 v plazmi zdravega posameznika je 115 pg/ml (Slika 44 in 45, črtkana črta). Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU, ni opaziti dinamike tega citokina.

Vrednosti IL-12p40 ostajajo pod mejo normalne vrednosti tekom celotnega bolnišničnega zdravljenja pri vseh bolnikih. Malo večjo dinamiko opazimo v primeru nekaterih z virusom DOB okuženih bolnikov, kjer koncentracija analita narašča s časom hospitalizacije. Povišana vrednost IL-12p40 pa je le ob koncu hospitalizacije pri bolniku P_268 s smrtnim izidom okužbe in P_301 s težkim potekom HMRS.



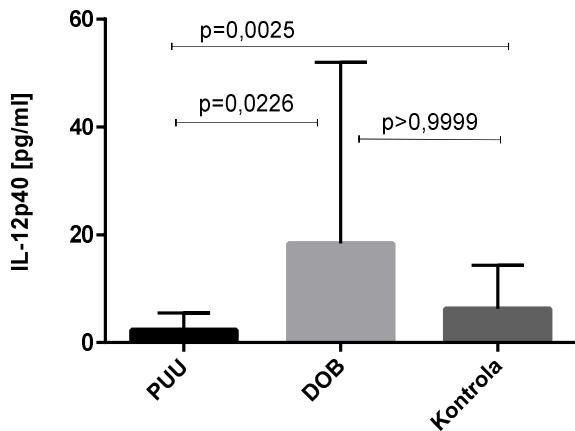
Slika 44: Dinamika IL-12p40 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.



Slika 45: Dinamika IL-12p40 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.

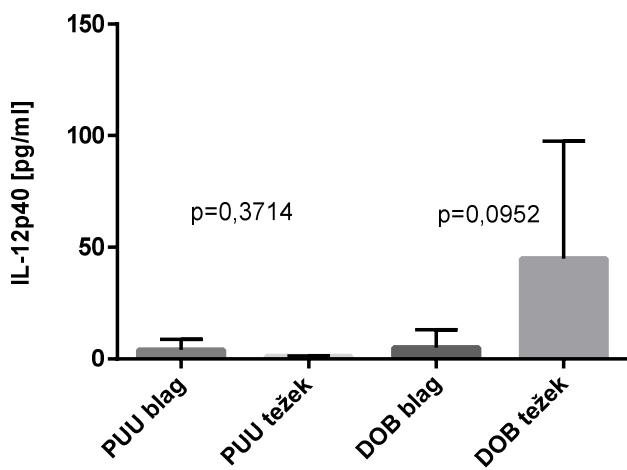
Spodnji graf (Slika 46) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino, ki jo predstavljajo zdravi posamezniki. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika. Koncentracija IL-12p40 se med skupinami bolnikov in kontrolo razlikuje značilno ($p=0,0025$ in $p=0,00226$, slika 46).

Vrednost IL-12p40 je najvišja pri bolnikih, okuženih z virusom DOB ($18,37 \pm 33,63$ pg/ml), najnižja pa pri bolnikih s PUU okužbo ($2,37 \pm 3,17$ pg/ml).



Slika 46: Primerjava koncentracije IL-12p40 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

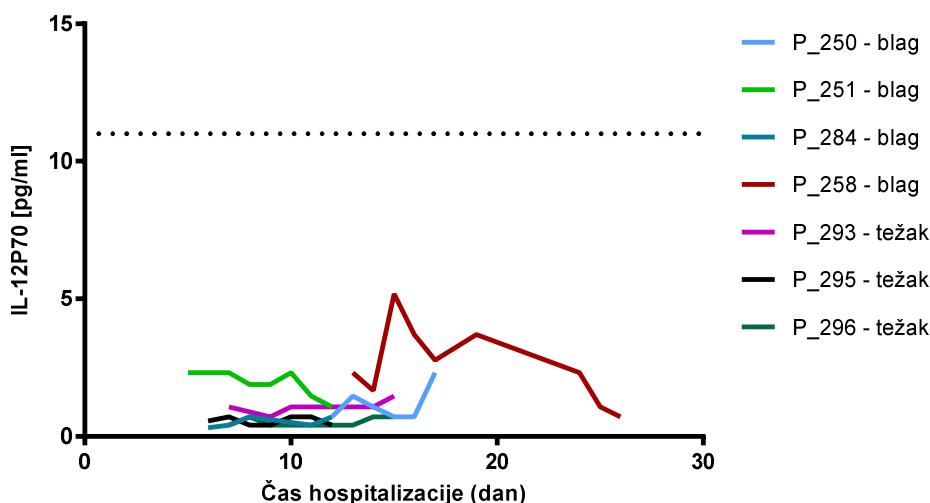
Ko smo primerjali skupine bolnikov glede na potek HMRS (Slika 47), smo ugotovili, da so bolniki okuženi z virusom PUU vrednosti citokina IFN γ višje pri blagem poteku bolezni (PUU blag: $4,03 \pm 4,76$ pg/ml vs. PUU težek: $1,13 \pm 0,33$ pg/ml). Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, pa pri težkem poteku HMRS (DOB težek: $44,97 \pm 52,58$ pg/ml vs. DOB blag: $5,06 \pm 8,16$ pg/ml). Ugotovili smo, da se bolniki, okuženi z virusom PUU oz. DOB, ne razlikujejo značilno v koncentraciji citokina IL-12p40 glede na potek HMRS (PUU: $p=0,3714$; DOB: $p=0,0952$).



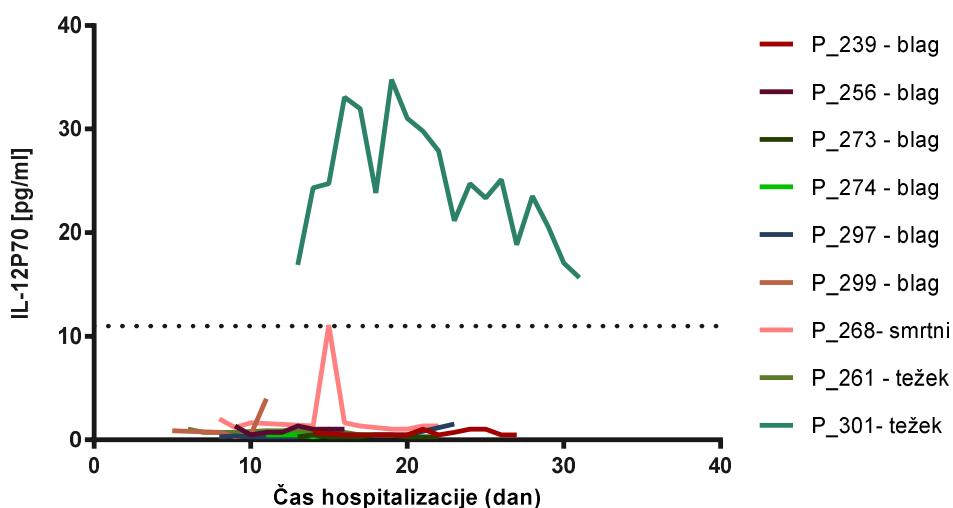
Slika 47: Primerjava koncentracije IL-12p40 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

4.2.10 Dinamika citokina IL-12p70 pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IL-12p70 v plazmi zdravega posameznika je 11 pg/ml (Slika 48 in 49; črtkana črta). Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU ali DOB so vrednosti IL-12p70 nižje od normalnih vrednosti tekom celotnega bolnišničnega zdravljenja. Povišana vrednost citokina smo dokazali le pri bolniku P_301, ki je imel težek potek bolezni.



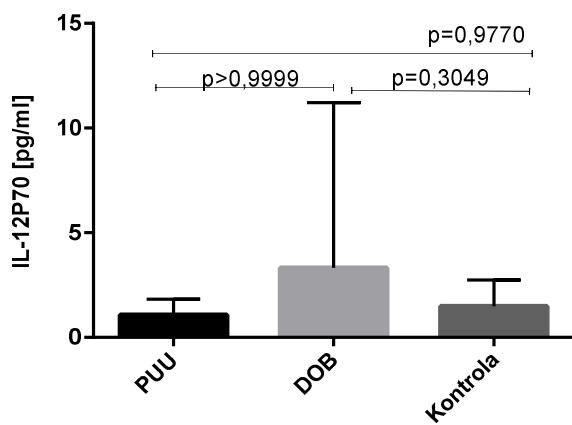
Slika 48: Dinamika IL-12p70 pri bolnikih, okuženih z virusom PUU. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.



Slika 49: Dinamika IL-12p70 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.

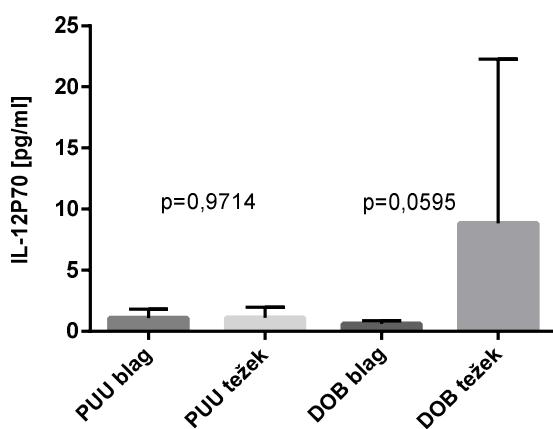
Spodnji graf (Slika 50) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino, ki jo predstavljajo zdravi posamezniki. Pri vseh treh skupinah so mediane IL-12p70 zelo nizke (PUU: $1,08 \pm 0,75$ pg/ml; DOB: $3,34 \pm 7,89$ pg/ml;

kontrola: $1,49 \pm 1,25$ pg/ml). Koncentracija IL-12p70 se med skupinami bolnikov ne razlikuje značilno (p vrednost je v vseh primerih > od 0,05; glej sliko 50).



Slika 50: Primerjava koncentracije IL-12p70 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Spodnji graf (Slika 51) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov, ki so okuženi z istim tipom virusa (DOB ali PUU), a se razlikujejo v poteku bolezni. Bolniki, okuženi z virusom PUU, se ne razlikujejo v mediani koncentracije IL-12p70 (PUU blag: $1,06 \pm 0,75$ pg/ml; PUU težek: $1,09 \pm 0,87$ pg/ml). Pri bolnikih okuženih z virusom DOB, so razlike večje: DOB blag: $0,6 \pm 0,27$ pg/ml; DOB težek: $8,81 \pm 13,46$ pg/ml. Kljub temu se koncentracije citokina IL-12p70 ne razlikujejo značilno glede na potek HMRS (PUU: $p=0,9714$; DOB: $p=0,0595$).

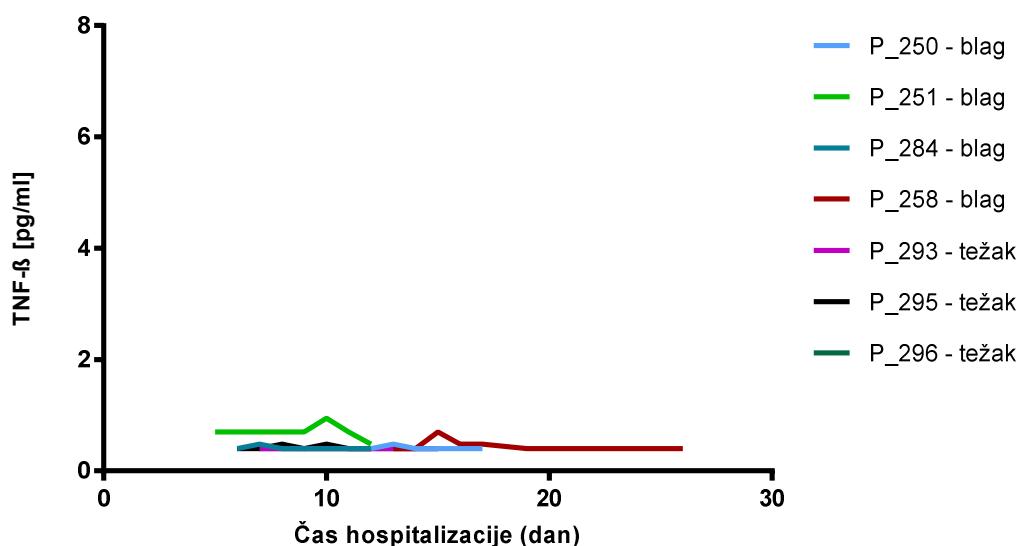


Slika 51: Primerjava koncentracije IL-12p70 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

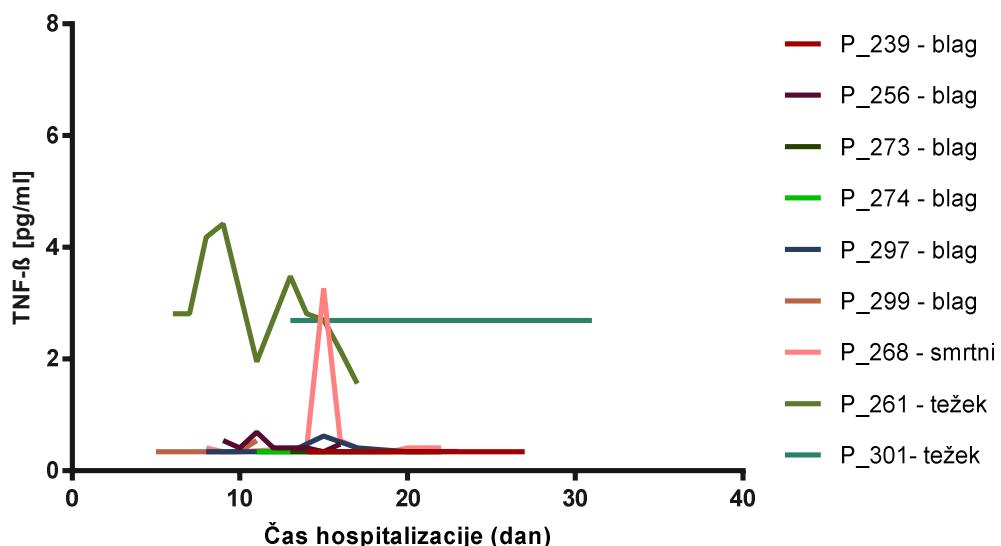
4.2.11 Dinamika citokina TNF- β pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina TNF- β je v plazmi zdravega posameznika pod mejo detekcije. Pri bolnikih, okuženih z virusom PUU in DOB, smo povisjanje v koncentraciji TNF- β zaznali

le v zelo majhnem obsegu. Dinamike citokina pri obravnavanih bolnikih ni, manjši skok v koncentraciji analita je le v primeru dveh z virusom DOB okuženima bolnikoma, P_273 (blag potek HMRS) in P_268 (smrtni izid HMRS).



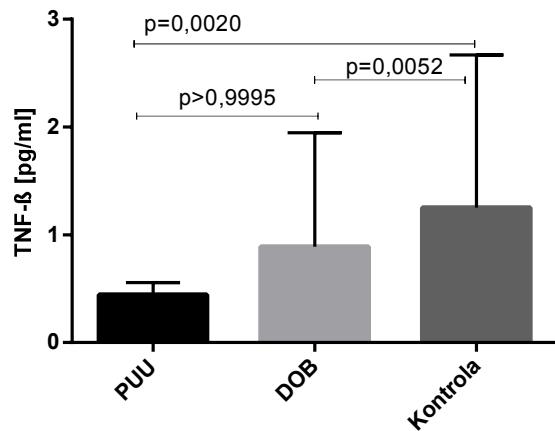
Slika 52: Dinamika TNF-β pri bolnikih, okuženih z virusom PUU.



Slika 53: Dinamika TNF-β pri bolnikih, okuženih z virusom DOB.

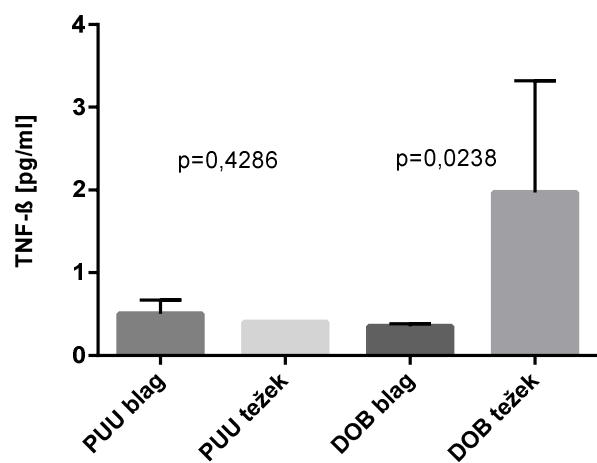
Spodnji graf (Slika 54) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov okuženih z virusom PUU, DOB in kontrolno skupino. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediane vrednosti posameznega bolnika. Povprečne koncentracije primerjanih skupin so v območju normalnih vrednosti (PUU: $0,44 \pm 0,22$ pg/ml; DOB: $0,89 \pm 1,1$ pg/ml; kontrola: $1,25 \pm 1,42$ pg/ml). Koncentracija TNF-β se med skupinama bolnikov ne razlikuje statistično značilno

($p>0,9995$), med skupinama bolnikov ter kontrolno skupino pa se razlikuje značilno ($p=0,0020$ in $p=0,0052$; slika 54).



Slika 54: Primerjava koncentracije TNF- β pri bolnikih, okuženih z virusom DOB, PUU in kontrolni skupini. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

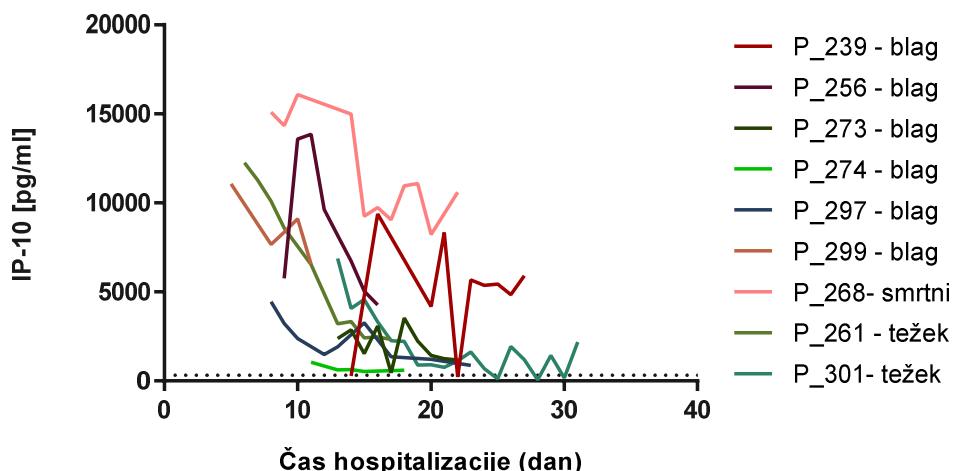
Spodnji graf (Slika 55) prikazuje primerjavo med skupino bolnikov, ki so okuženi z istim tipom virusa DOB ali PUU, a se razlikujejo v poteku bolezni. Ugotovili smo, da se bolniki, okuženi z virusom PUU ne razlikujejo značilno v koncentraciji citokina TNF- β glede na potek HMRS (PUU blag: $0,5\pm0,17$ pg/ml vs PUU težek: $0,4\pm0,0$ pg/ml; $p=0,4286$). Bolniki, okuženi z virusom DOB z blagim in težkim potekom HMRS, pa se razlikujejo značilno (DOB blag: $0,35\pm0,03$ pg/ml vs. DOB težek: $1,97\pm1,35$ pg/ml; $p=0,0238$).



Slika 55: Primerjava koncentracije TNF- β pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in PUU, glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

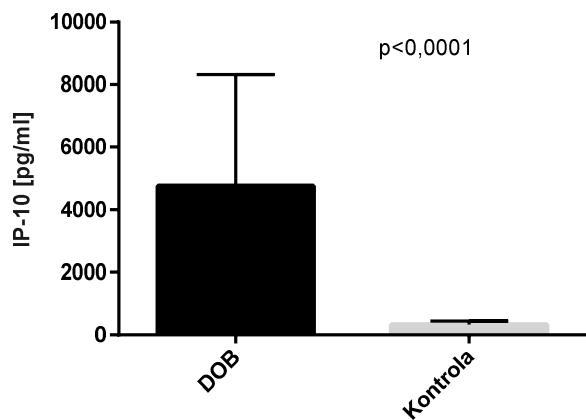
4.2.12 Dinamika citokina IP-10 pri bolnikih s HMRS

Koncentracija citokina IP-10 v plazmi zdravega posameznika je 325 pg/ml (Slika 55). Pri vseh bolnikih, razen pri bolniku P_274 z blagim potekom HMRS, je opazna dinamika citokina IP-10. Bolniki imajo povišana vrednost IP-10, ki ostaja nad mejo normalne vrednosti tekom celotnega bolnišničnega zdravljenja in z dnevi hospitalizacije upada.



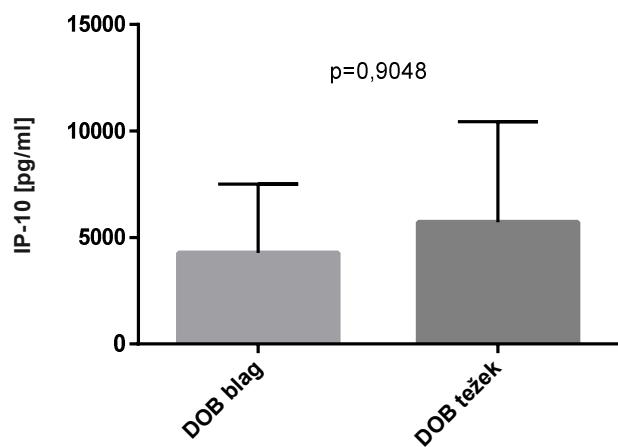
Slika 56: Dinamika IP-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB. Normalno vrednost predstavlja črtkana črta.

Mediane koncentracije IP-10 so bile pri DOB bolnikih 4759 ± 2560 pg/ml, pri kontrolni skupini pa $328,4 \pm 361,9$ pg/ml (Slika 57). Koncentracija IP-10 se med skupinama razlikuje značilno ($p < 0,0001$). Zaradi tehnične napake IP-10 nismo zmerili v skupini bolnikov okuženih z virusom PUU.



Slika 57: Primerjava koncentracije IP-10 pri bolnikih, okuženih z virusom DOB in kontrolno skupino. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

Ugotovili smo, da se bolniki ne razlikujejo značilno v koncentraciji citokina IP-10 glede na potek bolezni (DOB blag: 4279 ± 3243 pg/ml vs DOB težek: 5717 ± 4725 pg/ml; $p=0,9048$) (Slika 58).



Slika 58: Primerjava koncentracije IP-10 bolnikih, okuženih z virusom DOB glede na različen potek HMRS. Pri izrisu grafov smo upoštevali mediano vrednosti posameznega bolnika.

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV VIRUSNEGA BREMENA NA POTEK HMRS

Z magistrsko nalogo smo želeli raziskati vpliv virusnega bremena in citokinov na klinični potek HMRS. Zato smo retrospektivno analizirali vzorce bolnikov s HMRS, ki so bili okuženi z virusom PUU ali DOB. Predhodne raziskave vpliva virusnega bremena na potek HCPS in HMRS kažejo na povezavo med visokim virusnim bremenom in težjo klinično sliko (Terajima in sod., 1999; Xiao in sod., 2006; Saksida in sod., 2008). V raziskavi, ki so jo izvedli Saksida in sod. so ugotovili, da imajo bolniki okuženi z virusom DOB s težkim potekom bolezni v povprečju višje virusno breme kot bolniki z blagim potekom. V raziskavi, ki so jo izvedli Korva in sod. (Korva in sod., 2013b) so ugotovili, da virus DOB dosega višje virusno breme kot virus PUU, zato smo v magistrski nalogi primerjali dnevne koncentracije virusne RNA pri bolnikih okuženih z virusom DOB in tistih okuženih z virusom PUU (Slika 10). Pri bolnikih okuženih z virusom DOB, v nasprotju s pričakovanji, nismo dokazali višjega virusnega bremena v primerjavi z bolniki o kuženimi z virusom PUU. Tudi pri bolnikih s težjim potekom bolezni nismo ugotovili razlike v koncentraciji virusne RNA v primerjavi s skupino bolnikov z blagim potekom HMRS. Tudi, pri dinamiki virusnega bremena med bolnišničnim zdravljenjem (Sliki 8 in 9), nismo opazili značilnega vzorca v spreminjanju koncentracije, ki bi se razlikoval med skupino okuženo z enim ali drugim tipom virusa. Pri vseh skupinah bolnikov v začetku pride do upada v koncentraciji virusne RNA, nato se ta pri določenih bolnikih ustali, pri večini pa niha. Bolnišnično zdravljenje je v povprečju daljše pri bolnikih okuženih z virusom DOB. Vsi bolniki imajo ob odpustu iz bolnišnice še vedno dokazljivo virusno RNA, z izjemo enega bolnika P_258, ki je bil okužen z virusom PUU. V švedski raziskavi tudi niso potrdili povezave med trajanjem in višino viremije ter težo poteka HMRS (Pettersson in sod., 2014). Bolj kot virus sam ima verjetno vpliv na različen potek bolezni imunski odziv posameznika.

5.2 VPLIV CITOKINOV NA POTEK HMRS

Potek hemoragične mrzlice z renalnim sindromom je v veliki meri odvisen od mehanizmov prirojene in pridobljene odpornosti, ki poskušajo nevtralizirati virusno okužbo. Kot odziv na vnetne signale celice imunskega sistema proizvajajo citokine, ki sodelujejo pri regulaciji vnetja in povzročajo različne odzive, ki so odvisni od specifičnega lokalnega mikrookolja. Citokini vplivajo na potek okužbe s hantavirusi in naj bi bili vpletjeni v raznolik klinični potek bolezni. Zlasti TNF, IL-1, IL-6 so povezani z vročino, septičnim šokom in indukcijo proteinov akutne faze (Akira in sod., 1990). Pri bolnikih s HMRS so povišane koncentracije citokinov raziskovalci dokazali v urinu, plazmi in tkivu (Kanerva in sod., 1998; Borges in sod., 2008; Linderholm in sod., 1996; Outinen in sod., 2010; Sadeghi in sod., 2011).

V magistrski nalogi smo koncentracijo citokinov merili v zaporedno odvzetih vzorcih plazme pri bolnikih s HMRS. S spremljanjem sprememb v koncentraciji citokinov pri bolnikih okuženih z virusom DOB in PUU smo raziskovali vpliv dinamike na klinični potek bolezni. Analizirali smo 12 citokinov v 139 vzorcih plazme pri 7 bolnikih okuženih z virusom PUU in 9 bolnikih okuženih z virusom DOB. Ugotovili smo, da pri večini preiskovanih citokinov ni značilnih razlik med bolniki okuženimi z virusom DOB ali virusom PUU. Virus PUU sicer povzroča blažjo obliko bolezni, medtem ko je za bolnike, okužene z virusom DOB, značilen težji potek HMRS. Zato smo pričakovali, da bodo razlike v koncentraciji in dinamiki merjenih citokinov med obema skupinama večje. Statistično značilno razliko smo dokazali pri interlevkinu IL-10, kjer smo višje koncentracije izmerili pri bolnikih okuženih virusom DOB. IL-10 izločajo celice Th2 in je glavni regulator celic Th1 ter zavira celični imunski odziv (predstavljanje antigena, produkcijo vnetnih citokinov, ekspanzijo celic-T). Povišane vrednosti imunoregulatornega IL-10 so v skladu z dosedanjimi raziskavami HMRS (Linderholm in sod., 1996; Sadeghi in sod., 2011; Saksida in sod., 2011; Korva in sod., 2013b). Najvišje vrednosti IL-10 smo izmerili pri bolniku P_268, okuženem z virusom DOB, pri katerem se je okužba končala s smrtno. Pri ostalih bolnikih je večinoma opazen padajoč trend, pri bolniku P_268 pa vrednosti ostajajo visoke tekom dnevnega spremljanja bolnika do smrtnega izida. S tem bi lahko pojasnili tudi visoke vrednosti virusnega bremena pri tem bolniku, ki so višje v primerjavi z drugimi bolniki in tekom zdravljenja ne upadajo. Do tega bi lahko prišlo, ker IL-10 inhibira aktivnost celic Th1, NK in makrofagov, ki so pomembni za odstranitev patogena (Couper in sod., 2008). IL-10 omili pretiran celični imunski odziv (prekomerna produkcija IFN- γ in TNF- α), ki bi lahko vodil v imunopatološko stanje. Po drugi strani lahko pretirano izločanje IL-10 vodi v imunosupresijo, kar onemogoči odstranitev virusa in poruši ravnotežje med prirojeno in pridobljeno imunostjo.

Naslednji citokin, ki smo ga spremljali pri bolnikih s HMRS, je VEGF (vaskularni endoteljski rastni faktor). Ugotovili smo, da je le-ta pri vseh bolnikih ne glede na klinični potek bolezni in virusni tip okužbe povišan. Poleg tega je bila opazna tudi dinamika v koncentraciji citokina. Primerjava povprečnih vrednosti VEGF pri bolnikih okuženih z virusom PUU ali DOB nam pokaže, da so vrednosti višje pri bolnikov s PUU okužbo. Glede na potek HMRS pa razlike v koncentraciji VEGF niso statistično značilne. Naši rezultati so v skladu z nekaterimi raziskavami, ki ravno tako poročajo o povišani vrednosti VEGF pri HMRS in HCPS bolnikih (Lampugnani in sod., 2007; Gavrilovskaya in sod., 2008; Ma in sod., 2012). Izražanje VEGF inducira vnetni citokin TNF- α , ki je zelo pomemben v prvi fazi imunskega odziva. Patogeni hantavirusi se vežejo na integrine $\alpha v\beta 3$ in izrazito povečajo permeabilnost endoteljskih celic kot odziv na VEGF, medtem ko pri nepatogenih hantavirusih tega vpliva ni (Gavrilovskaya in sod., 1999; Raymond in sod., 2005; Krautkramer in sod., 2011; Gavrilovskaya in sod., 2008). Patogeni hantavirusi namreč inducirajo povečano fosforilacijo VEGFR2 (tirozin kinazni receptor) v okuženih

celicah, kar vodi v fosforilacijo, internalizacijo in razgradnjo VE-kadherina, ki je prevladujoča strukturna komponenta stikov endotelijskih celic. Na ta način oslabijo povezave stika celica-celica in kot posledica so s hantavirusi okužene endotelijске celice hiperpermeabilne (Lampugnani in sod., 2007; Gorbunova in sod., 2011; Tsergouli in Papa, 2013).

V več raziskavah so poročali tudi o povečanih koncentracijah citokinov IL-1, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-6, TNF- α pri HMRS bolnikih (Linderholm in sod., 1996; Mäkelä in sod., 2004; Outinen in sod., 2010; Sadeghi in sod., 2011; Saksida in sod., 2011; Takala in sod., 2000; Temonen in sod., 1996; Krakauer in sod., 1995; Markotic in sod., 2002). Tudi v naši raziskavi smo dokazali povišane koncentracije vnetnega citokina TNF- α in IL-6, IL-2 pa je povišan le pri enem DOB bolniku. IFN- γ , IFN- α 2, IL-17 in IL-12 pa so v območju normalnih vrednosti (z izjemo IL-12p70 pri bolniku P_301, DOB_težek). Visoke koncentracije IL-6 v plazmi bolnikov okuženih z virusom PUU nekateri znanstveniki povezujejo z odpovedjo ledvic in trombocitopenijo ter IL-6 predlagajo za napovednik teže poteka bolezni (Linderholm in sod., 1996; Outinen in sod., 2010; Mäkelä in sod., 2004). To se sklada z rezultati naših bolnikov v primeru DOB virusne okužbe, saj so povprečne vrednosti IL-6 pri bolnikih s težkim potekom HMRS statistično značilno višje od tistih z blagim potekom bolezni. V primeru okužbe z virusom PUU pa ta razlika ni značilna.

Pomemben vnetni citokin, ki smo ga spremljali med hospitalizacijo, je tudi TNF- α . Pri vseh obravnavanih bolnikih je bila vrednost TNF- α povišana. Skupini bolnikov, okuženi z virusom PUU in DOB, se ne razlikujeta statistično značilno, med njima tudi ni razlike glede na potek bolezni. Pri večini bolnikov smo opazili, da se koncentracija TNF- α z dnevi hospitalizacije zmanjšuje. Glede na potek bolezni lahko povišanje v koncentraciji TNF- α povežemo s prvo, vročinsko fazo HMRS, ki se odraža z znaki vnetja kot so potenje, vročina, slabost in bolečina. TNF- α je eden izmed citokinov, ki inducira nastanek proteinov akutne faze (CRP, fibrinogena, komponente komplementa C3, itd.). Poleg IL-6 in TNF- α tudi IL-1 inducira proteine akutne faze in vročino. Vendar tega citokina v vzorcih plazme bolnikov nismo merili, bi pa pričakovali, da je ravno tako povišan. Pri meritvi koncentracije IL-17a pri obravnavanih bolnikih nismo izmerili povišanih vrednosti. IL-17a je vnetni citokin, ki povzroča kronične vnetne bolezni, če je prisoten v visokih koncentracijah in inducira nastajanje veliko drugih citokinov (IL-6, TNF- α , GM-CSF, TGF- β) (Onishi in Gaffen, 2010). Analizo citokina smo izvedli, ker IL-17a privabi nevtrofilce in monocite na mesto vnetja, podobno kot IFN- γ , za katerega smo na podlagi predhodnih znanstvenih raziskav pričakovali, da bo povišan. IFN- γ ima namreč pomembno vlogo v imunskem odzivu, saj vzpodbudi prepoznavanje patogena, procesiranje in predstavitev antigena, migracijo levkocitov, lizosomalno aktivnost makrofagov in aktivnost NK (Schroder in sod., 2004). Glede na to, da imajo bolniki med bolnišničnim zdravljenja dokazljivo virusno RNA, smo pričakovali, da bomo zaznali povečane vrednosti IFN- γ vsaj v prvi polovici zdravljenja, saj ga v zgodni fazи obrambe pred okužbo izločajo celice NK in APC. Tudi koncentracije IFN- γ niso bile povišane pri bolnikih s HMRS.

Pričakovali smo višje vrednosti, saj IFN- γ inducira IP-10, ki je kemoatraktant za aktivirane celice T in smo ga v povišanih koncentracijah izmerili pri bolnikih, okuženih z virusom DOB. Izražanje IP-10 je značilno za veliko Th1 vnetnih bolezni, kjer privede aktivirane celice T na mesto vnetja. Zanimala nas je tudi dinamika IL-2, citokina, ki ima vlogo v vzpodbujanju proliferacije celic T in diferenciaciji naivnih celic T v efektorske in spominske celice. Poleg tega lahko zavira število antigen specifičnih celic T z aktivacijo celične smrti. IL-2 ima tudi protivnetne lastnosti, ker omejuje nastanek vnetnega IL-17. Koncentracije IL-2 so bile pri bolnikih z HMRS v območju normalnih vrednosti, razen pri bolniku P_239 (DOB, blag potek). Vlogo pri nevtralizaciji viruse okužbe ima tudi IFN- α 2, ki ojača efektorski imunski odziv: makrofage, NK in citotoksične celice-T. Vzpodbudi delovanje APC in inducira sintezo nekaterih ključnih protivirusnih mediatorjev: protein kinaze R, ki prepreči sintezo virusnih proteinov in 2'5' oligoadenilat sintetaze, ki aktivira Rnazo (Peters, 1996). Koncentracije IFN- α 2 pri bolnikih s HMRS niso povisane. To se ujema tudi z analizo dinamike virusnega bremena pri teh bolnikih, saj smo viremijo dokazali tekom celotnega zdravljenja, imunske celice torej niso bile učinkovite pri nevtralizaciji virusa.

Spremljali smo tudi dinamiko citokina IL-12, za katerega je značilno, da stimulira produkcijo IFN- γ in TNF- α s strani celic-T in NK. IL-12 vodi diferenciacijo naivnih celic T v celice Th1 in ojača citotoksično aktivnost limfocitov T, NK in makrofagov (Hamza in sod., 2010). V našem primeru so bile koncentracije IL-12 pod mejo normalnih vrednosti. Rahlo povisane koncentracije smo izmerili le pri bolniku P_301, ki je bil okužen z virusom DOB in je imel težek potek bolezni. Merili smo tudi TNF- β , ki ga proizvajajo limfociti in uravnava vnetne, imunostimulatorne in protivirusne mehanizme. Povišanih koncentracij pri obravnavanih bolnikih s HMRS nismo dokazali.

Patogeneza HMRS je najverjetnej posledica neustreznega imunskega odziva. Zaradi imunosupresije namreč pride do kopičenja imunskih kompleksov in podaljšanja viremije, saj je celičen imunski odziv oslabljen. Menimo, da lahko tako prešibek kot tudi premočan imunski odziv vodi v težek potek HMRS. Za ugoden izid okužbe je pomembna ustrezna regulacija imunskega odziva oziroma relativne količine protivnetnih in vnetnih citokinov in čas izločanja le-teh. Poleg citokinov so v hantavirusni patogenezi pomembni tudi drugi dejavniki imunskega sistema, kot je na primer komplement, ki ga v tej nalogi nismo analizirali. Vendar menimo, da bi to lahko dalo tudi zanimive rezultate in boljši vpogled v patogenezo. Aktivacija komplementa namrečsovpa s težo kliničnega poteka bolezni HMRS in bi lahko posredno ali neposredno inducirala povečano prepustnost žilnega epitelija. Le-ta bi bila lahko povečana tudi zaradi sekrecije bradikinina (spodbuja sproščanje mediatorjev vnetja, vazodilatacije in poveča prepustnost ožilja), kar je bilo pokazano v celični kulturi in z uspešnim zdravljenjem z virusom PUU okuženega bolnika z antagonistom receptorja bradikinina (Taylor in sod., 2013; Antonen in sod., 2013).

Analizo dinamike virusnega bremena in citokinov smo opravili na majhnem številu bolnikov, saj smo si pred začetkom magistrskega dela zastavili pogoje, ki so omejili nabor primernih bolnikov za vključitev v analizo. Ključen kriterij je bil, da smo imeli na voljo več zaporedno odvzetih vzorcev (vse od sprejema v bolnišnico in do odpusta). Da bi dobili boljšo sliko o tem, kako citokini vplivajo na imunski odziv in delovanje drugih citokinov, bi morali zajeti večjo skupino bolnikov okuženih z virusom DOB in PUU. Poleg tega bi bilo dobro analizirati še več citokinov, ki so vpleteni v imunske mehanizme (IL-1, TGF- β in poleg IL-10 še druge imunosupresivne citokine, kot so IL-4, IL-11 in IL-13). Tako bi lahko bolje opredelili vpliv regulatornih citokinov v patogenezi HMRS. Ker gre za omejene klinične raziskave in nabor ustreznih vzorcev bolnikov, je iskanje povezav med virusnim bremenom in imunskim odzivom še bolj oteženo. Potrebnih bo še veliko kliničnih raziskav, da se bo pridobljeno znanje različnih raziskovalnih skupin povezano in sestavilo za boljše razumevanje hantavirusne patogeneze.

6 SKLEPI

- Virusno breme smo dokazali pri vseh 16 bolnikih, ki smo jih vključili v raziskavo. Izmerjene koncentracije virusne RNA ob sprejemu v bolnišnico niso značilno različne med bolniki, okuženimi z enim ali drugim tipom virusa. Pri bolnikih nismo potrdili značilne povezave med višjim virusnim bremenom in težjim potekom bolezni HMRS.
- Pri bolniku, okuženemu z virusom DOB in s smrtnim izidom bolezni (P_268) je bila izmerjena koncentracija virusne RNA najvišja in je ostala visoka tudi po tem času zdravljenja.
- Na podlagi naše raziskave ugotavljamo, da bolniki, okuženi z virusom PUU, nimajo značilno drugačne dinamike izločanja citokinov kot bolniki, okuženi z virusom DOB.
- Povišane vrednosti imunoregulatornega IL-10 so v skladu z dosedanjimi raziskavami HMRS. Opazno višje so vrednosti tega citokina v primeru bolnika P_268, okuženega z virusom DOB, pri katerem se je okužba končala s smrtno. Menimo, da lahko pretirana produkcija IL-10 vodi v imunosupresijo, zaradi česar se verjetno kopijoči imunski kompleksi in se podaljša viremija, saj je celičen imunski odziv oslabljen.
- Pri vseh bolnikih ne glede na klinični potek bolezni in virusni tip okužbe smo opazili povečanje v koncentraciji citokina VEGF. Menimo, da VEGF igra pomembno vlogo v žilni prepustnosti.
- Ugotavljamo, da so povišane vrednosti v primeru vnetnega citokina TNF- α in IL-6. Citokini IL-2, IFN- γ , IFN- α 2, IL-17 in IL-12 pa pri večini bolnikov niso povišani.
- Patogeneza obravnnavanih bolnikov s HMRS je lahko posledica neustreznega imunskega odziva, saj je ravnovesje med prirojeno in pridobljeno imunostjo porušeno. Menimo, da lahko tako prešibak kot tudi premočan imunski odziv vodi v težek potek HMRS.

7 POVZETEK

Slovenija je endemično področje za okužbo s hantavirusi. Virus PUU povzroča blažjo obliko HMRS, medtem ko je za bolnike, okužene z virusom DOB, značilen težji potek HMRS s krvavitvami, šokom in 16 % smrtnostjo (Avšič-Županc in sod., 1999). Raziskave patogeneze kažejo na to, da na različen potek klinične slike HMRS vplivajo razlike v imunskem odzivu bolnika in v koncentraciji virusa ter mediatorjev vnetja. Želeli smo ugotoviti, ali bomo na podlagi retrospektivne analize bolnikov s HMRS dokazali povezavo med višino virusnega bremena, težo poteka bolezni in tipom virusa, ki bolezen povzroča. V raziskavo smo vključili 16 bolnikov: 7 okuženih z virusom PUU in 9 okuženih z virusom DOB, pri katerih smo imeli na voljo več zaporedno odvzetih vzorcev (od sprejema v bolnišnico do odpusta). Pri bolnikih, okuženih z virusom DOB nismo dokazali višjega virusnega bremena kot pri bolnikih okuženih z virusom PUU. Med tipoma virusa tudi nismo opazili razlik v vzorcu poteka dinamike virusnega bremena. Menimo, da ima imunski odziv posameznika večji vpliv na različen potek bolezni kot virus sam. Zanimalo nas je, kako citokini vplivajo na delovanje drug drugega in uravnavajo mehanizme prirojene in pridobljene imunosti. Skupno smo analizirali 139 vzorcev plazme (50 od 7 bolnikov okuženih z virusom PUU in 89 od 9 bolnikov okuženih z virusom DOB). Pri bolnikih s HMRS nismo opazili večje razlike med skupino, ki je okužena z virusom DOB in virusom PUU. Pomembno razliko smo ugotovili pri citokinu IL-10, kjer smo izmerili višje koncentracije pri bolnikih okuženih z virusom DOB. IL-10 zavira sintezo TNF- β , IFN- γ ter IL-12. Zaradi imunosupresije bi lahko prišlo do kopičenja imunskih kompleksov in podaljšanja viremije, saj je celičen imunski odziv oslabljen. Pri vseh bolnikih, ne glede na klinični potek bolezni in virusni tip okužbe, smo izmerili višje koncentracije citokina VEGF. VEGF bi bil lahko pomemben pri patogenezi, saj je ključni regulator žilne prepustnosti, ki je značilna za HMRS. Menimo, da je za ugoden izid okužbe pomembna ustrezna regulacija imunskega odziva oziroma relativne količine protivnetnih in vnetnih citokinov in čas izločanja le-teh.

8 VIRI

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. 2007. Cellular and molecular immunology. 8th ed. Philadelphia, Saunders Elsevier: 535 str.
- Antonen J., Leppanen I., Tenhunen J., Arvola P., Makela S., Vaheri A., Mustonen J. 2013. A severe case of Puumala hantavirus infection successfully treated with bradykinin receptor antagonist icatibant. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 45, 6: 494-496.
- Avšič-Županc T., Petrovec M., Furlan P., Kaps R., Elgh F., Lundkvist A. 1999. Hemorrahic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia—a 10-year survey. Clinical Infectious Diseases, 28, 4: 860-865.
- Avšič-Županc T., Korva M., Markotić A. 2014. HFRS and hantaviruses in the Balkans/South-East Europe. Virus Research, 187: 27-33.
- Avšič-Županc T., Petrovec M. 2003. Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom: biologija, epidemiologija in laboratorijska diagnostika. Medicinski Razgledi, 42, 1: 147-155.
- Avšič-Županc T., Xiao S.Y., Stojanovic R., Gligic A., van der Groen G., LeDuc J.W. 1992. Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. Journal of Medical Virology, 38, 2: 132-137.
- Bio-Rad Laboratories Inc. 2016. Multiplex immunoassays. Hercules, Bio-Rad: 4 str.
[http://www.bio-rad.com/en-si/applications-technologies/bio-plex-multiplex immunoassays](http://www.bio-rad.com/en-si/applications-technologies/bio-plex-multiplex-immunoassays) (10. apr. 2016)
- Björkström N.K., Lindgren T., Stoltz M., Fauriat C., Braun M., Evander M., Michaësson J., Malmberg K.J., Klingström J., Ahlm C., Ljunggren H.G. 2011. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell number in humans infected with hantavirus. Journal of Experimental Medicine, 208, 1: 13-21.
- Borges A.A., Campos G.M., Moreli M.L., Moro Souza R.L., Saggioro F.P., Figueiredo G.G., Livonesi M.C., Moraes Figueiredo L.T. 2008. Role of mixed Th1 and Th2 serum cytokines on pathogenesis and prognosis of hantavirus pulmonary syndrome. Microbes and Infection, 10, 11: 1150-1157.
- Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A., Hovi T., von Bonsdorff C.H., Vuorimies J., Manni T., Penttinen K., Oker-Blom N., Lahdevirta J. 1980. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. Journal of Infectious Diseases, 141, 2: 131-134.
- Carey D.E., Reuben R., Panicker K.N., Shope R.E., Myers M.R. 1971. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. Indian Journal of Medical Research, 59, 11: 1758-1760.

- Casalas J., Henderson B.E., Hoogstraal H., Johnson K.M., Shelokov A. 1970. A review of Soviet viral hemorrhagic fevers, 1969. *Journal of Infectious Diseases*, 122, 5: 437-453.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 1: 156-159.
- Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*, 180, 9: 5771-5777.
- Desmyter J., Leduc J., Johnson K., Brasseur F., Deckers C., van Ypersele Strihou C. 1983. Laboratory rat associated outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome due to Hantaan-like virus in Belgium. *Lancet*, 2: 1445-1448.
- Easterbrook J.D., Zink M.C., Klein S.L. 2007. Regulatory T cells enhance persistence of the zoonotic pathogen Seoul virus in its reservoir host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 39: 15502-15507.
- Enria D., Padula P., Segura E.L., Pini N., Edelstein A., Posse C.R., Weissenbacher M.C. 1996. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. *Medicina*, 56, 6: 709-711.
- Evander M., Eriksson I., Pettersson L., Juto P., Ahlm C., Olsson G.E., Bucht G., Allard A. 2007. Puumala hantavirus viremia diagnosed by real-time reverse transcriptase PCR using samples from patients with hemorrhagic fever and renal syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 8: 2491-2497.
- Ferres M., Vial P., Marco C., Yanez L., Godoy P., Castillo C., Hjelle B., Delgado I., Lee S.J., Mertz G.J. 2007. Prospective evaluation of household contacts of persons with hantavirus cardiopulmonary syndrome in chile. *Journal of Infectious Diseases*, 195, 11: 1563-1571.
- Gajdusek G.C. 1962. Virus hemorrhagic fevers. Special reference to hemorrhagic fever with renal syndrome (epidemic hemorrhagic fever). *Journal of Pediatrics*, 60: 841-857.
- Gavrilovskaya I.N., Gorbunova E., Koster F., Mackow E. 2012. Elevated VEGF levels in pulmonary edema fluid and PBMCs from patients with acute hantavirus pulmonary syndrome. *Advances in Virology*, 2012: ID 674360, doi:10.1155/2012/674360: 8 str.
- Gavrilovskaya I.N., Gorbunova E.E., Mackow N.A., Mackow E.R. 2008. Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *Journal of Virology*, 82, 12: 5797-5806.
- Gavrilovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H., Mackow E.R. 1999. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *Journal of Virology*, 73: 3951-3959.

- Gorbunova E.E., Gavrilovskaya I.N., Pepini T., Mackow E.R. 2011. VEGFR2 and Src kinase inhibitors suppress ANDV induced endothelial cell permeability. *Journal of Virology*, 85: 2296–2303.
- Hamza T., Barnett J.B., Li B., 2010. Interleukin 12- a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 789-806.
- Hepojoki J., Strandin T., Vaheri A., 2012. Hantavirus structure-molecular interactions behind the scene. *Journal of General Virology*, 93, 8: 1631-1644.
- Hujakka H., Koistinen V., Kuronen I., Eerikainen P., Parviaisen M., Lundkvist A., Vaheri A., Vapalahti O., Narvanen A. 2003. Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test. *Journal of Virological Methods*, 108, 1: 117-122.
- IMI. 2011. Posnetek virus Dobrava pod elektronskim mikroskopom. Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo: 1str. (interni gradivo).
- IMI. 2014. Grafičen prikaz števila HMRS primerov v Sloveniji v času od leta 1985 do 2014. Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo: 1 str. (interni gradivo).
- Jääskeläinen K.M., Kaukinen P., Minskaya E.S., Plyusnina A., Vapalahti O., Elliott R.M., Weber F., Vaheri A., Plyusnin A. 2007. Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. *Journal of Medical Virology*, 79, 10: 1527-1536.
- Jonsson C.B., Figueiredo L.T. , Vapalahti O. 2010. A gobal perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 2: 412-441.
- Kanerva M., Mustonen J., Vaheri A. 1998. Pathogenesis of puumala and other hantavirus infections. *Reviews in Medical Virology* 8, 2: 67-86.
- Kang H.J., Arai S., Hope A.G., Song J.W., Cook J.A., Yanagihara R. 2009. Genetic diversity and phylogeography of Seewis virus in the Eurasian common shrew in Finland and Hungary. *Virology Journal*, 6: 208-208.
- Klempa B., Avšič-Županc T., Clement J., Dzagurova T.K., Henttonen H., Heyman P., Jakab F., Kruger D.H., Maes P., Papa A., Tkachenko E.A., Ulrich R.G., Vapalahti O., Vaheri A. 2013. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: definition of genotypes and their characteristics. *Archives of Virology*, 158, 3: 521-529.
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Barriere P., Koivogui L., Meulen J., Kruger D.H. 2007. Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 3: 520-522.
- Klingstrom J., Hardestam J., Stoltz M., Zuber B., Lundkvist A., Linder S. 2006. Loss of cell membrane integrity in Puumala hantavirus-infected patients correlates with levels of epithelial cell apoptosis and perforin. *Journal of Virology*, 80, 16: 8279–8282.

- Korva M., Duh D., Saksida A., Trilar T., Avšič-Županc T. 2009. The hantaviral load in tissues of naturally infected rodents. *Microbes and Infection*, 11, 3: 344-351.
- Korva M., Knap N., Resman Rus K., Flajs L., Grubelnik G., Bremec M., Knapič T., Triar T., Avšič-Županc T. 2013a. Phylogeographic diversity of pathogenic and non-pathogenic hantaviruses in Slovenia. *Viruses*, 1999, 5: 3071-3087.
- Korva M., Saksida A., Kejžar N., Schmaljohn C., Avšič-Županc T. 2013b. Viral load and immune response dynamics in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome. *Clinical Microbiology and Infection*, 19, 8: 358-366.
- Kraigher A., Frelih T., Korva M., Avšič-Županc T. 2012. Increased number of cases of haemorrhagic fever with renal syndrome in Slovenia, January to April 2012. *Eurosurveillance*, 17, 21: pii=20176: 3 str.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20176> (10. apr. 2016)
- Krakauer T., Leduc J.W., Krakauer H. 1995. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interleukin-6 in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Viral Immunology*, 8, 2: 75-79.
- Krautkramer E., Grouls S., Stein N., Reiser J., Zeier M. 2011. Pathogenic old world hantaviruses infect renal glomerular and tubular cells and induce disassembling of cell-to-cell contacts. *Journal of Virology*, 85, 19: 9811-9823.
- Kruger D.H., Ulrich R., Lundkvist A.A.. 2001. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes and Infection*, 3, 13: 1129-1144.
- Kryštufek B. 1991. Sesalci Slovenije. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 150-159.
- Kuzman I., Puljiz I., Turcinov D., Markotic A., Turkovic B., Aleraj B., Andric Z., Petkovic D., Tutek V., Herendic B., Iskra M., Pandak N., Misetic Z., Peric L., Jelaska D., Majetic Sekovanic M., Ledina D., Misic-Majerus L., Radonic R. 2003. The biggest epidemic of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Acta Medica Croatica*, 57, 5: 337-346.
- Lampugnani M.G., Dejana E. 2007. Adherens junctions in endothelial cells regulate vessel maintenance and angiogenesis. *Thrombosis Research*, 123, 1: 187-190.
- Lee H.W., Lee P.W., Johnson K.M. 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 137, 3: 298-308.
- Linderholm M., Ahlm C., Settergren B., Waage A., Tarnvik A. 1996. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 173, 1: 38-43.
- Lindgren T., Ahlm C., Mohamed N., Evander M., Ljunggren H.G., Björkström N.K. 2011. Longitudinal analysis of the human T cell response during acute hantavirus infection. *Journal of Virology*, 85, 19: 10252-10260.

- López N., Padula P., Rossi C., Lázaro M.E., Franze-Fernández M.T., 1996. Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology*, 1, 220: 223–226.
- Ma Y., Liu B., Yuan B., Wang J., Yu H., Zhang Y., Xu Z., Yi J., Zhang C., Zhou X., Yang A., Zhuang R., Jin B. 2012. Sustained high level of serum VEGF at convalescent stage contributes to the renal recovery after HTNV Infection in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012: ID 812386, doi: 10.1155/2012/812386: 12 str.
- Manigold T., Vial P. 2014 Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology. *Swiss Medical Weekly*, 144: 1-10.
- Mäkelä S., Mustonen J., Ala-Houhala I., Hurme M., Koivisto A.M., Vaheri A., Pasternack A. 2004. Urinary excretion of interleukin-6 correlates with proteinuria in acute Puumala hantavirus-induced nephritis. *American Journal of Kidney Diseases*, 43, 5: 809-816.
- Markotic A., Gagro A., Dasic G., Kuzman I., Lukas D., Nichol S., Ksiazek T.G., Sabioncello A., Rode O., Rabatic S., Dekaris D. 2002. Immune parameters in hemorrhagic fever with renal syndrome during the incubation and acute disease: case report. *Croatian Medical Journal*, 43, 5: 587-590.
- Merck Millipore Corporation. 2016. Luminex xMAP® technology. Billerica, Merck: 2 str. https://www.merckmillipore.com/INTL/en/life-science-research/protein-detection-quantification/Immunoassay-Platform-Solutions/luminex-instruments/technology/OUGb.qB.D_kAAAFB6sYRRk_Q,nav (10. apr. 2016)
- Morgan B.P. 1999. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Critical Reviews in Immunology*, 19: 173–98.
- Mustonen J., Makela S., Outinen T., Laine O., Jylhava J., Arstila P. T. 2013. The pathogenesis of nephropathia epidemica: new knowledge and unanswered questions. *Antiviral Research*, 100, 3: 589–604.
- Myhrman G. 1951. Nephropathia epidemica, a new infectious disease in Northern Scandinavia. *Acta Medica Scandinavica*, 140: 52-56.
- Nichol S.T., Spiropoulou C.F., Morzunov S., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Feldmann H., Sanchez A., Childs J., Zaki S., Peters C.J. 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 262, 5135: 914-917.
- Niikura M., Maeda A., Ikegami T., Saijo M., Kurane I., Morikawa S. 2004. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus-infected endothelial cell monolayers. *Archives of Virology*, 149, 7: 1279-1292.
- Onishi R.M. in Gaffen S.L. 2010. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 129, 3: 311-321.

- Outinen T.K., Mäkelä S.M., Ala-Houhala I.O., Huhtala H.S., Hurme M., Paakkala A.S., Pörsti I.H., Syrjänen J.T., Mustonen J.T. 2010. The severity of Puumala hantavirus induced nephropathia epidemica can be better evaluated using plasma interleukin-6 than C-reactive protein determinations. *BMC Infectious Diseases*, 10: 132, doi: 10.1186/1471-2334-10-132: 8 str.
- Peters M. 1996. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: An overview. *Hepatology*, 23, 4: 909-916.
- Pettersson L., Thunberg T., Rocklöv J., Klingström J., Evander M., Ahlm C. 2014. Viral load and humoral immune response in association with disease severity in Puumala hantavirus-infected patients--implications for treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 3: 235-241.
- Pincelli M., Barbas C.S., Carvalho C.R., Souza L.T., Figueiredo L.T. 2003. Hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Jornal de Pneumologia*, 29: 309-324.
- Plyusnin A. 2002. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Archives of Virology*, 147, 4: 665-682.
- Radosevic Z., Mohacek I. 1954. The problem of nephropathia epidemica Myhrman-Zetterholm in relation to acute interstitial nephritis. *Acta Medica Scandinavica*, 149, 3: 221-228.
- Raftery M.J., Kraus A.A., Ulrich R., Krüger D.H., Schönrich G. 2002. Hantavirus infection of dendritic cells. *Journal of Virology*, 76, 21: 10724-10733.
- Raymond T., Gorbunova E., Gavrilovskaya I.N., Mackow E.R. 2005. Pathogenic hantaviruses bind plexin-semaphorin-integrin domains present at the apex of inactive, bent alphavbeta3 integrin conformers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 1163-1168.
- Resman K., Korva M., Fajs L., Zidaric T., Trilar T., Zupanc T.A. 2013. Molecular evidence and high genetic diversity of shrew-borne Seewis virus in Slovenia. *Virus Research*, 177, 1: 113-117.
- Reusken C., Heyman P. 2013. Factors driving hantavirus emergence in Europe. *Current Opinion in Microbiology*, 1, 3: 92-99.
- Sadeghi M., Eckerle I., Daniel V., Burkhardt U., Opelz G., Schnitzler P. 2011. Cytokine expression during early and late phase of acute Puumala hantavirus infection. *BMC Immunology*, 12: 65, doi: 10.1186/1471-2172-12-65: 10 str.
- Saksida A. 2008. Pomen imunskih dejavnikov in virusnega bremena v patogenezi bunjavirusnih hemoragičnih mrzlic. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 128 str.
- Saksida A. 2011. Bunjavirusi. V: Medicinska virologija. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 169-181.

- Saksida A., Duh D., Korva M., Avšič-Županc T., 2008. Dobrava virus RNA load in patients who have hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 197, 5: 681-685.
- Saksida A., Wraber B., Avšič-Županc T. 2011. Serum levels of inflammatory and regulatory cytokines in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *BMC Infectious Diseases*, 23, 11: 142, doi: 10.1186/1471-2334-11-142: 8 str.
- Sane J, Laine O., Mäkelä S., Paakkala A., Jarva H., Mustonen J., Vapalahti O., Meri S., Vaheri A. 2012. Complement activation in Puumala hantavirus infection correlates with disease severity. *Annals of Medicine*, 44, 5: 468-475.
- Schmaljohn C., Hjelle B. 1997. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 2: 95-104.
- Schmaljohn C.S., Nichol S. 2007. Bunyaviridae. V: Fields virology. 5th ed. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: 1741-1789.
- Schönrich G., Krüger D.H., Raftery M.J. 2015. Hantavirus-induced disruption of the endothelial barrier: neutrophils are on the payroll. *Frontiers in Microbiology*, 6: 222, doi: 10.3389/fmicb.2015.00222: 9 str.
- Schönrich G., Rang A., Lütteke N., Raftery M.J., Charbonnel N., Ulrich R.G. 2008. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunological Reviews*, 225: 163-189.
- Schountz T., Prescott J. 2014. Hantavirus immunology of rodent reservoirs: current status and future directions. *Viruses*, 6, 3: 1317-1335.
- Schountz T., Prescott J., Cogswell A.C., Oko L., Mirowsky-Garcia K., Galvez A.P., Hjelle B. 2007. Regulatory T cell-like responses in deer mice persistently infected with Sin Nombre virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 39: 15496-15501.
- Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75, 2: 163-189.
- Song J.W., Baek L.J., Schmaljohn C.S., Yanagihara R. 2007a. Thottapalayam virus, a prototype shrewborne hantavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 7: 980-985.
- Song J.W., Gu S.H., Bennett S.N., Arai S., Puorger M., Hilbe M., Yanagihara R. 2007b. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virology Journal*, 4: 114-118.
- Sumibcay L., Kadjo B., Gu S.H., Kang H.J., Lim B.K., Cook J.A., Song J.W., Yanagihara R. 2012. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Côte d'Ivoire. *Virology Journal*, 9: 1-7.

- Takala A., Lähdevirta J., Jansson S.E., Vapalahti O., Orpana A., Karonen S.L., Repo H. 2000. Systemic inflammation in hemorrhagic fever with renal syndrome correlates with hypotension and thrombocytopenia but not with renal injury. *Journal of Infectious Diseases*, 181, 6: 1964-1970.
- Taylor S.L., Wahl-Jensen V., Copeland A.M., Jahrling P.B., Schmaljohn C.S. 2013. Endothelial cell permeability during hantavirus infection involves factor XII-dependent increased activation of the kallikrein-kinin system. *PLoS Pathogens*, 9, 7: e1003470, doi: 10.1371/journal.ppat.1003470: 14 str.
- Temonen M., Mustonen J., Helin H., Pasternack A., Vaheri A., Holthofer H. 1996. Cytokines, adhesion molecules, and cellular infiltration in nephropathia epidemica kidneys: an 102 immunohistochemical study. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 78, 1: 47- 55.
- Terajima M., Hendershot J.D., 3rd, Kariwa H., Koster F.T., Hjelle B., Goade D., DeFronzo M.C., Ennis F.A. 1999. High levels of viremia in patients with the Hantavirus pulmonary syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 180, 6: 2030-2034.
- Terajima M., Vapalahti O., Van Epps H.L., Vaheri A., Ennis F.A. 2004. Immune responses to Puumala virus infection and the pathogenesis of nephropathia epidemica. *Microbes and Infection*, 6, 2: 238-245.
- Tsergouli K., Papa A. 2013. Vascular endothelial growth factor levels in Dobrava/Belgrade virus infections. *Viruses*, 5, 12: 3109–3118.
- Tsukada H., Ying X., Fu C., Ishikawa S., McKeown-Longo P., Albelda S., Bhattacharya S., Bray B., Bhattacharya J. 1995. Ligation of endothelial av β 3 integrin increases capillary hydraulic conductivity of rat lung. *Circulation Research*, 77: 651- 659.
- Vaheri A., Strandin T., Hepojoki J., Sironen T., Henttonen H., Mäkelä S., Mustonen J. 2013. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 539-550.
- Van Epps H.L., Terajima M., Mustonen J., Arstila T.P., Corey E.A., VaheriA., Ennis F.A. 2002. Long-lived memory T lymphocyte responses after hantavirus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 196, 5: 579-588.
- Vapalahti O., Lundkvist A., Kukkonen S.K., Cheng Y., Gilljam M., Kanerva M., Manni T., Pejcoch M., Niemimaa J., Kaikusalo A., Henttonen H., Vaheri A., Plyusnin A. 1996. Isolation and characterization of Tula virus, a distinct serotype in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Journal of General Virology*, 77, 12: 3063- 3067.
- Vapalahti O., Mustonen J., Lundkvist A., Henttonen H., Plyusnin A., Vaheri A. 2003. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 3, 10: 653-661.

- Vukićević-Radić O., Matić R., Kataranovski D., Stamenković S. 2006. Spatial organization and home range of *Apodemus flavicollis* and *A. agrarius* on mt. Avala, Serbia. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 52, 81–96.
- Weiss S., Witkowski P.T., Auste B., Nowak K., Weber N., Fahr J., Mombouli J., V., Wolfe N.D., Drexler J.F., Drosten C., Klempa B., Leedertz F.H., Kruger D.H., 2012. Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 159-161.
- Wells R.M., Sosa Estani S., Yadon Z.E., Enria D., Padula P., Pini N., Mills J.N., Peters C.J., Segura E.L. 1997. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? *Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia*. *Emerging Infectious Diseases* 3, 2: 171-174.
- Wilhelm J., Pingoud A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*, 4, 11: 1120-1128.
- Xiao R., Yang S., Koster F., Ye C., Stidley C., Hjelle B. 2006. Sin Nombre viral RNA load in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 194, 10: 1403-1409.
- Yashina L.N., Abramov S.A., Gutorov V.V., Dupal T.A., Krivopalov A.V., Panov V.V., Danchinova G.A., Vinogradov V.V., Luchnikova E.M., Hay J., Kang H.J., Yanagihara R. 2010. Seewis virus: phylogeography of a shrew-borne hantavirus in Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Disease*, 10, 6: 585-591.
- Zhu L.Y., Chi L.J., Wang X., Zhou H. 2009. Reduced circulating CD4+CD25+ cell populations in haemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Translational Immunology*, 156, 1: 88-96.

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila prof. dr. Tatjani Avšič Županc za prevzem mentorstva in ponujeno priložnost opravljanja magistrskega dela na zelo zanimivem področju. Somentorici dr. Miši Korva se zahvaljujem za strokovne nasvete in pomoč tekom praktičnega dela ter tudi za vložen čas in vse napotke med pisanjem naloge. Hvala Katarini Resman Rus za nasvete in pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela. Recenzentu dr. Ivanu Toplaku se zahvaljujem za strokovnen in hiter pregled naloge.

Hvala Evi za pomoč pri oblikovanju naloge. Zahvala gre tudi mojim staršem in ostali družini, ki so me podpirali tekom celotnega študija in vzpodbjali pri pisanju naloge.

Hvala Nurii in Petru za nadaljnje navdušenje nad raziskovanjem v svetu mikrobiologije.