

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
DOKAZOVANJE VIRUSA KLOPNEGA
MENINGOENCEFALITISA V MALIH SESALCIH
VZORČENIH NA DIVJIH ODLAGALIŠČIH V ISTRI

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Dokazovanje virusa klopnega meningoencefalitisa v malih sesalcih
vzorčenih na divjih odlagališčih v Istri**

(Demonstration of tick-borne encephalitis virus in small mammals sampled in illegal waste sites in Istria)

Ime in priimek: Urban Kunej

Študijski program: Biodiverziteta

Mentor: izr. prof. dr. Elena Varljen Bužan

Somentor: asist. dr. Darja Duh, univ. dipl. mikrobiol.

Koper, avgust 2014

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Urban KUNEJ

Naslov zaključne naloge: Dokazovanje virusa klopnega meningoencefalitisa v malih sesalcih vzorčenih na divjih odlagališčih v Istri

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 46

Število slik: 9

Število tabel: 7

Število prilog: 1

Število strani prilog: 2

Število referenc: 109

Mentor: izr. prof. dr. Elena Varljen Bužan

Somentor: asist. dr. Darja Duh, univ. dipl. mikrobiol.

Ključne besede: klopni meningoencefalitis, RT – PCR v realnem času, mali sesalci, divja odlagališča, Istra

Izvleček:

Virus klopnega meningoencefalitisa je zoonotski virus, ki pripada družini *Flaviviridae*. Razširjen je po Evrazijskem kontinentu, kjer ga smatramo za medicinsko najpomembnejšega, saj pri ljudeh povzroča težje oblike virusnih okužb osrednjega živčevja. Življenjski krog virusa KME v naravi vključuje prenašalce klope, ki imajo tudi vlogo rezervoarja, in gostitelje, ki so mali in veliki sesalci. Lahko se prenese neodvisno od razvoja viremije v sesalcih v procesu imenovanem so-hranjenje ali pa po vertikalni in/ali horizontalni poti med gostitelji in prenašalci. Slovenija je endemično območje virusa KME. Letno v Sloveniji zabeležimo približno 300 okužb z virusom KME in incidenco 14 na 100,000 prebivalcev. V Sloveniji je virus KME dodobra raziskan in opisan. Predhodno so že dokazali viremijo pri malih sesalcih vrst *Myodes* in *Apodemus*. V zaključni nalogi nas je zanimalo, če se virus KME pojavlja še v drugih vrstah malih sesalcev in če je frekvenca pojavljanja na divjih odlagališčih večja kot na ostalih območjih v Istri. Prisotnost virusa KME smo dokazovali z uporabo molekularnih tehnik. Celokupno RNK smo izolirali iz vzorcev vranic malih sesalcev in jo testirali z RT – PCR v realnem času. Uporabljali smo začetne oligonukleotide specifične za evropski podtip virusa KME. V nobenem vzorcu nismo zaznali prisotnosti virusa KME. Geografsko območje, ki smo ga testirali je območje z nizkim oziroma ničelnim pojavljanjem virusa KME. Pomemben zaključek naloge je, da torej tudi okolje, ki nudi spremenjene in favorizirane življenjske razmere, kot so divja odlagališča, ne vpliva na pojavljanje in širjenje virusa KME.

Key words documentation

Name and SURNAME: Urban KUNEJ

Title of the final project paper: Demonstration of tick-borne encephalitis virus in small mammals sampled in illegal waste sites in Istria

Place: Koper

Year: 2014

Number of pages: 46

Number of figures: 9

Number of tables: 7

Number of appendix: 1

Number of appendix pages: 2

Number of references: 109

Mentor: Assoc. Prof. Elena Varljen Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Prof. Darja Duh, PhD

Keywords: tick-borne encephalitis virus, real time RT – PCR, small mammals, illegal waste sites, Istria

Abstract:

Tick-borne encephalitis virus is a zoonotic flavivirus which belongs to the virus family named *Flaviviridae*. It occurs on the Eurasian continent where it is medically very important as the most frequent causative agent of central nervous system viral infections. In nature, TBEV circulate from tick to tick through vertebrates. In vertebrates it can be transmitted independent of a systemic viremia in process called co-feeding or by vertical or horizontal path between hosts and vectors. The ticks are considered as vectors as well as reservoirs for TBEV, while vertebrates are considered as transient hosts in the transmission and maintenance of the virus in nature. Slovenia is an endemic country for TBEV with approximately 300 cases reported annually and the incidence of around 14 per 100,000 inhabitants. In Slovenia, the viremia has been previously described among two vertebrate genera (*Myodes* and *Apodemus*). In our work we were interested whether TBEV could be present in other rodent species, which share the same living habitat in illegal waste sites on Istria peninsula. The presence of TBEV was determined using molecular techniques. Total RNA was extracted from the vertebrate spleen samples and tested with real time RT – PCR. Primers, specific to European subtype were used. All analyzed samples tested negative to the presence of TBEV which could be explained by the fact that the sampling area was in a region with a low incidence of TBEV. Simultaneously, we have proved that despite environmental and socio-economic changes that have been documented in the sampling area TBEV has not spread into the area.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so na kakršenkoli način pripomogli pri izdelavi moje zaključne naloge, najsi bo to s spodbudno besedo, svetovanjem ali podanimi izkušnjami.

Posebna zahvala gre mentoriciizr. prof. dr. Eleni Varljen Bužan za dano priložnost pisanja zaključne naloge pod njenim mentorstvom, ter za vso strokovno in pedagoško svetovanje pri izdelavi zaključne naloge. Zahvaljujem se za omogočeno sodelovanje na mednarodnem projektu DIVA – Sanacija divjih odlagališč, s čimer sem pridobil vzorce za izvedbo zaključne naloge, hkrati pa tudi dragocene izkušnje z delom na terenu in v laboratoriju.

Iskrena hvala somentorici dr. Darji Duh, univ. dipl. mikrobiol., ker mi je omogočila delo v svojem laboratoriju, za vso pomoč, strokovno in pedagoško svetovanje pri izdelavi zaključne naloge ter vse podane izkušnje in posredovano znanje.

Zahvala gre tudi Petru Maričiću dr. vet. med., ki je opravil ogromen delež terenskega dela ter strokovno izvedel odvzem tkivnih vzorcev. Zahvaljujem se za vso podano znanje in nasvete, ki sem jih pridobil na terenskem delu in v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi vsem raziskovalcem Inštituta za biodiverzitetne študije in vsem študentom biodiverzitetne, ki so sodelovali pri projektu DIVA. Posebna zahvala gre Sari Zupan, ki je posredovala rezultate analize cyt b za vrstno določitev ujetih malih sesalcev.

Posebno se zahvaljujem Sandri Hasić, ki me je navdušila nad delom v laboratoriju, ter mi podala ogromno količino znanja. Hvala za vso pomoč, nasvete in spodbudne besede ob pisanju zaključne naloge.

Zahvaljujem se vsem sošolcem in prijateljem, ki so me spremljali, mi nudili podporo in ustvarjali nepozabna študijska leta mojega življenja.

Velika zahvala gre moji družini, ki mi je omogočila študij, mi ves čas stala ob strani, me spodbujala in verjela vame. Zahvaljujem se za vso nudeno podporo v času študija ter med izdelavo zaključne naloge.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Namen dela	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	Zgodovinski pregled	2
2.2	Zgradba virusa KME	3
2.2.1	Struktura genoma virusa KME.....	4
2.2.2	Virusne beljakovine.....	4
2.2.3	Razmnoževanje virusa.....	5
2.3	Taksonomija in evolucija virusa KME	5
2.3.1	Podtipi virusa KME.....	6
2.4	Epidemiologija okužbe z virusom KME	7
2.4.1	Divja odlagališča kot potencialna naravna žarišča virusa KME	8
2.4.2	Razširjenost virusa KME po svetu	8
2.4.3	Razširjenost virusa KME v Sloveniji	9
2.4.4	Spremembe v incidenci klopnega meningoencefalitisa.....	11
2.5	Kroženje virusa v naravi	14
2.5.1	Kroženje virusa med prenašalci.....	14
2.5.2	Kroženje virusa med gostitelji.....	16
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	Terensko delo.....	18
3.1.1	Vzorčenje.....	20
3.2	Laboratorijsko delo	20
3.2.1	Izolacija DNK in RNK iz tkivnih vzorcev malih sesalcev	20
3.2.2	Vrstna determinacija malih sesalcev na molekularni osnovi	21
3.3	Dokazovanje prisotnosti RNK virusa KME	22
3.3.1	Preverjanje prisotnosti RNK virusa KME z metodo RT – PCR v realnem času	22
3.3.2	Preverjanje prisotnosti RNK virusov iz družine <i>Flaviviridae</i>	23
3.3.3	Preverjanje prisotnosti RNK virusov iz družine <i>Flaviviridae</i> z ugnezenim PCR	25

3.3.4	Elektroforeza produktov RT – PCR in ugnezdenega PCR v agaroznem gelu ..	26
4	REZULTATI ..	27
4.1	Prisotnost RNK virusa KME v malih sesalcih.....	27
4.2	Prisotnost RNK virusov družine <i>Flaviviridae</i>	27
5	ZAKLJUČEK IN DISKUSIJA.....	29
6	LITERATURA	30

KAZALO TABEL

Tabela 1: Vzorčna mesta (VM)	18
Tabela 2: Količine reagentov s končnimi koncentracijami v posamezni reakcijski mešanici.	23
Tabela 3: Količine in končne koncentracije reagentov za RT – PCR z genospecifičnimi začetnimi oligonukleotidi	24
Tabela 4: Količine in končne koncentracije reagentov uporabljenih pri metodi ugnezdene PCR.....	25
Tabela 5: Vrste malih sesalcev analiziranih za prisotnost virusa KME	27
Tabela 6: Vzorci analizirani z metodo RT – PCR z geno-specifičnimi (flavi.-uni.) začetnimi oligonukleotidi.	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz nezrelega (levo od črte) in zrelega (desno od črte) flavivirusnega delca (povzeto po Stiasny in Franz, 2006).	4
Slika 2: Shematski prikaz genoma virusa KME. Pravokotniki nad RNK sekvenco predstavljajo ohranjene sekundarne strukture (povzeto po Thurner in sod., 2004).	4
Slika 3: Povprečne stopnje pojavljanja KME po slovenskih regijah med leti 2000 in 2009 (povzeto po Grgič-Vitek in Klavs, 2011).	10
Slika 4: Sezonska aktivnost larv, nimf in odraslih klopov od leta 2005 do 2008 na območju Mozirja. Stolpci predstavljajo odrasle klope, prekinjena črta larve in polna črta nimfe (povzeto po Knap in Avšič-Županc, 2012).	10
Slika 5: Sezonska aktivnost larv, nimf in odraslih klopov od leta 2005 do 2008 na območju Črnega Kala. Stolpci predstavljajo klope, prekinjena črta larve in polna črta nimfe (povzeto po Knap in Avšič-Županc, 2012).	11
Slika 6: Nekateri izmed faktorjev, ki pripomorejo k povečanju incidence v osrednji in vzhodni Evropi. Podatki so iz držav: Estonija (EE), Latvija (LV), Litva (LT), Slovenija (SI) in Češka (CZ) (povzeto po Randolph, 2008).	14
Slika 7: Prikaz poti kroženja virusa KME med gostitelji in prenašalci v naravi (povzeto po Dobler in sod., 2012).	17
Slika 8: Lokacije vzorčnih mest v sklopu mednarodnega projekta DIVA. Na lokacijah št. 2,4,5,14 in 15-19 smo vzorčili male sesalce za dokazovanje virusa KME (povzeto po Bužan Varljen in sod., 2013).	19
Slika 9: Slika gelske elektroforeze genospecifičnih (pomnoženih 260bp) RT – PCR produktov (zgornja vrstica) in produktov ugnezdene PCR metode (pomnoženih približno 200bp) (spodnja vrstica) z za Flaviviridae univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi.	28

KAZALO PRILOG

PRILOGA A

SEZNAM KRATIC

KME	klopni meningoencefalitis
KMEV	virus klopnega meningoencefalitisa
DNA / DNK	deoksiribonukleinska kislina
cDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
RNA / RNK	ribonukleinska kislina
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RT – PCR	PCR z reverzno transkriptazo
RT – PCR v realnem času	PCR z reverzno transkriptazo v realnem času
NK	nukleinske kisline
VM	vzorčno mesto

1 UVOD

Virus klopnega meningoencefalitisa je zoonotski flavivirus, ki se pojavlja na Evrazijskem kontinentu in pri ljudeh povzroča bolezen klopni meningoencefalitis. V Sloveniji virus KME smatramo za medicinsko izredno pomemben zoonotski patogen, saj je najpogostejši vzrok za virusne okužbe osrednjega živčevja (Avšič-Županc in sod., 2009). Virus KME prenašajo artropodni prenašalci. Virus v naravi kroži med prenašalci (klopi), s pomočjo gostiteljev (sesalcev) v procesu imenovanem so-hranjenje (co-feeding), ki je neodvisen od stopnje viremije v gostitelju. Vretenčarji, v razvojnem ciklu virusa, služijo za prenos in vzdrževanje virusa v naravi. Ljudje smo v večini primerov samo naključni gostitelji, kateri razvijemo bolezenske znake, hkrati pa za virus predstavljamo slepo vejo kroženja v naravi (Randolph in sod., 1996). KME je v Sloveniji prvi opisal profesor doktor Milko Bedjanič leta 1948 (Bedjanič M., 1949). Prvo večjo epidemijo KME so v Sloveniji opazili leta 1953, zaradi česar so v tem letu izvedli tudi obširno študijo epidemiologije KME na slovenskem območju (Kmet in sod., 1955). Danes območje Slovenije spada v endemično območje zahodnega podtipa virusa KME. Letno imamo prijavljenih približno 300 primerov okužb z virusom KME in incidenco 14 na 100.000 prebivalcev. Virus KME na območju Slovenije kroži med klopi, malimi sesalci in srnjadjo. Viremijo so potrdili pri glodavcih vrste *Myodes* in *Apodemus* (Knap, 2011; Grgič-Vitek in Klavs, 2011).

1.1 Namen dela

Z globalnega stališča je območje Slovenije endemično območje centralno evropskega podtipa virusa KME, katerega prenaša klop vrste *Ixodes ricinus* (Dumpis in sod., 1999). V centralni Evropi in Baltskih državah, je endemično območje razširjenosti virusa KME, omejeno na določene regije, kjer lahko virus KME kroži med populacijami klopov in vretenčarjev (Dumpis in sod., 1999; Charrel in sod., 2004). Glavni gostitelj in rezervoar virusa so vrste malih sesalcev, klopi pa imajo vlogo prenašalcev, kot tudi rezervoarjev. Čeprav lahko virus KME okuži 14 vrst klopov, sta za prenos virusa KME na človeka v veliki meri odgovorna *I. ricinus* in *Ixodes persulcatus* (Dumpis, Crook, & Oksi, 1999). Znotraj Slovenije je virus KME različno razširjen. Prisotna so območja z visoko aktivnostjo do območij z nizko aktivnostjo, ter tudi območja, kjer je okužba z virusom KME malo verjetna ali celo ničelna (Avšič-Županc in sod., 1995). Mali sesalci imajo velik pomen pri kroženju virusa, kot gostitelji ličink in nimf klopov, ki prenašajo virus KME. V primeru okuženosti nimf in ličink klopov, se virus KME prenese tudi na gostitelja (Grešikova in Calisher, 1989).

Klasifikacija večine naravnih žarišč je na podlagi obolenj človeka z KME. Takšna metoda klasifikacije je lahko zavajajoča, saj se visoka stopnja precepljenosti človeške populacije odraža na zmanjševanju prijavljenih primerov KME (Achazi in sod., 2011).

Z zaključno nalogo želimo ugotoviti prisotnost in pogostost okuženih malih sesalcev z virusom KME na divjih odlagališčih v slovenski in hrvaški Istri. Odlagališča z biološkimi komunalnimi odpadki so vir ogromne količine hrane, hkrati pa nudijo zatočišče različnim vrstam živali, kot so mali sesalci, ki so potencialni prenašalci zoonoz. Ker je območje slovenske in hrvaške Istre območje z nizko ali ničelno aktivnostjo virusa KME, smo želeli ugotoviti, če je zaradi mikroklimatskih razmer in večje količine razpoložljive hrane na divjih odlagališčih, omogočeno pojavljanje virusa KME v malih sesalcih v primerjavi s podatki iz naravnega okolja. Divja odlagališča so majhna območja z večjo frekvenco pojavljanja malih sesalcev, zaradi česar prihaja do prekrivanja življenjskega prostora. Zanimalo nas je, če je možen prenos virusa KME iz vrst rodu *Apodemus* na hišne miši iz rodu *Mus*, čeprav pri slednjih še ni bilo dokazano, da so gostitelji virusa KME. Na raziskovalnem območju je glede na število prijavljenih obolenj z KME pri človeku nizka oziroma ničelna stopnja prekuženosti človeške populacije, kar pa ne pomeni, da virus na tem območju v naravi ne kroži. Poznavanje stopnje okuženosti malih sesalcev je pomembno, saj pokaže ali virus kroži na nekem območju. Prisotnost virusa KME smo dokazovali z uporabo molekularnih tehnik. Celokupno RNK smo izolirali iz vranic malih sesalcev in testirali z metodo RT – PCR v realnem času. Uporabljali smo specifične in genospecifične začetne oligonukleotide za evropski podtip virusa KME oziroma za flavivirusse.

2 PREGLED OBJAV

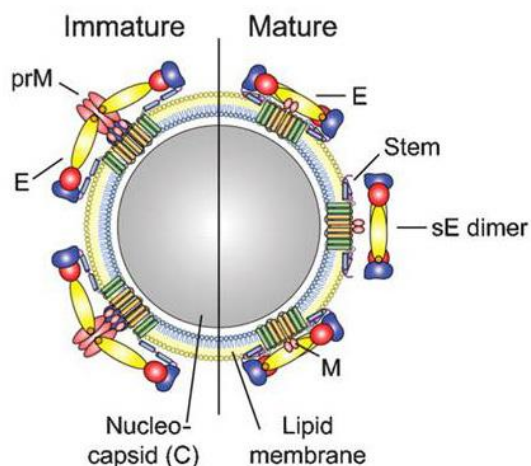
2.1 Zgodovinski pregled

Prvi zapisi, ki navajajo simptome klopnege meningoencefalitisa segajo v 18. stoletje in izhajajo iz cerkvenih registrov v Skandinaviji (Lindquist in Vapalahti, 2008). Leta 1927 je iz opazanj o večjem pojavljanju klinične bolezni v spomladanskem in zgodnje poletnem času v okolici Dunaja bolezen prvič opisal dr. Schneider in leta 1931 izdal monografijo o tej bolezni, ki jo je poimenoval »meningitis serosa epidemica« (Bedjanič, 1973; Kunz, 2003). Nadalje so podobno obliko bolezni opisali tudi na skrajnem vzhodu nekdanje Sovjetske zveze, kjer so tudi prvič osamili povzročitelja bolezni in pojasnili vlogo klopov kot prenašalcev (Smorodintsev, 1958). Ker se je bolezen sezonsko pojavljala na istih območjih, je Pavlovsky leta 1947 opisal endemična območja virusa in potrdil hipoteze o kroženju virusa med sesalci in klopi (Pavlovsky, 1947). Za ohranjanje virusa v naravi je potrebno veliko število malih sesalcev, pri katerih je viremija dovolj visoka, kakor tudi klopov. Ugotovili so, da mali sesalci predstavljajo glavnega gostitelja virusa KME. Rezultati raziskav naravnih žarišč KME so pokazali, da je klop *I. ricinus* glavni prenašalec zahodnega podtipa virusa KME, ki prevladuje na območju Evrope. Vrsta *I. persulcatus* je prenašalec daljnovzhodnega podtipa virusa KME, ki prevladuje na osrednjem območju Rusije (Nosek, Kozuch in Ernek, 1967; Kožuch in sod., 1967).

Klopni meningoencefalitis je v Sloveniji prvi opisal prof. dr. Milko Bedjanič leta 1948 (Bedjanič, 1949), večja raziskovanja naravnih žarišč bolezni pa so se začela po osamitvi virusa iz klopotov in krvnih vzorcev pacientov (Likar in Kmet, 1956; Vesenjāk-Zmijanac in sod., 1955). Leta 1953 je bila opažena prva večja epidemija KME v Sloveniji. V tem letu so izvedli obširno študijo epidemiologije ter analizirali klinične značilnosti bolezni (Kmet in sod., 1955). Uspela jim je tudi izolacija virusa iz hemokulture, s tem pa so ugotovili, da gre za virus soroden Louping ill-u in ruskemu pomladansko-poletnemu encefalitisu (Bedjanič, 1973). Prva epidemiološka značilnost bolezni, je pojavljanje na endemičnem območju. Med epidemijo leta 1953 so bili primeri prijavljeni na naravnih žariščih, poznanih od leta 1946. Večino primerov so zaznali v osrednji Sloveniji in vzhodnem delu Julijskih Alp. Ta območja so bila večinoma prekrita z gozdovi ali pa je bila na njih razvita kmetijska dejavnost. Drugo zelo aktivno območje je bilo severovzhodno vznožje Savinjskih Alp (Kmet in sod., 1955; Lešničar, 1960).

2.2 Zgradba virusa KME

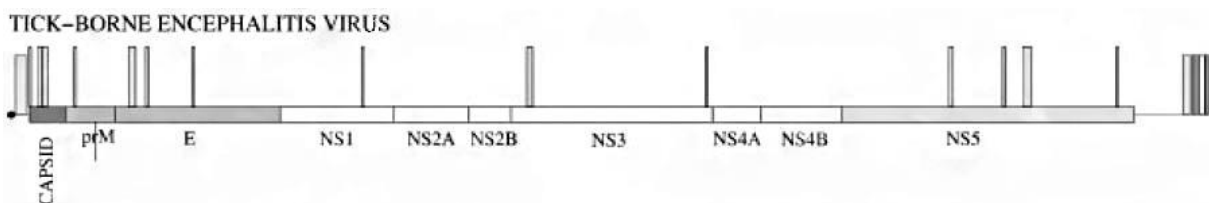
Virus KME ima značilno zgradbo virusov družine *Flaviviridae* (Slika 1). Virusni delec je ikozaedrične oblike in v premeru meri od 40 do 60 nm. Virus je zgrajen iz 6% ribonukleinskih kislin (RNK), 66% beljakovin, 9% ogljikovih hidratov in 17% lipidov (Schlesinger in Schlesinger, 1991). Virusna beljakovina C (angl.: capsid) je močno bazična beljakovina, ki pritrjuje enoverižno, pozitivno polarno genomsko RNK in skupaj tvorita sferično strukturo - nukleokapsido, ki v premeru meri 30 nm in jo obdaja lipidni dvosloj (Rey in sod., 1995; Schlesinger in Schlesinger, 1991; Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Nukleokapsida ščiti genom virusa pred celičnimi nukleazami in je gostiteljskega izvora (Monath in Heinz, 1996). Kapsida zrelega virusnega delca vsebuje dve virusni beljakovini: glikolizirano membransko beljakovino E in neglikolizirano membransko beljakovino M. Beljakovina E (iz angl.: envelope) je glavna površinska beljakovina, ki ima vlogo liganda, hkrati pa posreduje vezavo virusnih delcev z receptorji celice in zlitje virusne ovojnice z endosomom. Na virulenco virusa lahko vplivajo tudi mutacije na genu za beljakovino E (Heinz, 1986). Beljakovina M nastane po cepitvi beljakovine prM (angl.: *precursor M*). (Russell in sod., 1980). PrM deluje kot šaperon, ki usmerja zvižanje beljakovine E med zorenjem virusa (Rey in sod., 1995; Allison in sod., 1995).



Slika 1: Shematski prikaz nezrelega (levo od črte) in zrelega (desno od črte) flavivirusnega delca (povzeto po Stiasny in Franz, 2006).

2.2.1 Struktura genoma virusa KME

Genom virusa je pozitivno polarna, enovijačna RNK, ki je dolga približno 11.000 baznih parov. Ker je genom virusa kopija prenašalske mRNK (angl. messenger RNA), omogoča neposredno prevajanje, zaradi česar je genom tudi infektiven. Genomska RNK ima en odprt bralni okvir, ki se prevede v polipeptidno molekulo, sestavljeno iz 3414 aminokislin (Slika 2). Polipeptidna molekula je med prevajanjem in po prevajanju razcepljena z virusnimi in gostiteljskimi proteazami na 3 strukturne (C, prM, E) in 7 nestrukturnih (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) beljakovin (Heinz, 2003; Lindenbach in sod., 2007). Odprt bralni okvir vseh flavivirusov je obdan s 5' (približno 130 nukleotidov) in 3' (400-700 nukleotidov) nekodirajočima regijama (NKR). RNK lahko na teh regijah tvori sekundarne strukture, ki sodelujejo pri podvajanju, translaciji in sestavljanju virusnega delca (Gritsun in sod., 2003).



Slika 2: Shematski prikaz genoma virusa KME. Pravokotniki nad RNK sekvenco predstavljajo ohranjene sekundarne strukture (povzeto po Thurner in sod., 2004).

2.2.2 Virusne beljakovine

Strukturne beljakovine sestavljajo virusni delec, ne-strukturne beljakovine pa opravljajo več različnih funkcij. Natančna vloga beljakovine NS1 še ni znana, vendar vemo, da je močno ohranjena in povzroči imunski odziv proti flavivirusom (Gritsun in sod., 2003). Beljakovina NS3 skupaj z NS2B zagotavlja virus specifično serin-proteazno aktivnost, ki omogoča cepljenje novo sintetiziranega virusnega poliproteina. Nestrukturni NS4A in

NS4B beljakovini poskrbita za pravilno orientacijo poliproteina znotraj intracelularne membrane in s tem zagotavljata pravilno cepitev in delovanje polimeraznega kompleksa (Lindenbach in sod., 2007). NS5 je največja in najbolj ohranjena beljakovina v bralnem okvirju. NS5 je od RNK odvisna RNK polimeraza in skupaj z NS3 (helikazo), med infekcijskim ciklom, tvori polimerazni kompleks, ki se preko beljakovin NS1 in NS2A povezuje z membrano (Gritsun, in sod., 2003; Lindenbach in sod., 2007).

2.2.3 Razmnoževanje virusa

Najprej poteče vezava beljakovine E z receptorjem gostiteljske celice. Poteče receptorsko posredovana endocitoza viriona, pri čemer celica z uvihanjem celične membrane navznoter obda virusni delec s prelizosomskim endocitotskim mešičkom oziroma endosomom. Nizek pH v endosomu sproži strukturne spremembe beljakovine E, kar vodi v fuzijo virusne membrane z membrano endosoma. S tem se virusna nukleokapsida sprosti v celično citoplazmo (Heinz in Allison, 2003). Virusni genom se sprosti iz nukleokapside in se prevede v polipeptidno molekulo. S procesiranjem polipeptidne molekule nastanejo posamezne virusne beljakovine, ki so sposobne pomnoževanja virusnega genoma. Genomska RNK je prevedena v komplementarno negativno polarno vijačnico RNK z RNK polimerazo, ki je sestavljena iz ne strukturne beljakovine NS3 in NS5. Negativno polarne kopije služijo kot podloga za nastajanje novih pozitivno polarnih RNK oziroma genomov za novonastale viruse. Sintetizirani beljakovini prM in E se preneseta v endoplazmatski retikulum. Na citoplazemski strani endoplazmatskega retikuluma se iz beljakovine C tvori kapsida, ki obdaja genomsko RNK in brsti v lumen endoplazmatskega retikuluma, hkrati pa se obda z virusno ovojnico v kateri so usidrani beljakovini prM in E (Chambers in sod., 1990). Zorenje virusa poteče, ko gostiteljski proteazni furin razcepi prM in ko virion potuje po sekretorni poti preko trans-Golgijevih cistern k celični membrani. Zreli virioni se nato z eksocitozo sprostijo iz celice (Gritsun in sod., 2003; Heinz in Allison, 2003; Heinz, 2003; Lindenbach in sod., 2007).

2.3 Taksonomija in evolucija virusa KME

Virus KME spada v družino *Flaviviridae*, ki jo delimo na rodove *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* in *Pegivirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2014). Družina je bila poimenovana po virusu rumene mrzlice (lat. *flavus* pomeni rumen), ki je bil prvi izoliran virus iz te skupine (Monath in Tsai, 1997). Viruse so na podlagi antigenskih determinant beljakovine E (nevtralizacijski test in test navzkrižne reaktivnosti) razvrstili v osem serokompleksov (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Raziskave so potrdile, da sta antigenska in filogenetska sorodnost flavivirusov soodvisni (Mandl in sod., 1988).

Rod flavivirusov sestavlja 50 vrst in 23 podtipov virusov (Gubler in sod., 2007). Termin »virus klopnega meningoencefalitisa« je bil uporabljen, ko so različne seve ali podtipe virusov ločili na podlagi seroloških raziskav. Na podlagi molekularne analize nukleotidnih sekvence in konstrukcije filogenetskih dreves, so viruse razvrstili v različne skupine, klade in vrste. Glede na virusne prenašalce so ustvarili 3 skupine (Kaiser, 2008):

- virusi, ki nimajo prenašalca oziroma je le ta neznan
- virusi, ki jih prenašajo klopi
- virusi, ki jih prenašajo komarji

Filogenetske analize so pokazale, da se je skupina virusov, ki jih prenašajo klopi, razvijala počasneje od skupine virusov, ki jih prenašajo komarji. Glede na molekularne epidemiološke študije je počasen razvoj potekal med širjenjem proti severu in zahodu preko Azije in Evrope. Počasen razvoj je verjetno posledica dolgega življenjskega cikla prenašalca, ki lahko traja do pet let. Klop je tako imel velik vpliv pri hitrosti širjenja in razvoja virusov, saj se vsaka stopnja klopa hrani le enkrat v življenjskem ciklu in lahko preživi dolga obdobja brez prehranjevanja in razmnoževanja (Kuno in sod., 1998). Zaradi tega, ti dve skupini predstavljata ločeni liniji, ki sta se razvijali na različna načina. Skupina virusov, ki jih prenašajo komarji, se je razvijala na večjih geografskih razdaljah, torej nepovezano, hkrati pa je prihajalo do genetskih rekombinacij, kar je vodilo k povečanju raznolikosti (Gould in Solomon, 2008; Grard in sod., 2007). V skupino klopno prenosljivih flavivirusov, ki tvorijo svoj serokompleks, spadajo virus Powassan (POWV), virus Louping ill (LIV), virus Langat (LGTV), virus hemoragične mrzlice Omsk (OHFV), virus bolezni gozda Kyasanur (KFDV) ter virus klopnega meningoencefalitisa (KMEV) (Gould in Solomon, 2008).

2.3.1 Podtipi virusa KME

Poznamo tri podtipe virusa klopnega meningoencefalitisa (Lindquist in Vapalahti, 2008):

- Evropski podtip (virus KME – Eu) s prototipnim sevom Neudoerfl, ki je razširjen v osrednji Evropi in na Balkanu.
- Daljnovzhodni podtip (virus KME – FE) je poznan tudi kot virus ruskega pomladno-poletnega encefalitisa (RSSE). Prototipni sev Sofijin je razširjen v vzhodni Evropi, Rusiji in na Japonskem.
- Sibirski podtip (virus KME – Sib) predstavlja prototipni sev Vasilchenko. Razširjen je v sibirskem pasu Rusije in se nekoliko prekriva z območjem podtipa KMEV – FE.

Podtipi se razlikujejo tudi v svojih prenašalcih. Prenášalec virusa KME – Eu je klop vrste *I. ricinus* prenašalec virusov KME – FE in KME – Sib pa je klop vrste *I. persulcatus* (Lindquist in Vapalahti, 2008). Variacija v amino-kislinskem zaporedju znotraj podtipa ne presega 2,6 %, med posameznimi podtipi pa je do 5,6 % (Ecker in sod., 1999). Raznolikost virusa KME, ki se prenaša s klopom vrste *I. persulcatus* je dosti večja kot pri virusih, ki se prenašajo z drugimi vrstami klopov. Razlog za to je verjetno daljši čas razvoja. Sevi podtipa virusa KME – Eu, ki se prenašajo s klopom vrste *I. ricinus*, nimajo velike diverzitete in so se razširili šele v zadnjih nekaj stoletjih, verjetno s pomočjo emigrirajočih ptic (Waldenstrom in sod., 2007). To nakazuje predvsem nejasna geografska razporeditev skupin. Na primer sevi znotraj ene države ne formirajo enotnih genskih skupin (Lindquist in Vapalahti, 2008). Virusna podtipa KME – FE in KME – Sib sta med seboj bolj sorodna kot z virusom KME – Eu, kateri je najbolj soroden virusu Louping ill, ki ga prav tako prenaša klop vrste *I. ricinus* in povzroča bolezen predvsem pri ovcah, redko pa pri ljudeh (Grard in sod., 2007).

2.4 Epidemiologija okužbe z virusom KME

Pojavljanje in epidemiologija klopnega meningoencefalitisa je izredno kompleksna in se neprestano spreminja, saj je odvisna tako od biotskih, abiotskih in antropogenih dejavnikov (Knap in Avšič-Županc, 2012). Virus klopnega meningoencefalitisa je eden od pomembnih povzročiteljev vnetij osrednjega živčevja v Evropi (Avšič-Županc in sod., 1995). KME je zoonoza, kar pomeni, da jo povzročajo patogeni mikroorganizmi, kot so bakterije, glive, zajedavci in virusi. Za večino takšnih mikroorganizmov je značilno, da pri prenašalcih ne povzročajo bolezni, ampak v njih živijo kot komenzali. Človek je po navadi naključni gostitelj v katerega se prenesejo skozi poškodovano kožo, posredno z vdihovanjem okuženih živalskih izločkov ali s piki ter ugrizi členonožcev. Tako preneseni mikroorganizmi lahko pri ljudeh povzročijo hudo in dolgotrajno bolezen ali celo smrt (Avšič-Županc, 2012). Glavni gostitelj in rezervoar virusa KME so mali sesalci. Klopi imajo vlogo prenašalca, človek pa je le naključni gostitelj in nima nobene vloge pri kroženju virusa KME v naravi. Čeprav lahko virus KME okuži 14 vrst klopov, specifični ekološki dejavniki dovoljujejo prenos virusa na človeka samo vrstama *I. persulcatus* in *I. ricinus* (Charrel in sod., 2004; Dumpis in sod., 1999). Endemična območja podtipov virusa KME lahko jasno geografsko opredelimo, vendar pa poznamo območja na katerih istočasno krožita dva ali celo vsi trije podtipi virusa KME (Golovljova in sod., 2004; Demina in sod., 2010).

2.4.1 Divja odlagališča kot potencialna naravna žarišča virusa KME

Teorijo o naravnih žariščih je razvil Evgenij Pavlovsky, ki je s študijami ugotavljal način prenosa virusa na ljudi. Ugotovil je, da povzročitelj, gostitelj in prenašalec sestavljajo biocenozo v biotopu. Naravno žarišče je definiral kot geografsko območje, kjer je evolucija vodila do posebnih odnosov med virusom, prenašalcem in gostiteljem. Prenášalec in virus sta v simbiotskem odnosu, zato virus ne vpliva na razvoj in razmnoževanje prenašalca. Virus tako na tem območju kroži kot potreben člen naravno razvite biocenoze, neodvisno od človeka in domačih živali (Pavlovsky, 1939; Grešikova in Calisher, 1989). Naravna žarišča se pojavljajo znotraj endemičnega območja in so aktivna, kjer so velike in številne populacije klosov in gostiteljev (Grešikova in Calisher, 1989). Prisotnost protiteles proti virusu KME pri ljudeh, ki živijo na endemičnem območju, je lahko velika in po navadi variira od 1 % do 20 %. Na območju naravnih žarišč je lahko seroprevalenca tudi večja in doseže celo 100 % okuženost človeške populacije (Libikova, 1981). Če je na določenem območju ugotovljena prisotnost virusa KME v gostiteljih, bolezen pa se pri človeški populaciji na tem območju ne izraža, takšno območje označujemo kot latentno endemično območje (Malovrh in Marc, 1997). Pri raziskovanju naravnega žarišča je pomembno upoštevati sezonsko dinamiko klosov. V kontinentalnih predelih je za klopa vrste *I. ricinus* značilen dvofazni potek sezonskega nihanja z vrhom v aprilu ali maju in kasneje v septembru. V mediteranskih predelih pa ima fluktacijska krivulja en sam vrh v zimskih mesecih. V tem obdobju se aktivirajo larve, nimfe in odrasli osebki klopa. Obdobje, ki ga obsegajo krivulje sezonske aktivnosti navadnega klopa, smatramo za obdobje normalne cirkulacije virusa v žariščih, ki se manifestirajo v humano populacijo (Bedjanič, 1973). Divja odlagališča z biološkimi komunalnimi odpadki nudijo hrano in zatočišče različnim vrstam živali, še posebej pa predstavljajo ugodno okolje za vrste malih sesalcev, ki so potencialni prenašalci zoonoz. Sinantropne vrste – živali, ki so vezane na človeška bivališča – med katere uvrščamo med drugim hišne miši (*Mus musculus*), si na divjih odlagališčih delijo življenjski prostor z »gozdnimi vrstami«, med katere prištevamo vrste rodu *Apodemus* (Courtney in Fenton, 1976). Zaradi stika teh dveh skupin živali na divjih odlagališčih je prenos povzročiteljev bolezni ter notranjih in zunanjih zajedavcev z enih na druge pričakovan, zaradi česar so prebivalci bližine odlagališč potencialno bolj izpostavljeni okužbi z zoonozami (Bužan Varljen in sod., 2013).

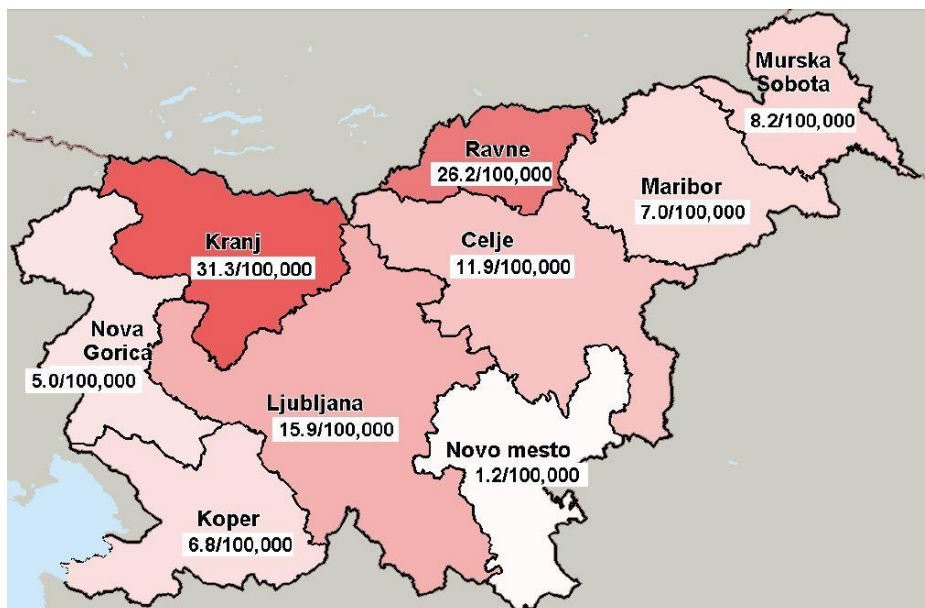
2.4.2 Razširjenost virusa KME po svetu

Endemično območje KME se razprostira vse od skrajnega vzhoda Azije, preko Rusije in vzhodne ter srednje Evrope (Dumpis in sod., 1999). Podtip virusa KME – Eu, katerega prenašalec je klopa vrste *I. ricinus*, je razširjen v Srednji in Vzhodni Evropi. Podtipa virusa KME – Sib in KME – FE, ki ju prenaša klopa vrste *I. persulcatus*, pa je razširjen v azijskem delu Rusije, na Kitajskem in na Japonskem. Geografska razširjenost podtipov virusa KME

sovpada z razširjenostjo prenašalcev (Monath in Tsai, 1997). V Evropi najdemo naravna žarišča v Avstriji, Belorusiji, Bolgariji, Estoniji, Franciji, Nemčiji, Italiji, Romuniji, Sloveniji in Švici ter na Madžarskem, Norveškem, Poljskem, Švedskem, Finskem, Češkem in na Danskem (Dumpis in sod., 1999). Samo na območju Evrope je bilo med letoma 1990 in 2009 prijavljenih 169.937 primerov KME, kar je približno 8497 primerov na leto. Od teh je bilo letno 2815 (33,1 %) primerov prijavljenih v Evropi ob neupoštevanju Rusije. V letih od 1976 do 1989 je bilo zabeleženih od 1452 (52 %) do 2755 primerov KME. Trend okužbe ljudi z virusom KME v zadnjih treh desetletjih močno narašča in se je na dane podatke število primerov v Evropi, vključno z območjem Rusije, povečalo za 317,8 %. Ob neupoštevanju območja Rusije se je število prijavljenih primerov povečalo za 193,2 % (Süss, 2008). Števil prijavljenih obolenj se na območju Evrope iz leta v leto spreminja. To lahko prepišemo spremembam v gostoti populacij malih sesalcev in klopotov. Pomemben vpliv pa imajo tudi podnebne spremembe in socio-ekonomski dejavniki (Gray in sod., 2009). Čeprav ni dvoma, da trend okužbe z virusom KME pri ljudeh narašča, je pomembno upoštevati, da k temu botrujejo tudi obvezno prijavljanje primerov okužbe z virusom KME, boljši nadzor in izboljšane diagnoze bolezni, kar je še posebej pomembno v socio-ekonomsko manj razvitih regijah Evrope, kjer se zdravstveni sistem izboljšuje v zadnjih tridesetih letih (Süss, 2008).

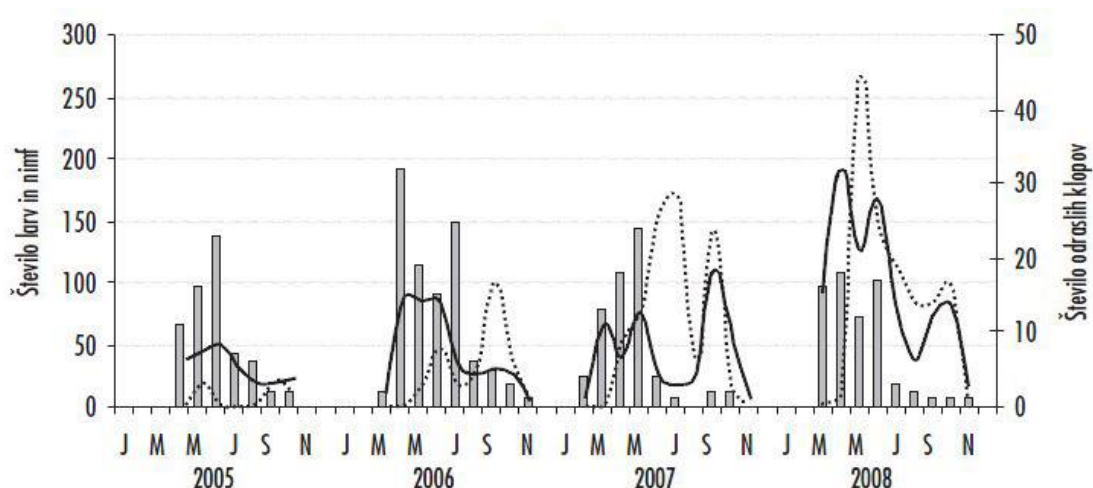
2.4.3 Razširjenost virusa KME v Sloveniji

Endemično območje KME v Sloveniji je južni del velikega srednjeevropskega endemičnega območja, ki sega od Češke čez Avstrijo v Slovenijo. Pojavljanje bolezni je vezano na naravna žarišča z različnimi intenzitetami. Najbolj prizadeta območja v Sloveniji so območje ob vznožju Savinjskih Alp, območje Zgornje in deloma Spodnje Savinjske doline, okolica Velenja, Slovenj Gradca, Pohorje ter nadalje južna pobočja Kamniških planin in Karavank. Proti jugu in vzhodu intenzivnost prizadetosti endemičnega območja pojema, vendar se pojavljajo naravna žarišča z nizkimi intenzitetami ali latentna žarišča, kjer okužba in obolenje nista verjetni (Avšič-Županc in sod., 1995; Lešničar, 1992). V Sloveniji se je povprečna stopnja pojavnosti KME v različnih časovnih obdobjih spreminjala in v zadnjih letih dosegla 13,8 na 100.000 prebivalcev, kar nas uvršča v sam evropski vrh (Slika 3) (Grgič-Vitek in Klavs, 2011; Sočan in sod., 2012). Stopnja prekuženosti prebivalstva na endemičnih območjih je zelo različna. Na nekaterih področjih je zelo visoka in dosega od 30 % do 80 % (Urlep in sod., 1977). Pojavljanje KME je odvisno od vremenskih dejavnikov, ki vplivajo na biološko aktivnost klopotov in tudi na številčnost populacije malih sesalcev. V Sloveniji je vsako leto prijavljenih približno 250-300 primerov KME (Grgič-Vitek in Klavs, 2011; Grgič-Vitek, 2011).



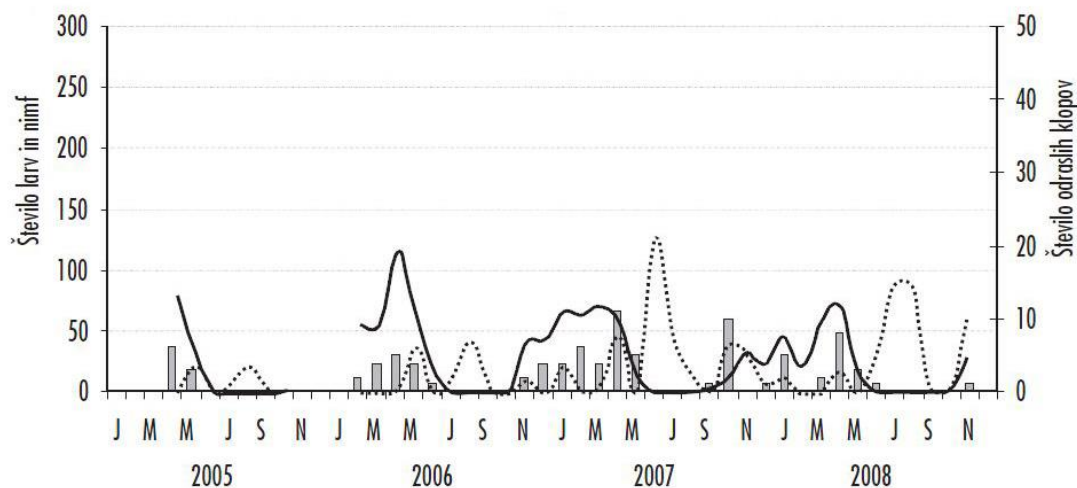
Slika 3: Povprečne stopnje pojavljanja KME po slovenskih regijah med leti 2000 in 2009 (povzeto po Grgič-Vitek in Klavs, 2011).

Slovenija je sicer majhno območje, vendar je raznolikost tako vremenskih razmer kot habitatnih tipov v različnih regijah zelo velika. Knap in sodelavci so leta 2009 z mesečnim vzorčenjem klopov na različnih lokacijah po Sloveniji, v obdobju od aprila 2005 do novembra 2008, dokazali, da raznolikost vremenskih razmer in habitatnih tipov posledično vpliva na življenjske razmere klopov vrste *I. ricinus* in pogojuje različne vzorce sezonske aktivnosti (Knap in sod., 2009). V celinskem področju Slovenije imajo klopi vrste *I. ricinus* značilen dvofazen ali bimodalen sezonski vzorec. Prvi vrh aktivnosti je v pomladanskih mesecih (april, maj, junij), drugi vrh pa nastopi v jesenskih mesecih (september, oktober) (Slika 4) (Knap in Avšič-Županc, 2012).



Slika 4: Sezonska aktivnost larv, nimf in odraslih klopov od leta 2005 do 2008 na območju Mozirja. Stolpci predstavljajo odrasle klopi, prekinjena črta larve in polna črta nimfe (povzeto po Knap in Avšič-Županc, 2012).

Primorska regija ima submediteransko podnebje za katero so značilna vroča, suha in dolga poletja ter kratke, suhe in hladne zime. Sezonska aktivnost klopov je na tem področju nekoliko drugačna kot drugod po Sloveniji. Klopi so aktivni čez celo zimo, vrh aktivnosti pa se pojavi v zgodnjih pomladnih mesecih (Slika 5) (Knap in Avšič-Županc, 2012).



Slika 5: Sezonska aktivnost larv, nimf in odraslih klopov od leta 2005 do 2008 na območju Črnega Kala. Stolpci predstavljajo klope, prekinjena črta larve in polna črta nimfe (povzeto po Knap in Avšič-Županc, 2012).

V Sloveniji je povprečna stopnja okužbe klopov z virusom KME približno 0,3 %. Odstotek okuženih klopov se spreminja glede na lokacijo vzorčenja ter po letih vzorčenja in se giblje med 2 % na cerkniškem območju in 0 % na primorskem (Durmiši in sod., 2011; Knap, 2011).

Za oblikovanje naravnega žarišča so pomembni tudi gostitelji virusa (Pavlovsky, 1964). Leta 2012 so Knap in sodelavci dokazali prisotnost protiteles proti virusu KME v 5,53 % serumov malih sesalcev, pri čemer se je stopnja okužbe razlikovala glede na vrsto in območje ulova malih sesalcev. Potrdili so, da je dokazovanje specifičnih protiteles proti virusu KME v serumu malih sesalcev dober pokazatelj prisotnosti virusa na nekem območju (Knap in sod., 2012; Achazi in sod., 2011).

2.4.4 Spremembe v incidenci klopnega meningoencefalitisa

V zadnjih dveh desetletjih so se po Evropi pojavila številna nova naravna žarišča KME. Na teh območjih v preteklosti niso zaznali prijav okužb KME, saj ta območja niso spadala v endemična območja (Süss, 2008; Brinkley in sod., 2008; Rizzoli in sod., 2007). Leta 2004 so na Finskem iz klopa vrste *I. persulcatus* izolirali sibirski podtip virusa KME. To območje je precej severo-zahodno od prej opaženega pojavljanja tega podtipa virusa KME (Mansfield in sod., 2009). V zadnjih treh desetletjih opažajo močno naraščanje incidence KME, katera se je na nekaterih območjih povečala tudi do 400% (Randolph, 2001; Süss, 2008). Povečanje pojavljanja virusa KME v zadnjih dveh desetletjih lahko prepisujemo klimatskim spremembam (posredno vplivajo na dinamiko klopov in malih sesalcev),

socialno-ekonomskim spremembam, političnim, ekološkim, demografskim in ostalim dejavnikom, ki imajo vlogo pri razširjanju virusnih obolenj na nova območja (Süss, 2008; Šumilo in sod., 2007). Prisotnost evropskega podtipa virusa KME so zaznali severneje in tudi na višjih nadmorskih višinah (Lindgren in Gustafson, 2001).

Posledice podnebnih sprememb

Podnebne spremembe vplivajo na številčnost in razširjenost prenašalcev in gostiteljev virusa KME, s tem pa posredno tudi na razširjenost samega virusa KME in nastajanje novih naravnih žarišč. Glavna okoljska dejavnika, ki vplivata na razširjenost in številčnost klopov sta temperatura in vlaga (Gray in sod., 2009).

- **Zimska aktivnost klopov**

Odrasli klopi in nimfe so v srednji Evropi aktivni od marca in vse do oktobra, larve se začnejo hraniti nekoliko pozneje in sicer od maja do avgusta. V zimskem času (od srede novembra do srede marca) pa jih ni moč najti (Gray in sod., 2009). V zimski sezoni leta 2006-2007 so v okolici Berlina (Nemčija) izvedli študijo aktivnosti klopov v zimskem času. V tem obdobju so bile v Nemčiji prvič prijavljene štiri okužbe z virusom KME. V študiji so z metodo zastave ulovili klope v naravi ter na poljih. Ugotovili so, da so bili klopi aktivni tudi v zimskem času, čeprav so manj uspešni pri iskanju gostitelja (Süss, 2008; Gray in sod., 2009; Dautel in sod., 2008). Burri in sodelavci so v istem obdobju (v zimski sezoni 2006-2007) opravili študijo vpliva mikroklimatskih razmer na aktivnost klopov in prav tako ugotovili, da so mile zimske razmere botrovale k aktivnosti klopov v zimskih mesecih. Sledila je suha in topla pomlad, kar je omogočilo hitrejši začetek hranjenja larv in nimf (Burri in sod., 2011). Podobna študija je bila opravljena tudi na Finskem pozimi 2008-2009, kjer so ugotovili prisotnost virusa v malih sesalcih ujetih v zimskih mesecih. S serološko analizo in metodo RT – PCR v realnem času so v možganih in notranjih organih malih sesalcev ugotovili prisotnost evropskega in sibirskega podtipa virusa KME. Rezultati so pokazali, da lahko oba podtipa virusa KME podaljšata viremično fazo oziroma prisotnost virusa v malih sesalcih izven sezone hranjenja klopov (Tonteri in sod., 2011).

- **Pojavljanje klopov na višjih nadmorskih višinah**

Študije na Češkem iz leta 1957 in v letih 1979-80 so pokazale pojavljanja klopa vrste *I. ricinus* do 700 m nadmorske višine. Nad to nadmorsko višino klopi niso bili zmožni zaključiti svojega razvojnega cikla (Daniel, 1993; Daniel in sod., 2003). V Sloveniji je bil ugotovljen stik sesalcev z virusom do 1000 m nadmorske višine, višje ne (Tovornik, 1973). V letih 2001-2002 so z metodo zastave in nabiranjem klopov s psom na istih območjih ugotovili pojavljanje klopa na nadmorskih višinah

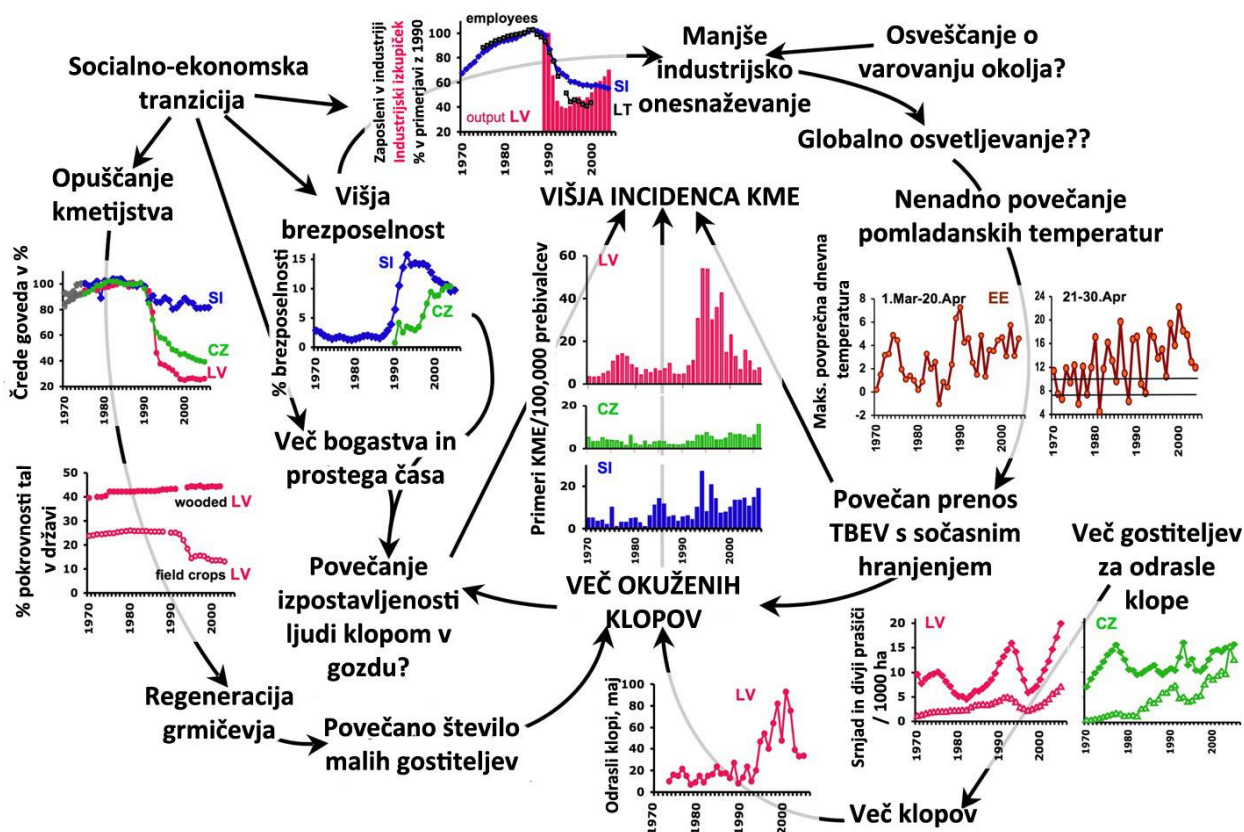
višjih od 1100 m, kjer se mali sesalci več ne pojavljajo (Daniel in sod., 2003; Danielova in sod., 2006).

- Premik severne meje razširjenosti klopov

Na Švedskem so premik meje razširjenosti klopa vrste *I. ricinus* in nekaterih drugih živalskih in rastlinskih vrst proti severu, opazili že v poznih osemdesetih letih (Tälleklint in Jaenson, 1998). Klop vrste *I. ricinus* je bil razširjen do 61° severne geografske širine, danes pa ga najdemo ob celotni obali Baltskega morja do 66° severne geografske širine, vzdolž rečnih dolin in ob večjih jezerih v najsevernejših regijah. Razširjenje živalskih in rastlinskih vrst severneje je povezano s povečanjem števila toplejših dni, ki so primerni za preživetje, aktivnost in razvoj (Jaenson in sod., 1994; Lindgren in sod., 2001). V osrednjem delu Švedske se je zaradi milih zim ter podaljševanja pomladnega in jesenskega obdobja, povečalo število klopov. Klimatske spremembe, ki vplivajo na aktivnost, razširjenost in povečanje števila klopov, posledično vplivajo tudi na povečanje števila obolelih za KME (Lindgren in Gustafson, 2001).

Posledice socialno-ekonomskih sprememb

Spremembe v pojavljanju virusa KME so tudi posledica socialnih in ekonomskih sprememb (Šumilo, 2008). Povečanje pojavljanja KME v preteklosti je bila posledica sprememb političnih sistemov, do katerih je prišlo po padcu Sovjetske zveze. V tem času je prišlo do opuščanja kmetijstva, kar je vodilo v spremembe v pokrivnosti tal. Zaraščanje obdelovalnih površin je omogočilo nastajanje habitatov, primernih za male sesalce, ki so pomembni gostitelji virusa KME. Zaradi propada industrije se je povečala brezposelnost in revščina, kar je vodilo v spremembe v življenjskih razmerah in navadah. Socialno ekonomski dejavniki vplivajo na aktivnost človeka v naravi. Z aktivnostmi kot je rekreacija ali nabiranje gozdnih sadežev se poveča možnosti stika ljudi z okuženimi klopi (Randolph, 2008; Knap in Avšič-Županc, 2012).



Slika 6: Nekateri izmed faktorjev, ki pripomorejo k povečanju incidence v osrednji in vzhodni Evropi. Podatki so iz držav: Estonija (EE), Latvija (LV), Litva (LT), Slovenija (SI) in Češka (CZ) (povzeto po Randolph, 2008).

2.5 Kroženje virusa v naravi

Virus KME v naravi kroži med prenašalci, njihovimi gostitelji in naključnimi gostitelji. Naključni gostitelji predstavljajo slepo vejo v razširjanju virusa, saj ne razvijejo dovolj visoke viremije, ki bi omogočala nadaljnji prenos virusa (Malovrh in Marc, 1997). Virus KME se med prenašalci in gostitelji prenaša po horizontalni poti, kar pomeni, da se klop okuži med hranjenjem na gostitelju v času viremije. Virus KME se v prenašalcu namnoži in se ob naslednjem hranjenju preko sline prenese v gostitelja. Na ta način se virus prenaša med prenašalci in gostitelji v obe smeri (Bakhvalova in sod., 2009).

2.5.1 Kroženje virusa med prenašalci

Klopi imajo pomembno vlogo pri razmnoževanju in ohranjanju virusa KME v naravi. S hranjenjem klopov na svojih gostiteljih poskrbijo za prenos virusa, hkrati pa lahko virus v klopah tudi prezimi (Ludwig in Iacono-Connors, 1993). Evropski podtip virusa prenaša klop vrste *I. ricinus*, sibirski in daljno vzhodni podtip klop vrste *I. persulcatus* (Lindquist in Vapalahti, 2008). Kot prenašalci virusa KME služijo tudi druge vrste klopov (Chmela in Lichard, 1971; Kozuch in Nosek, 1980; Krivanec, Kopecky, Tomkova, in Grubhoffer, 1988; Lichard in Kozuch, 1967). Klop se z virusom KME lahko okuži na več načinov:

- **Viremičen prenos:**
Ta način prenosa poteče med hranjenjem klopa na gostitelju, ki ima razvito visoko viremijo in je s tem omogočen prenos virusa v klope. Za tak način prenosa so najbolj primerni mali sesalci, ki predstavljajo glavne rezervoarje in gostitelje virusa (Nuttall in Labuda, 1994).
- **Transovarialen prenos:**
Je vertikalni način prenosa virusa med klopi, kar pomeni, da se virus prenaša iz starševske generacije klopov na potomce. Virus prehaja iz okužene samice na jajčeca. Tak način prenosa je malo verjeten, vendar je pomemben za kroženje virusa znotraj naravnega žarišča (Danielova in sod., 2002). Transovarialen prenos so zasledili do četrtega rodu, vendar je koncentracija virusa v vsaki generaciji manjša (Lešničar, 1992). Vertikalni prenos vključuje tudi spolni prenos, ki poteče med spolnim odnosom okuženega samca z neokuženo samico (Malovrh in Marc, 1997).
- **Transstadialni prenos:**
Življenjski krog klopa obsega štiri razvojne stopnje: jajčece, larvo, nimfo in odraslo žival. Na vsaki stopnji se klop na gostitelju hrani le enkrat, nato se preobrazi v naslednjo obliko. Trajanje hranjenja je odvisno od stadija klopa. Larve se hranijo 2-3 dni, nimfe 4-5 dni in odrasli osebkovi od 7-9 dni (Gray, 2002). Daljše trajanje hranjenja na okuženem gostitelju povečuje možnost okužbe klopa. Po okužbi z virusom KME klop ohranja virus skozi vse stadije razvoja (Kunz, 1992).
- **Neviremičen prenos:**
Virus se lahko prenese s sočasnim hranjenjem neokuženih larv in okuženih nimf na gostitelju v neposredni bližini. Prenos je mogoče med klopi na gostitelju, ki je že razvil imunost, kot tudi na gostitelju, ki še ni bil okužen oziroma ni razvil dovolj visoke viremije (Randolph in sod., 1996; Labuda in sod., 1997). Ker se larve hranijo na malih sesalcih, nimfe pa na srednje velikih gostiteljih, so za neviremičen prenos s sočasnim hranjenjem potrebne posebne razmere, ki dovoljujejo, da se oba stadija klopa hranita na malih sesalcih (Tälleklint in Jaenson, 1994; Labuda in Randolph, 1999). Takšni pogoji so izpolnjeni zgodaj spomladi, ko temperature v kratkem času dosežejo 10 °C, kar je najnižja temperatura pri kateri se začnejo hraniti larve, nimfe pa postanejo aktivne že pri 7 °C (Randolph, 2004; Burri in sod., 2011). Drugi pogoj, ki mora biti izpolnjen so suhe klimatske razmere. Nizka vlažnost prisili nimfe, da se hranijo v nižjih vegetacijskih slojih, kjer se hranijo larve, kar posredno prisili hranjenje obeh stadijev na gostiteljih iste vrste (Randolph in Storey, 1999).

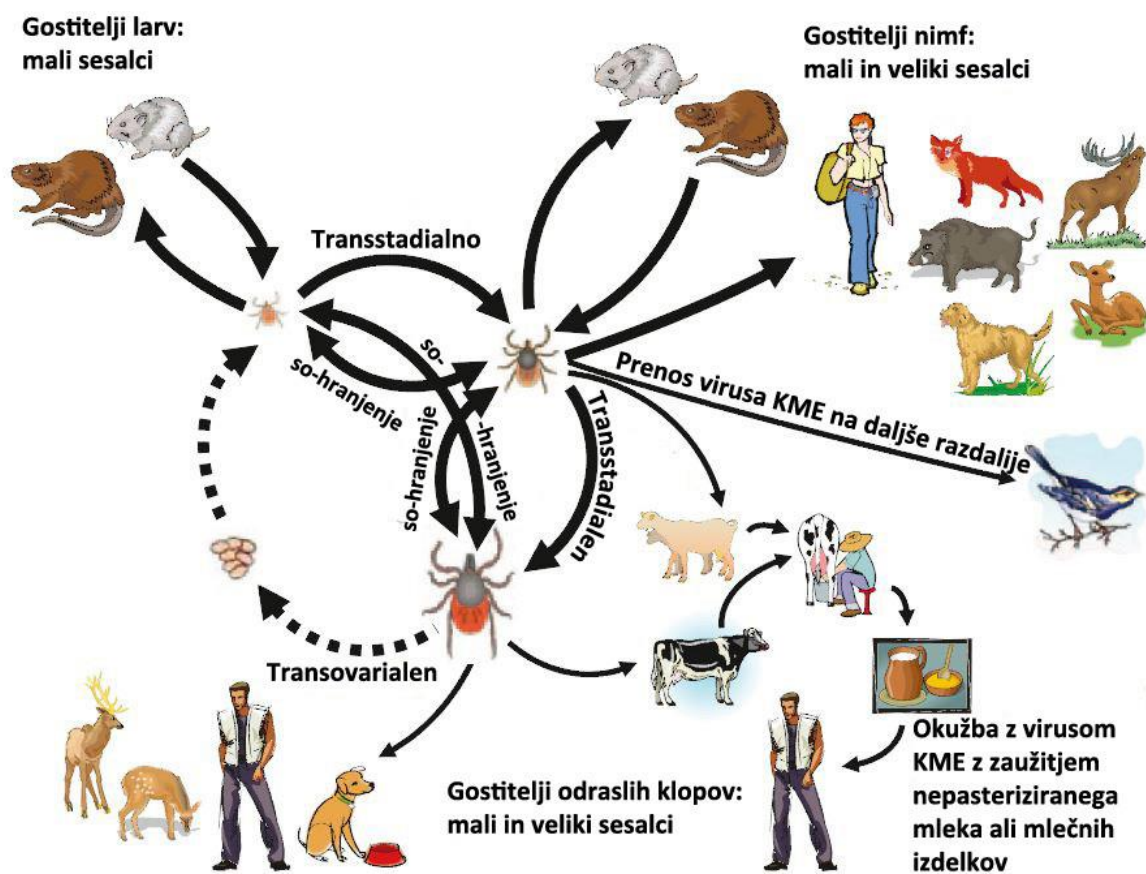
2.5.2 Kroženje virusa med gostitelji

Mali sesalci so pomembni gostitelji in rezervoarji virusa KME in so sposobni vzdrževati virusno okužbo tudi daljše obdobje (Bakhvalova in sod., 2009). Znanih je vsaj 10 vrst glodavcev in žužkojedov, ki lahko služijo kot gostitelji virusa. Med najpomembnejšimi so rumenogrla gozdna miš (*Apodemus flavicollis*), navadna gozdna miš (*Apodemus sylvaticus*), dimasta miš (*Apodemus agrarius*), gozdna voluharica (*Clethrionomys glareolus*), poljska voluharica (*Microtus arvalis*) ter jež (*Erinaceus europaeus*) (Kožuch in sod., 1967; Labuda in sod., 1997; Achazi in sod., 2011). Med malimi sesalci poteka vertikalni in horizontalni prenos virusa KME. Vertikalni prenos je prenos virusa KME med materjo in mladiči in se lahko zgodi prenatalno, perinatano ali / in postnatalno. Prenatalno se zarodki okužijo transplacentalno, postnatalno pa se mladiči okužijo preko materinega mleka. Horizontalni prenos vključuje prenos virusa med parjenjem, pri čemer okužen samec prenese virus na neokuženo samico (Bakhvalova in sod., 2009). Po okužbi z virusom KME gostitelj razvije specifična protitelesa, ki se ohranijo vse življenje. Viremija traja le nekaj dni in je v tem času dovolj visoka, da se virus KME prenese na klope, ki se hranijo na viremični živali (Achazi in sod., 2011; Heigl in von Zeipel, 1966). Mali sesalci omogočajo tudi neviremičen prenos s sočasnim hranjenjem klopov. Na ta način mali sesalci pripomorejo k prenosu virusa med klopi, kljub temu, da so sami razvili protitelesa proti virusu KME (Labuda in sod., 1997). Številčnost populacije malih sesalcev se z leti spreminja in je odvisna od količine razpoložljive hrane v okolju. Letom z obilico hrane sledi leto z visoko številčnostjo populacij malih sesalcev. Mali sesalci imajo kratek generacijski čas, kar pomeni, da je virusu vedno na voljo veliko število mladih, za okužbo dovzetnih živali (Pucek in sod., 1993; Ostfeld in sod., 2006; Kožuch in sod., 1967).

Tudi ježi so pomemben člen pri kroženju virusa KME v naravi. Pomembni so pri prezimovanju virusa in tako predstavljajo pomemben rezervoar za ohranjanje virusa v naravi. Spomladi se lahko virus prenese v klope, ki se hranijo na ježu. Ker pa imajo ježi večji domač teritorij kot mali sesalci, so pomembni tudi pri prenosu okuženih klopov na sosednja območja, ter s tem prispevajo k razširjanju virusa KME v okoliške biocenoze ali v bližino človeških naselij (Kožuch in sod., 1967; Kozuch in sod., 1963).

Zaradi vse hitrejšega širjenja virusa KME na nova območja, so se začela pojavljati vprašanja, ali imajo ptice selivke vlogo pri razširjanju virusa KME. Klopi vrste *I. ricinus* se prehranjujejo na nekaterih vrstah ptic, ter lahko s tem prenesejo virus nanje (Waldenström in sod., 2007). Zanesljivih dokazov o prenosu virusa KME iz ptic na neokužene klope še ni, vendar imajo lahko ptice pomembno vlogo pri razširjenju klopov na nova območja. Na pticah se večinoma hranijo nimfe in če so le te okužene in so prenesene na druga območja, kjer se spustijo s ptic, se lahko v naslednjem stadiju (larva) hrani na malih sesalcih, ki so primerni za razširjanje okužbe. Ker je stopnja transovarialnega prenosa zelo nizka (manj

kot 0,5 %) je tudi verjetnost prenosa virusa v novo žarišče zelo majhna (Waldenström in sod., 2007; Randolph, 2008).



Slika 7: Prikaz poti kroženja virusa KME med gostitelji in prenašalci v naravi (povzeto po Dobler in sod., 2012).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Terensko delo

Terensko delo je potekalo v sklopu mednarodnega projekta DIVA – Sanacija divjih odlagališč. Vzorčenje malih sesalcev je potekalo med oktobrom 2011 in marcem 2013. Vzorčili smo na več lokacijah, na divjih odlagališčih, po slovenski in hrvaški Istri. Vzorčili smo na divjih odlagališčih pri mestih Umag in Pulj na Hrvaškem ter v Podgorju in Svetem Antonu v Sloveniji. V Pulju je vzorčenje zajemalo 5 vzorčnih mest, ki smo jih zaradi relativne bližine združili pod eno vzorčno mesto »Pula 2«. Zadnje odlagališče, na katerem smo vzorčili, je sanirano odlagališče v Sv. Antonu (Slovenija). Vzorčenje je potekalo tudi na drugih lokacijah na Hrvaškem in sicer pri Istrskih Toplicah, Pazinu, Kaščergi, ob reki Mirni in na otočju Brioni ter v Sloveniji na Rakitovcu in Sv. Antonu (Slika 8).

Vzorčna mesta smo definirali kot štiri različne habitate (Tabela 1) (povzeto po Bužan Varljen in sod., 2013):

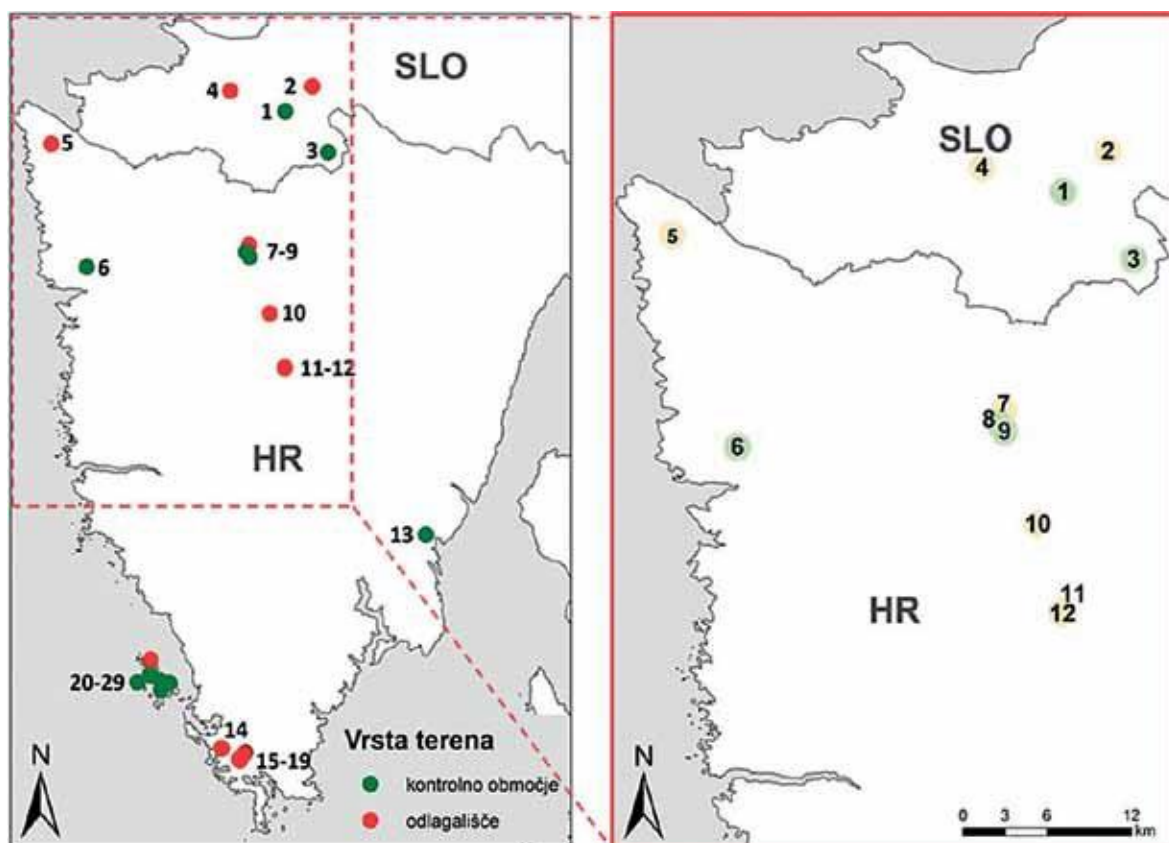
- popolnoma naraven gozdni habitat (Istrske Toplice 2, Hrastovlje 2);
- polnaraven habitat, ki združuje njive, travnike, izlive rek, ter manjša razpršena odlagališča, kjer je antropogeni vpliv manjši (Kaščerga, Podgorje*, Sv. Anton, Rakitovec, Pazin, Istrske Toplice 1 in 3, Mirna, Raša in Brioni 1 in 3);
- antropogeni habitat (združuje kmetijo v Hrastovljah (HR 1) in vzorčna mesta na Malem Brionu (B2);
- ter večji odlagališči (Umag in Pula)

* Vzorčno lokacijo v Podgorju smo zaradi njenih bioloških karakteristik definirali kot polnaraven habitat oziroma habitat z manjšim človeškim vplivom (povzeto po Bužan Varljen in sod., 2013).

Tabela 1: Vzorčna mesta (VM)

Lokacija številka	Kraj	Vzorčno mesto	Tip habitata	Država	Površina VM (m ²)
2	Podgorje	odlagališče v gozdu	polnaraven	SLO	4550
4	Sv. Anton	Sanirano odlagališče	polnaraven	SLO	7119
5	Umag	Odlagališče	odlagališče	HR	17151
14	Pula 1	Odlagališče ob naselju	antropogeno	HR	22851

15-19	Pula 2	1. odlagališče, 1. lokacija ob cesti za Medulin	odlagališče	HR	976
		1. odlagališče, gozd pri smetišču	gozd	HR	2266
		2. odlagališče, 2. lokacija ob cesti za Medulin	odlagališče	HR	4097
		2. odlagališče, drevesa ob cesti	drevesa ob njivi	HR	608
		3. odlagališče, 3. lokacija ob cesti za Medulin	odlagališče	HR	1521



Slika 8: Lokacije vzorčnih mest v sklopu mednarodnega projekta DIVA. Na lokacijah št. 2,4,5,14 in 15-19 smo vzorčili male sesalce za dokazovanje virusa KME (povzeto po Bužan Varljen in sod., 2013).

3.1.1 Vzorčenje

Vzorčenje malih sesalcev je potekalo med oktobrom 2011 in marcem 2013 na osmih vzorčnih mestih po slovenski in hrvaški Istri. Male sesalce smo lovili z živo-lovnimi pastmi tipa Sherman in Uggland. Za vabo smo uporabili čokoladen ali kikirikijev namaz. Pasti smo postavili na različnih predelih na divjih odlagališčih. Mesta postavitve pasti so bila izbrana na podlagi predvidevanja o možnosti zadrževanja oziroma gibanja malih sesalcev. Pasti smo postavljali predvsem v senčne predele, na primer pod grmovja ali smeti. S tem smo zvišali možnosti preživetja živali ter zmanjšali stres v času, ko je bila žival ujeta v živo-lovni pasti. Ujete živali smo ustrezno transportirali v laboratorij Inštituta za biodiverzitetne študije UP ZRS. V laboratoriju smo ujete živali usmrtili v skladu z zakonodajo in z dovoljenjem, ki ga je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije (Ministrstvo za kmetijstvo in okolje Republike Slovenije). Določili smo vrsto ujetih živali ter vsak organizem označili, izmerili, stehali in odvzeli vzorce krvi. Živali smo nato secirali, jim odstranili notranje organe ter le te shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za nadaljnjo delo smo uporabili vranice malih sesalcev.

3.2 Laboratorijsko delo

Prisotnost virusa KME v vzorcih smo dokazovali v Laboratoriju za klinično molekularno diagnostiko, Oddelka za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano. Pri delu smo upoštevali navodila o organizaciji dela v molekularnem mikrobiološkem laboratoriju. Delo v molekularnem laboratoriju temelji na doslednem ločevanju prostorov in opreme za namene določenih postopkov. Delo poteka v smeri od pred-analitičnih postopkov (kjer ni nukleinskih kislin) do po-analitičnih postopkov (kjer so NK v visokih koncentracijah). Obvezna je uporaba zaščitne opreme v vseh prostorih ter preventivno čiščenje in dekontaminacija delovnih površin in opreme. Vzorci, reagenti in produkti PCR se shranjujejo ločeno oziroma se odstranijo z avtoklaviranjem.

3.2.1 Izolacija DNK in RNK iz tkivnih vzorcev malih sesalcev

Izolacijo DNK in RNK iz tkivnih vzorcev malih sesalcev smo izvajali v laboratoriju Inštituta za biodiverzitetne študije, Znanstveno raziskovalnega središča Univerze na Primorskem. Za zagotavljanje čim manjše možnosti kontaminacije, smo izolacijo opravljali v mikrobiološki komori. Pred delom smo komoro obsevali z UV svetlobo, ter jo tik pred delom očistili z DNA / RNA Zap raztopinami (Ambion). Za pripravo tkiv za izolacijo smo uporabljali sterilne in očiščene skalpele, pincete, secirne igle in mikrocentrifugirke. Za zmanjševanje možnosti kontaminacije vzorcev smo večkrat menjali rokavice in razkuževali delovne površine z etanolom.

Za izolacijo smo uporabili komplet reagentov RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (Stratec). DNK in RNK smo izolirali iz tkiva vranic po navodilih proizvajalca. Najprej smo odmerili zadostno količino tkiva (približno 1 mm³ tkiva) in ga prenesli v ekstrakcijsko mikrocentrifugirko (Extraction tube) (Eppendorf), ki je že vsebovala encime za lizo tkiva v liofilizirani obliki. Dodali smo 400 µL ddH₂O ter inkubirali v vodni kopeli s konstantnim stresanjem 15 minut pri 65 °C in nato še 10 minut pri 95 °C. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 1 minuto pri 10.000 obratih / min. Nastali supernatant smo odpipetirali v novo reakcijsko posodico, usedlino pa zavrgli. Supernatantu smo nato dodali 400 µL raztopine *Binding solution*, ki omogoči učinkovitejšo vezavo nukleinskih kislin na kolone s filtrom. Mešanico smo premešali na stresalniku. Vzorce smo odpipetirali na RTA Filter Set kolono in centrifugirali 1 minuto pri 10.000 obratih / min. Filtrat smo zavrgli, kolono pa prenesli v novo mikrocentrifugirko. Sledilo je čiščenje DNK / RNK vezane na filtru. Najprej smo dodali 500 µL R1 čistilnega pufra (*Wash buffer R1*) in centrifugirali 30 sekund pri 10.000 obr/min. Filtrat smo ponovno zavrgli ter prenesli kolono v novo mikrocentrifugirko. Nadalje smo dodali 700 µL čistilnega pufra R2 (*Wash buffer R2*) in ponovno centrifugirali 30 sekund pri 10.000 obr/min. Kolono smo ponovno prenesli v novo mikrocentrifugirko in centrifugirali 4 minute pri maksimalnih obratih, s čimer smo odstranili morebitno preostalo tekočino iz prejšnjih korakov, hkrati pa smo povečali čistost izoliranega produkta. Po končanem centrifugiranju smo DNK / RNK eluirali s predhodno segretim elucijskim pufrom (*Elution Buffer*) na 80 °C. Vzorcem smo nato izmerili koncentracijo DNK / RNK s spektrofotometrom Epoch. Za optimalno določitev koncentracije DNK / RNK v vzorcu smo uporabili 3 µL izolata. Izolate smo shranili pri -80 °C.

3.2.2 Vrstna determinacija malih sesalcev na molekularni osnovi

Natančna določitev vrst malih sesalcev na podlagi morfoloških značilnosti je zelo težavna, saj so si nekatere vrste tako podobne, da jih prepoznajo le strokovnjaki, specializirani za posamezno skupino. Vrstno določanje na podlagi morfoloških značilnosti je še posebej težavna pri juvenilnih osebkih (Bužan Varljen in sod., 2013). Določevanje vrst malih sesalcev smo opravili z analizo nukleotidnega zaporedja mitohondrijskega gena za citokrom b. Podrobni opis metodologije je opisan v diplomskem delu Domna Trkova (Trkov in Varljen Bužan, 2012) in v delu Bužan Varljen in sodelavcev (Bužan Varljen in sod., 2013).

3.3 Dokazovanje prisotnosti RNK virusa KME

3.3.1 Preverjanje prisotnosti RNK virusa KME z metodo RT – PCR v realnem času

Za dokazovanje prisotnosti RNK virusa KME, smo uporabili RT – PCR v realnem času. Osnova metode PCR v realnem času je enaka kot pri metodi PCR (Poljak in sod., 1994), vendar s to razliko, da z PCR v realnem času izmerimo količino produktov že med pomnoževanjem (Klein, 2002). Vsi sistemi PCR v realnem času zaznajo fluorescenčno barvilo in nato fluorescenčne signale povezujejo s količino produktov v reakciji. Obstaja več metod za fluorimetrično detekcijo in vrednotenje PCR produktov. Na podlagi izmerjenih podatkov program nariše krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov (Klein, 2002; Bookout in sod., 2003). Na eksponentnem delu krivulje določimo fluorescenčni prag (C_t), ki ločuje intenziteto fluorescence produktov od fluorescence ozadja. Za vsak vzorec se določi cikel v katerem je fluorescenca produktov preseгла C_t . S primerjavo vrednosti C_t vzorcev in standardnim C_t , pri katerem je poznano število kopij matrice v določenem ciklu, določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu (Klein, 2002; Bookout in sod., 2003).

Virusno RNK pomnožujemo s parom začetnih oligonukleotidov, ki se komplementarno vežejo na določeni sekvenci genoma virusa KME. Uporabili smo sledeča začetna oligonukleotida:

- F-TBE 1 z nukleotidnim zaporedjem 5' ggg Cgg TTC TTg TTC TCC 3'
- R-TBE 1 z nukleotidnim zaporedjem 5' ACA CAT CAC CTC CTT gTC AgA CT 3'

Na zaporedje med začetnima oligonukleotidoma se veže tudi sonda $_{FAM}$ -TBE-probe-WT- $_{TAMRA}$ z nukleotidnim zaporedjem 5' TgA gCC ACC ATC ACC CAg ACA CA 3'. Sonda ima na 5' koncu vezan fluorofor FAM, na 3' koncu pa ima vezan dušilec TAMRA (Schwaiger in Cassinotti, 2003).

Za reakcijsko mešanico smo uporabili komplet reagentov Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen), začetna oligonukleotida (F-TBE1 in R-TBE1) in sondo (TibMolBiol).

Volumen celotne reakcijske mešanice vsakega vzorca je 25 μ L.

Tabela 2: Količine reagentov s končnimi koncentracijami v posamezni reakcijski mešanici.

Reagent	Količina (μL)	Končna koncentracija
RNase-free water	7,75	
5x Qiagen OneStep RT-PCR pufer	5	1X
10 mM dNTP Mix	1	0,4 mM
10 μM F-TBE 1	1,25	0,5 μM
10 μM R-TBE 1	1,25	0,5 μM
10 μM TBE-probe-WT	0,75	0,3 μM
25 mM Mg^{++}	2	2 mM
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1	
RNK	5	
Volumen celotne reakcijske mešanice	25	

Reakcija RT – PCR v realnem času je potekala v aparaturi RotorGene Q (5-plex, HRM) (Qiagen). Reakcija je potekala pod sledečimi pogoji. Reverzni prepis RNK v cDNK je potek 30 minut pri 50 °C. Nato je sledil korak inaktivacije reverzne transkriptaze in aktivacija polimeraze, kar je potekalo 15 minut pri 95 °C.

Sledilo je 45 temperaturnih ciklov:

- 10 sekund pri 95 °C – denaturacija cDNK
- 50 sekund pri 60 °C – ker je odsek med začetnima oligonukleotidoma dovolj kratek, je ta korak združeval pripenjanje začetnih oligonukleotidov ter sonde in podaljševanje tarčnega odseka. V tem koraku je potekalo tudi branje fluorescence v območju FAM (510 ± 5 nm), ki je prikazalo rezultate produktov.

Po končani reakciji smo s programom Rotor-Gene Q (Qiagen) opravili analizo rezultatov. Na podlagi rezultatov analize smo za nadaljnje raziskave izbrali 16 vzorcev, ki so nakazovali prisotnost virusov iz družine *Flaviviridae*.

3.3.2 Preverjanje prisotnosti RNK virusov iz družine *Flaviviridae*

Za dokazovanje prisotnosti virusov iz družine *Flaviviridae* smo uporabili metodo ugnezdene (angl. nested) RT – PCR. Ugnezdene PCR je metoda, pri kateri produkti PCR služijo kot matrika DNK in je mesto vezave para začetnih oligonukleotidov znotraj vezavnih mest para začetnih oligonukleotidov iz prve PCR reakcije. Z uporabo ugnezdenega PCR se poveča občutljivost in specifičnost pomnoževanja DNK, kar pomeni, da se zmanjša možnost nespecifične vezave začetnih oligonukleotidov na nespecifične produkte (Newton in Graham, 1994).

RNK virusov smo pomnožili s parom univerzalnih začetnih oligonukleotidov, ki so specifični za pomnoževanje flavivirusnega genoma. Začetni oligonukleotidi so genspecifični, kar pomeni, da so primerni za dokazovanje virusov iz družine *Flaviviridae*.

Homologni so zaporedju genoma za ne-strukturni protein NS5. Začetna oligonukleotida, ki smo ju uporabili sta FUF-1 (nukleotidno zaporedje: 5' TAC AAC ATG ATG GGV AAR AGA GA 3') in FUR-1 (nukleotidno zaporedje: 5' GTG TCC CAG CCD GCD GTG TC 3'). Z njima smo pomnožili tarčni odsek v dolžini 260 baznih parov. Uporabili smo komplet reagentov Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen). Končni volumen reakcijske mešanice vsakega vzorca je 25 μ L in vsebuje reagente, kot so zapisani v tabeli 3.

Tabela 3: Količine in končne koncentracije reagentov za RT – PCR z genospecifičnimi začetnimi oligonukleotidi

Reagent	Količin (μ L)	Končna koncentracija
ddH ₂ O	8,5	
5x Qiagen OneStep RT – PCR pufer	5	1x
10 mM dNTP Mix	1	0,4 mM
5x Q – Solution	5	
10 μ M FUF-1	1	0,4 μ M
10 μ M FUR-1	1	0,4 μ M
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1	
RNK	2,5	
Volumen celotne reakcijske mešanice	25	

Reverzni prepis RNK in verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli v aparaturi Eppendorf Mastercycler[®] nexus gradient (Eppendorf). Reverzni prepis RNK v cDNK je potekal 30 minut pri 50 °C. Nato je 15 minut pri 95 °C potekla inaktivacija reverzne transkriptaze in aktivacija polimeraze. Sledilo je 40 ciklov s sledečim temperaturnim profilom:

- 30 sekund pri 94 °C - denaturacija nastale cDNK-RNK dvojne vijačnice
- 40 sekund pri 52 °C – pripenjanje začetnih oligonukleotidov
- 45 sekund pri 72 °C – podaljševanje verige

Zadnji korak je potekal 5 minut pri 72 °C.

3.3.3 Preverjanje prisotnosti RNK virusov iz družine *Flaviviridae* z ugnezdenim PCR

Pri pomnoževanju produkta smo uporabili par začetnih nukleotidov FUF2 (5' GCC ATH TGG TAC ATG TGG CT 3') in FUR1. Z njima smo pomnožili tarčni odsek v dolžini ~200 baznih parov. Uporabili smo mešanico reagentov Qiagen HotStart Polymerase (Qiagen) in začetne oligonukleotide (TibMolBiol). Za vsak vzorec smo uporabili 25 μ L reakcijske mešanice (Tabela 4).

Tabela 4: Količine in končne koncentracije reagentov uporabljenih pri metodi ugnezdene PCR.

Reagent	Količin (μ L)	Končna koncentracija
RNase-free water	18,75	
10x Qiagen PCR pufer	2,5	1x
10 mM dNTP Mix	0,5	0,2 mM
10 μ M FUF-2	1	0,4 μ M
10 μ M FUR-1	1	0,4 μ M
HotStart Taq DNA Poly	0,25	
Produkti RT - PCR s FUF-1 in FUR-1 začetnimi oligonukleotidi	1	
Volumen celotne reakcijske mešanice	25	

Reakcijo smo izvedli v aparaturi Eppendorf Mastercycler[®] nexus gradient (Eppendorf). Uporabili smo sledeč temperaturni profil.

95 °C	15 min	35 x
94 °C	30 sek	
54 °C	40 sek	
72 °C	45 sek	
72 °C	5 min	

Dobljene ugnezdene PCR produkte smo skupaj z izbranimi geno-specifičnimi produkti RT - PCR preverili z gelsko elektroforezo.

3.3.4 Elektroforeza produktov RT – PCR in ugnezenega PCR v agaroznem gelu

Prisotnost produktov PCR smo ugotavljali z vodoravno gelsko elektroforezo. Produkta PCR smo ločevali v 2 % agaroznem gelu. Agarozni gel smo pripravili z 80 mL 0,5 krat koncentriranega TBE pufra in 1,6 grama agaroze (Sigma). Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici do vrelišča. Gel smo nato vlili v plastični nosilec in odstranili morebitne mehurčke, ki bi povzročali težave pri potovanju produktov vzdolž gela. Ko se je gel ohladil, smo ga prenesli v elektroforezno kad, ki smo jo napolnili z 0,5x koncentriranim pufrom, tako, da je bil gel v celoti potopljen v pufer. V zgornje žepke na agaroznem gelu smo nanесли 10 μL geno-specifičnega produkta PCR, katerim smo predhodno dodali 2 μL nosilne raztopine (*Loading dye*). V spodnje žepke smo nanесли 10 μL ugnezenega produkta PCR, katerim smo prav tako dodali 2 μL nosilne raztopine (*Loading dye*). Nosilna raztopina obarva vzorce, ter lahko tako sledimo njihovem potovanju v gelu. V prvo (robno) vdolbinico obeh vrstic smo nanесли 5 μL DNK lestvice, pri kateri se fragmenti razlikujejo za 100 bp. Gelska elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti 120 V. Nato smo gel za 20 minut položili v etidijev bromid. Gel smo posneli z Mini Bis polaroidno kamero (DNR Bio-Imaging Systems) v programu Gel Capture.

4 REZULTATI

Skupno smo analizirali 80 vzorcev iz različnih vzorčnih mest na divjih odlagališčih po slovenski in hrvaški Istri (PRILOGA A). V vzorcih smo z metodo RT – PCR v realnem času določali prisotnost RNK virusa klopnega meningoencefalitisa.

4.1 Prisotnost RNK virusa KME v malih sesalcih

V nobenem od skupno 80 analiziranih vzorcev, z metodo RT – PCR v realnem času, nismo zaznali prisotnosti RNK virusa KME.

Tabela 5: Vrste malih sesalcev analiziranih za prisotnost virusa KME

VRSTA	ŠT. ANALIZIRANIH VZORCEV	ŠT. POZITIVNIH ZA KME
<i>Mus sp.</i>	6	0
<i>Mus musculus</i>	24	0
<i>Apodemus sp.</i>	35	0
<i>Apodemus sylvaticus</i>	7	0
<i>Apodemus agrarius</i>	5	0
<i>Crocidura sp.</i>	1	0
<i>Crocidura leucodon</i>	1	0
<i>Rattus sp.</i>	1	0

4.2 Prisotnost RNK virusov družine *Flaviviridae*

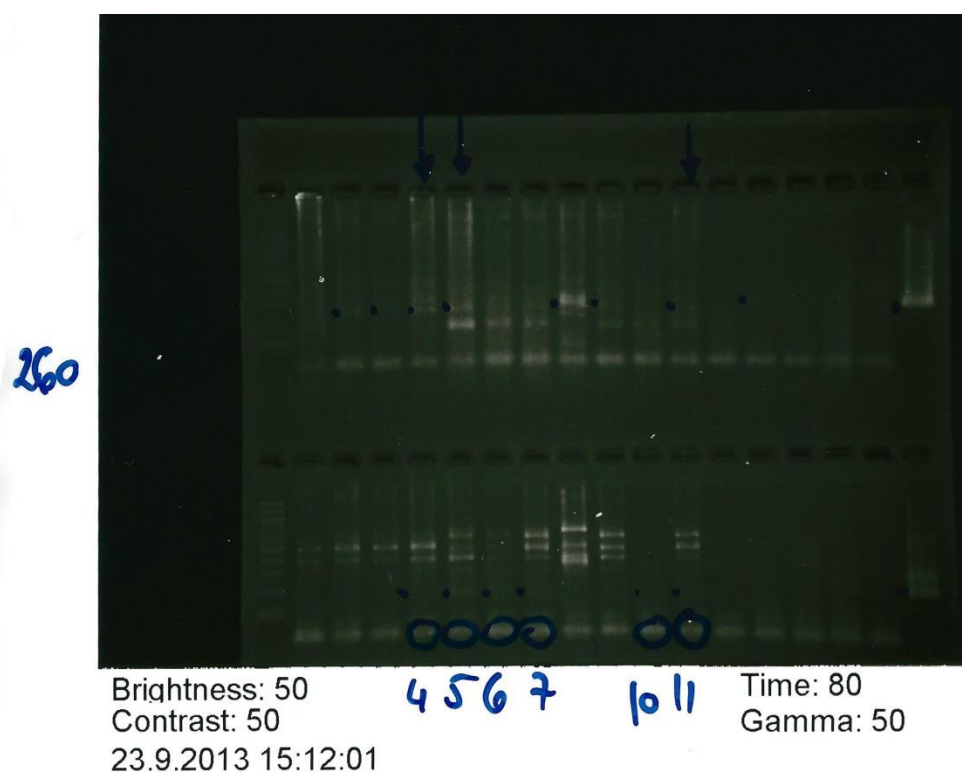
Z metodo RT – PCR v realnem času in uporabo geno-specifičnih začetnih oligonukleotidov, smo zaznali prisotnost RNK virusov družine *Flaviviridae* v šestnajstih vzorcih (Tabela 6).

Tabela 6: Vzorci analizirani z metodo RT – PCR z geno-specifičnimi (flavi.-uni.) začetnimi oligonukleotidi.

ŠT.	OZNAKA VZORCA	VRSTA	LOKALITETA
1	18	<i>M. musculus</i>	UMAG
2	19	<i>M. musculus</i>	UMAG
3	20	<i>M. musculus</i>	UMAG
4	31	<i>M. musculus</i>	UMAG
5	32	<i>Apodemus sp.</i>	UMAG
6	39	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE
7	57	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE
8	58	<i>Apodemus sp.</i>	PULA
9	98	<i>Apodemus agrarius</i>	PODGORJE
10	100	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE
11	101	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE

12	102	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE
13	105	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON
14	115	<i>Apodemus sp.</i>	/
15	124	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON
16	126	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE
17	NK		
18	WN		

Produkte metod RT – PCR z geno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in ugnezdenim PCR smo preverili z gelsko elektroforezo (Slika 9). Izmed teh 16 vzorcev, samo z ugnezdenim PCR ugotovili, v katerih vzorcih je prišlo do tvorbe nespecifičnih produktov.



Slika 9: Slika gelske elektroforeze genospecifičnih (pomnoženih 260bp) RT – PCR produktov (zgornja vrstica) in produktov ugnezdene PCR metode (pomnoženih približno 200bp) (spodnja vrstica) z za Flaviviridae univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi.

S primerjavo rezultatov obeh metod na agaroznem gelu, smo ugotovili, da je šest vzorcev (vzorec št.: 31, 32, 39, 57, 100, 101) potencialnih za prisotnost RNK virusov iz družine *Flaviviridae*.

Pojavljanje RNK virusov iz družine *Flaviviridae* smo ugotovili v petih izolatih vrst rodu *Apodemus* in v enem izolatu vrste *M. musculus*.

5 ZAKLJUČEK IN DISKUSIJA

V zaključni nalogi smo ugotavljali prisotnost virusa klopnega meningoencefalitisa (KMEV), ki je zoonotski flavivirus in se pojavlja na Evrazijskem kontinentu ter pri ljudeh povzroča bolezen klopnega meningoencefalitisa (KME). V naravi virus kroži med klopi, ki so njegov glavni prenašalec ter rezervoar in sesalci. Le-ti so prehodni gostitelji virusa pri katerih se razvije viremična faza in s tem skrbijo za kroženje virusa v naravi. Naš cilj je bil preveriti ali so mali sesalci na primorskem, ki ni endemično območje in je pravzaprav KME izredno malo, okuženi z virusom KME. Izbrali smo divja odlagališča za katera vemo, da je frekvenca pojavljanja malih sesalcev večja in na katerih prihaja do prekrivanja življenjskega prostora »divjih« (*Apodemus sp.*) in sinantropnih (*Mus sp.*) vrst malih sesalcev. Pri slednjih virus KME še ni bil dokazan.

Ugotovili smo, da se virus KME ne pojavlja v vzorcih malih sesalcih na divjih odlagališčih po slovenski in hrvaški Istri. Vzroke za negativne rezultate lahko razložimo s tem, da je naše vzorčno območje v predelu Slovenije in Hrvaške, kjer je nizka ali ničelna incidenca klopnega meningoencefalitisa. Potrdili smo, da je kljub posebnim razmeram na divjih odlagališčih, lokalna stopnja okužbe malih sesalcev ničelna in da večja razpoložljivost hrane za gostitelje virusa KME ne zadostuje, da bi virus KME lahko zaključil svoj razvojni krog.

Na divjih odlagališčih si vrste rodu *Apodemus* in *Mus* delijo življenjski prostor, vendar pri nobeni od teh virus KME ni bil prisoten. Hipotezo o prenosu virusa iz vrste, ki je poznan gostitelj virusa KME na vrste rodu *Mus*, pri kateri še ni bilo dokazano, da je gostitelj virusa KME, smo ovrgli. Ugotovili smo, da za virus KME na primorskem divja odlagališča ne predstavljajo tveganja okužbe z virusom KME.

Hkrati smo potrdili tudi, da se na teh območjih incidenca virusa KME, kljub spremembam v incidenci po Evrazijskem kontinentu, ni spremenila.

V šestih vzorcih smo z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi dobili produkte primerne dolžine RNK virusov družine *Flaviviridae*. Produkte primerne dolžine RNK virusov družine *Flaviviridae* smo zaznali v petih izolatih vrst rodu *Apodemus* in enem izolatu vrste hišne miši (*Mus musculus*).

V nadaljevanju študije moramo te produkte izrezati iz gela, jih sekvenirati in določiti vrsto flavirusa na osnovi nukleotidne sekvence. S tem bi potrdili vrsto flavirusa, ki za gostitelje uporablja vrste malih sesalcev na divjih odlagališčih.

6 LITERATURA

- Achazi, K., Růžek, D., Donoso-Mantke, O., Schlegel, M., Sheikh Ali, H., Wenk, M., . . . Niedrig, M. (2011). Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(6): 641-647.
- Allison, S. L., Stadler, K., Mandl, C. W., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1995). Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *Journal of Virology*, 69(9), 5816-20.
- Avšič-Županc, T. (2012). Zoonoze - večni izziv. *Medicinski razgledi*, 51: S6: 3-8.
- Avšič-Županc, T., Knap, N., Korva, M., & Lotrič-Furlan, S. (2009). Z vektorji preneseni virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja. *Medicinski razgledi*, S 5: 61-66.
- Avšič-Županc, T., Petrovec, M., Jelovšek, M., & Strle, F. (1995). Medicinsko pomembni arbovirusi v Sloveniji. *Zdravniški vestnik*, 64, 15-19.
- Bakhvalova, V. N., Potapova, O. F., Panov, V. V., & Morozova, O. V. (2009). Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents. *Virus Research*, 140(1-2):172-178.
- Bedjanič, M. (1949). Meningitis serosa. *Zbornik I. kongresa lekara FNRJ*, (str. 86-88).
- Bedjanič, M. (1973). Petindvajset let klopnega meningoencefalitisa v SRS (s posebnim ozirom na ozemlje, ki gravitira na Infekcijsko kliniko v Ljubljani). *Simpozij o klopnem meningoencefalitisu* (str. 5-8). Celje: Slovensko zdravniško društvo.
- Bookout, A. L., Cummins, C. L., & Mangelsdorf, D. J. (2003). High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. V F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology* (str. Unit 15.8, Supplement 71). New York City: John Wiley & Sons Inc.
- Brinkley, C., Nolskog, P., Golovljova, I., Lundkvist, A., & Bergstrom, T. (2008). Tick-borne encephalitis virus natural foci emerge in western Sweden. *International journal of medical microbiology*.
- Burri, C., Bastic, V., Maeder, G., Patalas, E., & Gern, L. (2011). Microclimate and the Zoonotic Cycle of Tick-Borne Encephalitis Virus in Switzerland. *Journal of Medical Entomology*, 48(3):615-627.
- Bužan Varljen, E., Duh, D., Fišer Pečnikar, Ž., Glasnović, P., Ivović, V., Kalan, K., . . . Zupan, S. (2013). *Škodljivi vplivi divjih odlagališč na biodiverzitetu in zdravje ljudi*. Koper: Univerzitetna založba Annales.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annual Review of Microbiology*, 44: 649-688.

- Charrel, R. N., Attoui, H., Butenko, A. M., Clegg, J. C., Deubel, V., & Frolova, T. (2004). Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 1040-1055.
- Chmela, J., & Lichard, M. (1971). On the development of the tick *Ixodes hexagonus* Leach, 1815 in the North-Moravian natural focus of tick-borne encephalitis. *Folia parasitologica*, 18: 79-83.
- Courtney, P. A., & Fenton, M. B. (1976). The effects of a small rural garbage dump on populations of *Peromyscus leucopus* RaCnesque and other small mammals. *Journal of Applied Ecology*, 13 (2): 413-442.
- Daniel, M. (1993). Influence of the microclimate on the vertical distribution of the tick, *Ixodes ricinus* (L.) in Central Europe. *Acarologia*, 34 (2): 105–113.
- Daniel, M., Danielova, V., Kriz, B., Jirsa, A., & Nozicka, J. (2003). Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 22: 327-328.
- Danielova, V., Holubova, J., Pejcoch, M., & Daniel, M. (2002). Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitologica (Praha)*, 49: 323-325.
- Danielova, V., Rudenko, N., Daniel, M., Holubova, J., Materna, J., Golovchenko, M., & Schwarzova, L. (2006). Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *International journal of medical microbiology*, 296 Suppl 40: 48-53.
- Dautel, H., Dippel, C., Kämmer, D., Werkhausen, A., & Kahl, O. (2008). Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *International Journal of Medical Microbiology*, 298 (1): 50-54.
- Demina, T. V., Dzhoiev, Y. P., Verkhozina, M. M., Kozlova, I. V., Tkachev, S. E., Plyusnin, A., . . . Zlobin, V. I. (2010). Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *Journal of Medical Virology*, 82: 965-976.
- Dobler, G., Gniel, D., Petermann, R., & Pfeffer, M. (2012). Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr*, 162: 230–238.
- Dumpis, U., Crook, D., & Oksi, J. (1999). Tick-Borne Encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 28: 882-890.
- Durmiši, E., Knap, N., Saksida, A., Trilar, T., Duh, D., & Avšič-Županc, T. (2011). Prevalence and Molecular Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Slovenia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(6): 659-664.
- Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., & Heinz, F. X. (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*, 80: 179–185.

- Golovljova, I., Vene, S., Sjolander, K. B., Vasilenko, V., Plyusnin, A., & Lundkvist, A. (2004). Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *Journal of Medical Virology*, 74: 580-588.
- Gould, E. A., & Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. *Lancet*, 371: 500-509.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., Gallian, P., . . . Lamballerie, X. (2007). Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*, 361: 80–92.
- Gray, J. S. (2002). Biology of Ixodes species ticks in relation to tick-borne zoonoses. *Wiener klinische wochenschrift*, 114: 473-478.
- Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., & Lindgren, E. (2009). Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1-12.
- Grešikova, M., & Calisher, C. H. (1989). Tick-borne encephalitis. *Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, 4: 177-202.
- Grgič-Vitek, M. (2011). *Epidemiologija klopnega meningoencefalitisa in precepljenosti v Sloveniji: doktorsko delo*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani.
- Grgič-Vitek, M., & Klavs, I. (2011). High burden of tick-borne encephalitis in Slovenia – challenge for vaccination policy. *Vaccine*, 29: 5178-5183.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., & Gould, E. A. (2003). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57, 129-146.
- Gubler, D., Kuno, G., & Markoff, L. (2007). Flaviviruses. V : Knipe D. M., & Howley P. M., *Fields Virology* (str. 1154-1252). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Heigl, Z., & von Zeipel, G. (1966). Experimental infection with tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus* - 1. Virological studies. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 66: 489-509.
- Heinz F. X. (1986). Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Advances in Virus Research*, 31:, 103-168.
- Heinz, F. X. (2003). Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine*, 21: Suppl 1:S3-S10.
- Heinz, F. X., & Allison, S. L. (2001). The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Current Opinion in Microbiology*, 4(4):450-455.
- Heinz, F. X., & Allison, S. L. (2003). Flavivirus structure and membrane fusion. *Advances in Virus Research*, 59:63–97.
- International Committee on Taxonomy of Viruses*. (4. junij 2014). Pridobljeno iz International Committee on Taxonomy of Viruses: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

- Jaenson, T. G., Tälleklint, L., Lundqvist, L., Olsen, B., Chirico, J., & Mejlom, H. (1994). Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in Sweden. *Journal of Medical Entomology*, 31(2): 240-256.
- Kaiser, R. (2008). Tick-Borne Encephalitis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22: 561-575.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 6: 257-260.
- Kmet, J., Vesenjāk-Zmijanac, J., Bedjanič, M., & Rus, S. (1955). Virus meningoencephalitis in Slovenia. *Bulletin - WHO | World Health Organization*, 12: 491-501.
- Knap, N. (2011). *Poglavitni biotski, abiotski in antropogeni dejavniki za spremembe v incidenci klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji [doktorska disertacija]*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani.
- Knap, N., & Avšič-Županc, T. (2012). Dejavniki, ki vplivajo na pojavnost klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Medicinski razgledi*, 51: S6: 109-117.
- Knap, N., Durmiši, E., Saksida, A., Korva, M., Petrovec, M., & Avšič-Županc, T. (2009). Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4): 275-281.
- Knap, N., Korva, M., Dolinšek, V., Sekirnik, M., Trilar, T., & Avšič-Županc, T. (2012). Patterns of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Rodents in Slovenia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(3): 236-242.
- Kozuch, O., & Nosek, J. (1980). Experimental transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Haemaphysalis concinna* ticks. *Acta virologica*, 24: 377.
- Kozuch, O., Nosek, J., Ernek, E., Lichard, M., & Albrecht, P. (1963). Persistence of Tick-Borne Encephalitis Virus in Hibernating Hedgehogs and Dormice. *Acta virologica*, 7: 430-433.
- Kožuch, O., Grešíková, M., Nosek, J., Lichard, M., & Sekeyová, M. (1967). The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis*. *Bull World Health Organ.*, 36(Suppl 1), 61-66.
- Krivanec, K., Kopecky, J., Tomkova, E., & Grubhoffer, L. (1988). Isolation of TBE virus from the tick *Ixodes hexagonus*. *Folia parasitologica*, 35: 273-276.
- Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology*, 72: 73-83.
- Kunz, C. (1992). Tick-borne encephalitis in Europe. *Acta Leidensia*, 60, 2: 1-14.
- Labuda, M., & Randolph, S. E. (1999). Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 289 (5-7): 513-524.

- Labuda, M., Kozuch, O., Zuffova, E., Eleckova, E., Hails, R. S., & Nuttall, P. A. (1997). Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission between Ticks Cofeeding on Specific Immune Natural Rodent Hosts. *Virology*, 235: 138–143.
- Lešničar, J. (1960). Prispevki h kliniki, epidemiologiji in etiologiji endemskega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Celjski zbornik*, 3.
- Lešničar, J. (1992). *Klopni meningoencefalitis / Janko Lešničar. Lymška borelijoza / Franc Strle*. Celje: CETIS Celje.
- Libikova, H. (1981). Epidemiological and clinical aspects of tick-borne encephalitis in reaction to multiple viral infections. *Proceedings of Tick-Borne Encephalitis, an International Symposium (Baden)* (str. 235-246). Vienna: Facultas Verlag.
- Lichard, M., & Kozuch, O. (1967). Persistence of tick-borne encephalitis virus in nymphs and adults of *Ixodes arboricola* and its transmission to white mice. *Acta virologica*, 11: 480.
- Likar, M., & Kmet, J. (1956). Virus meningo-encephalitis in Slovenia. 4. Isolation of the virus from the ticks *Ixodes ricinus*. *Bull World Health Organization*, 15(1-2):, 275-279.
- Lindenbach, B. D., Thiel, H., & Rice, C. M. (2007). Flaviviridae : The viruses and their replication. V D. M. Knippe, & P. M. Howley, *Fields Virology* (Zv. 5th ed., str. 1102-1152). Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins.
- Lindgren, E., & Gustafson, R. (2001). Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet*, 358: 16-18.
- Lindgren, E., Tälleklint, L., & Polfeldt, T. (2001). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Health Perspectives*, 108 (2): 119-123.
- Lindquist, L., & Vapalahti, O. (2008). Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 371: 1861-1871.
- Ludwig, G. V., & Iacono-Connors, C. (1993). Insect-transmitted vertebrate viruses: Flaviviridae. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 29 A (4):296-309.
- Malovrh, T., & Marc, M. (1997). Proučevanje naravnih gostiteljev virusa klopnega meningoencefalitisa v aktivnih in latentnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Medicinski razgledi*, 36: 465-478.
- Mandl, C. W., Heinz, F. X., & Kunz, C. (1988). Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology*, 166: 197-205.
- Mandl, C., Ecker, M., Holzmann, H., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1997). Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudorfl and high virulence strain Hypr. *Journal of General Virology*, 79, 981-988.

- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., & Solomon, T. (2009). Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 90: 1781–1794.
- Monath T.P., & Heinz F.X. (1996). Flaviviruses. V : Fields B. N., Knipe D. M., & Howley P. M., *Fields virology. 3rd ed.* (str. 961-1034). Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers.
- Monath, T. P., & Tsai, T. F. (1997). Flaviviruses. V : Richman D. D., Whitley R. J., & Hayden F. G., *Clinical virology* (str. 1133-1185). New York: Churchill Livingstone Inc.
- Newton, C. R., & Graham, A. (1994). Instrumentation, reagents and consumables. V J. M. Graham, & D. Billington, *PCR* (str. 9-25). Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Nosek, J., Kozuch, O., & Ernek, E. (1967). The importance of goats in maintenance of tick-borne encephalitis virus in nature. *Acta virologica*, 11, 470-472.
- Nuttall, P., & Labuda, M. (1994). Tick-borne encephalitis subgroup. V D. Sonenshine, & T. Mather, *Ecological Dynamics of Tick-borne Zoonoses* (str. 351 - 391). New York/Oxford: Oxford University Press.
- Ostfeld, R. S., Canham, C. D., Oggenfuss, K., Winchcombe, R. J., & Keesing, F. (2006). Climate, deer, rodents, and acorns as determinants of variation in lyme-disease risk. *PLoS biology*, 4(6): e145. doi:10.1371/journal.pbio.0040145.
- Pavlovsky, E. (1939). Natural focality of infectious diseases. *Vestnik Akademii Nauk SSSR*, 10: 98-108.
- Pavlovsky, E. (1947). Ticks and tick-borne encephalitis (in Russian). *Parazitologia Dalnego Vostoka Leningrad*, 5, 212-264.
- Pavlovsky, E. N. (1964). Natural nidality of transmissible disease in relation to landscape epidemiology of zoonoses. V C. Buck, A. Ilopis, & E. Najera, *The Challenge of Epidemiology: Issues and Selected Readings* (str. 401-405). Washington: Pan American Health Organization.
- Poljak, M., Avšič-Županc, T., & Seme, K. (1994). Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33, 3: 379-400.
- Pucek, Z., Jedrzejewski, W., Jedrzejewska, B., & Pucek, M. (1993). Rodent population dynamics in a primeval deciduous forest (Bialowieza National Park) in relation to weather, seed crop and predation. *Acta Theriologica*, 38 (2): 199-232.
- Randolph, S. (2001). Tick-borne encephalitis in Europe. *Lancet*, 358: 1731-1732.
- Randolph, S. E. (2004). Evidence that climate change has caused ‘emergence’ of tick-borne diseases in Europe? *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, 293 (37): 5–15.

- Randolph, S. E. (2008). Tick-borne encephalitis incidence in Central and Eastern Europe: consequences of political transition. *Microbes and Infection*, 10: 209-216.
- Randolph, S. E. (2008). Tick-borne encephalitis virus, ticks and humans: short-term and long-term dynamics. *Current opinion in infectious diseases*, 21: 462-467.
- Randolph, S. E., & Storey, K. (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of Medical Entomology*, 36(6):741-748.
- Randolph, S. E., Gern, L., & Nuttall, P. A. (1996). Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology today*, 12: 472 - 479.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375(6529):291-298.
- Rizzoli, A., Neteler, M., Rosa, R., Versini, W., Cristofolini, A., Bregoli, M., . . . Gould, E. A. (2007). Early detection of tick-borne encephalitis virus spatial distribution and activity in the province of Trento, northern Italy. *Geospatial health*, 1: 169-176.
- Russell P. K., Brandt W. E., & Dalrymple J. M. (1980). Chemical and antigenic structure of flaviviruses. V : Schlesinger R. W., *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication* (str. 503-529). New York: Academic Press.
- Schlesinger S., & Schlesinger M.J. (1991). Replication of Togaviridae and Flaviviridae. V : Fields B. N., Knipe D.M., Chanock R.M., & Hirsch M.S., *Fundamental virology 2nd ed.* (str. 453-467). New York: Raven Press Ltd.
- Schwaiger, M., & Cassinotti, P. (2003). Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology*, 27, 2:, 136-145.
- Smorodintsev, A. A. (1958). Tick-borne spring-summer encephalitis. *Prog Med Virol*, 1, 210-247.
- Sočan, M., Blaško Markič, M., & Grgič Vitek, M. (2012). Bolezni, ki jih prenašajo členonožci in hemoraške mrzlice. V M. Seljak, *Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2012* (str. 57-62). Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja.
- Stiasny, K., & Franz, X. H. (2006). Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology*, 2755–2766.
- Süss , J. (2008). Tick-borne encephalitis in Europe and beyond - The epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance*, Volume 13, Issue 26.
- Šumilo, D., Asokliene, L., Bormane, A., Vasilenko, V., Golovljova, I., & Randolph, S. E. (2007). Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics. *PLoS One*, 2(6): e500. doi:10.1371/journal.pone.

- Šumilo, D., Bormane, A., Asokliene, L., Vasilenko, V., Golovljova, I., Avšič-Županc, T., . . . Randolph, S. E. (2008). Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe. *Reviews in Medical Virology*, 18(2): 81-95.
- Tälleklint, L., & Jaenson, T. G. (1994). Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *Journal of Medical Entomology*, 31: 880 - 886.
- Tälleklint, L., & Jaenson, T. G. (1998). Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Central and Northern Sweden. *Journal of Medical Entomology*, 35 (4): 521-526.
- Turner, C., Witwer, C., Hofacker, I. L., & Stadler, P. F. (2004). Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *Journal of General Virology*, 85: 1113–1124.
- Tonteri, E., Jääskeläinen, A. E., Tikkakoski, T., Voutilainen, L., Niemimaa, J., Henttonen, H., . . . Vapalahti, O. (2011). Tick-borne Encephalitis Virus in Wild Rodents in Winter, Finland, 2008-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (1): 72-75.
- Tovornik, D. (1973). O naravnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. *Simpozij o klopnem meningoencefalitisu* (str. 23-29). Celje: Slovensko zdravniško društvo.
- Trkov, D., & Varljen Bužan, E. (2012). *Mitohondrijski markerji kot orodje za identifikacijo vrst: zaključna naloga*. Koper: Univerza na Primorskem.
- Urlep, F., Lešničar, J., Jung, M., & Krech, U. (1977). Serološka preučitev akutnih febrilnih obolenj domnevne virusne etiologije v občini Mozirje poleti 1975. *Zdravstveni vestnik*, 46: 9-12.
- Vesenjaj-Zmijanac, J., Bedjanič, M., Rus, S., & Kmet, J. (1955). Virus meningoencephalitis in Slovenia. 3. Isolation of the causative agent. *Bull World Health Organization*, 12(4):, 513–520.
- Waldenstrom, J., Lundkvist, A., Falk, K. I., Garpmo, U., Bergström, S., Lindegren, G., . . . Olsen, B. (2007). Migrating Birds and Tickborne Encephalitis Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8): 1215-1218.
- Waldenström, J., Lundkvist, Å., Falk, K. I., Garpmo, U., Bergström, S., Lindegren, G., . . . Olsen, B. (2007). Migrating Birds and Tickborne Encephalitis Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (8): 1215-1218.

PRILOGA A

Seznam vzorcev, uporabljenih za dokazovanje virusa KME in ostalih virusov iz družine *Flaviviridae*. S »+« so označeni vzorci, v katerih je lahko prisoten flavivirus.

Št.	OZNAKA VZORCA	VRSTA	LOKALITTA	FLAVI UNIVERSAL RT - PCR
1	1	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
2	2	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
3	3	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
4	4	<i>Apodemus sylvaticus</i>	UMAG	
5	5	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
6	7	<i>Apodemus sylvaticus</i>	UMAG	
7	8	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
8	11	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
9	12	<i>Mus musculus</i>	PULA	
10	13	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
11	14	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
12	17	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
13	18	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
14	19	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
15	20	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
16	21	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
17	22	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
18	23	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
19	26	<i>Mus musculus</i>	PULA	
20	27	<i>Mus musculus</i>	PULA	
21	31	<i>Mus musculus</i>	UMAG	+
22	32	<i>Apodemus sp.</i>	UMAG	+
23	33	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
24	34	<i>Apodemus sp.</i>	UMAG	
25	35	<i>Apodemus sp.</i>	UMAG	
26	36	<i>Mus sp.</i>	UMAG	
27	37	<i>Mus sp.</i>	UMAG	
28	39	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	+
29	40	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	
30	41	<i>Crocidura leucodon</i>	PULA	
31	42	<i>Apodemus sylvaticus</i>	PULA	
32	43	<i>Apodemus sylvaticus</i>	PULA	
33	44	<i>Apodemus sylvaticus</i>	PULA	
34	45	<i>Mus musculus</i>	UMAG	
35	46	<i>Apodemus agrarius</i>	UMAG	
36	47	<i>Mus sp.</i>	PULA	
37	49	<i>Mus sp.</i>	PULA	
38	51	<i>Apodemus agrarius</i>		
39	52	<i>Mus musculus</i>		

40	53	<i>Apodemus agrarius</i>		
41	54	<i>Apodemus agrarius</i>	PODGORJE	
42	55	<i>Apodemus sylvaticus</i>	PODGORJE	
43	56	<i>Apodemus sylvaticus</i>	PODGORJE	
44	57	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	+
45	58	<i>Apodemus sp.</i>	PULA	
46	62	<i>Mus musculus</i>	PODGORJE	
47	68	<i>Mus musculus</i>	PODGORJE	
48	89	<i>Apodemus sp.</i>		
49	90	<i>Rattus sp.</i>	PULA	
50	91	<i>Mus sp.</i>	PULA	
51	92	<i>Apodemus sp.</i>	PULA	
52	93	<i>Apodemus sp.</i>	PULA	
53	94	<i>Apodemus sp.</i>	PULA	
54	95	<i>Apodemus sp.</i>	PULA	
55	96	<i>Apodemus sp.</i>	PULA	
56	98	<i>Apodemus agrarius</i>	PODGORJE	
57	100	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	+
58	101	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	+
59	102	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	
60	103	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	
61	104	<i>Mus sp.</i>	SV. ANTON	
62	105	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
63	106	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
64	107	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
65	108	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
66	109	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
67	110	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
68	111	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	
69	114	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	
70	115	<i>Apodemus sp.</i>		
71	116	<i>Apodemus sp.</i>		
72	117	<i>Crocidura sp.</i>	PODGORJE	
73	120	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
74	121	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
75	122	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
76	123	<i>Apodemus sp.</i>		
77	124	<i>Apodemus sp.</i>	SV. ANTON	
78	125	<i>Apodemus sp.</i>		
79	126	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	
80	127	<i>Apodemus sp.</i>	PODGORJE	