

Proučevanje naravnih gostiteljev virusa klopnega meningoencefalitisa v aktivnih in latentnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji*

Examination of tick-borne encephalitis virus natural reservoirs in active and latent tick-borne encephalitis foci in Slovenia*

Tomaž Malovrh**, Mateja Marc***

Ključne besede
encefalitis virusni klopni
bolezen rezervoarji
imunoencimske tehnike
polimerazna verižna reakcija

Key words
encephalitis viruses tick-borne
disease reservoirs
immunoenzyme techniques
polymerase chain reaction

Izvleček. Klopni meningoencefalitis je bolezen osrednjega živčevja, ki jo povzroča virus klopnega meningoencefalitisa. Le-ta se v naravi ohranja s kroženjem med gostitelji (mali sesalci, divjad) in klopi. Pojavljanje klopnega meningoencefalitisa je vezano na naravna žarišča, ki nihajo v aktivnosti. Naš namen je bil odkrivanje vrst in pogostosti okužbe malih sesalcev z virusom klopnega meningoencefalitisa na območju Gorjancev in Tenetiš. Z encimskoimunskim testom smo v serumih živali ugotavljali specifična protitelesa. Prisotnost virusa pa smo neposredno dokazovali z metodo verižne reakcije s polimerazo. Protitelesa proti virusu klopnega meningoencefalitisa smo dokazali v 8,3 % serumov, virusni genom pa v 45,9 % pregledanih živali. Ugotavljamo, da le z dokazovanjem prisotnosti protiteles ni mogoče oceniti stopnje okuženosti malih sesalcev. Dokazali smo, da je v Sloveniji rumenogrla miš primarni gostitelj virusa klopnega meningoencefalitisa in da ni razlik v stopnji okuženosti med različno aktivnimi žarišči. Metoda verižne reakcije s polimerazo, ki smo jo prvi uporabili za dokazovanje virusa klopnega meningoencefalitisa v naravnih gostiteljih, je primerna za oceno naravnega žarišča klopnega meningoencefalitisa.

Abstract. Tick-borne encephalitis is the most important human central nervous system virus infection in Europe. The virus is maintained in nature by a cycle involving reservoirs (small mammals, deer) and vector (ticks). Tick-borne encephalitis occurs in endemic areas, which vary in activity. The purpose of the study was to determine the species and frequency of tick-borne encephalitis infection among small mammals caught in Gorjanci and Tenetiše endemic areas. The enzyme immunoassay was used for demonstration of specific viral antibodies, and the polymerase chain reaction for direct detection of viral genome. Seroprevalence was 8,3 %, while viral genome was detected in 45,9 % of the tested animals. Our study confirmed that the demonstration of viral antibodies alone cannot provide an accurate information of the incidence of tick-borne encephalitis infection in small mammals. The yellow-necked mouse was found to be a primary reservoir of tick-borne encephalitis virus in Slovenia. No difference in infection rate was found between studied natural foci. Polymerase chain reaction, which was for the first time employed for the detection of tick-borne encephalitis in natural reservoirs, represents a convenient tool for determining tick-borne encephalitis natural foci.

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1996.

**Tomaž Malovrh, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana.

***Mateja Marc, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana.

Uvod

Virus klopnega meningoencefalitisa (KME) je arbovirus iz družine *Flaviviridae*, ki pri človeku povzroča obolenje osrednjega živčevja. V naravi kroži virus med klopi (prenašalci) in gozdnimi sesalci (gostitelji). Okužba členonožcev in vretenčarjev poteka običajno brez kliničnih znakov (1).

Poznamo dva podtipa virusa KME: virus centralnoevropskega encefalitisa (CEE), ki ga predstavlja prototip Neudorfl, in virus ruskega pomladno-poletnega encefalitisa (RSSE), katerega prototip je virus Sofjin (2). Ugotovili so, da imata oba virusna podtipa zelo podobne antigenske lastnosti. Pri človeku povzročata okužbo osrednjega živčevja, vendar v različno hudi obliki.

Prenos virusa v naravi

Klopi

Klopi igrajo pomembno vlogo kot prenašalci in naravni rezervoarji virusa. Navadni klop, *Ixodes ricinus*, je najpomembnejši pri razširjanju zahodnega podtipa virusa KME (virusa CEE), klop vrste *Ixodes persulcatus* pa pri razširjanju vzhodnega podtipa (virus RSSE).

Življenjski krog navadnega klopa zajema tri stadije: larva, nimfa in odrasla žival. Za prehod v naslednjo obliko se mora klop v vsakem stadiju hraniti na vretenčarju (slika 1). Glavni gostitelji larv in nimf so mali glodalci, žužkojedi in ptice, gostitelji odraslih kloпов pa srnjad, ježi, lisice, govedo, ovce, koze, prašiči, psi, mačke in človek (1).

Po hranjenju na viremičnem gostitelju postanejo klopi doživljenjsko kužni. Virus se v klopju razmnožuje v različnih organih (tudi v žlezah slinavkah) in se prenaša pri vbodu (3). Virus KME se v klopjih prenaša vertikalno. Vertikalni prenos vključuje spolni (iz okuženega samca v samico), transovarialni (iz samice na jajčeca) in transstadialni (iz larve na nimfo iz nje na odraslo žival) prenos (slika 1). Virus lahko v klopjih tudi uspešno prezimi. Obe lastnosti omogočata ohranjanje virusa v naravi in s tem dajeta klopom pomembno vlogo naravnega rezervoarja (4). Za dolgotrajni obstoj pa je zaradi izgub virusa pri prehodih v nove stadije (le 1 % jajčec okužene samice prejme virus; le 10 % odraslih kloпов iz okuženih larv in 30 % iz okuženih nimf je okuženih) nujno potreben še horizontalni prenos, ki vključuje odnose med klopi in sesalci (2, 5) (slika 1).

V naravnih žariščih je stopnja okuženih kloпов od 0,1 do 5 % in niha glede na endemsko področje (3). V Sloveniji ni natančnih podatkov o deležu z virusom KME okuženih kloпов. Ocenjujejo, da je v endemičnih predelih okuženih približno 0,1 % kloпов (6).

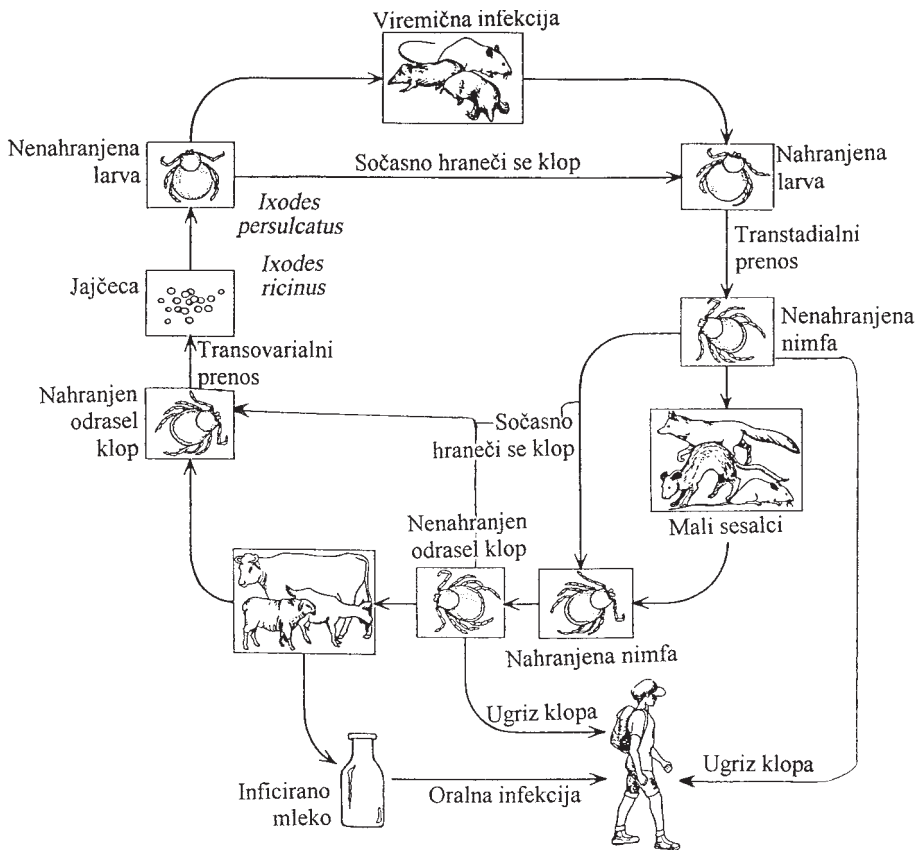
Sezonska aktivnost klopa *I. ricinus* ima dva vrha, prvega pozno pomladi (april, maj), drugega pa jeseni (september, oktober). S tem je povezana tudi pojavnost KME pri ljudeh v endemskih področjih (7).

Mali sesalci

Različni razvojni stadiji klopa pogosto zajedajo na prostoživečih malih sesalcih. Zato so glodalci pomembni gostitelji virusa KME. Okužba gostiteljev poteka brez simptomov.

Glavna gostiteljja virusa KME sta gozdna voluharica (*Clethrionomys glareolus*) in rume-nogrla gozdna miš (*Apodemus flavicollis*) (1). Po teden dni trajajoči viremiji najdemo vi-rus KME v različnih organih malih sesalcev. V raziskavi alzacijskega žarišča KME so pri vrstah *A. flavicollis* in *C. glareolus* osamili virus iz ledvic, vranice, možganov in žlez slinavk (5).

Žival se na okužbo odzove s tvorbo protiteles proti virusu KME. Protitelesa zaznamo 13. dan po okužbi in so verjetno prisotna do konca drugega meseca (5). Tako je mogo-če posredno ugotavljati pogostost okužbe malih sesalcev z virusom. Pri proučevanju raz-ličnih naravnih žarišč KME v Evropi so ugotovili, da so prisotna specifična virusna protitelesa pri 6 do 12 % malih sesalcev (1). Zelo pomemben podatek je, da imajo mali sesalci kratek generacijski čas (7). Stare, serološko pozitivne (imune) živali namreč kot naravni rezervoar za virus niso primerne, zato je pomembno, da je vselej zagotovljeno zadostno število mladih, za okužbo dovzetnih živali (7).



Slika 1. Kroženje virusa KME v naravi med vektorji in gostitelji.

Veliki sesalci in človek

Veliki sesalci so pomembni predvsem za razširjanje okuženih klopov s potovanjem na daljše razdalje. Viremija po okužbi pri njih ni zadostna za okužbo klopov. Zato predstavljajo slepo vejo za nadaljnji prenos virusa (7).

Tudi človek predstavlja prekinitev kroženja virusa v naravi. Z virusom se okuži ponavadi preko nimf ali odraslih živali, ki so sposobne predreti človeško kožo (3) (slika 1). Ogroženi so predvsem ljudje, ki delajo oziroma živijo na ali ob mestih naravnih žarišč virusa KME, gozdni delavci, taborniki in vojaki (2).

Naravno žarišče

Naravno žarišče je v teoriji Pavlovskega označeno kot geografsko področje, kjer je evolucija vodila do posebnih odnosov med virusom, prenašalcem in gostiteljem. Virus in prenašalec sta lahko v simbiotskem razmerju. Virus ima v prenašalcu ugodno okolje in nima nobenega vpliva na razvoj, življenje in razmnoževanje prenašalca. Prenášalec služi za prenos virusa od gostitelja donorja do gostitelja prejemnika. Vsa medsebojna dogajanja v tem okolju se vspostavijo pred prihodom človeka (1).

Aktivno naravno žarišče je tisto, kjer so velike in stabilne populacije klopov, malih sesalcev in žužkojedov. Eden izmed pogojev za oznako aktivnega žarišča je vsaj 15 % prisotnost protiteles proti virusu KME pri zdravih ljudeh s tega področja (1). Če na nekem področju ugotovimo prisotnost virusa KME v gostiteljih, bolezen pa se pri tamkajšnjem prebivalstvu ne izraža, to področje označujemo kot latentno žarišče (8).



Slika 2. Primeri klopnege meningoencefalitisa v letu 1995 po kraju okužbe. (Povzeto po zborniku Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 1995, Center za nalezljive bolezni Ljubljana, 1995).

Tudi v Sloveniji je intenziteta aktivnosti naravnih žarišč različna; od izredno aktivnih, kjer je možnost okužbe in zbolevanja velika, do manj aktivnih in celo latentnih žarišč, kjer okužba in zbolevanje nista verjetni (slika 2).

Laboratorijsko dokazovanje klopnega meningoencefalitisa

KME je mogoče natančno potrditi le s pomočjo laboratorijskih metod, saj so klinična znamenja bolezni pogosto neznačilna in nezadostna za postavitve diagnoze.

Serološka diagnostika klopnega meningoencefalitisa

Za hitro diagnostiko KME je danes najprimernejša encimsko-immunska metoda (EIA, angl. *enzyme immuno assay*), ki temelji na dokazovanju specifičnih protiteles. Metoda je hitra in občutljiva ter hkrati omogoča dokaz specifičnih protiteles IgM, ki kažejo na nedavno okužbo (7, 9).

Molekularna diagnostika klopnega meningoencefalitisa

Razvoj modernih metod molekularne virologije je v zadnjem času odprl nove možnosti in poglede na diagnostiko virusnih okužb. Največji diagnostični in raziskovalni pomen ima verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*). PCR je metoda sinteze nukleinskih kislin *in vitro*, s katero lahko pomnožimo značilni odsek DNA v velikem številu kopij. Metoda je izredno občutljiva, hitra, specifična in varna (8, 10). Z osnovno metodo PCR lahko pomnožujemo le molekule DNA. Zato je treba v primeru dela z RNA-virusi osamljeno RNA prepisati z encimom reverzno transkriptazo v komplementarno DNA (cDNA).

Schneider in sodelavci so s pomočjo metode PCR prvič pomnožili in dokazali virus KME v serumu in likvorju bolnikov ter v klopih (11). Avšič - Župančeva in sodelavci so na Inštitutu za mikrobiologijo v Ljubljani razvili PCR-metodo, kjer so uporabili par začetnih oligonukleotidov, ki je sposoben prepoznati oba podtipa virusa KME. Metodo so izboljšali tako, da so izdelali še par notranjih začetnih oligonukleotidov (angl. *nested PCR*) in s tem povečali občutljivost metode. Ugotovili so tudi, da lahko z razgradnjo PCR-priredelka z različnimi restrikcijskimi endonukleazami opredelijo virusni podtip (12).

Namen naloge

V naši nalogi smo želeli raziskati pogostost okužbe naravnih gostiteljev z virusom KME. V ta namen smo preiskusili in uporabili molekularno metodo PCR in njene rezultate primerjali s serološko metodo EIA.

Pričakovali smo, da bomo tako lahko ugotovili, katere vrste malih sesalcev so pomembni gostitelji virusa KME v Sloveniji. Glede na to, da se KME pogosteje pojavlja na določenih področjih, smo sklenili primerjati pogostost okužbe gostiteljev virusa v dveh naravnih žariščih, ki se razlikujeta v stopnji zbolevnosti. Za bolezen je značilna tudi povezanost s sezonsko aktivnostjo klopov, zato nas je zanimalo, kako se stopnja prekuženosti malih sesalcev spreminja glede na letni čas.

Material in metode

Vzorci

Preiskali smo material 109 malih sesalcev, vrst rumenogrla gozdna miš (*Apodemus flavicollis*), navadna belonoga miš (*Apodemus sylvaticus*), dimasta miš (*Apodemus agrarius*), gozdna voluharica (*Clethrionomys glareolus*), ilirska voluharica (*Pitymys lichtensteini*), gozdna rovka (*Sorex araneus*), povodna rovka (*Neomys fodiens*), močvirska rovka (*Neomys anomalus*), veliki podkovernjak (*Rhinolophus ferrumequinum*) in južni podkovernjak (*Rhinolophus euryale*). Živali so ulovili leta 1995 na področju Gorjancev (maj, junij, avgust) in področju Tenetiš (julij) v sodelovanju s Prirodoslovnim muzejem Slovenije. Vzorci so bili sterilno shranjeni pri -70°C (tkiva), oziroma pri -20°C (serumi). Za preiskave s serološkimi metodami smo uporabili serume, za preiskave z molekularnimi metodami pa tkiva ledvic malih sesalcev.

Pri ugotavljanju protiteles v serumih živali smo v testu EIA kot pozitivno kontrolo uporabili serum z virusom KME eksperimentalno okužene miši. Pri dokazovanju virusnega genoma v vzorcih ledvic pa smo uporabili kot pozitivno kontrolo ekstrahirano RNA virusa KME, podtip CEE, sev Ljubljana.

Encimsko-imunski test

EIA je serološka metoda, s katero smo dokazovali specifična protitelesa razreda IgG proti virusu KME v serumih malih sesalcev. Uporabili smo virusni antigen, ki smo ga pripravili s postopkom ekstrakcije z virusom KME okuženih celic Vero-Neudorfl (13).

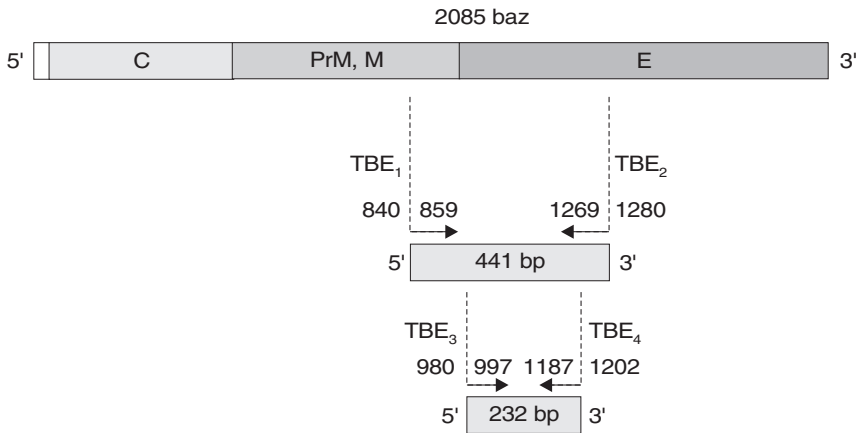
Verižna reakcija s polimerazo

Ekstrakcija RNA iz ledvic malih sesalcev

Celotno celično RNA smo ekstrahirali iz ledvic malih sesalcev po izboljšani metodi Chomczynskega in Sacchija (14, 15). Postopek ekstrakcije zajema pet faz: homogenizacija, faza separacije, RNA-precipitacija, spiranje RNA in ponovno raztapljanje RNA. Rastopino RNA smo hranili pri -20°C .

Izbira začetnih oligonukleotidov

Pri metodi PCR je najpomembnejši pravilni izbor začetnih oligonukleotidov. Uporabili smo začetne oligonukleotide, ki so jih razvili v arbovirusnem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in jih uporabljajo za pomnoževanje virusa KME iz humanega materiala: TBE₁, TBE₂, TBE₃ in TBE₄. S parom TBE₁ in TBE₂ smo pomnoževali 441 baznih parov (bp) dolg odsek, ki zajema končni del zapisa za beljakovino prM in začetni del zapisa za beljakovino E virusa KME. TBE₃ in TBE₄ se pripenjata znotraj omenjenega dela in pomnožujeta 223 bp dolg odsek. S slednjim parom smo pomnoževali del pridelka, ki smo ga dobili po uporabi prvega para oligonukleotidov. Tako smo povečali specifičnost reakcije in koncentracijo pridelka. Reakcija se imenuje PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. Oba para začetnih oligonukleotidov smo izbrali tako, da dovoljujeta pomnoževanje obeh podtipov virusa KME.



Slika 3. Shematski prikaz genoma podtipa Neudorfl virusa KME z označenimi pozicijami parov začetnih oligonukleotidov. Številke ob puščicah označujejo oddaljenost od 5'-konca genoma. TBE₁₋₄ – začetni oligonukleotidi. Nukleotidno zaporedje povzeto po NCBI (genski banki podatkov): podtip Neudorfl – dostopna koda U27495.

Reverzno transkriptna verižna reakcija s polimerazo

Po uspešni ekstrakciji vzorčne RNA smo za dokazovanje prisotnosti virusne RNA uporabili metodo reverzno transkriptne PCR (RT-PCR), ki je različica klasične metode PCR.

Reakcija poteka v dveh fazah: reverzni prepis RNA v cDNA in metoda klasične PCR.

Uporabili smo komplet reagentov Gene Amp RNA PCR Kit (Perkin Elmer Cetus Corp., Norwalk, ZDA). Za prepis RNA v cDNA smo uporabili naključne začetne oligonukleotide (angl. *random hexamers*) in encim reverzno transkriptazo. Pri metodi PCR smo uporabili začetna nukleotida TBE₁ in TBE₂ ter encim polimeraza DNA Taq. Obe fazi smo izvajali v računalniško vodeni aparaturi Mastercycler 5330, Eppendorf, Nemčija.

Po končani reakciji smo dobili pridelke PCR, to je veliko število pomnoženih delov tarčne cDNA. Pomnoženi pridelek smo uporabili v naslednji reakciji PCR, v kateri smo uporabili začetne oligonukleotide TBE₃ in TBE₄, ki se pripenjajo znotraj prvotno pridobljenega pridelka, in encim polimeraza DNA Taq. S tem postopkom smo povečali občutljivost metode.

Pravilnost priprave mešanice in pravilnost postopka PCR smo vedno preverjali s pozitivno in negativno kontrolo.

Elektroforeza pridelkov verižne reakcije s polimerazo v agaroznem gelu

Za ugotavljanje prisotnosti in velikosti pridelkov PCR smo uporabili vodoravno elektroforezo v agaroznem gelu. Pomnožene delce DNA smo ločevali v 3 % agaroznem gelu (Nu Sieve GTG agarose, Genetic technology Grade, FMC Bio Products, ZDA). Glede na dolžino pričakovanega pridelka PCR smo uporabili molekularni označevalec DNA 123 bp (GibcoBRL, Bethesda, ZDA), ki vsebuje delce DNA velikosti: 123, 246, 369, 492,

615, 878, 984 in 1107 bp. Po končani elektroforezi smo gel pogledali pod UV-svetlobo in fotografirali s polaroidnim fotoaparatom. Velikost pridelkov PCR smo določili s primerjavo z delci DNA molekularnega označevalca znane velikosti.

Razgradnja pridelkov verižne reakcije s polimerazo z restrikcijskimi encimi

Za potrditev rezultatov metode PCR smo uporabili metodo encimske razgradnje pridelkov PCR. Specifičnost pridelka PCR namreč potrdimo takrat, ko ga uporabljeni restrikcijski encimi razgradijo na delce, ki po velikosti in številu ustrezajo predhodno določenemu vzorcu razgradnje. V našem primeru smo izbrali kombinacijo restrikcijskih encimov, ki so jih v našem laboratoriju že uporabili. Encime smo izbrali tako, da vzorec razgradnje pridelka omogoča ločevanje podtipov virusa KME. Uporabili smo naslednje restrikcijske encime: AluI, PstI, RsaI, HaeIII in Sau3AI.

Velikost posameznih delcev razgrajenega pridelka PCR smo ugotovili z vodoravno elektroforezo v agaroznem gelu.

Rezultati

Serološke metode

Specifična protitelesa proti virusu KME smo z EIA ugotovili v 9 vzorcih (8,3%) serumov živali. Vsi pozitivni vzorci so bili s področja Gorjancev. Rezultate testa EIA prikazuje tabela 1.

Tabela 1. Protitelesa proti virusu klopnega meningoencefalitisa v serumih malih sesalcev, ujetih v različnih mesecih na dveh območjih Slovenije.

Področje ulova	Mesec	Število pozitivnih vzorcev	Število preiskanih vzorcev
Gorjanci	maj	2	41
	junij	2	33
	avgust	5	18
Tenetiše	julij	0	17
Skupaj		9	109

Med seropozitivnimi sta bili dve vrsti malih sesalcev; *A. flavicollis* (5 vzorcev, tj. 7,9%) in *C. glareolus* (4 vzorci, tj. 18,2%), kar prikazuje tabela 2.

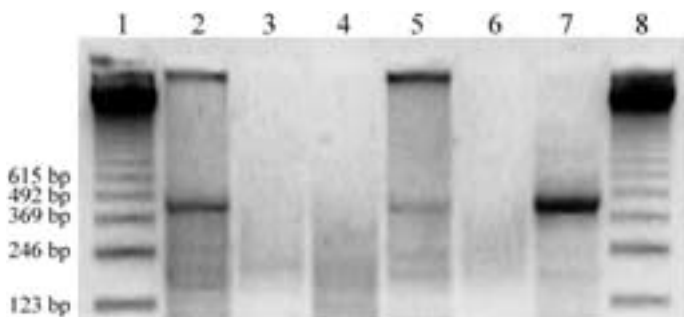
Tabela 2. Protitelesa proti virusu klopnega meningoencefalitisa v serumih različnih vrst malih sesalcev.

Vrsta	Število pozitivnih vzorcev	Število preiskanih vzorcev
<i>A. flavicollis</i>	5	63
<i>C. glareolus</i>	4	22
Ostale vrste	0	24
Skupaj	9	109

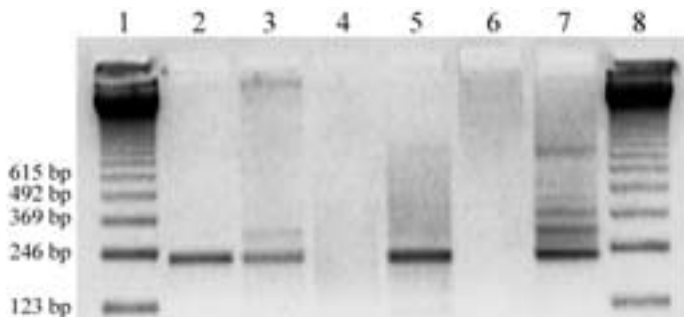
Molekularne metode

Virusno RNA smo dokazali v skupaj 50 od 109 vzorcev (45,9%).

Primeri uspešnega in neuspešnega dokazovanja prisotnosti RNA virusa KME v tkivih ledvic malih sesalcev z začetnimi oligonukleotidi TBE₁, TBE₂, TBE₃ in TBE₄ so prikazani na slikah 4 in 5.



Slika 4. Pomnoževanje 441 bp velikega dela genoma virusa KME s parom začetnih oligonukleotidov TBE₁ in TBE₂. 1 in 8 – molekularni označevalec; 2 in 5 – primera uspešnega pomnoževanja; 3 in 4 – primera neuspešnega pomnoževanja; 7 – pozitivna kontrola; 6 – negativna kontrola.



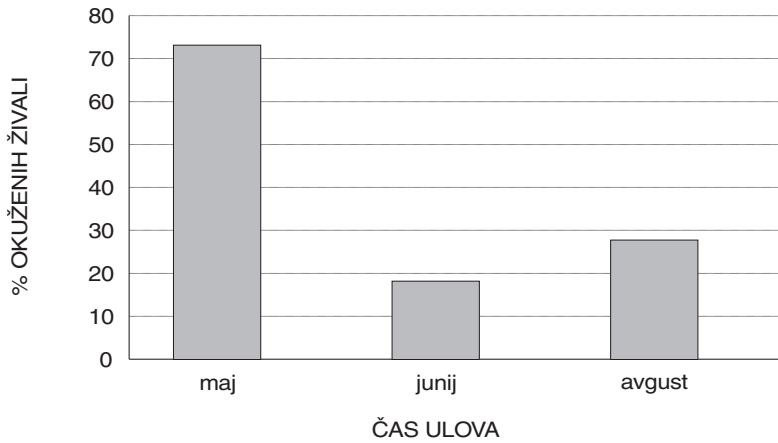
Slika 5. Pomnoževanje 223 bp velikega dela genoma virusa KME s parom notranjih začetnih oligonukleotidov TBE₃ in TBE₄. 1 in 8 – molekularni označevalec; 2, 3 in 5 – primeri uspešnega pomnoževanja; 4 – primer neuspešnega pomnoževanja; 7 – pozitivna kontrola; 6 – negativna kontrola.

Primerjava glede na različna področja zbolewnosti klopnega meningoencefalitisa

S področja Gorjancev je bilo pozitivnih 41 vzorcev (44,6%), iz Tenetiš pa 9 (52,9%).

Prekuženost vzorcev s področja Gorjancev glede na mesec ulova

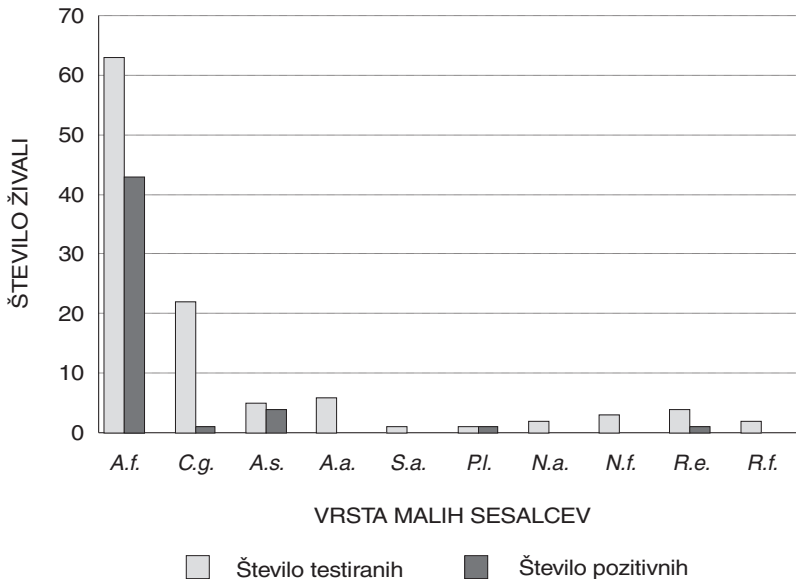
Pri živalih, ujetih meseca maja, smo dokazali virusno RNA pri 30 vzorcih (73,2%), junija pri 6 vzorcih (18,2%) in avgusta pri 5 vzorcih (27,8%) (slika 6).



Slika 6. Prikaz pogostosti okužbe malih sesalcev s področja Gorjancev glede na mesec ulova.

Prekuženost posameznih vrst malih sesalcev z virusom klopnega meningoencefalitisa

Najpogosteje je bila okužena vrsta *A. flavicollis* (68,3%). Med 22 testiranimi vzorci vrste *C. glareolus* je bil pozitiven le en vzorec (4,5%) (slika 7).



Slika 7. Pogostost okužbe z virusom KME pri posameznih vrstah malih sesalcev. A.f. – *A. flavicollis*; C.g. – *C. glareolus*; A.s. – *A. sylvaticus*; A.a. – *A. agrarius*; S.a. – *S. araneus*; Pl. – *P. lichtensteini*; N.a. – *N. anomalus*; N.f. – *N. fodiens*; R.e. – *R. euryale*; R.f. – *R. ferrumequinum*.

Tipizacija virusa klopnega meningoencefalitisa z restrikcijskimi endonukleazami

Pri vseh vzorcih, ki smo jih razgradili z encimi, smo opazili enak vzorec razgradnje, ki je bil drugačen kot vzorec razgradnje pozitivne kontrole. Zaradi nespecifičnih rezultatov restrikcije pridelkov osnovnega PCR smo se odločili še za encimsko razgradnjo pridelkov PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. Tu je bil vzorec razgradnje v vseh primerih enak in ni bil značilen za katerega od podtipov, bolj pa je bil podoben podtipu Sofjin.

Razpravljanje

Serološke in molekularne metode

Serološke metode

Z ugotavljanjem protiteles v serumih živali ne moremo prikazati dejanske stopnje okuženosti malih sesalcev z virusom KME. Protitelesa se pri malih sesalcih pojavijo šele 13. dan po okužbi z virusom in jih lahko zasledimo do konca drugega meseca (5). Torej je ugotavljanje okužbe malih sesalcev s serološkimi metodami omejeno na določeno časovno obdobje.

Z encimsko-immunsko metodo smo specifična protitelesa ugotovili v 9 od 109 serumov.

Molekularne metode

Glavni cilj naše naloge je bila neposredna določitev okužbe malih sesalcev z virusom KME. V ta namen smo uporabili molekularno metodo PCR. Metodo so drugod že uporabili za pomnoževanje RNA virusa KME, osamljene iz človeške krvi, možganov laboratorijskih miši po inokulaciji ali iz kloпов. Metodo so povsod označili kot hitro, specifično in občutljivo (12, 16–18).

V naši raziskavi smo se odločili za poskus dokaza RNA virusa KME, ki smo jo izolirali iz tkiv gostiteljev. Pričakovali smo, da bodo rezultati pokazali večjo pogostost okužbe malih sesalcev, kot jo navajajo v literaturi, kjer so do zdaj prikazani le rezultati seroloških raziskav (1, 5).

Z osnovno metodo PCR smo dokazali RNA virusa KME pri 30 vzorcih ledvic malih sesalcev od 109 testiranih. Občutljivost metode smo povečali tako, da smo vse vzorce preiskali še z metodo PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. S tem smo dokazali virusno RNA še v dodatnih 20 vzorcih. Metoda PCR se je tako izkazala kot primernejša metoda za določanje prekuženosti naravnih gostiteljev.

Značilnost pridelkov PCR smo želeli potrditi z razgradnjo z restrikcijskimi endonukleazami. Glede na vzorca razgradnje 441 bp in 223 bp velikih pridelkov PCR z restrikcijskimi encimi Alu I, Pst I, Rsa I, Hae III in SAU 3 A I menimo, da smo v vzorcih živali dokazali virus, ki se od obeh virusnih podtipov razlikuje. Za dokončno opredelitev virusnega tipa bo treba ugotoviti nukleotidno zaporedje pomnoženega dela genoma in ga primerjati z danes znanimi zaporedji nukleotidov.

Pogostost okužbe malih sesalcev

Ker so mali sesalci pomembni gostitelji virusa KME, je podatek o pogostosti njihove okužbe zelo pomemben za opredelitev aktivnosti žarišča. Rezultati dosedanjih raziskav, ki temeljijo na ugotavljanju prisotnosti protiteles, ne odražajo dejanske stopnje okuženosti malih sesalcev (1). Z rezultati naše raziskave smo ta predvidevanja potrdili. V serumih smo sicer ugotovili protitelesa pri 8% živali, kar je v skladu s podatki iz literature, vendar smo z neposredno metodo PCR dokazali znatno višjo stopnjo okužbe živali (45,9%). Pri analizi rezultatov smo opazili, da pri večini živali, kjer smo dokazali virusno RNA, nismo našli protiteles proti virusu KME. Predvidevamo, da so bile živali morda ujete še pred serokonverzijo ali na njenem začetku, ko protiteles še ni mogoče zaznati. Odsotnost protiteles bi lahko razložili tudi z oslavljenim imunskim odgovorom živali ob sočasni okužbi s katerim izmed mikroorganizmov. Mali sesalci so namreč gostitelji številnih mikroorganizmov (npr. borelija, erlihija, rikecija, babezia) (19). Pri petih živalih, kjer smo ugotovili specifična protitelesa, nismo dokazali virusne RNA. Menimo, da so se te živali okužile že pred časom.

Pogostost okužbe malih sesalcev s področij, različnih po obolenosti za klopnim meningoencefalitisom

Po podatkih epidemiološkega zavoda v Kranju in Novem mestu je bila leta 1995 obolenost prebivalstva na področju Gorjancev šestkrat manjša kot na področju Tenetiš (Novo mesto: 0,44 na 10.000 prebivalcev, Kranj: 2,7 na 10.000 prebivalcev) (20). V skladu z obolenostjo smo na tem področju pričakovali tudi precej manjšo pogostost okužbe malih sesalcev. Vendar smo z metodo PCR ugotovili le majhno razliko v stopnji prisotnosti virusnega genoma v malih sesalcih z Gorjancev (44,6%) in Tenetiš (52,9%). Menimo, da prisotnost virusa v naravi ni edini pogoj, ki določa aktivnost žarišča. Žarišče na področju Gorjancev je kljub veliki gostoti okuženih gostiteljev neaktivno. Tak primer je opisan v naravnem žarišču v Nemčiji in je označen kot latentno žarišče (8). Vzrok za nastanek latentnega žarišča lahko predstavlja sprememba aktivnosti in okuženosti populacije klopop. Zelo pomemben vzrok verjetno predstavlja sprememba v virulenci virusa, ki je pogojena z mutacijo virusnega genoma. Natančen odgovor na vprašanje o morebitni genomski mutaciji bi dobili le s pomočjo analize nukleotidnega zaporedja. Postopka v raziskavi nismo izvedli, saj je časovno in tehnično preveč zahteven. Kljub temu ugotavljamo, da smo dobili enak vzorec razgradnje pridelkov PCR ne glede na naravno žarišče, ki smo ga proučevali. To nakazuje na prisotnost istega podtipa virusa v gostiteljih obeh področjih. Da bi bolje razumeli obnašanje naravnega žarišča bi morali sočasno proučevati še druge gostitelje in predvsem prenašalce virusa KME (klope).

Krajevna primerjava bi bila še bolj natančna, če bi bile testirane živali s področja Gorjancev in Tenetiš ujete v istem časovnem obdobju in bi bila vzorca tudi številčno uravnotežena.

Pogostost okužbe malih sesalcev s področja Gorjancev glede na mesec ulova

Rezultati metode PCR kažejo, da doseže pogostost okužbe malih sesalcev dva vrhova v sezoni. V mesecu maju smo opazili največjo okužbo živali (73,2%), ki se je po padcu

v juniju (18,2 %) v mesecu avgustu spet dvignila (27,8 %). Sezonsko nihanje okužbe se ujema z aktivnostjo klopov, pa tudi z biološkim ritmom populacije malih sesalcev (1).

Pogostost okužbe posameznih vrst malih sesalcev

Različni avtorji navajajo, da je vrsta *A. flavicollis* najpomembnejši gostitelj virusa KME (1). Tudi naši rezultati metode PCR kažejo, da je vrsta *A. flavicollis* pomemben gostitelj. *A. flavicollis* je bila najpogosteje zastopana vrsta živali (57,8 %) in hkrati najbolj pogosto okužena (68,3 %). Za razliko od drugih raziskovalcev ugotavljamo, da živali vrste *C. glareolus* niso pogosto okužene z virusom KME (4,5 %). Morda predstavlja ta vrsta malih sesalcev, tako kot večina ostalih proučevanih vrst, le vlogo naključnega gostitelja v naravnem žarišču KME.

Sklep

Ugotovili smo, da je za določanje prekuženosti naravnih gostiteljev virusa KME metoda PCR bistveno bolj primerna kot serološka metoda EIA, saj smo z molekularno metodo PCR dokazali virusni genom pri 45,9 %, protitelesa pa z metodo EIA le pri 8,3 % živali.

Kljub veliki razliki v zbolewnosti za KME na področju Gorjancev in Tenetiš nismo ugotovili razlik v pogostosti okužbe malih sesalcev v letu 1995. Zato menimo, da je področje Gorjancev latentno žarišče virusa KME.

V deležu okuženih malih sesalcev smo leta 1995 opazili dva vrha, maja in avgusta, kar sovпада s sezonsko aktivnostjo navadnega klopa in pojavom KME v Sloveniji.

Med vzorci, ki smo jih preiskovali, je bila najpogosteje zastopana vrsta *A. flavicollis*, ki je imela tudi najvišjo stopnjo prekuženosti z virusom KME. Zato domnevamo, da je vrsta *A. flavicollis* najpomembnejši gostitelj virusa KME v Sloveniji.

Zahvala

Zahvaljujemo se mentorici, doc. dr. Tatjani Avšič - Županc, dipl. biol., za pomoč in strokovno vodstvo pri delu.

Iskrena hvala Mirču Petrovcu, dr. med., za pomoč in koristne nasvete.

Zahvaljujemo se tudi Mateji Jelovšek in vsem ostalim zaposlenim v laboratoriju za virusno serologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Literatura

1. Grešikova M, Calisher CH. Tick-borne encephalitis. In: Monath TP, ed. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, vol 4. Boca Raton: CRC Press, 1989: 177–202.
2. Monath P, Heinz F. Flaviviruses. In: Fields B, Knipe D, Howley P, et al, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Raven Publishers, 1996: 961–1034.
3. Avšič – Županc T, Petrovec M. Epidemiology of tick-borne encephalitis. In: Saluzzo JF, Dodet B, eds. *Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases*. Paris: Elsevier, 1997: 215–22.

4. Ludwig GV, Iacono-Connors LC. Insect-transmitted vertebrate viruses: Flaviviridae. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993; 29A: 296–309.
5. Perez-Eid C, Hannoun C, Rodhain F. The Alsatian tick-borne encephalitis focus: presence of the virus among ticks and small mammals. *Eur J Epidemiol* 1992; 8(2): 178–86.
6. Strle F. Klopni meningoencefalitis in Lymška borelijoza – podobnosti in razlike. In: Lešničar J, ed. *Klopni meningoencefalitis*. Celje: Infektološka sekcija SZD, Infekcijski oddelek bolnišnice Celje, 1993: 42–50.
7. Anon. *Tick-borne encephalitis (TBE) and its immunoprophylaxis*. Wien: Immuno, 1989: 1–45.
8. Suss J, Sinnecker H, Sinnecker R, et al. Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus of tick-borne encephalitis. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1992; 277 (2): 224–35.
9. Matjašič M. Sodobna laboratorijska diagnostika klopnega meningoencefalitisa. In: Lešničar J, ed. *Klopni meningoencefalitis*. Celje: Infektološka sekcija SZD, Infekcijski oddelek bolnišnice Celje, 1993: 59–60.
10. Avšič – Županc T, Poljak M. Uporaba metod molekularne virologije pri raziskovanju etiologije klopnega meningoencefalitisa. In: Lešničar J, ed. *Klopni meningoencefalitis*. Celje: Infektološka sekcija SZD, Infekcijski oddelek bolnišnice Celje, 1993: 61–6.
11. Schreier E, Schweiger B, Ramelow C, Beziat P, Suss J. Rapid detection of tick-borne encephalitis virus sequences by cDNA amplification coupled to a simple DNA enzyme immunoassay. *Clin Diagn Virol* 1994; 2: 291–5.
12. Avšič – Županc T, Poljak M, Matičič M, et al. Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clinical and Diagnostic Virology* 1995; 4: 51–9.
13. Avšič – Županc T. Antigenske lastnosti hantavirusa Dobrava in njegova patogenost. Doktorska dizertacija. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 1991.
14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–9.
15. Chirgwin IM, Przybyla AE, MacDonald RI, Rutter WI. Isolation of biological active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem* 1979; 18: 5294–5.
16. Pletnev AG, Yamshchikov VF, Blinov VM. Nucleotide Sequence of the Genome and Complete Amino Acid Sequence of the Polyprotein of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Virology* 1990; 174: 250–63.
17. Puchhammer – Stockl E, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clinical and Diagnostic Virology* 1995; 4: 321–6.
18. Eldadah ZA, Asher DM, Godec MS, et al. Detection of Flaviviruses by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol* 1991; 33: 260–7.
19. Spach DH, Liles WC, Campbell GL, Quick RE, Anderson DE, Fritsche TR. Tick-borne diseases in the United States. *N Engl J Med* 1993; 329: 936–47.
20. Kraigher A, Hočevar Grom A. *Epidemiological surveillance of communicable diseases in Slovenia in 1995*. Ljubljana: Institute of Public health Republic of Slovenia, 1996: 34–6.

Prispelo 1. 6. 1997