



UDK

636.09:578.2:616-036.2:578.824:577.212.3:57.065(497.12)(043.3)

Danijela Rihtarič, dr. vet. med.

**PROUČEVANJE MOLEKULARNO-EPIDEMOILOŠKIH ZNAČILNOSTI
VIRUSA STEKLINE PRI DIVJIH IN DOMAČIH ŽIVALIH V SLOVENIJI**

Doktorska disertacija

**STUDY OF MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF RABIES VIRUS IN WILD AND DOMESTIC ANIMALS IN
SLOVENIA**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2013

Danijela Rihtarič

Proučevanje molekularno-epidemioloških značilnosti virusa stekline pri divjih in domačih živalih v Sloveniji

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Peter Hostnik

Somentor: viš. zn. sod. dr. Ivan Toplak

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jože Grom

Članica: prof. dr. Darja Barlič Maganja

Član: doc. dr. Gorazd Vengušt

Član: prof. dr. Srečko Koren

IZVLEČEK

Ključne besede: Molekularna epidemiologija; steklina – epidemiologija – veterinarska; steklina, virus – genetika – klasifikacija; molekulsko zaporedje, podatki; zaporedje, analiza, DNA, RNA; filogeneza; polimeraza, verižna reakcija – metode; živali – virologija; Slovenija – epidemiologija.

Z molekularno-epidemiološko analizo 93 virusnih sevov stekline, zbranih med letoma 1994 in 2012, smo ugotovili, da slovenski virusi stekline spadajo med klasične evropske seve in so vsi uvrščeni v vrsto RABV. Primerjali smo nukleotidna zaporedja virusov stekline, ki smo jih ugotovili pri različnih živalskih vrstah, in potrdili, da je v Sloveniji glavni rezervoar virusa stekline rdeča lisica (*Vulpes vulpes*). S filogenetsko analizo smo ugotovili, da slovenski sevi oblikujejo tri genetske skupine. V prvo in drugo genetsko skupino je uvrščenih 91 divjih sevov virusa stekline, v tretjo pa dva cepna seva virusa stekline. Izbrali smo trideset virusnih sevov, izoliranih na različnih geografskih lokacijah, iz različnih živalskih vrst v različnih obdobjih in pripravili filogenetski analizi nukleotidnih zaporedij v odseku gena za nukleoprotein (1092 nt) in v odseku gena za glikoprotein RVG (672 nt). Ugotovili smo, da je razporeditev virusnih sevov v obeh filogenetskih drevesih skoraj identična, zato lahko za zanesljivo filogenetsko razvrstitev virusov stekline uporabimo oba odseka virusnega genoma. Z molekularno analizo smo ugotovili, da sta dva odvzeta vzorca možganov lisic vsebovala cepni sev virusa stekline. Ugotovljena primera cepnega seva v možganih lisic po naši oceni nimata velikega epidemiološkega pomena. Primerjali smo različne metode za ugotavljanje virusa stekline v živalskih vzorcih. Med metodami dIF, IVCK in RT-PCR se je metoda RT-PCR izkazala za najbolj občutljivo in najbolj primerno predvsem za dokazovanje virusov v vzorcih, ki smo jih trideset dni hranili pri sobni temperaturi. Za razlikovanje med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2 smo modificirali postopek po Wakeleyu in sodelavcih, za dokazovanje cepnih sevov pa smo razvili nov postopek RT-PCR v realnem času. Modificirani in razviti postopki za RT-PCR v realnem času so namenjeni razlikovanju med cepnimi in divjimi sevi virusa stekline in tipizaciji virusov stekline, razen za seve RABV, ki izvirajo iz Južne in Severne Amerike.

ABSTRACT

Key words: Molecular epidemiology; rabies – epidemiology – veterinary; rabies virus – genetics – classification; molecular sequence data; sequence analysis, DNA, RNA; phylogeny; polymerase chain reaction – methods; animals – virology; Slovenia – epidemiology.

Molecular-epidemiological analysis of 93 rabies virus positive samples, collected between 1994 and 2012, showed that Slovenian strains of rabies viruses belong to classical European strains within RABV species. The comparison of rabies virus nucleotide sequences, originating from different animal species, confirmed that the red fox (*Vulpes vulpes*) is the main reservoir of rabies virus in Slovenia. Phylogenetic analysis classified Slovenian strains in three genetic groups. Ninety-one wild strains are grouped into two main groups; three vaccine strains are grouped into third genetic group. Thirty strains isolated from different animal species on different geographical locations in different time period were selected for phylogenetic analysis. Nucleoprotein (1092 nt) and glycoprotein RVG (672 nt) gene region were selected for nucleotide sequences comparison. Topology of viral strains in both phylogenetic trees is almost identical. For reliable phylogenetic classification of rabies viruses, both genetic regions can be used. By molecular analyses, we discovered that two brain samples originating from foxes contain vaccine strain of rabies virus. In our opinion, the described cases of vaccine strains detected in fox brains have little significance. The comparison of dIF, VI, and RT-PCR methods revealed that RT-PCR has the highest sensitivity and is the most adequate method for testing samples that were kept at room temperature for 30 days. To distinguish among RABV, EBLV 1, and EBLV 2 species, the protocol from Wakeley and co-workers was modified. To detect vaccine strains, a new real time RT-PCR protocol was developed. Modified and newly developed real time RT-PCR protocols are suitable for differentiation between vaccine and wild rabies virus strains and for typing of rabies viruses, excluding RABV strains from South and North America.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	16
2 PREGLED LITERATURE.....	18
2.1 ZGODOVINSKI ZAPISI O STEKLINE.....	18
2.2 LASTNOSTI VIRUSA STEKLINE.....	20
2.2.1 Taksonomska uvrstitev.....	20
2.2.2 Zgradba in pomnoževanje virusa stekline	23
2.3 PATOGENEZA, IMUNOST IN PATHOLOGIJA	29
2.4 EPIDEMIOLOGIJA	33
2.5 PREPREČEVANJE POJAVA STEKLINE PRI LJUDEH	41
2.6 PREPREČEVANJE POJAVA STEKLINE PRI DOMAČIH ŽIVALIH.....	42
2.7 PREPREČEVANJE STEKLINE PRI DIVJIH ŽIVALIH.....	43
2.8 KLINIČNA SLIKA	49
2.9 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA	50
2.9.1 Dokazovanje virusa stekline s histološko in imunohistološko preiskavo	51
2.9.2 Test direktne imunofluorescence (dIF) za dokaz virusnih antigenov	52
2.9.3 Biološki poskus.....	54
2.9.4 Izolacija virusa stekline na celični kulturi (IVCK).....	54
2.9.5 Tipizacija virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi	55
2.9.6 Molekularne metode za dokaz nukleinskih kislin virusa stekline.....	56
2.9.6.1 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)	57
2.9.6.2 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo v realnem času	58
2.9.6.3 Uporaba DNA-vezalnih barvil za dokazovanje produktov RT-PCR v realnem času.....	59
2.9.6.4 Uporaba označenih specifičnih začetnih oligonukleotidov in sond za dokazovanje produktov RT-PCR v realnem času.....	60
2.9.6.5 Kvantitativno in kvalitativno določanje produktov RT-PCR v realnem času	61
2.9.6.6 Uporaba metode RT-PCR v realnem času v diagnostiki stekline.....	62
2.9.6.7 Genetsko razvrščanje virusov stekline	62
3 MATERIAL IN METODE.....	65
3.1 VZORCI	65
3.1.1 Vzorci za proučevanje molekularno-epidemioloških značilnosti virusov stekline	65
3.1.2 Vzorci za ugotavljanje občutljivosti in robustnosti metod dIF, IVCK in RT-PCR	70
3.1.3 Referenčni material za validacijo postopkov RT-PCR v realnem času	71

3.2 METODE	75
3.2.1 Test direktne imunofluorescence (dIF)	75
3.2.2 Izolacija virusa na celični kulturi (IVCK).....	76
3.2.3 Tipizacija virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi.....	77
3.2.4 Molekularne metode	78
3.2.4.1 Izolacija RNA.....	78
3.2.4.2 Metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR).....	79
3.2.4.3 Analiza produktov RT-PCR z elektroforezo v agaroznem gelu	82
3.2.4.4 Določanje nukleotidnega zaporedja.....	83
3.2.4.5 Analiza nukleotidnih zaporedij	84
3.2.4.6 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP).....	84
3.2.4.7 Metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) v realnem času	85
3.2.4.7.1 Začetni oligonukleotidi in sonde za razlikovanje med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2 ...	85
3.2.4.7.2 Začetna oligonukleotida in sonda za dokazovanje cepnih sevov virusov stekline	86
3.2.4.7.3 Enostopenjski RT-PCR v realnem času.....	87
3.2.4.7.4 Določanje optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond.....	89
3.2.4.7.5 Določanje optimalne koncentracije MgSO ₄	90
3.2.4.7.6 Preverjanje pravilnosti, specifičnosti in zanesljivosti metode RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV, EBLV 1, EBLV 2 in cepnih sevov	90
3.2.4.7.7 Preverjanje ponovljivosti rezultatov RT-PCR v realnem času.....	91
3.2.4.7.8 Določitev meje zaznavnosti postopkov RT-PCR v realnem času	91
3.2.4.7.9 Preverjanje robustnosti postopkov RT-PCR v realnem času.....	92
3.2.4.7.10 Določanje diagnostične specifičnosti in občutljivosti postopkov RT-PCR v realnem času..	92
4 REZULTATI.....	93
4.1 REZULTATI PROUČEVANJA MOLEKULARNO-EPIDEMIOLOŠKIH ZNAČILNOSTI VIRUSOV STEKLINE	93
4.1.1 Rezultat analize cepnih sevov z monoklonalnimi protitelesi in RFLP	104
4.2 REZULTATI PRIMERJAVE OBČUTLJIVOSTI IN ROBUSTNOSTI METOD DIF, IVCK IN RT-PCR	105
4.2.1 Občutljivost testa direktne imunofluorescence (dIF)	105
4.2.2 Robustnost testa direktne imunofluorescence (dIF)	106
4.2.3 Občutljivost metode IVCK.....	107
4.2.4 Robustnost metode IVCK.....	108
4.2.5 Občutljivost metode RT-PCR.....	109
4.2.6 Robustnost metode RT-PCR.....	110

4.3 REZULTATI VALIDACIJE IN OPTIMIZACIJE METOD RT-PCR V REALNEM ČASU	110
4.3.1 Rezultati določanja optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond	110
4.3.2 Rezultati določanja optimalne koncentracije MgSO₄	111
4.3.3 Rezultati preverjanja pravilnosti postopkov RT-PCR v realnem času	111
4.3.4 Rezultati določanja ponovljivosti metode RT-PCR v realnem času.	115
4.3.5 Rezultati določanja občutljivosti RT-PCR v realnem času	116
4.3.6 Rezultati preverjanja robustnosti postopkov RT-PCR v realnem času	117
4.3.7 Rezultati preverjanja specifičnosti postopkov RT-PCR v realnem času	118
5 RAZPRAVA	119
5.1 PROUČEVANJE MOLEKULARNO-EPIDEMIOLOŠKIH ZNAČILNOSTI VIRUSA STEKLINE	119
5.2 CEPNA SEVA VIRUSA STEKLINE PRI LISICAH V SLOVENIJI	121
5.3 PRIMERJAVA OBČUTLJIVOSTI IN ROBUSTNOSTI METOD DIF, IVCK IN RT-PCR	125
5.4 RT-PCR V REALNEM ČASU ZA RAZLIKOVANJE MED VRSTAMI RABV, EBLV 1, EBLV 2 IN CEPNIMI SEVI	129
6 ZAKLJUČKI	134
7 POVZETEK	135
8 SUMMARY	138
9 ZAHVALE	141
10 LITERATURA	142
11 PRILOGE	167

KAZALO TABEL

Tabela 1: Vrste uvrščene v rod <i>Lyssavirus</i> in njihovi gostitelji ter razširjenost	21
Table 1: Species from <i>Lyssavirus</i> genus, hosts and distribution	21
Tabela 2: Pojavljanje stekline pri domačih in divjih živalih v letih 1987–2011.....	39
Table 2: Rabies in domestic and wild animals between 1987–2011.....	39
Tabela 3: Opisani primeri prenosa steklini sorodnih virusov iz netopirjev na človeka	40
Table 3: Bat associated human cases of rabies related viruses	40
Tabela 4: Vzorci za proučevanje molekularno-epidemioloških značilnosti virusov stekline.....	65
Table 4: Samples for molecular-epidemiological analysis of rabies viruses.....	65
Tabela 5: Nukleotidna zaporedja virusov stekline iz podatkovne zbirke GenBank.....	69
Table 5: Rabies virus nucleotide sequences obtained from GenBank data collection	69
Tabela 6: Vzorci za primerjavo občutljivosti metod dIF, IVCK in RT-PCR	71
Table 6: Samples for comparison of dIF, IVCK, and RT-PCR methods sensitivity.....	71
Tabela 7: Vzorci, uporabljeni za validacijo metod RT-PCR v realnem času	72
Table 7: Samples used for real time RT-PCR validation.....	72
Tabela 8: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odsekov na genu, ki kodira nukleoprotein.....	80
Table 8: Primers for partial nucleoprotein gene amplification	80
Tabela 9: Začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka na genu, ki kodira terminalni del nukleoproteina in začetni del fosfoproteina	81
Table 9: Primers for amplification of terminal part of nucleoprotein and initial part of phosphoprotein.....	81
Tabela 10: Začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka na genu za RVG	81
Table 10: Primers for partial RVG gene amplification	81
Tabela 11: Začetni oligonukleotidi in sonde za dokazovanje RABV, EBLV 1 in EBLV 2	86
Table 11: Primers and probes for RABV, EBLV 1 and EBLV 2 detection	86
Tabela 12: Začetna oligonukleotida in sonda za dokazovanje cepnih sevov virusov stekline	87
Table 12: Primers and probe for rabies vaccine strains detection.....	87
Tabela 13: Testirane koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde	90
Table 13: Tested primers and probe concentration.....	90
Tabela 14: Kode (accession number) nukleotidnih zaporedij odseka v genu za nukleoprotein in odseka v genu za RVG slovenskih sevov stekline v podatkovni zbirki GenBank.....	99

Table 14: Accession numbers of nucleoprotein gene region sequences and RVG gene region sequences of Slovenian rabies virus strains in GenBank data collection.....	99
Tabela 15: Določanje občutljivosti testa dIF	106
Table 15: Sensitivity determination of dIF test	106
Tabela 16: Določanje robustnosti testa dIF.....	107
Table 16: Robustness determination of dIF test	107
Tabela 17: Določanje občutljivosti metode IVCK	108
Table 17: Sensitivity determination of virus isolation method	108
Tabela 18: Določanje občutljivosti metode RT-PCR	109
Table 18: Sensitivity determination of RT-PCR method.....	109
Tabela 19: Rezultati preverjanja robustnosti metode RT-PCR.....	110
Table 19: Results of robustness testing of RT-PCR method	110
Tabela 20: Določanje optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond	110
Table 20: Determination of primers and probe optimal concentration	111
Tabela 21: Rezultati postopkov RT-PCR v realnem času	112
Table 21: Results of real time RT-PCR protocols	112
Tabela 22: Standardna deviacija in koeficient variacije pri preverjanju ponovljivosti rezultatov RT-PCR v realnem času	115
Table 22: Standard deviation and variation coefficient in repeatability testing of real time RT-PCR results.....	115
Tabela 23: Določanje občutljivosti metod RT-PCR v realnem času.....	117
Table 23: Sensitivity determination of real time RT-PCR methods.....	117
Tabela 24: Standardna deviacija in koeficient variacije pri preverjanju robustnosti postopkov RT-PCR v realnem času	118
Table 24: Standard deviation and variation coefficient in robustness testing of real time RT-PCR protocols	118

KAZALO SLIK

Slika 1: Elektronsko mikroskopski posnetek virusa stekline.....	19
Figure 1: Electron microscope image of rabies virus.....	19
Slika 2: Prikaz filogenetskega drevesa predstavnikov vrst znotraj rodu <i>Lyssavirus</i> , pripravljenega na osnovi primerjave zaporedij 405 nukleotidov gena za nukleoprotein.....	22
Figure 2: Phylogenetic tree of representatives of the <i>Lyssavirus</i> genus based on comparison of 405 nucleotides of nucleoprotein gene.....	22
Slika 3: Shematski prikaz strukture virusa stekline.....	23
Figure 3: Schematic representation of rabies virus structure	23
Slika 4: Organizacija genoma virusa stekline.....	24
Figure 4: Rabies virus genome organization	24
Slika 5: Pomnoževalni ciklus virusa stekline	25
Figure 5: Rabies virus replication cycle.....	25
Slika 6: Patogeneza virusa stekline.....	31
Figure 6: Rabies virus pathogenesis	31
Slika 7: Negrijevo telesce.....	52
Figure 7: Negri inclusion body	52
Slika 8: Rezultati testa dIF pri vzorcu pozitivnem na virus stekline	53
Figure 8: dIF result in rabies positive sample	53
Slika 9: IVCK na celicah N2a: primer vzorca, pozitivnega na virus stekline	55
Figure 9: Cell culture virus isolation on N2a cells: example of positive sample.....	55
Slika 10: Potek RT-PCR v realnem času z uporabo hidrolizne sonde	61
Figure 10: Real time RT-PCR using hydrolysing probe.....	61
Slika 11: Analiza produktov pomnoževanja 1313 bp odseka, ki kodira nukleoprotein, na 1,8 % agaroznem gelu	93
Figure 11: Analysis of 1313 bp long amplification products of nucleoprotein coding region on 1.8 % agarose gel.....	93
Slika 12: Geografska lokacija analiziranih sevov virusov stekline.....	94
Figure 12: Geographical location of analyzed rabies viruses	94
Slika 13: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij odseka za nukleoprotein	95
Figure 13: Phylogenetic tree of nucleoprotein gene region nucleotide sequences.....	95

Slika 14: Primerjava nukleotidnih zaporedij odseka na genu za nukleoprotein slovenskih sevov 537-08SVN, 3511-12SVN in cepnih sevov SAD B19, SAD Bern in PV.....	97
Figure 14: Comparison of nucleoprotein gene region nucleotide sequences of Slovenian strains 537-08SVN, 3511-12SVN and vaccine strains SAD B19, SAD Bern and PV.....	98
Slika 15: Analiza produktov pomnoževanja 730 bp dolgega odseka, ki kodira RVG, na 1,8 % agaroznem gelu.....	98
Figure 15: Analysis of 730 bp long amplification products of RVG coding region on 1.8 % agarose gel	98
Slika 16: Filogenetski drevesi, ki vključujeta nukleotidna zaporedja 30 izbranih slovenskih sevov virusov stekline in sevov iz GenBank.....	101
Figure 16: Phylogenetic trees including nucleotide sequences of 30 selected Slovenian rabies virus strains and strains from GenBank	101
Slika 17: Podobnost nukleotidnih zaporedij sedmih slovenskih sevov in hrvaškega seva CRO_09SK	102
Figure 17: Nucleotide similarity of seven Slovenian strains and Croatian strain CRO_09SK	102
Slika 18: Primerjava prevedenih aminokislinskih zaporedij dela nukleoproteina 30 slovenskih sevov in štirih sevov iz GenBank	103
Figure 18: Comparison of deduced amino acid sequences of a part of nucleoprotein of 30 Slovenian strains and four strains from GenBank	103
Slika 19: Primerjava prevedenih aminokislinskih zaporedij dela RVG 30 slovenskih sevov in seva SAD B19	104
Figure 19: Comparison of deduced amino acid sequences of a part of RVG of 30 Slovenian strains and SAD B19	104
Slika 20: Analiza produktov RFLP na 1,8 % agarozmen gelu	105
Figure 20: Analysis of RFLP products on 1.8 % agarose gel	105

SEZNAM OKRAJŠAV

ABLV	avstralski netopirski lisavirus; angl. Australian bat lyssavirus
AchR	acetilholinski receptor
ARAV	virus Aravan; angl. Aravan virus
Arg	arginin
ATCC	ameriška zbirka celičnih kultur; angl. American type culture collection
BHK	ledvične celice hrčka; angl. baby hamster kidney cells
bp	bazni pari
CD56	adhezijska molekula živčnih celic
cDNA	komplementarna DNA; angl. complementary DNA
Cq	cikel kvantifikacije; angl. quantification cycle value
Da	dalton
dIF	test direktne imunofluorescence
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvojnoverižna DNA; angl. double stranded DNA
DUVV	virus Duvenhage; angl. Duvenhage virus
EBLV 1	evropski netopirski virus 1; angl. European bat lyssavirus 1
EBLV 2	evropski netopirski virus 2; angl. European bat lyssavirus 2
ELISA	encimsko imunski test; angl. enzyme-linked ImmunoSorbent Assay
ER	endoplazemski retikulum
EU	Evropska unija
FAVN	virus nevtralizacijski test; angl. fluorescent antibody virus neutralization test
FLI	Inštitut Friedricha Loefflerja
FRET	fluorescenčni resonančni prenos enerfije; angl. fluorescent resonance energy transfer
GA	Golgijev aparat
Glu	glutamin
Gly	glicin

GPS	navigacijski sistem; angl. global positioning system
I.E.	internacionalne enote
ICTV	Mednarodni komite za taksonomsko uvrstitev; angl. International Committee on Taxonomy of Viruses
Ille	izolevcin
IRKV	virus Irkut; angl. Irkut virus
IVCK	izolacija virusa na celični kulturi; angl. virus isolation in cell culture (VI)
KHUV	virus Khujand; angl. Khujand virus
L	od RNA odvisna polimeraza RNA
LBV	netopirski virus Lagos; angl. Lagos bat virus
le	nekodirajoča sekvenca; angl. Leader
Lys	lizin
M	protein matriksa
Met	metionin
MNA	nevroblastomske celice; angl. murine neuroblastoma cells
MOKV	virus Mokola; angl. Mokola virus
mRNA	informacijska RNA; angl. messenger RNA
N	nukleoprotein
N2a	nevroblastomske celice; angl. neuroblastoma cells
nt	nukleotid
ORF	odprt bralni okvir; angl. open reading frame
P	fosfoprotein
PBS	fosfatni pufer; angl. phosphate buffered saline
PCR	verižna reakcija s polimerazo; angl. polymerase chain reaction
p75	nevrotropinski receptor
RABV	klasični sevi virusov stekline; angl. rabies virus
RFLP	polimorfizem dolžin restriktijskih fragmentov; angl. restriction fragment length polymorphism
RPMI	medij inštituta Roswell Park Memorial; angl. Roswell Park Memorial Institute medium

RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo; angl. reverse transcription and polymerase chain reaction
RVG	glikoprotein virusa stekline; angl. rabies virus glycoprotein
Ser	serin
SHBV	virus Shimoni; angl. Shimoni virus
SP	signalni peptid
SPF	prost specifičnih antigenov; angl. specific antigen free
tr	nekodirajoča sekvenca; angl. trailer
UVHVVR	Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
WCBV	zahodnokavkaški netopirske virus; angl. West-Caucasian bat virus
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija; angl. World health organization
ZDA	Združene države Amerike
Ψ	psevdogena regija

1 UVOD

Steklina je virusna bolezen sesalcev, ki jo povzroča virus iz rodu *Lyssavirus*, uvrščen v družino *Rhabdoviridae*. V preteklem desetletju so v Evropi opravili številne molekularno-epidemiološke študije virusa stekline (Bourhy in sod., 1999; Pastoret in Brochier, 1999; Kuzmin in sod., 2004; Marston in sod., 2007; Matouch, 2008), s katerimi so potrdili, da so sevi RABV najbolj razširjeni pri sesalcih; vrsti evropski netopirske lisaviruse 1 (EBLV 1) in evropski netopirske lisaviruse 2 (EBLV 2) pa sta prisotni predvsem med žužkojedimi netopirji. Opisali so tudi posamezne primere prenosa EBLV 1 z netopirja na ovco (Ronsholt, 2002), jazbeca (Muller in sod., 2002a) in domačo mačko (Dacheux in sod., 2009).

Prvič so molekularno-epidemiološke značilnosti virusov stekline s področja Slovenije opisali leta 1999 (Bourhy in sod., 1999). V raziskavi so določili delno nukleotidno zaporedje dveh slovenskih virusnih sevov (9494SLN, 94100SLN) in ju primerjali s 93 sevi iz 25 različnih držav. Seve so razvrstili glede na geografsko lokacijo v štiri razrede. Slovenska seva 9494SLN in 94100SLN so uvrstili v razred zahodnoevropskih sevov.

Glavni prenašalec virusa stekline v Sloveniji je rdeča lisica (*Vulpes vulpes*). Virus stekline lahko z ugrizom prenese na divje in domače živali ali celo na človeka. Bolezen je smrtna, zato je za njeno ugotavljanje in njen uspešen nadzor bistvenega pomena uporaba hitrih metod za dokazovanje virusa in specifičnih protiteles. Med klasične metode za diagnostiko virusa stekline sodijo izolacija virusa na celični kulturi (IVCK), test direktne imunofluorescence (dIF), protitelesa pa ugotavljamo s serološkimi metodami (virus nevtralizacijski test (FAVN, angl. fluorescent antibody virus neutralisation test) in encimsko imunski test (ELISA)).

V rutinski diagnostiki kužnih bolezni se je v zadnjem desetletju uspešno uveljavila metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času (Belak, 2007). Največja prednost te metode je sprotno spremeljanje pomnoževanja tarčnega zaporedja, nadaljnje rokovanie z nastalimi produkti pa ni potrebno, kar zmanjša možnost kontaminacije med vzorci. Metoda je hitra, občutljiva, zanesljiva in ponovljiva.

Namen raziskave

Namen našega dela je proučiti molekularno-epidemiološke značilnosti virusa stekline pri divjih in domačih živalih v Sloveniji v letih 1994–2012. Na podlagi nukleotidnega zaporedja določenih odsekov na genomu virusov stekline bomo lahko primerjali slovenske seve s sevi, shranjenimi v podatkovni zbirki GenBank. Z analizo nukleotidnih zaporedij bomo lahko razlikovali med divjimi in cepnimi sevi virusov stekline, ki se pojavljajo na področjih, na katerih se izvaja peroralno cepljenje lisic v Sloveniji.

Uvedli bomo metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) za ugotavljanje genoma virusa stekline v arhivskih vzorcih. Občutljivost in robustnost metode bomo primerjali z metodama IVCK in dIF. Dobljeni rezultati nam bodo v pomoč pri izbiri ustrezne metode za uporabo v rutinski diagnostiki, zlasti pri ugotavljanju virusa v neprimerno hranjenih vzorcih.

Uvedli in validirali bomo tudi metodo RT-PCR v realnem času za dokazovanje in razlikovanje virusov stekline iz vrst RABV, EBLV 1 in EBLV 2.

Razvili bomo tudi metodo RT-PCR v realnem času, s katero bomo lahko razločevali med divjimi in cepnimi sevi brez nadaljnjega določanja nukleotidnega zaporedja.

Molekularne metode za dokazovanje različnih virusov stekline nam bodo omogočile hitro in učinkovito diagnostiko, ki je nujna za načrtovanje poizpostavitev terapije.

Hipoteze

- Predvidevamo, da spadajo slovenski sevi virusa stekline med seve RABV.
- Predvidevamo, da je na območju, na katerem se izvaja peroralno cepljenje lisic, občasno mogoče ugotoviti tudi lisice, ki so pozitivne na cepni sev virusa stekline.
- Predvidevamo, da bomo virus stekline lahko dokazali z metodo RT-PCR tudi v vzorcih, ki bodo z metodama IVCK in s testom dIF ovrednoteni kot negativni.
- Predvidevamo, da je s kombinacijo specifičnih metod RT-PCR v realnem času mogoče razlikovati med cepnimi in divjimi sevi virusa stekline.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ZGODOVINSKI ZAPISI O STEKLINI

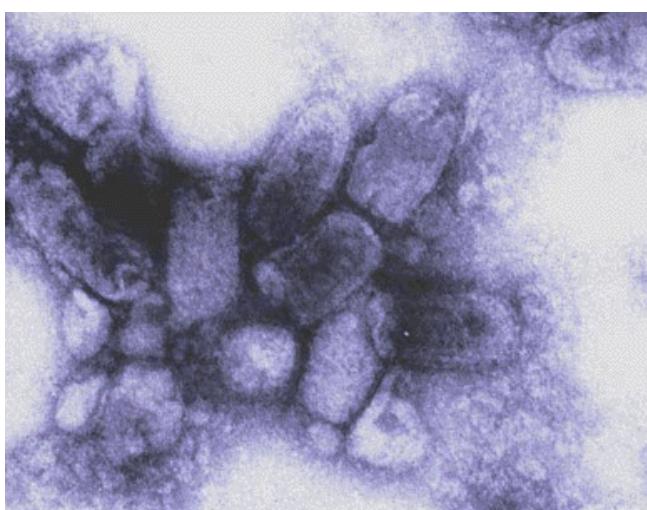
Najzgodnejši zapisi z opisom bolezni, katere znaki kažejo na steklino, so v babilonskih spisih, nastalih skoraj pred 4.500 leti. Beseda steklina izvira iz latinske besede *rabere* in pomeni besneti. Ta beseda izvira iz sanskrtske besede *rabhas*, s pomenom nasilje (Wilkinson, 2002). Prvi zapisi o vzročni povezavi, ko je pes ugriznil človeka in s tem povzročil njegovo smrt, izvirajo iz časa 2.300 pr. n. št. iz Eshnunna v Mezopotamiji. V mezopotamskem zakoniku je bila tudi opisana kazen za lastnika psa, ki je povzročil smrt človeka (Wilkinson, 2002). V četrtem stoletju pr. n. št. je Aristotel (384–322 pr. n. št.) opisal bolezen psov, ki lahko z ugrizi povzročijo smrt drugih živali in človeka (Wilkinson, 2002).

Aulus Cornelius Celsus (25 pr. n. št.–50 n. št.) je v prvem stoletju pr. n. št. v knjigi *De Medicina Libri Octo* opisal priporočeno ravnanje po ugrizu. V svojem delu opisuje, da je rano treba pustiti odprto, »da lahko virus prosto odteče«. Virus je v tistem času pomenilstrup. V drugem stoletju pr. n. št. je Klavdij Galen (199–129 pr. n. št.) pisal, da so naravni rezervoar stekline psi in da lahko kapljica sline na človeško kožo povzroči hidrofobijo, pri kateri oboleni človek trpi za žejo, nepremagljivim strahom pred vodo in pri kateri je zelo malo upanja za ozdravitev (Wilkinson, 2002).

Prvi znanstveni opisi o naravi bolezni izvirajo iz leta 1546. Tega leta je Girolamo Fracastoro (1478–1553) iz Verone opisal prenos bolezni. V svojem delu je zapisal, da je za nastanek bolezni pri človeku potreben ugriz steklega psa. Zapisal je tudi, da je »seme« vzrok za bolezen in tako postavil temelje kontagioznosti bolezni. Sledilo je obdobje, dolgo več kot tri stoletja, brez napredka na področju poznavanja bolezni, terapije ali preventivnih ukrepov. Louis Pasteur (1822–1895) iz Francije je leta 1885 dosegel pomemben preboj, saj je razvil prvo cepivo proti virusu stekline. Cepivo je uspešno uporabil najprej na psih in kuncih. Leta 1885 pa je cepivo prvič preizkusil tudi na človeku, na devetletnem dečku Josephu Meistru, ki ga je napadel stekli pes. Pes mu je povzročil globoke ugrizne rane, zato so menili, da deček nima veliko možnosti za preživetje. Edino upanje za njegovo preživetje je bilo

poizpostavitevno cepljenje s Pasteurjevim cepivom, ki je vsebovalo inaktiviran virus stekline. Cepljenje je povzročilo imunski odziv z nevtralizacijskimi protitelesi proti virusu stekline. Leta so se vezala na virus stekline in preprečila vstopanje virusa v živčne celice. Terapija s Pasteurjevim cepivom je bila uspešna in deček je preživel. Pasteurjev način cepljenja so sprejeli po vsem svetu. Še vedno pa so ostali nerešeni problemi, kot so alergijske reakcije in neučinkovitost cepljenja pri globokih ugrizih, zlasti v bližini glave, in možnost pojava bolezni pri človeku ob cepljenju z oslabljenim virusom (Wilkinson, 2002).

Pomembno prelomnico v diagnostiki stekline je prispeval Adelchi Negri (1876–1912) iz Perugie, ki je leta 1903 prvič opisal eozinofilne inkluzije, danes imenovane Negrijeva telesca. Identificiral jih je kot protozoje, ki povzročajo steklino. Kasneje so se Negrijeva telesca izkazala za diagnostično pomemben patognomoničen znak, ki se pojavi samo pri steklini (Negri, 1903; Negri, 1909). Šele z razvojem ultracentrifuge leta 1926, tehnike ultrafiltracije leta 1928 in elektronskega mikroskopa leta 1930 so znanstveniki določili prve morfološke značilnosti virusa stekline. Virus stekline so uvrstili med viruse RNA z ovojnico, virion pa ima značilno obliko naboja (slika 1) (Topley in Wilson, 1984). Pomemben dosežek so dosegli znanstveniki v ZDA s proizvodnjo cepiva na inštitutu Winstar v Philadelphia. Virus so namnožili na človeških diploidnih celicah in tako izdelali varno in učinkovito cepivo. Leta 1984 so na istem inštitutu razvili tudi prvo peroralno cepivo za rakanje pse (Findley, 1988).



Slika 1: Elektronsko mikroskopski posnetek virusa stekline (Center Wadsworth, ZDA).

Figure 1: Electron microscope image of rabies virus (Wadsworth Center, USA).

Iz znanstvenih poskusov in opazovanj poteka bolezni so znanstveniki nenehno izboljševali terapijo po ugrizu, s katero so lahko preprečili smrt človeka, ki ga je ugriznila stekla žival. Kljub temu da se v današnjem času v večini držav uspešno uporablja cepljenje izpostavljenih ljudi in živali, pa v državah v razvoju letno še vedno umre do 55.000 ljudi zaradi okužbe z virusom stekline (Bourhy in sod., 2010).

2.2 LASTNOSTI VIRUSA STEKLINE

2.2.1 Taksonomska uvrstitev

Po trenutno veljavni klasifikaciji mednarodnega komiteja za taksonomsko uvrstitev (ICTV, angl. International Committee on Taxonomy of Viruses) uvrščamo viruse stekline v rod *Lyssavirus*, v družino *Rhabdoviridae*. Družina *Rhabdoviridae* skupaj z družinami *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* in *Bornaviridae* oblikuje red *Mononegavirales*. V rod *Lyssavirus* je uvrščenih 11 vrst (tabela 1). Taksonomska ureditev virusov stekline temelji na analizi nukleotidnih zaporedij nukleoproteina. Virusi, pri katerih se nukleotidna zaporedja nukleoproteina ujemajo manj kot 82-odstotno, oblikujejo vrsto znotraj rodu (Kuzmin in sod., 2005; Kuzmin in sod., 2008). V svetu so najpogosteje ugotovljeni sevi vrste klasičnih virusov stekline (RABV), v katero je uvrščenih največ opisanih terenskih izolatov, laboratorijskih in cepnih sevov virusa stekline. V preostalih deset vrst sodijo steklini sorodni virusi, to so virus Lagos (LBV), virus Mokola (MOKV), virus Duvenhage (DUVV), evropski netopirske lisaviruse 1 (EBLV 1), evropski netopirske lisaviruse 2 (EBLV 2), avstralski netopirske lisaviruse (ABLV), virus Irkut (IRKV), virus Aravan (ARAV), virus Khujand (KHUV) in zahodnokavkaški netopirske virus (WCBV). V letu 2009 so prvič opisali netopirske virus Shimoni (SHBV) in bo uvrščen v lastno vrsto steklini sorodnih virusov (Kuzmin in sod., 2010) (slika 2).

Tabela 1: Vrste, uvrščene v rod *Lyssavirus*, in njihovi gostitelji ter razširjenost.

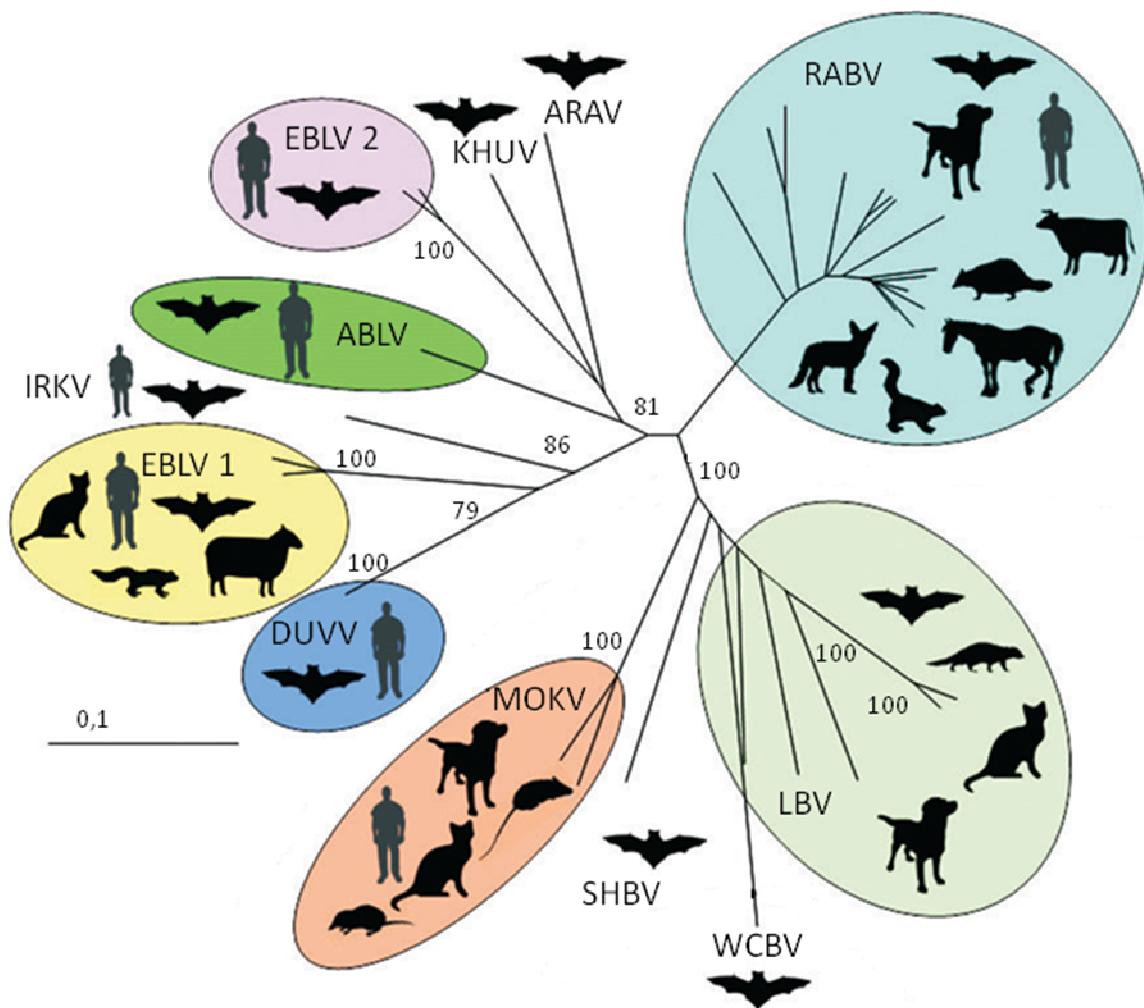
Table 1: Species from *Lyssavirus* genus, hosts and distribution.

Vrsta	Gostitelji	Razširjenost
RABV (angl. Rabies virus)	sesalci	vse celine
LBV (angl. Lagos bat virus)	netopir, mačka, pes, vodna mangusta	Afrika
MOKV (angl. Mokola virus)	človek, mačka, pes, miš, rovka	Afrika
DUVV (angl. Duvenhage virus)	človek, netopir	Afrika
EBLV 1 (angl. European bat lyssavirus 1)	človek, netopir, mačka, jazbec, ovca	Evropa
EBLV 2 (angl. European bat lyssavirus 2)	človek, netopir	Evropa
ABLV (angl. Australian bat lyssavirus)	človek, netopir	Avstralija
IRKV (angl. Irkut virus)	človek, netopir	Azija
ARAV (angl. Aravan virus)	netopir	Azija
KHUV (angl. Khujand virus)	netopir	Azija
WCBV (angl. West-Caucasian bat virus)	netopir	Azija

Virusi RABV so razširjeni pri sesalcih po vsem svetu. Virusi, sorodni virusom stekline, LBV, MOKV in DUVV, so razširjeni na afriški celini. Virusi EBLV 1 in 2 so razširjeni med netopirji na področju Evrope, virusi ABLV pa med netopirji na področju Avstralije (Arai in sod., 2003; Kuzmin in sod., 2003). Vse vrste steklini sorodnih virusov, razen vrste MOKV, so ugotovili pri netopirjih (Badrane in Tordo, 2001; Nel in Rupprecht, 2007). Viruse SHBV so ugotovili pri netopirjih na področju Kenije (Kuzmin in sod., 2010).

V preteklem desetletju so v Evropi opravili številne molekularno-epidemiološke študije virusa stekline (Bourhy in sod., 1999; Pastoret in Brochier, 1999; Kuzmin in sod., 2004; Marston in sod., 2007; Matouch, 2008), s katerimi so potrdili, da je v Evropi najpogosteje ugotovljena vrsta RABV pri sesalcih, vrsti EBLV 1 in 2 pa sta prisotni predvsem pri žužkojedih netopirjih. Opisali so tudi posamezne primere prenosa vrste EBLV 1 na ovco (Ronsholt, 2002), jazbeca (Muller in sod., 2002a) in domačo mačko (Dacheux in sod., 2009).

Po trenutno veljavni klasifikaciji je znotraj posameznih vrst rodu *Lyssavirus* uvrščeno zelo različno število virusnih sevov. Štiri opisane vrste (IRKV, ARAV, KHUV in WCBV) imajo samo enega predstavnika. Ostale vrste imajo od dva (DUVV) do več tisoč opisanih predstavnikov (RABV) (slika 2). Z razvojem molekularnih metod za odkrivanje novih virusov se bo taksonomija rodu *Lyssavirus* še spremnjala (Nadin-Davis in sod., 2011).



Slika 2: Prikaz filogenetskega drevesa predstavnikov vrst znotraj rodu *Lyssavirus*, pripravljenega na osnovi primerjave zaporedij 405 nukleotidov gena za nukleoprotein.

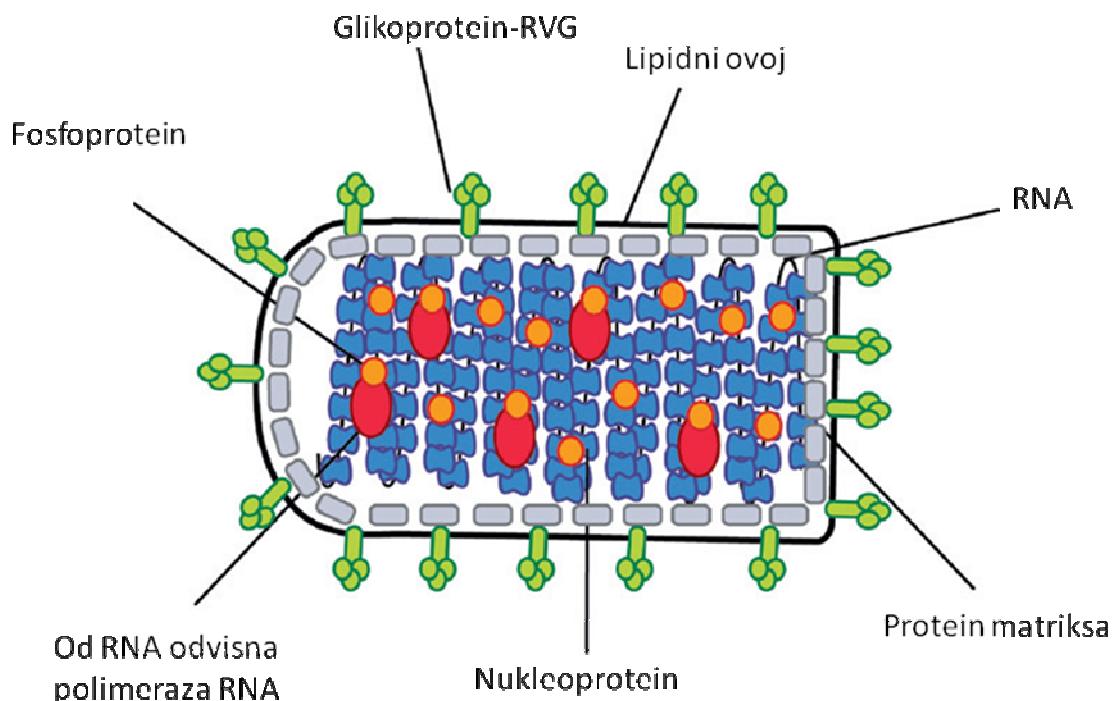
Figure 2: Phylogenetic tree of representatives of the *Lyssavirus* genus based on comparison of 405 nucleotides of nucleoprotein gene.

Za vsako vrsto so narisane ciljne skupine živalskih vrst (Banyard in sod., 2011).

For each virus species, target animals are drawn (Banyard in sod., 2011).

2.2.2 Zgradba in pomnoževanje virusa stekline

Zgradbo virusa stekline je prvi opisal Matsumoto (1962). Osnovne lastnosti virusa je proučeval z elektronskim mikroskopom. Skupna značilnost virusov iz družine *Rhabdoviridae* je ta, da imajo virioni obliko naboja. Širina virusa je 75 nm, njegova dolžina pa se med vrstami znotraj rodu *Lyssavirus* razlikuje in meri od 100 do 300 nm (Matsumoto, 1962; Matsumoto in sod., 1966; Tordo in Poch 1988). Na enem koncu je virus konične oblike, na drugem koncu pa je sploščen (slika 3). Molekulska teža viriona je od 300 do 1.000×10^6 daltona (Da).



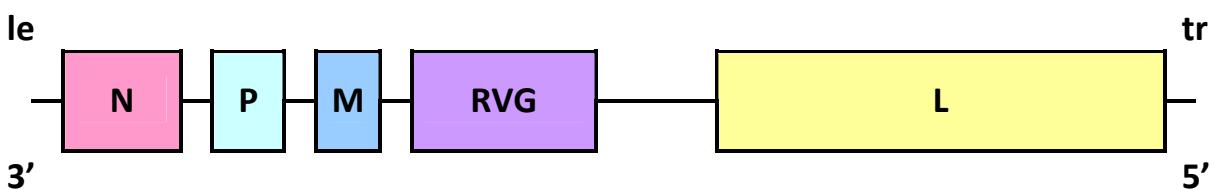
Slika 3: Shematski prikaz strukture virusa stekline (Albertini in sod., 2011).

Figure 3: Schematic representation of rabies virus structure (Albertini in sod., 2011).

Virus je sestavljen iz nukleokapside in plašča. Nukleokapsida ima vijačno simetrijo, ki je tudi sicer značilna za velike virusa. Plašč tvori dvoslojna lipidna ovojnica, ki se tesno prilega na nukleokapsido. Iz plašča štrlico proteinske peplomere, dolge približno 10 nm (Murphy in Harrison, 1979).

Genom virusa stekline vsebuje nesegmentirano, negativno polarno, enojnovijačno molekulo RNA, ki je dolga približno 12.000 nukleotidov (Mayo in Pringle, 1998). Genom je razmeroma preprosto modularno organiziran in vsebuje zapis za pet strukturnih proteinov: nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), protein matriksa (M), zunanji glikoprotein (RVG) in od RNA odvisno polimerazo RNA (L) (slika 4).

Genom virusa stekline ima na 3' koncu (začetnih 58 nukleotidov) nekodirajočo sekvenco le (angl. leader), na 5' koncu se nahaja nekodirajoča sekvenca tr (angl. trailer). Sekvenca le ima vlogo signala, ki začne prepisovanje RNA (Tordo in sod., 1986a, b). Med posameznimi geni so kratke intergenske regije dinukleotidov ali pentanukleotidov, ki segajo od 5' konca enega gena do 3' konca drugega gena. Intergenske regije se nahajajo med genoma N in P (dva nukleotida), med genoma P in M (pet nukleotidov), med genoma M in RVG (pet nukleotidov ali 16 nukleotidov za MOKV in LBV) in med genoma RVG in L (423 nukleotidov ali 504 nukleotidov za MOKV) (Le Mercier in sod., 1997). Intergenska regija med genoma RVG in L je dovolj dolga, da bi lahko kodirala protein, vendar nima odprtega bralnega okvirja (ORF, angl. open reading frame), zato jo imenujemo psevdogena regija (ψ). Iz začetnega signala UUAU ψ in stop signala na informacijski RNA (mRNA, angl. messenger RNA) je mogoče sklepati, da je nekoč kodirala protein (Tordo in sod., 1992). Psevdogena regija predstavlja najbolj variabilni del genoma, zato je z analizo nukleotidnega zaporedja te regije mogoče slediti evoluciji virusa stekline (Sacramento in sod., 1991).

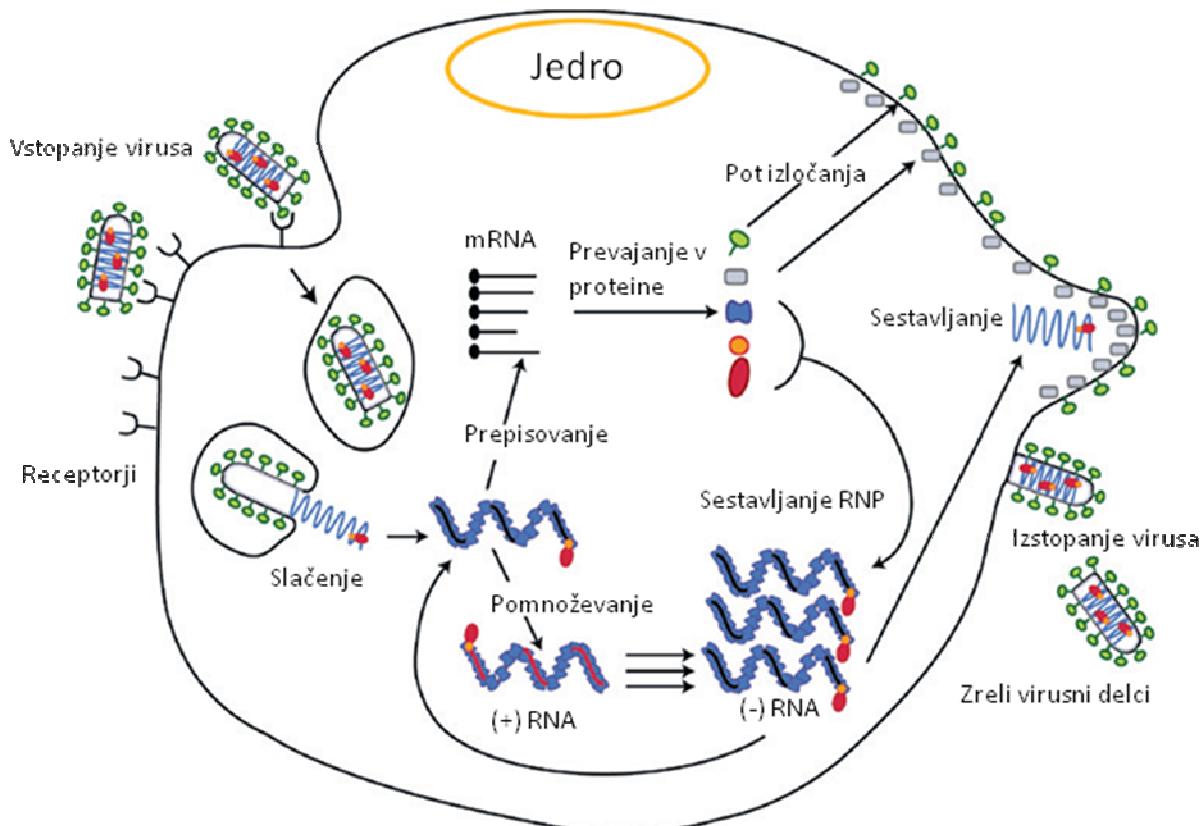


Slika 4: Organizacija genoma virusa stekline.

Figure 4: Rabies virus genome organization.

Pomnoževalni ciklus virusa stekline se začne z vstopanjem virusa v celico, nadaljuje se s prepisovanjem in pomnoževanjem ter konča s sestavljanjem in izstopanjem virusa z brstenjem iz celice (slika 5).

Virus stekline vstopi v tarčno celico preko receptorja ali druge celične receptorske enote. Prvi receptor, ki so ga raziskovali, je bil acetilholinski receptor (AchR), ki se nahaja na motorični ploščici (Burrage in sod., 1982). Vse celice, ki so podvržene okužbi z virusom stekline, nimajo AchR, zato znanstveniki domnevajo, da lahko virus stekline za vstop v celico uporabi več tipov receptorjev (Kucera in sod., 1985; Tsiang in sod., 1986; Lafay in sod., 1991). Dva že znana receptorja za virus stekline sta adhezijska molekula živčnih celic CD56 (Thoulouze in sod., 1998) in nevrotropinski receptor p75NTR (Tuffereau in sod., 1998). Po vezavi virusa na receptor sledi vstop preko zlitja virusne ovojnice s celično membrano in nato še z endosomalno membrano (Marsh in Helenius, 1989) ali vstop preko receptorsko vodene endocitoze (Superti in sod., 1984). Vstopanje virusa je mogoče tudi s procesom pinocitoze, pri katerem se oblikujejo mešički, ki lahko vsebujejo od dva do pet virionov (Tsiang in sod., 1983). Po vstopu virusa v celico se mešiček odpre in nukleokapsida virusa preide v citoplazmo (Inseni in sod., 1998).



Slika 5: Pomnoževalni ciklus virusa stekline (Aubertini in sod., 2011).

Figure 5: Rabies virus replication cycle (Aubertini et al., 2011).

Po vstopu virusa stekline v celico sledi prepisovanje in pomnoževanje virusnih genomov. Proces prepisovanja in pomnoževanja virusa poteka s pomočjo od RNA odvisne polimeraze RNA, ki lahko začne prepisovanje na 3' koncu genoma ali na začetku gena, ki kodira zapis za nukleoprotein (Whelan, 2008). Vsak od petih genov stekline se prepiše v monocistronske mRNA, ki se prevedejo v virusne proteine (Holloway in Obejski, 1980). Na intergenskih povezavah del od RNA odvisne polimeraze RNA (20–30 %) disociira iz virusnega genoma, preskoči intergenski odsek in nadaljuje s prepisovanjem na naslednjem genu. Gre za sistem samoregulacije virusne ekspresije, kot neke vrste lokalizirane atenuacije (Iverson in Rose., 1981).

V procesu prepisovanja virusne RNA nastanejo komplementarne kopije RNA enake dolžine, kot je genomska RNA šele potem, ko zadostna količina nukleoproteina zavre preskok intergenskih regij (Blumberg in sod., 1983; Yang in sod., 1999). Komplementarne kopije RNA imenujemo antigenom ali replicirajoče intermediarne RNA, ki so pozitivno polarne in služijo kot matrica za nastanek novih negativno polarnih RNA.

Prevajanje N, P, M in L mRNA v virusni protein poteka na prostih ribosomih v citoplazmi celice. Prevajanje RVG mRNA poteka na ribosomih, vezanih na membrano endoplazemskega retikuluma (ER). Virusni protein RVG se sprosti v lumen ER, kjer se ustvari homotrimerna struktura. Končno oblikovanje karbohidratnih verig virusnega proteina RVG poteka v Golgijevem aparatu (GA), kjer se homotrimerna struktura z encimi glikozidaze in glikoziltransferaze spremeni v končno trimerno strukturo (Konfred in Konfred, 1985).

Sestavljanje virionov se začne, ko je v celici dovolj negativno polarnih RNA in virusnih proteinov N, P in L in je že oblikovana nukleokapsida. Sestavljanje virionov poteka toliko časa, dokler je gostiteljska celica metabolično aktivna. Proses sestavljanja viriona se začne z vrivanjem virusne RNA v kapsido. Pri tem nastane kompleks virusne RNA z nukleoproteinom. Ko se nukleoprotein veže na nukleotidni skelet, postane RNA popolnoma zaščitenaa pred razgradnjo, ki bi jo sicer povzročile celične ribonukleaze (Kouznetzoff in sod, 1998). V citoplazmi inficirane celice se kopičijo proteini N in P, ki se povežejo v homologne in heterologne komplekse. V času sestavljanja virionov je tako v 25–30 % pozitivnih možganov

mogoče opaziti Negrijeva telesca, ki so heterologni kompleksi proteinov N in P (Chenik in sod., 1994; Fu in sod., 1994; Yang in sod., 1999). Heterologni kompleksi proteinov N in P preprečujejo enkapsulacijo nespecifične nevirusne RNA. Protein P, vezan v kompleksu RNA-N-P, sproži še vezavo proteina L. Na kompleks RNA-N-P-L se veže še protein M. Sledi pakiranje virusa, pri katerem se proteina M in RVG povežeta (Simons in Garoff, 1980; Mebatsion in sod., 1999). Interakcija med proteinoma M in RVG je pomembna za stabilizacijo trimerov proteina RVG na površini viriona. Proteina M in RVG sta vezana na membrano celice, ki se pri izstopanju virusa iz celice uviha in oblikuje ovojnico virusa. Če pride do pomanjkanja proteina RVG, sestavljanje viriona ni popolno in taki virusi niso infektivni, saj nimajo proteinskih peplomer na površini (Murphy in sod., 1973; Matsumoto in sod., 1974; Gosztonyi, 1994). Občasno se lahko pojavi znotrajcelično sestavljanje virusa, ki pridobi svojo ovojnico iz membranskih organelov gostiteljske celice (GA, ER). Tako sestavljeni virusi niso infektivni in preidejo iz celice s procesom sekrecije.

Nukleoprotein je sestavljen iz 450 aminokislin s skupno molekulsko težo 57 kDa. Odsek genoma za nukleoprotein predstavlja najbolj ohranjeno regijo v genomu virusa stekline, zato je primeren za izvajanje epidemioloških študij in ugotavljanje evolucijskih sorodnosti med virusi stekline (Smith in sod., 1992; Nadin-Davis in sod., 1994; Kissi in sod., 1995). Zanesljivo karakterizacijo virusov stekline lahko opravimo s primerjavami aminokislinskih zaporedij nukleoproteina (Sacramento in sod., 1991; Bourhy in sod., 1993). Prav tako je za tipizacijo virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi pomembna sestava aminokislinskega zaporedja nukleoproteina, saj imajo razlike v aminokislinskem zaporedju lahko za posledico tudi razlike v epitopih, kamor se vežejo monoklonalna protitelesa (Flamand in sod., 1980a, 1980b; Dietzschold in sod., 1987; Smith, 1989). Zaradi ohranjenosti nukleoproteina le-tega uporabljajo za proizvodnjo specifičnih konjugatov, ki se uporabljajo v diagnostiki stekline.

Fosfoprotein je sestavljen iz 279 aminokislin in je dobro ohranjena regija virusnega genoma. Po mnenju nekaterih znanstvenikov fosfoprotein sodeluje pri aksonskem prenosu virusa, saj se na fosfoproteinu nahaja vezno mesto za proteina dinein in kinezin. Ta dva proteina predstavljata molekulski motor, ki sodeluje pri hitrem aksonskem prenosu (Jacob in sod., 2000; Raux in sod., 2000). S točkovnimi mutacijami v genomu virusa stekline na

fosfoproteinu so znanstveniki poskušali preprečiti vstop in prenos virusa v osrednji živčni sistem, vendar brez uspeha (Mebatsion, 2001; Tan in sod., 2007). Z omenjenim eksperimentom je bila teorija o ključni vlogi fosfoproteina pri aksonskem prenosu ovržena. Fosfoprotein skupaj z nukleoproteinom predstavlja ključno komponento RNA polimeraznega kompleksa v virionu in deluje kot regulatorni protein pri replikaciji virusa. Kot enota RNA polimeraznega kompleksa (L-P) ima fosfoprotein vlogo kofaktorja v procesu prepisovanja in replikacije virusnega genoma (Chenik in sod., 1994; Fu in sod., 1994). Fosfoprotein deluje tudi kot šaperon nukleoproteina in s tem preprečuje njegovo polimerizacijo in nespecifično vezavo na RNA (Chenik in sod., 1994; Fu in sod., 1994). Najbolj ohranjena regija na fosfoproteinu se nahaja v sredinskem delu med 139. in 170. aminokislino (Conzelmann in sod., 1999).

Protein matriksa je najmanjši izmed proteinov virusa stekline. Sestavljena je iz 202 aminokislin s skupno molekulsko težo 25 kDa (Rayssiguier in sod., 1986; Conzelmann in sod., 1990; Bourhy in sod., 1993; Hiramatsu in sod., 1993). Protein matriksa oblikuje cevast ovoj okrog jedra in služi kot skelet viriona. Protein matriksa daje virionu karakteristično strukturo oblike izstrelka (Barge in sod., 1993; Lyles in sod., 1996), sodeluje pri regulaciji prepisovanja RNA, pri izstopanju virionov iz celice, hkrati je skupaj s proteinom G potreben za učinkovito sestavljanje virusnih delcev (Ito in sod., 1996).

Protein RVG je sestavljen iz 505 aminokislin. Začetnih 19 aminokislin predstavlja signalni peptid (SP) za prenos RVG na membrano zrnatega ER in v GA, kjer se SP odcepi. (Benmansour in sod., 1992; Bourhy in sod., 1993). Trimeri RVG sestavljajo proteinske peplomere na površini viriona. Proteinske peplomere omogočajo pripenjanje virusa na tarčno celico in zlitje virusa s celično membrano. RVG se po vezavi na receptor spremeni v aktivno hidrofobno obliko, ki omogoča vezavo virusa na hidrofobno endosomalno membrano. Aminokislina arginin (Arg -333) ali lizin (Lys -333) v RVG je pomembna za fenotipsko izražanje virulence virusa stekline. Genetske mutacije na RVG imajo pomembno vlogo v virusni patogenezi. Virusne variante, ki imajo glutamin (Glu), izoleucin (Ile), glicin (Gly), metionin (Met) ali serin (Ser) namesto arginina (Arg-333) ali lizina (Lys-333), predstavljajo seve, ki so manj patogeni ali celo nevirulentni za odrasle imunokompetentne

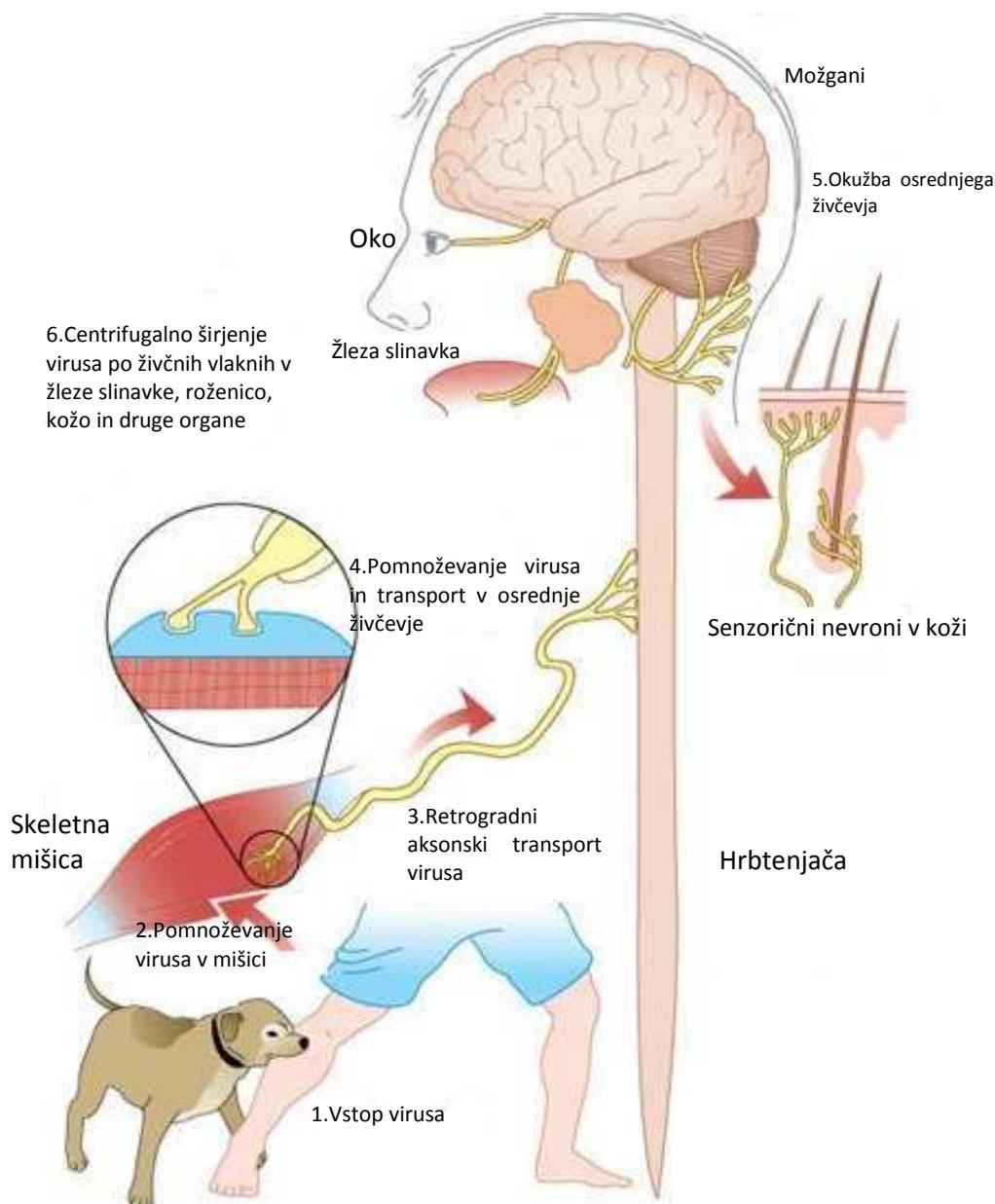
miši (Dietzschold in sod., 1983; Seif in sod., 1985; Tuffereau in sod., 1989). Za indukcijo celične imunosti je RVG najpomembnejši protein virusa stekline. RVG sproži nastanek nevtralizacijskih protiteles in stimulira pomočnike limfocite T in citotoksične limfocite T (Dietzschold in sod., 1988; Benmansour in sod., 1991).

Od RNA odvisna polimeraza RNA je največji protein virusa stekline in je sestavljena iz 2127-2142 aminokislin. Je katalitična enota polimeraznega kompleksa. Skupaj z nekatalitičnim kofaktorjem fosfoproteina je odgovorna za ključne aktivnosti v procesih prepisovanja in replikacije virusa. Iz analize nukleotidnih zaporedij so ugotovili, da od RNA odvisna polimeraza RNA vsebuje ohranjene in variabilne regije (Tordo in sod., 1988; Poch in sod., 1990).

2.3 PATOGENEZA, IMUNOST IN PATHOLOGIJA

Steklina je akutna in neozdravljiva bolezen osrednjega živčevja, ki se konča s smrto (Dietzschold in sod., 2005). Vstopno mesto virusa stekline je običajno poškodovana koža ali sluznica. V podkožje ali mišičje se virus prenese z ugrizom, lizanjem ali praskanjem okužene živali, ki je najpogosteje mesojeda ali netopir (Charlton, 1994). V zelo redkih primerih so mogoči prenos virusa stekline z vdihavanjem kužnega aerosola ali s presaditvijo organov (Gode in Bhide, 1988; Krebs in sod., 1995; Hellenbrand in sod., 2005; Smith in sod., 2006). Virus stekline kaže izrazito nevrotropnost, nevroinvazivnost, vendar se v *in vivo* pogojih na začetku in na koncu okužbe lahko pomnožuje tudi v neživčnem tkivu. Na začetku okužbe se na mestu ugriza virus pomnožuje v mišičnih celicah, nato vstopa v živčni sistem preko motoričnih ali senzoričnih nevronov. V drugem delu okužbe se virus pomnožuje v acinarnih celicah žleze slinavke in se izloča s slino. Po začetnem pomnoževanju na mestu vstopa se virus stekline specifično veže na nikotinske receptorje Ach v živčno-mišičnih stikih (Burrage in sod., 1982) (slika 6). Po vstopu v motorične nevrone potuje s hitrim pasivnim retrogradnim aksonskim transportom s hitrostjo od 12 do 100 mm/dan (Kucera in sod., 1985). Pri transportu izkorišča motorna proteina dinein in kinezin. Transport virusa prekinejo metabolični inhibitorji ali prekinitev živca. Virus se znotraj nevronov intenzivno pomnožuje predvsem v hrbtenjači in osrednjem živčevju, od koder potuje v centrifugalni smeri v

notranje organe. Virus doseže dobro oživčene žleze slinavke in dlačne folikle, respiratorni in prebavni sistem (Krebs in sod., 1995). Tako okuži veliko neživčnih celic, vključno z acinarnimi celicami žleze slinavke, zato je prisoten v slini že pred pojavom kliničnih znakov. Pri mačkah naj bi se virus izločal v slini tri dni pred pojavom kliničnih znakov (Vaughn in sod., 1963), pri netopirjih 12 dni (Baer in Bales, 1967), pri lisicah pa tudi do 29 dni pred pojavom kliničnih znakov (Aubert in sod., 1994).



Slika 6: Patogeneza virusa stekline (Jackson in Johannsen, 2008).

Figure 6: Rabies virus pathogenesis (Jackson and Johannsen 2008).

Med transportom v osrednji živčni sistem poteka pomnoževanje virusa stekline znotraj nevronov, v katerih je nedosegljiv za imunski odgovor. Pri človeku lahko po ugrizu stekle živali zaznamo nevtralizacijska protitelesa šele po pojavu simptomatskega encefalitisa. Nevtralizirajoča protitelesa so usmerjena proti površinskemu RVG virusa stekline. Virus se

izogiba imunskemu odgovoru tudi med transportom iz osrednjega živčnega sistema na periferijo.

Steklina se pri živalih pojavlja z živčnimi znaki in konča s smrtjo. Smrt po okužbi z virusom stekline nastopi kot posledica encefalomielitisa. Okužba limbičnega sistema vpliva na spremenjeno obnašanje živali (agresija, grizenje, nočno aktivne živali postanejo aktivne podnevi, divje živali se ne bojijo človeka). V prizadetem tkivu ni večjih patoloških sprememb in nekroze, območja intenzivnih znakov vnetja pa se ne ujemajo z območji pojavljanja Negrijevih telesc. Virusna okužba najbolj vpliva na metabolične funkcije in prevajanje signalov živčnih celic (Jackson 1991; 2002). Posmrtno lahko ugotavljamo virusni antigen v možganih z imunohistološko metodo, ki omogoča barvanje okuženih nevronov. Med različnimi področji možganov se pojavljajo razlike v intenzitetiobarvanosti (Charlton, 1988). Charlton je ugotovil, da je agresivno vedenje, ki je posledica stekline, kompleksna nevralna disfunkcija nevronov na področju srednjih možganov in nevronov v medialnem hipokampusu, kjer se nahajajo centri za inhibicijo agresivnega vedenja. Makroskopske spremembe encefalomielitisa, ki so posledica okužbe z virusom stekline, so nezaznavne. Možgani so lahko otečeni, v možganskih ovojnicih se lahko pojavi kongestija krvnih žil, posledica tega pa je odpoved respiratornega in srčnega sistema (Iwasaki in Muneshige, 2000).

Histopatološke spremembe so v možganih po okužbi z virusom stekline običajno nezaznavne. Sporadično je opaziti piknozo in nekrozo nevronov. Prav tako se lahko pojavi perivaskularna in subarahnoidalna infiltracija vnetnih celic (Iwasaki in Muneshige, 2000).

Med intenzivnim pomnoževanjem virusa stekline znotraj nevronov se kopijo virusni proteini, ki vodijo v nastanek citoplazemskih vključkov, imenovanih Negrijeva telesca. Pri naravnih okužbah človeka z virusom stekline so Negrijeva telesca prisotna pri od 50 do 70 % primerov (Herzog, 1945; Dupont in Earle, 1965). Negrijeva telesca so velika od 0,25 do 27 µm, velikost se razlikuje tudi med različnimi živalskimi vrstami (Acton in Harvey, 1925; Goodpasture, 1925).

Čeprav steklina velja za smrtno bolezen, so tudi primeri živali in ljudi, ki so bolezen preboleli. Omenjene primere so opisali tudi pri netopirjih iz Trinidada (Pawan, 1936) in Španije (Echevarria in sod., 2001) ter pri psih (Fekadu 1972; 1975). V ZDA so opisali primer stekline pri človeku, ki so ga uspešno ozdravili po protokolu Wisconsin, ki ga je razvil dr. Rodney Willoughby, Jr., dr. med (2005). Latentna oblika stekline brez kliničnih znakov je redka (Remlinger in Bailey, 1940).

2.4 EPIDEMIOLOGIJA

Steklina je zoonoza, prisotna na vseh celinah in ugotovljena že v najmanj 150 državah sveta. Stekline ni v Avstraliji, Novi Zelandiji, na Norveškem in v Veliki Britaniji. Zaradi učinkovitega cepljenja divjih živali narašča število držav, ki jim svetovna zdravstvena organizacija (WHO, angl. World Health Organization) priznava status »država prosta stekline«. Pogoj za pridobitev tega statusa je, da v državi v štirih zaporednih letih ni opisanega primera pri domači ali divji živali, z izjemo netopirjev.

Na različnih geografskih področjih se pojavljajo različni prenašalci stekline. Steklna se pojavlja v dveh oblikah, in sicer kot urbani in silvatični tip stekline. Urbani tip stekline se pojavlja v manj razvitih državah, silvatični tip se pojavlja v razvith in manj razvitih državah. Pri urbanem tipu stekline je glavni prenašalec virusa pes. Zaradi tesnega stika psa s človekom se v razvitih državah za preprečevanje prenosa virusa stekline na človeka v populaciji psov izvaja preventivno cepljenje (Hampson in sod., 2009). Pri silvatičnem tipu stekline je v Evropi glavni prenašalec virusa lisica (*Vulpes vulpes*), v ZDA pa poleg lisice še dihurji (*Mustela putorius*) in rakunji psi (*Nyctereutes procyonoides*) (Krebs in sod., 2003). Tudi v Evropi (na Finskem) so lahko prenašalci virusa rakunji psi (Schuster in sod., 2001; Vos in sod., 2001). Silvatični tip stekline se lahko prenese iz divjih na domače živali in te lahko neposredno ogrožajo zdravje ljudi (Pastoret in sod., 1985).

V začetku štiridesetih let prejšnjega stoletja se je steklina začela širiti iz Poljske v države srednje in zahodne Evrope (Pastoret in Brochier, 1999). Z vsakim letom se je območje epidemije razširilo za od 20 do 60 km. Leta 1967 je epidemija stekline dosegla severozahodni

del Švice in se potem razširila na področje celotne države. Največje število primerov bolezni, povzročenih z RABV, so ugotovili v letih 1975 in 1976 (Breitenmoser in sod., 1994). V sedemdesetih letih se je bolezen širila tudi v ostale evropske države. V drugi polovici leta 1950 so steklino najpogosteje ugotavljali pri lisicah. Zaradi prehoda urbanega tipa stekline v silvatični tip so znanstveniki razvili nove strategije izkoreninjanja bolezni (Muller in Schluter, 1998).

Velika Britanija ima status država prosta stekline. V preteklosti je bila v Veliki Britaniji steklina, povzročena z RABV, razširjena v populaciji psov. Med letoma 1886 in 1903 so zabeležili 3.056 steklih živali. V populaciji divjih živali pa le dva primera, in sicer leta 1856 in leta 1886 v populaciji jelenov (Meldrum, 1988). Država je imela status prosta stekline do leta 1918, ko se je ponovno pojавil urbani tip stekline. Leta 1922 so bolezen izkoreninili (Pastoret in Brochier, 1999) in uvedli šestmesečno karanteno za vse mesojede živali, ki vstopajo v državo. Steklino so v populaciji divjih živali zadnjič ugotovili leta 1886, zato programa peroralnega cepljenja lisic v Veliki Britaniji niso nikoli izvajali. Glede na gostoto lisic nekateri znanstveniki domnevajo, da bo v primeru pojava stekline v populaciji lisic treba uvesti program peroralnega cepljenja lisic (Smith, 1995; Suppo in sod., 2000; Smith in Cheeseman, 2002). Smith (2002) predpostavlja, da se v Veliki Britaniji lahko pojavi silvatični tip stekline tudi v populaciji jazbecev. Nadzor nad steklini sorodnimi virusi v populaciji netopirjev so začeli izvajati leta 1985 in do leta 2011 ugotovili deset netopirjev, pozitivnih na EBLV 2 (Banyard in sod., 2009; baza podatkov Rabies Bulletin Europe). Vrste EBLV 1 v Veliki Britaniji niso nikoli ugotovili, vendar Harris in sodelavci (2009) predvidevajo, da so v državi prisotni tudi virusni sevi vrste EBLV 1, saj so pri netopirjih dokazali specifična nevtralizacijska protitelesa.

Zaradi uspešne izvedbe programa peroralnega cepljenja lisic so v Švici zadnji primer stekline pri lisici ugotovili leta 1996 (Breitenmoser in sod., 2000). Steklino, povzročeno z RABV, so opazili tudi v populaciji psov, zadnji primer je bil leta 1997 pri psu, uvoženem iz Maroka. V letu 2002 so ugotovili tudi primer EBLV 2 pri netopirju (Fooks in sod., 2003).

V vzhodni Nemčiji so ugotovili steklino, povzročeno z RABV, v populaciji lisic leta 1947. Z uvedbo programa peroralnega cepljenja se je število ugotovljenih pozitivnih primerov postopno zmanjševalo iz 5.584 leta 1990 na 12 leta 2006, ko se je steklina pojavila v populaciji lisic zadnjič. V letih 2001, 2002, 2004 in 2005 so v Nemčiji pri štirih lisicah ugotovili tudi cepni sev skupine SAD (Muller in sod., 2009a). RABV so ugotovili tudi pri domačih živalih, zadnji primer je bil leta 2010 pri psu, ki so ga uvozili iz Bosne in Hercegovine (Eismann in sod., 2010). V populaciji netopirjev so ugotovili steklini sorodne viruse vrst EBLV 1 in EBLV 2 že leta 1982. Število ugotovljenih pozitivnih netopirjev se je spremenjalo od 17 primerov do 1 primera letno (vir: baza podatkov Rabies Bulletin Europe).

V Italiji so urbani tip stekline, povzročene z RABV, izkoreninili leta 1973. Prve primere stekline v populaciji divjih živali pa so ugotovili leta 1977 (Mutinelli, 2002). S programom peroralnega cepljenja lisic so steklino izkoreninili že leta 1997, vendar so jo ponovno ugotovili pri lisicah leta 2008 na severovzhodu države ob meji s Slovenijo. Na prisotnost EBLV 1 in EBLV 2 so testirali vzorce 500 živih in 135 pognulih netopirjev, vendar EBLV 1 in EBLV 2 v populaciji netopirjev niso ugotovili (Morganti in Prosperi, 1972; Mutinelli in Vernier 1993).

V Belgiji je bilo pred letom 1986 letno okrog 500 primerov stekline, povzročene z RABV, pri domačih in divjih živalih. Zadnji primer stekline so pri lisici ugotovili leta 1998, zadnji primer pri psu pa leta 2007.

Silvatični tip stekline so v Franciji ugotovili že leta 1968. V letu 1989 je bilo 4.214 pozitivnih primerov. Z uvedbo peroralnega cepljenja lisic se je to število postopoma zmanjševalo. Leta 1998 je bil ugotovljen zadnji primer stekline pri lisici. V populaciji netopirjev so od leta 1989 do 2011 ugotovili 62 primerov netopirjev, okuženih s sevi EBLV 1 (vir: baza podatkov Rabies Bulletin Europe).

V Avstriji so ugotovili steklino, povzročeno z RABV, pri divjih in domačih živalih. Z uvedbo peroralnega cepljenja se je število ugotovljenih pozitivnih lisic zmanjšalo iz 2.514 leta 1990 na dva ugotovljena primera v letu 2000. Zadnji izbruh stekline v populaciji lisic je bil na mejnem področju s Slovenijo v občini Grebinj leta 2002. V Avstriji so ugotovili bolezen,

povzročeno s cepnim sevom skupine SAD, pri dveh lisicah leta 2004 in 2006 (Muller in sod., 2009a).

Prisotnost urbanega tipa stekline, povzročenega z RABV, so na Madžarskem ugotovili že leta 1930. Z izvajanjem preventivnega cepljenja psov so prvi v Evropi izkoreninili urbani tip stekline. Prvi primer silvatičnega tipa stekline je bil ugotovljen leta 1954, število pozitivnih primerov pa se je z uvedbo peroralnega cepljenja lisic postopoma zmanjševalo. Med letoma 1999 in 2011 so v populaciji netopirjev ugotovili skupno pet primerov vrste EBLV 1 (vir: baza podatkov Rabies Bulletin Europe).

Na Hrvaškem so ugotovili RABV pri domačih in divjih živalih že pred letom 1933. Leta 1934 so uvedli preventivno cepljenje psov in urbani tip stekline izkoreninili leta 1967 (Kodrnja, 1969). Silvatični tip stekline so prvič zabeležili leta 1977, od takrat je steklina na Hrvaškem prisotna v populaciji divjih živali.

Med letoma 1946 in 1957 je več kot polovica primerov stekline pri volkovih in več kot tretjina primerov stekline pri lisicah iz področja bivše Jugoslavije izvirala iz Republike Bosne in Hercegovine (Kodrnja, 1959). Z zmanjševanjem števila psov in preventivnim cepljenjem psov so število primerov stekline v tej državi zmanjšali iz 304 leta 1954 na samo 32 v letu 1957 (Kodrnja, 1959). Od 1964 je bila Bosna in Hercegovina prosta urbane stekline, vendar se je zaradi opuščanja preventivnega cepljenja psov pojavil nov val urbane stekline leta 1971 (Rukavina, 1973). Silvatični tip stekline se je razširil iz severnega dela države na celotno območje Bosne in Hercegovine leta 1982 (Djuričić in sod., 1988).

Prvi Pasteurjev inštitut za poizpostavitev terapijo ljudi v Sloveniji so ustanovili v Celju leta 1925 (Milovanović, 1933). Med obema vojnoma pa vse do leta 1954 je bil v Sloveniji razširjen urbani tip stekline predvsem v populaciji psov. Preventivno cepljenje psov proti steklini smo v Sloveniji začeli izvajati z obveznim cepljenjem z odlokom leta 1947 (Ur. List RS 139/2006), ko je bilo cepljenih 97 % psov. Število steklih psov se je v naslednjih letih zmanjševalo iz 133 leta 1946, 126 leta 1947, 26 leta 1948, na 8 primerov leta 1949 (Kodrnja, 1959). Zadnji primer urbane stekline v Sloveniji je bil leta 1954.

Po drugi svetovni vojni se je steklina pojavljala v populaciji divjih in domačih živali na področju celotne bivše Jugoslavije. Prve stekle lisice so na področju te države ugotovili leta 1972 (Petrović, 1974), na področju Slovenije pa septembra leta 1973 (Železnik in Janc, 1997), ko se je pojavila steklina pri lisicah na meji z Madžarsko (Petrović, 1974). Prvi dokazani primer silvatične stekline, povzročene z RABV, smo ugotovili pri rdeči lisici v občini Petrovci, od koder se je steklina razširila po vsem Prekmurju do naravne meje, ki jo je predstavljala reka Mura. Leta 1979 je iz smeri Avstrije na področju Jesenic, Žirovnice in Prevalj ter Raven na Koroškem Slovenijo zajel nov val silvatične stekline, ki se je do leta 1981 razširila po celotnem ozemlju Slovenije (Petrović in sod., 1980; Djuričić in sod., 1988). Steklina se je v Sloveniji pojavljala ciklično z vrhovi leta 1981 (1.766 primerov), 1988 (805 primerov) in 1995 (1.084 primerov). Med letoma 1995 in 2011 je število ugotovljenih pozitivnih primerov upadal in znova naraščalo, dokler v letu 2011 prvič ni bilo nobenega pozitivnega primera (tabela 2). Od leta 1973 do leta 1979 je bila steklina v Sloveniji prisotna le v populaciji divjih živali v Prekmurju, nato se je razširila tudi na druge regije. Med domačimi živalmi je bila v Sloveniji med letoma 1987 in 2011 steklina največkrat ugotovljena pri mačkah (124 primerov) in psih (86 primerov), med divjimi živalmi pa pri lisicah (4.856 primerov) in jazbecih (101 primer) (tabela 2, povzeto iz podatkov Virološkega laboratorija Veterinarske fakultete).

Prvi dokaz steklini sorodnih virusov pri netopirju na področju Evrope je bil ugotovljen leta 1954 (Mohr, 1957). S tipizacijo virusov, opisanih pri netopirjih v Evropi, so ugotovili, da se le-ti razlikujejo od virusov stekline, ugotovljenih pri lisicah (Schneider in Cox, 1994). Prvi opisan primer steklini sorodnega virusa, ugotovljenega pri netopirju, so poimenovali EBLV 1 (Davis in sod., 2005, 2006). Viruse EBLV 1 so ugotovili samo na področju Evrope pri netopirjih vrste pozni netopir (*Eptesicus serotinus*), navadni netopir (*Myotis myotis*), resasti netopir (*Myotis natteri*), veliki podkovnjak (*Rhinolopus ferrumequinum*) in dolgokrili netopir (*Miniopterus schreibersii*) (Serra-Cobo in sod., 2002; Amengual in sod., 2007). EBLV 2 so prvič opisali na Nizozemskem pri netopirju vrste močvirski netopir (*Myotis dasicneme*) (Nieuwenhuijs, 1987). EBLV 2 so ugotovili še v Švici (Amengual in sod., 1997), Veliki Britaniji (Banyard in sod., 2009), Nemčiji (Freuling in sod., 2008) in na Finskem (Jakava-Vijanen in sod., 2010). V ZDA krvosesi netopirji prenašajo RABV, na ostalih kontinentih pa so žežkojedi

netopirji lahko prenašalci ostalih steklini sorodnih virusov. Ugotovljeni so redki primeri (tabela 3), ko so žužkojedi netopirji prenesli steklini sorodne viruse na človeka (Lafon, 2005).

Tabela 2: Pojavljanje stekline pri domačih in divjih živalih v letih 1987–2011 (povzeto iz podatkov Virološkega laboratorija Veterinarske fakultete).

Table 2: Rabies in domestic and wild animals between 1987–2011 (according to data from the Virological laboratory of Veterinary faculty).

Leto	Pes	Mačka	Govedo	Konj	Ostale domače živali	Skupaj domače živali	Lisica	Jazbec	Kuna	Divji prašič	Druge divje živali	Skupaj divje živali	Skupno število primerov
1987	0	1	0	0	0	1	41	1	0	0	0	41	42
1988	14	19	6	1	3	43	716	14	7	0	25	762	805
1989	8	12	6	1	2	29	695	23	7	0	7	732	761
1990	3	7	0	0	0	10	232	1	1	0	2	236	246
1991	0	10	1	0	0	11	175	1	1	0	0	177	188
1992	7	2	1	0	0	10	196	9	12	1	6	224	234
1993	8	13	1	0	1	23	452	13	11	0	7	483	506
1994	12	10	4	1	3	30	750	21	18	0	20	809	839
1995	12	24	2	1	3	42	1001	10	21	0	15	1047	1089
1996	11	14	1	0	0	26	209	1	5	0	6	221	247
1997	1	6	1	0	0	8	18	0	3	0	0	21	29
1998	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	14	14
1999	0	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	5	6
2000	2	2	0	0	0	4	103	3	0	1	3	110	114
2001	7	3	0	0	0	10	117	2	3	0	3	125	135
2002	0	0	0	0	0	0	14	1	0	0	0	15	15
2003	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	8
2004	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2
2005	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	3
2006	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2
2007	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	3
2008	1	0	0	1	0	2	51	2	0	0	0	53	55
2009	0	0	1	0	0	1	34	0	0	0	0	34	35
2010	0	0	1	0	0	1	15	0	0	0	0	15	16
2011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SKUPAJ	86	124	25	5	6	252	4856	101	89	2	11	5142	5394

Leta 2008 smo v Sloveniji začeli ugotavljati prisotnost steklini sorodnih virusov v populaciji netopirjev (Hostnik in sod., 2010). Z metodo FAVN smo na prisotnost protiteles testirali vzorce krvi, z metodo RT-PCR smo testirali vzorce brisov ustne votline odvzetih pri živih netopirjih, pri poginulih netopirjih pa bris lobanjske votline. Leta 2008 smo testirali 219 vzorcev, leta 2009 171 vzorcev, leta 2010 221 vzorcev, leta 2011 pa 160 vzorcev. RNA virusa stekline nismo dokazali v nobenem od preiskovanih vzorcev. Izmed vseh testiranih krvnih vzorcev z metodo FAVN smo jih sedem ovrednotili kot dvomljive, ostali krvni vzorci so bili negativni na prisotnost specifičnih protiteles (povzeto iz podatkov Virološkega laboratorija Veterinarske fakultete).

Zelo redki so primeri prenosa stekline iz človeka na človeka. Poznan je primer prenosa s transplantacijo organov. Zadnji opisani primer se je zgodil v Nemčiji leta 2004, ko so organe darovalca presadili trem prejemnikom, ki so nato umrli zaradi okužbe z virusom stekline. Darovalec je nekaj mesecev pred smrtjo potoval po Indiji, kjer je steklina endemično prisotna (Hellenbrand in sod., 2005).

Tabela 3: Opisani primeri prenosa steklini sorodnih virusov iz netopirjev na človeka (Banyard in sod., 2011).

Table 3: Bat associated human cases of rabies related viruses (Banyard et al., 2011).

Virus	Razširjenost	Vrsta netopirja	Št. primerov pri ljudeh	Referenca
EBLV 1	Evropa	<i>Eptesicus serotinus</i>	5	Roine in sod, 1988; Selimov in sod., 1989; Botvinkin in sod., 2005
EBLV 2	Nizozemska, Švica, Finska, Velika Britanija, Nemčija	<i>Myotis daubentonii</i>	2	Lumio in sod., 1986; Fooks in sod., 2003
ABLV	Avstralija	Ni določeno	2	Allworth in sod., 1996; Hanna in sod., 2000
IRKV	Rusija	<i>Murina lecogaster</i>	1	Belikov in sod., 2009

2.5 PREPREČEVANJE POJAVA STEKLINE PRI LJUDEH

Za preprečevanje pojava stekline pri ljudeh izvajamo pri izpostavljeni populaciji preventivno cepljenje in poizpostavitevno terapijo. Preventivno cepljenje proti virusu stekline je priporočljivo za tiste ljudi, ki pri svojem poklicu prihajajo v stik z domačimi ali divjimi živalmi (veterinarji, delavci v klavnicih, laboratorijsko osebje, biologi, gozdarji, lovci, kmetje). V Sloveniji se za ljudi uporablja cepivo, ki vsebuje inaktiviran virus stekline, sev Pitman-Moore, vzgojen na kulturi humanih diploidnih celic. Program zaščitnega cepljenja je sestavljen iz treh cepljenj. Prvemu cepljenju sledi drugo v razmiku 7. dni in tretje 21. dni po drugem odmerku cepiva. Cepivo je učinkovito proti virusom RABV, EBLV 1, EBLV 2, ABLV (Brookes in sod., 2006), IRKV, ARAV, KHUV (Hanlon in sod., 2005). Slabo je učinkovito proti virusu DUVV, neučinkovito pa proti virusom MOKV, LBV (King in Crick, 1988; Markotter in sod., 2008) in WCBV (Hanlon in sod., 2005).

Poizpostavitevna terapija je v osnovi sestavljena iz treh delov, in sicer iz takojšnje oskrbe rane, infiltracije imunoglobulinov proti virusu stekline okrog rane in cepljenja proti virusu stekline (CDC, angl. Centers for disease control and prevention, 2008). Ugrizno rano ali drugo rano, ki jo je povzročila potencialno stekla žival, je treba sprati z milom in vodo, sledi razkuževanje z virucidnim sredstvom (jodovi preparati). Nadaljnji ukrepi so odvisni od imunskega statusa poškodovanega človeka. Če je oseba že predhodno cepljena proti virusu stekline, sta potrebna oskrba rane in cepljenje z dvema odmerkoma cepiva. Prvi odmerek se aplicira takoj, drugi pa po treh dneh. Pri necepljenih osebah je treba pri oskrbi rane le-to dobro infiltrirati z imunoglobulini proti virusu stekline, ki jih dodatno aplicirajo intramuskularno v deltoidno mišico. Necepljene osebe je treba zaščititi s cepivom v petih ali šestih odmerkih, ki jih aplicirajo po shemi takoj, tretji, sedmi, štirinajsti in trideseti dan ter opcionalno še devetdeseti dan (Stantič Pavlinič in Hostnik, 2002).

Poizpostavitevna terapija ima lahko neželene učinke, kot so slabost in anafilaktični šok (Wilde in sod., 1989). Prav tako poizpostavitevna terapija predstavlja visok strošek v manj razvitih državah, kar je tudi poglaviti razlog, da se jo v Indiji uporabi le v nujnih primerih in jo prejme le 18 odstotkov izpostavljenih oseb (Satpathy in sod., 2005). Poizpostavitevna

terapija v določenih primerih ni bila učinkovita, zlasti pri nepravilni aplikaciji imunoglobulinov proti virusu stekline (Wilde, 2007). Neučinkovita je tudi v primerih, ko je rana na področju glave ali vratu in je virus že vstopil v osrednji živčni sistem (Hooper in sod., 2011).

2.6 PREPREČEVANJE POJAVA STEKLINE PRI DOMAČIH ŽIVALIH

Da bi preprečili pojav urbanega tipa stekline, so po drugi svetovni vojni v večini evropskih držav uvedli obvezno preventivno cepljenje psov proti steklini (Hampson in sod., 2009). V Sloveniji je cepljenje psov obvezno, za ostale domače živali pa priporočljivo. Pse je treba proti steklini cepiti najpozneje ob dopolnjenem tretjem mesecu starosti. Ponovna cepljenja psov je treba opravljati v rokih, ki jih določajo proizvajalci cepiv. Za nadzor izvajanja preventivnega cepljenja je Urad za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) leta 2001 uvedel centralni register psov, starejših od 3. mesecev, psi pa morajo biti označeni z mikročipom (Pravilnik o označevanju živali, veterinarskem spričevalu in veterinarski napotnici, Ur. l. RS 99/2001).

Sum na steklino pri domačih živalih je, kadar živali kažejo klinične znake, na osnovi katerih je mogoče sumiti, da se je pojavila bolezen, ali ko domača žival poškoduje človeka. Veterinarska organizacija v primeru suma bolezni s pisnim navodilom določi osamitev živali, ki kaže klinične znake, vendar ne več kot 10 dni za pse in ne več kot 20 dni za ostale živali. Če žival pogine, mora veterinarska organizacija poslati žival na preiskavo v nacionalni referenčni laboratorij za steklino. Za pse in mačke, ki so poškodovale človeka, vendar ne kažejo kliničnih znakov, mora veterinarska organizacija odrediti desetdnevni nadzor in tri klinične pregledе živali, in sicer prvi, peti in deseti dan po ugrizu. Necepljene pse in mačke, za katere se sumi, da so prišli v stik s steklo živaljo, je treba usmrtiti. Dokazano cepljenim živalim, ki so prišle v stik s steklo živaljo, se mora določiti zaščitni titer protiteles. Če je titer manjši od 0,5 I.E./ml (internacionalnih enot/mililiter), je treba žival ponovno cepiti in opraviti trimesečno veterinarsko kontrolo. Če lastnik ne soglaša s cepljenjem ali trimesečno kontrolo, je treba žival usmrtiti (Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, preprečevanje in zatiranje stekline – Rabies (Lyssa), Ur. l. RS 139/06).

Za nekomercialne premike psov, mačk ali belih dihurjev na Irsko, Švedsko, Veliko Britanijo in Malto sta obvezna evropski potni list za živali, ki potrjuje opravljeno preventivno cepljenje živali proti steklini, in potrdilo o testiranju na protitelesa proti virusu stekline, pri čemer mora biti titer nevtralizacijskih protiteles višji ali enak 0,5 I.E./ml (Ur List RS 25/2008). Testiranje na protitelesa se izvaja vsaj 30 dni po cepljenju oziroma tri mesece pred potovanjem. Za vrnitev v Slovenijo po potovanju znotraj držav članic Evropske unije (EU) ali tretjih držav z ugodnimi razmerami glede stekline se zahteva, da je žival označena in ima evropski potni list, ki potrjuje, da je pes preventivno cepljen. Za vrnitev v Slovenijo po potovanju iz ostalih držav, ki niso na nobeni listi, je treba imeti še potrdilo o testiranju na protitelesa proti virusu stekline (Ur List RS 25/2008).

Na podlagi Odredbe o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja bolezni in cepljenj živali v letu 2012 je v Sloveniji obvezno preventivno cepljenje proti virusu stekline za govedo, drobnico in kopitarje, ki se pasejo na območjih z izrazitim tveganjem za steklino. Cepljenje opravijo tri tedne pred pašo.

2.7 PREPREČEVANJE STEKLINE PRI DIVJIH ŽIVALIH

V Evropi je med divjimi živalmi glavni prenašalec in rezervoar virusa stekline lisica. Sprva so za preprečevanje širjenja stekline uporabljali metodo zmanjševanja populacije lisic (Ballantyne in O'Donoghue, 1954), vendar rezultati niso bili zadovoljivi. Sledil je nov koncept preprečevanja stekline z zniževanjem plodnosti lisic, ki so ga razvili v ZDA (Storm in Sanderson, 1969a; 1969b). Pomanjkljivost tega koncepta je bila slaba specifičnost (Turner in Kirkpatrick, 1996). V sedemdesetih letih so raziskovalci predstavili nov koncept preprečevanja stekline, ki je temeljal na aktivni imunizaciji lisic po peroralni poti (Baer in sod., 1971; Black in Lawson, 1970; Blancou, 1985; Winkler, 1992). Sprva so za ovoj vabe uporabljali piščančjo glavo, kasneje se je sestava ovoja vabe spremenila tako, da vsebuje parafin, loj in ribjo moko (Have in sod., 2002). Vabe za aktivno imunizacijo lisic so danes pripravljene iz plastične kapsule z živim atenuiranim virusom, obdanem z ovojem, ki služi kot atraktant, da lisica vabo poišče. Ovoj vsebuje tudi biomarker tetraciklin, ki se vgradi v zobovje živali, ki vabo zaužijejo. Tetraciklin lahko zaznamo v zobovju živali z

imunofluorescenčnim mikroskopom in tako določimo odstotek vzorčenih lisic, ki so odvzele vabo. Pri grizenju se plastična kapsula predre in cepni virus pride v stik s sluznico. Virus nato vstopi v organizem skozi sluznico ustne votline in žrela.

Prvo uspešno cepljenje lisic v Evropi je bilo izvedeno v Švici leta 1978 (Steck in sod., 1982). Vabe so prvič polagali v kantonu Valais, na področju 1500 m nad morsko gladino, kjer je gostota populacije lisic največja (Steck in sod., 1982). Z desetimi polaganji vab so steklino na tem področju izkoreninili. Vabe so polagali v mesecu marcu in oktobru ročno in s helikopterji, gostota vab je bila $15,5/\text{km}^2$. Za cepljenje so v Švici uporabili atenuirane virusne seve SAD Bern, SAD B19, SAG 1 in SAG 2 (Steck in sod., 1982; Aubert in sod., 1994). Leta 1982 so ugotovili 1.001 pozitivni primer, od tega 652 primerov pri lisicah, leta 1990 pa le 24 pozitivnih primerov pri lisicah, kar je posledica njihovega uspešnega cepljenja (Zanoni in sod., 2000). Zaradi dobrih rezultatov peroralnega cepljenja lisic v Švici so podobne programe zaščite uvedle še druge države, in sicer Nemčija leta 1983, Italija leta 1984, Avstrija, Belgija, Francija in Luksemburg leta 1986, Finska, Nizozemska in Slovenija leta 1988, Češka leta 1989, Madžarska in Slovaška leta 1992 in Poljska leta 1993 (Aubert in sod., 1994; Muller in Schluter, 1988; Železnik in Janc 1997; Vos in sod., 2000). Leta 1994 so peroralno cepljenje lisic izvajali že v 17 državah Evrope. Letno so položili okrog 15 milijonov vab, število ugotovljenih primerov v letu 1994 pa se je zmanjšalo za 20 % glede na število primerov iz leta 1993 (Stohr in Meslin, 1996). Za peroralno cepljenje lisic so v evropskem prostoru najpogosteje uporabili živ atenuiran sev SAD B19 (Brochier in sod., 2001; Pastoret in sod., 2004), ki ima visoko imunogeno aktivnost (Vos in sod., 2000; Neubert in sod., 2001). Virusni sev SAD so izolirali v Alabami leta 1935 pri steklem psu, iz njega pa izhajajo cepni sevi ERA, Vnukovo-32, SAD Bern, SAD B19, SAD-P5/88; SAG-1 in SAG-2. Kljub številnim študijam varnosti cepnih sevov (WHO, 1989; WHO, 2005), ki so pokazale, da je njihova uporaba varna, pa v literaturi zasledimo redke primere stekline po cepljenju (Muller in sod., 2009a). Cepivo, ki vsebuje sev SAD Bern ali SAD B19, je lahko patogeno za glodavce in živali z oslabljenim imunskim sistemom (Pastoret in Brochier, 1999; Vos in sod., 1999; Wandeler, 2000; Have in sod., 2002). Cepni sev, ki se uporablja za peroralno cepljenje lisic, naj ne bi imel nevropatogenih lastnosti, zato ga pri cepljeni živali ne bi smeli najti v možganskem tkivu. Na področju Avstrije in Nemčije so opisali šest primerov, pri katerih so v možganih lisic našli

cepni sev virusa stekline (Muller in sod., 2009a). Vsa cepiva, ki so jih uporabili v teh državah, so vsebovala sev SAD B19, ki ni patogen za ciljno vrsto (lisice). Razlog za pojav bolezni je lahko oslabljen imunski sistem cepljene živali ali sprememba virulence cepnega seva (Muller in sod., 2009a), vendar pa s proučevanjem mutacij in genetske stabilnosti seva SAD B19 skozi več pasaž znanstveniki potrjujejo genetsko stabilnost seva SAD B19 (Beckert in sod., 2009).

Da bi izkoreninili steklino pri rakunjih psih, so leta 1988 na Finskem začeli izvajati program peroralnega cepljenja. Pojave stekline pri rakunjih psih so zmanjšali s polaganjem vab v dveh periodah letno vse do leta 1991 (Metlin in sod., 2008).

V Belgiji so program peroralnega cepljenja lisic proti steklini izvajali od leta 1989 do 1991 le na geografskem področju, na katerem je bila steklina ugotovljena. Posledično se je število ugotovljenih pozitivnih živali zmanjšalo za 80 odstotkov. Med letoma 1992 in 1994 so program peroralnega cepljenja v Belgiji izvajali le še na mejnih področjih z Nizozemsko, Nemčijo, Luksemburgom in Francijo. Posamezne primere stekline so ugotovili med letoma 1994 in 1996 v osrednjem delu države, zato so ponovno začeli izvajati peroralno cepljenje po celotnem ozemlju. Spremenili so tudi strategijo polaganja vab tako, da so vabe polagali z letali v obdobju od novembra do marca, ko je gostota populacije lisic najnižja. Pri tem so uporabljali navigacijski sistem GPS (angl. Global positioning system), zmanjšali so razdalje med zračnimi preleti letal in povečali število vab iz 15 na $17/\text{km}^2$. Zadnji primer stekline so ugotovili leta 1999 (Cliquet in Aubert, 2004).

V Franciji so začeli izvajati program peroralnega cepljenja leta 1989, ko je bilo več kot 4.200 primerov stekline. Program peroralnega cepljenja so izvajali vse do leta 1996, ko se je število pozitivnih primerov zmanjšalo za 99,7 odstotkov glede na leto 1989. Zadnji pozitivni primer so v Franciji ugotovili leta 1998 pri lisici. Program eradikacije stekline je v Franciji požel velik uspeh zaradi dobrega medsosekskega sodelovanja z Belgijo, Luksemburgom in Švico (Cliquet in Aubert, 2004).

V Italiji se peroralno cepljenje izvaja od leta 1984. Polaganje vab je bilo omejeno le na geografska področja, na katerih so ugotovili steklino. Steklino so s peroralnim cepljenjem

izkoreninili v populaciji lisic leta 1995, vendar se je ponovno pojavila leta 2008 na severovzhodu države ob meji s Slovenijo (DeBenedictis in sod., 2009). Oktobra leta 2008 so ugotovili dve stekli lisici v provinci Udine. V letu 2009 se je steklina razširila proti zahodu v regijo Veneto in v letu 2010 zajela še provinci Trento in Bolzano. Zaradi ponovnega pojava stekline v populaciji lisic so ponovno začeli izvajati peroralno cepljenje lisic novembra 2009 (Capello in sod., 2010). Med steklimi živalmi so ugotovili največ lisic, v manjšem številu primerov pa so steklino ugotovili tudi pri jazbecih, jelenih, mačkah in oslih. Največje število pozitivnih živali je bilo v regiji Veneto (Mutinelli, 2010).

V Avstriji so začeli s programom peroralnega cepljenja lisic leta 1986 in v nekaj letih drastično zmanjšali število pozitivnih primerov. Steklina se je ponovno pojavila na mejnem področju s Slovenijo leta 2002, ko so ugotovili 24 pozitivnih živali. Da bi preprečili širjenje stekline med divjimi živalmi, so ponovno uvedli peroralno cepljenje lisic (Vogl, 2002). Zadnji primer stekline pri lisici je bil ugotovljen leta 2006.

Na Madžarskem so uvedli peroralno cepljenje lisic leta 1992. Zaradi peroralnega cepljenja so opazili porast populacije lisic. Ta se je podvojila tudi na področjih, na katerih cepljenja niso izvajali (Miklos in sod., 2000).

Na Hrvaškem so leta 1977 prvič ugotovili silvatični tip stekline. Program peroralnega cepljenja so izvajali med letoma 1991 in 2000, nato so program zaradi pomanjkanja sredstev prekinili. Posledično je naraslo število primerov stekline; leta 2008 jih je bilo 1.061. Ponovna uvedba peroralnega cepljenja v letu 2010 je vplivala na zmanjšanje števila ugotovljenih primerov leta 2011, ko so ugotovili le 375 primerov stekline (vir: baza podatkov Rabies Bulletin Europe).

V Sloveniji smo program peroralnega cepljenja lisic prvič izvedli na področju Gorenjske v jeseni leta 1988 (Hostnik in sod., 2006). V sodelovanju z Avstrijo in Italijo smo pripravili štiriletni program izkoreninjanja stekline v populaciji lisic v smeri od zahoda proti vzhodu. Vabe so med letoma 1988 in 1992 polagali lovci ročno po predhodno izdelanem načrtu.

Ročno polaganje vab se je v Sloveniji izkazalo za uspešno, vendar ne dovolj učinkovito, da bi preprečili pojavljanje stekline (Kovač, 1993).

Uspešnemu prvemu obdobju peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji (Curk in Carpenter, 1994) je sledila druga perioda, ki se je začela leta 1995. Vabe smo tokrat polagali s posebej prilagojenimi športnimi letali iz višine 300–500 m. Sistem polaganja vab se je skozi leta spremenjal, izpopolnjeval z računalniškim nadzorom GPS, da bi dosegli čim boljšo zaščito lisic. Leta 1999 smo program peroralnega cepljenja lisic izvajali na področju celotnega ozemlja Slovenije z izjemo urbanih naselij in področij visokih gora. Leta 2000, ko sta Italija in Avstrija steklino izkoreninili, smo v Sloveniji začeli izvajati polaganje vab le na obmejnem področju s Hrvaško v pasu, širokem 12.500 km². Do leta 2001 smo z letali polagali vabe po vzporednicah v razdalji 1.000 m, gostota izmeta vab pa je bila 18–23 vab na km². Od leta 2001 naprej uporabljamo sistem križnega naleta, s katerim se v peroralno cepljenje zajame večji odstotek lisic kot pri predhodnem sistemu, saj vabe polagamo v vodoravnih in navpičnih linijah preleta letal (Hostnik in sod., 2006). Med letoma 1995 in 2012 smo na ozemlju Slovenije s peroralnim cepljenjem lisic položili več kot 9 milijonov kosov vab za lisice. Program peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji od leta 2009 ponovno izvajamo na področju celotne države zaradi pojava stekline v sosednji Italiji (DeBenedictis in sod., 2009). Program v Sloveniji izvajamo vsako leto v dveh terminih, in sicer spomladji (maja in junija) in jeseni (oktobra in novembra). Sprva smo spomladansko cepljenje izvajali marca in aprila, vendar v tem obdobju ni bilo mogoče zajeti populacije mladih lisic (Hostnik in sod., 2003). Zato so nekateri avtorji raziskav priporočali, da bi spomladansko cepljenje razdelili v dva dela, pri katerem se prvi del cepljenja izvede marca in drugi del konec maja ali začetek junija, ko mlade lisice že iščejo hrano in tako pridejo v stik z vabo (Muller in sod., 1999; Vos in sod., 2001).

V Sloveniji smo od leta 1988 do leta 2006 uporabljali dve vrsti cepiv, in sicer Lysvulpen (Bioveta, Češka), ki vsebuje sev SAD Bern, in Fuchsoral (IDT Biologika GmbH, Nemčija), ki vsebuje sev SAD B19. Zahodno od Ljubljane smo uporabljali cepiva Lysvulpen, vzhodno od Ljubljane pa cepiva Fuchsoral. Po letu 2006 v Sloveniji uporabljamo le eno cepivo – Fuchsoral (Hostnik in sod., 2011).

Za oceno programa cepljenja lisic v Sloveniji izvajamo aktivni in pasivni monitoring. V okviru aktivnega monitoringa UVHVVR financira odlov lisic, katerih možgane testiramo s testom dIF na prisotnost antigena virusa stekline. Pri odlovu lisic se upošteva priporočilo WHO, da je treba vzorčiti vsaj 8 lisic na 100 km^2 . Prav tako se v okviru aktivnega monitoringa določa prisotnost biomarkerja tetraciklina v kosti lisic. V ta namen z žago za rezanje mineralov (Buehler Isomet, Nemčija) pripravimo 1,0 mm debele rezine čeljusti in prisotnost tetraciklina ovrednotimo s fluorescenčnim mikroskopom. V okviru aktivnega monitoringa s testom ELISA testiramo serumske vzorce lisic na prisotnost protiteles proti virusu stekline in tako ocenimo odstotek lisic, ki so po peroralnem cepljenju ustvarile zaščitni nivo protiteles proti virusu stekline.

V okviru pasivnega monitoringa v Sloveniji preverjamo prisotnost stekline pri poginulih živalih. S testom dIF testiramo vzorce možganov poginulih živali na prisotnost antigena virusa stekline. Prav tako v okviru pasivnega monitoringa na prisotnost virusa z metodo IVCK testiramo živali, ki so ugriznile človeka ali pri katerih je bilo ugotovljeno nenavadno obnašanje ali sum na steklino zaradi stika z divjo živaljo.

Hostnik in sodelavci (2011) smo testirali stabilnost vab glede na temperaturo, ki je odvisna od rastlinja na mestu polaganja. Testirali smo vabe, položene na nizko travo, visoko travo in v senco pod drevo in grmičevje. Vabe smo položili ročno v opisane okoliščine in v intervalih nekaj dni vzorce pobirali ter z metodo IVCK določili titer virusa v vabah. Titer virusa v vabah je padel na 0 v 3–4 dneh v nizki travi, v 15–17 dneh v visoki travi in v 45–53 dneh v senčni lokaciji. Razgradnja vab se je pojavila že v prvih 24 urah v nizki travi oziroma v šestih dneh v visoki travi in v senčni lokaciji. V študiji smo ugotovili, da ni primerno polaganje vab v dneh, ko je dnevna temperatura višja od 30°C , saj se pri visokih temperaturah ovoj vabe hitreje razgradi (Hostnik in sod., 2011).

Od leta 1995, ko se je v Sloveniji začelo drugo obdobje peroralnega cepljenja lisic, se je število lisic, pozitivnih na virus stekline, zmanjševalo vsako leto. Leta 1999 je bilo pozitivnih samo pet lisic (tabela 2). Število ugotovljenih primerov stekline se je nato v letih 2000 in 2001 ponovno povišalo na 114 oziroma na 135. V letu 2002 smo ugotovili 15, v letu 2003 pa

8 primerov. Nizko število ugotovljenih primerov stekline je bilo vse do leta 2008, ko se je število steklih živali ponovno povišalo na 55. V istem letu (2008) so prvič po letu 1997 ponovno ugotovili steklino tudi v sosednji Italiji, ki je bila prosta stekline od leta 1997 (DeBenedictis in sod., 2009). Leta 2009 smo v Sloveniji ugotovili 35 primerov, v letu 2010 16, v letu 2011 pa ni bilo nobenega primera stekle živali. Letu 2012 sta bila do konca meseca julija ugotovljena dva primera stekline pri lisicah. Po uvedbi cepljenja lisic na celotnem področju Slovenije večino pozitivnih primerov ugotavljamo v obmejnem področju s Hrvaško, število pozitivnih primerov na steklino se je zmanjšalo (Hostnik in sod., 2011). Izven območja cepljenja smo leta 2008 ugotovili primer stekle lisice v občini Kanal ob Soči v bližini italijanske meje (Hostnik in sod., 2011).

Prvo obdobje izvajanja peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji med 1988 in 1992 ni bilo dovolj učinkovito, da bi bolezen izkoreninili v populaciji lisic. Po začetku polaganja vab s pomočjo letal, ki se je začelo 1995, se je število ugotovljenih primerov stekline zmanjševalo na skupno šest primerov leta 1999. Pri načrtovanju števila položenih vab na km^2 je treba vsako leto število vab prilagajati spremnjanju populacije lisic. Med letoma 2000 in 2001, ko se je povečala populacija lisic, število vab pa je ostalo enako, se je posledično število ugotovljenih primerov stekline povečalo (Hostnik in sod., 2011).

2.8 KLINIČNA SLIKA

Inkubacijska doba bolezni je pri živalih in človeku lahko zelo kratka, do 5 dni, ali pa ekstremno dolga, tudi do več let. V povprečju je inkubacijska doba dolga 20–90 dni. Odvisna je od količine virusa in od mesta ugriza. Inkubacijska doba je krajsa v primerih, ko je mesto ugriza blizu glave, saj je pot virusa do osrednjega živčnega sistema krajsa. Pri človeku je inkubacijska doba po ugrazu stekle živali na področju vrata ali glave 25–48 dni, po ugrazu v zgornjo okončino 46 dni, po ugrazu v spodnjo okončino pa 78 dni (povzeto po Petrovec, 2011).

Bolezen pri divjih in domačih živalih poteka v treh fazah:

- Prodormalna faza traja 1–3 dni. Pojavijo se povišana telesna temperatura, zmanjšan apetit in spremembe v obnašanju živali. V tej fazi nočno aktivne živali postanejo dnevno aktivne.
- Ekscitacijska faza traja 2–4 dni. Kaže se s povečano razdražljivostjo živali, povečane so zenice, pospešen je pulz, pojavi se drhtenje, mišična inkoordinacija (Tepsumethanon in sod., 2005). Živali postanejo nemirne, grizejo premikajoče se objekte (predmete, živali, ljudi), divje živali izgubijo strah pred človekom in zahajajo v naselja.
- Paralitična faza je zadnja faza bolezni in traja 2–4 dni. Živali kažejo znake paralize spodnje čeljusti, grla in žvekalnih mišic. Zaradi nezmožnosti požiranja se pojavi slinjenje. Sledi paraliza okončin, koma in smrt.

Bolezen se pri živalih lahko pojavi v tiki obliki, ki je sestavljena le iz prodormalne in paralitične faze.

Pri netopirjih so opisali klinične znake: mišični krči, drhtenje, agresivno vedenje in dnevna aktivnost (Brass, 1994; Whitby in sod., 2000; Shankar in sod., 2004). Pri netopirjih lahko steklina poteka tudi brez kliničnih znakov (Ronsholt in sod., 1998).

2.9 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

Klinične znake bolezni je pri živalih in človeku po okužbi z virusom stekline težko razlikovati od ostalih okužb osrednjega živčnega sistema. Diferencialna diagnoza pri psih je pasja kuga, pri človeku pa sindrom Guillain-Barre, poliomielitis in ostali virusni encefalitisi (Plotkin, 2000). Postavitev zanesljive dokončne diagnoze je mogoča le z laboratorijsko diagnostiko. S posameznimi metodami lahko ocenimo uspešnosti programa peroralnega cepljenja lisic ter spremljamo epidemiološko situacijo v državi.

Steklino lahko dokažemo z metodami za dokazovanje prisotnosti virusa stekline (IVCK, biološki poskus), metodami za dokazovanje prisotnosti virusnega antiga (dIF, test ELISA) ali

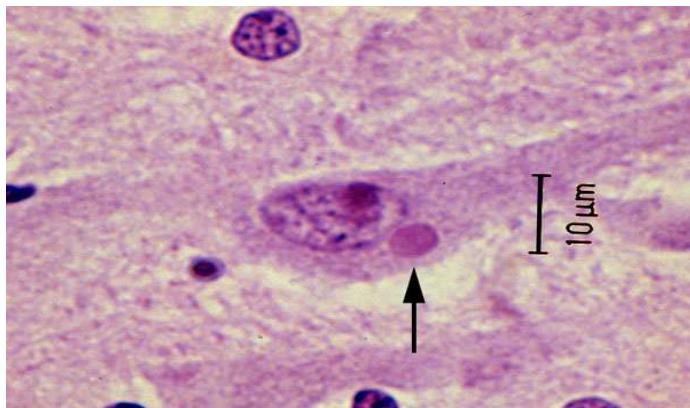
metodami za dokazovanje virusnega genoma (RT-PCR ali RT-PCR v realnem času). V začetnih fazah okužbe lahko z naštetimi testi dobimo lažno negativen rezultat, zato je pomembno, da žival ob sumu osamimo in šele po peginu odvzamemo vzorce za preiskavo. Vsi vzorci, odvzeti pri sumu na steklino, lahko vsebujejo infektiven virus, zato je potrebna posebna previdnost pri rokovovanju z vzorci. WHO (2004) priporoča uporabo zaščitne mikrobiološke komore v laboratoriju 2. varnostne stopnje, za delo z živim virusom z visokim titrom, kot je pri proizvodnji cepiv, pa priporoča uporabo laboratorijskih 3. varnostne stopnje.

WHO (2005) za spremljanje epidemiološke situacije in oceno uspešnosti programa cepljenja lisic priporoča uporabo klasičnih viroloških metod (dIF, ELISA, IVCK, biološki poskus). Uporabo molekularnih metod (RT-PCR, RT-PCR v realnem času) WHO za zdaj priporoča le za potrditev rezultatov klasičnih viroloških metod (Fooks in sod., 2009).

Pred uporabo mikrobioloških metod v diagnostične namene je treba le-te validirati in optimizirati. V okviru optimizacije postopkov je treba preveriti številne parametre, kot so različne koncentracije reagentov in različne temperature inkubacij oziroma pomnoževanja pri molekularnih metodah. Z validacijo testiramo pravilnost, ponovljivost, občutljivost, robustnost in specifičnost metod.

2.9.1 Dokazovanje virusa stekline s histološko in imunohistološko preiskavo

Prisotnost okužbe z virusom stekline lahko dokažemo s histološko ali imunohistološko preiskavo vzorcev. V histoloških rezinah, barvanih po Sellerju (Terkel in Atanasiu, 1996), preverjamo prisotnost Negrijevih teles (slika 7). Negrijeva telesca niso prisotna pri vseh bolnikih in živalih s steklino, kar pomeni, da lahko dobimo lažno negativne rezultate. Pri okužbi z virusom pasje kuge lahko rezultat ocenimo kot lažno pozitiven na virus stekline, saj so znotrajcelične inkluzije zelo podobne Negrijevim telescem (Hamir in sod., 1998). Imunohistološko dokazovanje temelji na uporabi specifičnih označenih protiteles proti virusu stekline. Protitelesa so lahko označena z biotinom, za vrednotenje rezultatov pa potrebujemo le svetlobni mikroskop. Metoda se v sodobnih laboratorijskih ne uporablja več.



Slika 7: Negrijevo telesce (CDC).

Figure 7: Negri inclusion body (CDC).

2.9.2 Test direktne imunofluorescence (dIF) za dokaz virusnih antigenov

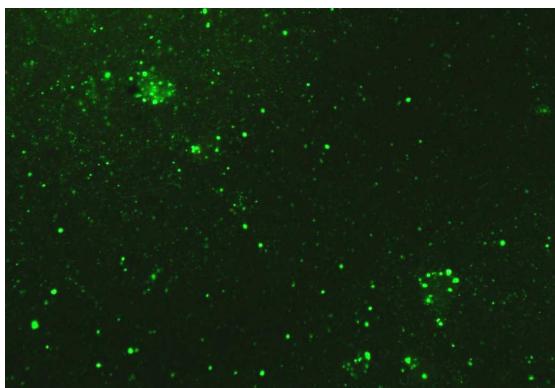
Test dIF sta opisala Goldwasser in Kissling že leta 1958. Po priporočilih WHO (2005) je test dIF standardna in osnovna metoda, ki se uporablja v diagnostiki stekline. Velja za najhitrejšo metodo za dokazovanje virusnih antigenov stekline pri živi živali v biopsatu kože, odtisu roženice ali razmazu možganov (Goldwasser in sod., 1959; Warrel in sod., 1988). Posmrtno lahko s testom dIF dokažemo virusne antigene v možganskem tkivu. Pri pognulih in usmrčenih živalih preiskujemo tkivo Amonovega rogu, možganskega debla, možganskega mostu, podaljšane hrbtenjače in malih možganov. Test temelji na specifični vezavi označenih protiteles na virusni antigen (WHO, 2004).

Test dIF za dokazovanje virusnih antigenov v vzorcu izvedemo tako, da pripravimo odtis ali razmaz na predmetnici, ga fiksiramo s hladnim acetonom ali toploto in nanesemo monoklonalna ali poliklonalna protitelesa, označena s fluorescein izotiocianatom. Rezultate odčitamo s fluorescenčnim mikroskopom (Dean in sod., 1996). Rezultat testa dIF je pozitiven, kadar so v vidnem polju prisotna zelena zrnca različnih velikosti in ostrih robov (slika 8). Če ne najdemo zrnčic, ocenimo rezultat testa dIF za negativen. Vzorce, pri katerih rezultat testa dIF ni jasno pozitiven ali jasno negativen, ovrednotimo dvomljivo. Take vzorce je priporočeno testirati z drugo metodo, saj so Hostnik in sodelavci (2001) ugotovili, da je od 37 vzorcev ovrednotenih dvomljivo 17 reagiralo pozitivno v testu IVCK.

Vzorci možganskega tkiva za preiskavo s testom dIF morajo biti testirani znotraj 48 ur, v nasprotnem primeru jih je treba hraniti v zamrzovalniku pri temperaturi pod –15 °C (CDC, 2006). Odstopanje od predpisanega načina hrانjenja vzorca in večkratno zamrzovanje in tajanje vzorca zmanjša zanesljivost rezultata (CDC, 2006). Pri vzorcih, ki niso hranjeni na predpisani način, negativen rezultat s testom dIF ne izključuje bolezni. Če se v takih vzorcih potrdi prisotnost virusnega antiga, je diagnoza potrjena (CDC, 2006). Rojas in sodelavci (2006) so izvedli poskus tako, da so hranili pozitivne vzorce pri temperaturi 25–27 °C do 26 dni in jih testirali s testom dIF 1., 2., 3., 4., 7., 10., 12., 16., 18., 23. in 26. dan. Pozitiven rezultat so dobili le do 7. dneva.

Vzorci, fiksirani v formalinu, so pogojno primerni za preiskavo s testom dIF, saj se med fiksacijo tvorijo navzkrižne povezave med proteini. Za sprostitev vezi med proteini je fiksirane vzorce v formalinu treba pred analizo s testom dIF obdelati z encimom proteinazo K (Kulonen in sod., 1999).

V zgodnji fazi okužbe z virusom stekline, pred pojavom kliničnih znakov, je število virusnih delcev pod pragom detekcije z metodo dIF, zato lahko dobimo lažno negativne rezultate. V primeru negativnega rezultata pri živali, ki je poškodovala človeka, se priporoča še izvedba IVCK ali biološkega poskusa (Cliquet in Barrat, 2008).



Slika 8: Rezultati testa dIF pri vzorcu, pozitivnem na virus stekline (Virološki laboratorij, Veterinarska fakulteta).

Figure 8: dIF result in rabies positive sample (the Virological laboratory of Veterinary faculty).

2.9.3 Biološki poskus

Z biološkim poskusom na miškah lahko dokazujemo prisotnost infektivnega virusa stekline (Webster in Dawson, 1953; Surreau in sod., 1991). Za biološki poskus najpogosteje uporabljajo sesne miši, kunce, budre, podgane in hrčke. Po priporočilih OIE je treba petim do desetim mišim, starim 3–4 tedne (12–14 g), ali dva dni starim sesnim mišim intracerebralno aplicirati supernatant suspenzije vzorca. 20-odstotno suspenzijo vzorca pripravimo z izotonično raztopino fosfatnega pufra (PBS; angl. phosphate buffered saline), jo centrifugiramo in za biološki poskus uporabimo le supernatant. Vzorci za preiskavo so Amonov rog, mali možgani in podaljšana hrbtenjača (WHO, 2004). 3–4 tedne stare miši, ki jim intracerebralno inokuliramo supernatant, opazujemo 28 dni, možgane vsake poginule miši pa pregledamo s testom dIF. Pri uporabi dva dni starih sesnih miši, le-te žrtvujemo 5., 7., 9. in 11. dan po inokulaciji miši, možgane vsake žrtvovane miši pregledamo s testom dIF. Pogin miši v prvih štirih dneh je lahko posledica stresa ali bakterijske okužbe, pogin od petega dne po inokulaciji je posledica okužbe z virusom stekline.

Z izvedbo biološkega poskusa so povezani visoki stroški, še posebno kadar uporabljam živali, ki so proste specifičnih patogenov (SPF, angl. specific pathogen free). Rezultate dobimo šele po 28 dneh oziroma pri uporabi dva dni starih sesnih miši po 11 dneh. V primeru pozitivnega rezultata z biološkim poskusom pridobimo veliko količino virusa za nadaljnjo tipizacijo virusa.

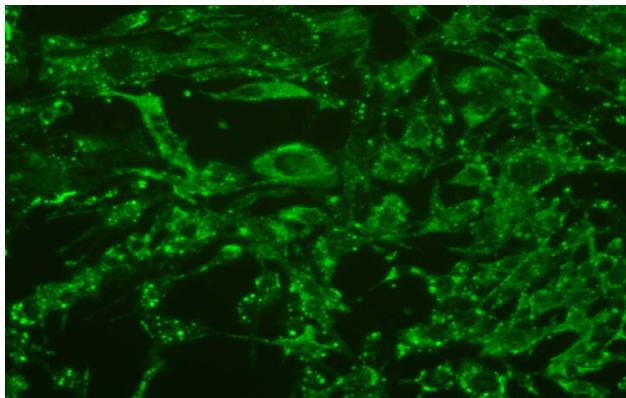
2.9.4 Izolacija virusa stekline na celični kulturi (IVCK)

Z IVCK dokazujemo prisotnost infektivnega virusa stekline v vzorcu tako, da virus namnožimo na celični kulturi. Živalski vzorci, ki jih uporabljam za IVCK, so slina, bris žrela, bris traheje ali bris očesa in cerebrospinalna tekočina. Za dokaz virusa stekline po smrti je najprimernejši vzorec tkiva možganov.

Test IVCK se najpogosteje izvaja na mišjih nevroblastomskeh celicah (N2a, angl. neuroblastoma cells) (American Type Culture Collection, ATCC) (WHO, 2004). Za test IVCK pripravimo suspenzijo vzorca z medijem za gojenje celic. Supernatant te suspenzije

nanesemo na sloj celic ali pa suspenzijo pomešamo s sveže tripsiniziranimi celicami. Sledi inkubacija vsaj štiri dni pri 37 °C in 5 % CO₂. Po inkubaciji celični sloj fiksiramo z acetonom, nato nanesemo monoklonalna ali poliklonalna protitelesa, označena s fluorescein izotiocianatom. Rezultate odčitamo s fluorescentnim mikroskopom. Rezultat IVCK je pozitiven, kadar so v vidnem polju v citoplazmi celic prisotne zelene inkluzije različnih velikosti in ostrih robov (slika 9). Če v citoplazmi celic ni inkluzij, označimo rezultat IVCK za negativen.

Za preiskavo s testom IVCK so primerni le sveži vzorci. Rezultati testa IVCK so lahko lažno negativni pri vzorcih, ki niso hranjeni po priporočilih CDC (Rubb in Trimarchi, 1989).



Slika 9: IVCK na celicah N2a: primer vzorca, pozitivnega na virus stekline (Virološki laboratorij, Veterinarska fakulteta).

Figure 9: Cell culture virus isolation on N2a cells: example of positive sample (the Virological laboratory of Veterinary faculty).

2.9.5 Tipizacija virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi

Prva monoklonalna protitelesa za dokazovanje virusnega antiga sta proizvedla Wiktor in Koprowski (1978). Z njimi so opravili prve tipizacije virusov stekline in steklini sorodnih virusov (Flamand in sod., 1980a, 1980b).

Z monoklonalnimi protitelesi proti nukleoproteinu virusa stekline je mogoče razlikovati med divjimi in cepnimi sevi stekline. Prav tako je z njimi mogoče razlikovati med različnimi vrstami virusov stekline. Za tipizacijo virusov stekline uporabljamo monoklonalna protitelesa

W239.17, W187.5 in MW187.6.1 (Cox in sod., 1992; Diesel in sod., 1995). Tipizacijo virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi lahko izvajamo na fiksiranem odtisu ali razmazu vzorca na predmetnici ali na fiksiranem sloju celic po zaključeni IVCK. Monoklonalna protitelesa (W239.17, W187.5 ali MW187.6.1) se vežejo na antigen virusa stekline, če je le-ta prisoten v preiskovanem vzorcu. Na vezana monoklonalna protitelesa se nato vežejo označena protitelesa (FITC anti-rabies monoclonal globulin; FDI, ZDA). Rezultate ovrednotimo s fluorescenčnim mikroskopom. Vzorce, pri katerih so prisotne zeleno obarvane inkluzije različnih velikosti, ovrednotimo kot pozitivne na virus stekline, vzorce, pri katerih zelenih inkluzij ni, ovrednotimo kot negativne.

2.9.6 Molekularne metode za dokaz nukleinskih kislin virusa stekline

Molekularne metode za dokaz nukleinskih kislin virusa stekline temeljijo na pomnoževanju specifičnega odseka genoma (Remick in sod., 1990). Z uvedbo molekularnih metod v laboratorijsko diagnostiko stekline so skrajšali čas, ki je potreben za zanesljiv dokaz virusa stekline.

Molekularne metode omogočajo tudi hitro genetsko tipizacijo virusa stekline, kar je pomembno zlasti v deželah, kjer se pojavlja več različnih vrst virusov stekline. Z metodo določanja nukleotidnega zaporedja dobimo vpogled v genetsko sorodnost virusov, kar je nujno potrebno za opis epidemiološke situacije na določenem področju (Fooks in sod., 2009).

Molekularne metode so uporabne tudi za pregled vzorcev, ki niso primerno hranjeni (Whitby in sod., 1997; David in sod., 2002; Araujo in sod., 2008), in za arhivske vzorce (Kulonen in sod., 1999). Z molekularnimi metodami lahko preiskujemo tudi vzorce likvorja, ki ni primeren za preiskavo s testom dIF (Crepin in sod., 1998; Noah in sod., 1998).

2.9.6.1 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)

Metodo PCR je zasnoval Kary Mullis leta 1983 (Mullis, 1990). V praksi so metodo začeli uporabljati dve leti pozneje (Saiki in sod., 1985). Leta 1993 je za svoje odkritje Kary Mullis prejel Nobelovo nagrado na področju kemije. Na tržišču so dostopni kompleti kemikalij in aparatur različnih proizvajalcev, ki omogočajo enostavno izvedbo metode PCR v kratkem času (Tang in sod., 1997; Fredricks in Relman, 1999). Metoda je mednarodno priznana in splošno uporabna v rutinski virološki diagnostiki za določanje prisotnosti virusne nukleinske kisline (Mackay in sod., 2002).

Za dokazovanje virusne RNA je treba pred izvedbo PCR virusno RNA prepisati v DNA. Postopek imenujemo reverzna transkripcija.

Pred izvedbo RT-PCR moramo iz vzorca najprej ekstrahirati nukleinske kisline. Poznamo več različnih metod. Pri metodi ekstrakcije izkoriščamo selektivno vezavo RNA na membrano silikatnega gela, ki se nahaja v kolonah. Po vezavi RNA na membrano silikatnega gela sledijo faze spiranja. Na koncu se RNA, vezana na membrano silikatnega gela, eluira v vodno raztopino. Metode ekstrakcije RNA lahko temeljijo tudi na vezavi nukleinskih kislin na površino paramagnetnih delcev, ki jih po vezavi z magnetom ločimo od nečistoč v vzorcu. RNA shranjujemo pri temperaturi pod –50 °C.

Virusno RNA prepišemo v komplementarno DNA (cDNA, angl. complementary DNA) z encimom reverzna transkriptaza, pomnoževanje specifičnih odsekov tarčne cDNA pa izvedemo z encimom DNA polimeraza. Za uspešno pomnoževanje z metodo PCR je potrebno predhodno poznavanje tarčnih delov nukleotidnega zaporedja virusnega genoma (Remick in sod., 1990). Počevanje nukleotidnega zaporedja nam omogoča pravilno izbiro začetnih oligonukleotidov, komplementarnih z zaporedjem začetnega in končnega odseka virusnega genoma, ki ga želimo pomnožiti. Pomnoževanje poteka v več ciklih, vsak cikel pa je sestavljen iz treh korakov: denaturacija DNA, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige. Pri denaturaciji se dvojnovidna DNA razklene in nastaneta dve enovijačni DNA, ki služita kot matrici pri pomnoževanju tarčnega odseka. V drugi fazji se na matrično DNA vežejo začetni oligonukleotidi. V tretji fazji encim polimeraza DNA sintetizira verigo,

komplementarno matrični DNA. Število pomnoženih molekul se v vsakem ciklu podvoji in tako eksponentno narašča (Saiki in sod., 1988).

Največ postopkov RT-PCR za diagnostiko stekline temelji na pomnoževanju odseka na genu za nukleoprotein, ki predstavlja najbolj ohranjen odsek v genomu virusa stekline (Kulonen in Boldina, 1993; Bourhy in sod., 1993, 1999; Ito in sod., 2003). Občutljivost metod povečamo z dodatnim pomnoževanjem produktov RT-PCR s t. i. vgnezdenim PCR (Heaton in sod., 1997; Vasquez-Moron in sod., 2006). Pri metodi vgnezdenega PCR obstaja velika nevarnost kontaminacije med pozitivnimi in negativnimi vzorci in s tem pojav lažno pozitivnih rezultatov (Hughes in sod., 2006).

Po končani reakciji RT-PCR sledi ločevanje produktov z elektroforezo v agaroznem gelu. Velikost specifičnih produktov določimo tako, da jih primerjamo z velikostjo produktov molekularnega označevalca in z velikostjo produkta pozitivne kontrole. Če je prisoten produkt specifične velikosti, je rezultat pozitiven, če produkta ni ali pa je nespecifične velikosti, je rezultat negativen.

Vzorce za preiskavo z metodo RT-PCR hranimo pri temperaturi 4 °C (do dva dni), za daljše hranjenje pa jih zamrznemo (pod –50 °C). Hranjenje pri temperaturi okrog –20 °C ne prepreči razgradnje RNA. Ugotovili so, da se po dveh letih hranjenja na –20 °C razgradi 50 % RNA (Araujo in sod., 2008).

2.9.6.2 Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Metodo RT-PCR v realnem času so prvič uporabili leta 1993 kot nadgradnjo metode RT-PCR. Metoda omogoča sprotno spremljanje količine nastajajočih produktov RT-PCR med pomnoževanjem (Higuchi in sod., 1993). Dokazovanje produktov RT-PCR v agaroznem gelu ni potrebno, kar časovno skrajša postopek dokazovanja virusne nukleinske kisline. Za dokazovanje produktov RT-PCR v realnem času lahko uporabimo specifična barvila, ki se vežejo na dvojnovidno DNA (dsDNA, angl. double stranded DNA) in po osvetlitvi s svetlobo določene valovne dolžine oddajajo fluorescentno svetlobo. Produkte RT-PCR lahko

dokazujemo tudi z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov in sond. Označen začetni oligonukleotid ali sonda se specifično veže na nukleotidno zaporedje tarčnega dela genoma in pri pomnoževanju oddaja fluorescentno svetlobo. Določanje produktov RT-PCR poteka na osnovi merjenja višine signala, ki pri pozitivnih vzorcih med pomnoževanjem eksponentno narašča. Ko količina produktov RT-PCR narašča, se sorazmerno povečuje signal poročevalskega barvila. Rezultat pomnoževanja pri pozitivnih vzorcih se kaže kot krivulja, na kateri je izražena jakost fluorescence poročevalskega barvila v posameznem ciklu pomnoževanja. Krivulja je sestavljena iz treh faz. V prvi fazi je fluorescentni signal poročevalskega barvila zaradi nizke količine produkta RT-PCR pod pragom določljivosti. Druga faza predstavlja eksponentni del krivulje, kjer količina produktov RT-PCR eksponentno narašča. V tretji fazi krivulja doseže t. i. plato, saj se komponente reakcije sčasoma porabijo. V začetnem delu eksponentne faze, kjer začne fluorescenco nastalega produkta naraščati, je prag določljivosti. Število ciklov, ki so potrebni za dvig signala fluorescence nad prag določljivosti, predstavlja vrednost Cq (angl. quantification cycle value). Število kopij tarčne molekule v preiskovanem vzorcu določa, koliko ciklov reakcije bo potrebnih, da bo fluorescentni signal presegel prag določljivosti. Kadar je vrednost Cq visoka, je v vzorcu prisotna nizka količina tarčne nukleinske kisline. Pri negativnih vzorcih ne dobimo krivulje.

Z metodo RT-PCR v realnem času dokazujemo krajše odseke nukleinske kisline, kar zagotavlja večjo občutljivost in specifičnost metode v primerjavi s klasično metodo RT-PCR. Krajši odseki nukleinskih kislin lažje denaturirajo, kar omogoča učinkovito vezavo začetnih oligonukleotidov in sonde za vezavna mesta na tarčnem odseku, prav tako je čas podaljševanja kratkih odsekov krajši (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002).

2.9.6.3 Uporaba DNA-vezalnih barvil za dokazovanje produktov RT-PCR v realnem času

Prvo poznano DNA-vezalno barvilo je etidijev bromid. Danes so v uporabi še barvila SYBR Green I, Sybr Gold, BEBO, BOXTO in druga.

Dokazovanje produktov RT-PCR v realnem času z uporabo od sekvene neodvisnih DNA-vezalnih barvil je cenovno bolj ugodno. Med pomnoževanjem produktov RT-PCR izmerjeni

signal narašča, ko se število novo nastalih dsDNA povečuje. Barvilo se veže v vse nastale dsDNA, tudi v vse nespecifične dsDNA in dimere začetnih oligonukleotidov. Prisotnost nespecifičnih dsDNA in dimerov začetnih oligonukleotidov preverimo po končani reakciji RT-PCR z določitvijo temperature tališča produkta RT-PCR (Kubista in sod., 2006; Mackay, 2007). Temperatura tališča se med različnimi produkti pomnoževanja razlikuje, saj je odvisna od deleža GC, od dolžine produkta RT-PCR in od nukleotidnega zaporedja (Ririe in sod., 1997).

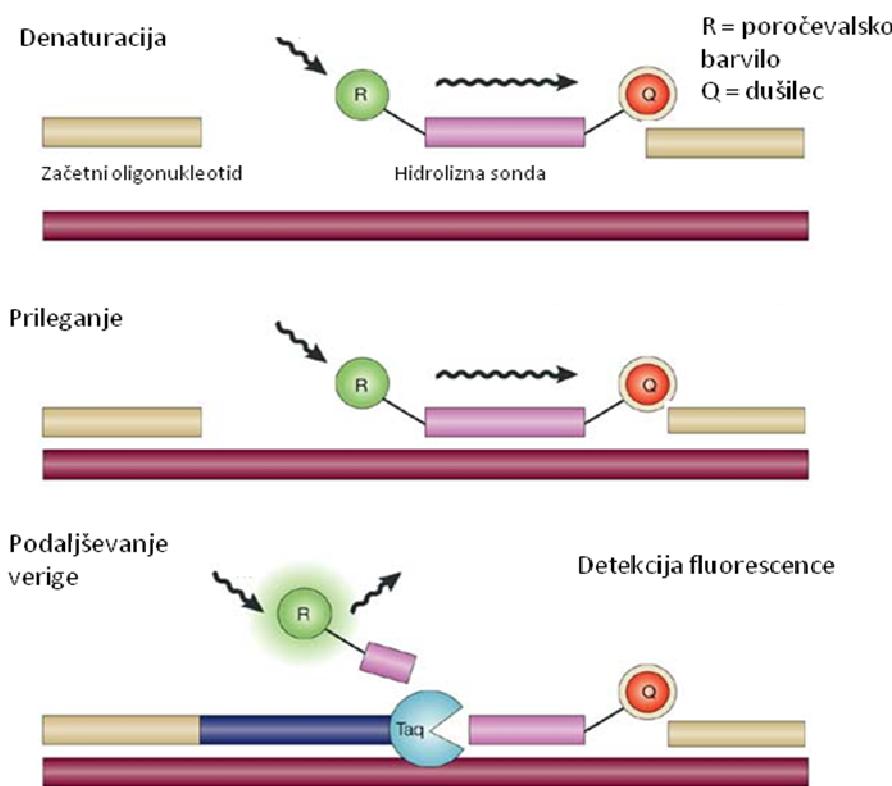
2.9.6.4 Uporaba označenih specifičnih začetnih oligonukleotidov in sond za dokazovanje produktov RT-PCR v realnem času

Za dokazovanje produktov RT-PCR v realnem času se lahko uporablajo označeni specifični začetni oligonukleotidi ali sonde. Pri tej metodi je optimalna dolžina pomnoženega odseka 50–150 bp, vendar dopušča dolžino tudi do 250 bp. Sonda in začetna oligonukleotida se prilegajo nukleotidnemu zaporedju tarčnega odseka genoma, ki ga želimo pomnožiti. Za diagnostične namene izberemo začetna oligonukleotida in sondu v zelo ohranjenem odseku virusnega genoma. Za dokazovanje razlik med virusnimi sevi izberemo sondu na odseku tarčnega genoma, kjer se pojavlja največ razlik med virusnimi sevi. Sonde so lahko označene z dvema barviloma ali z enim samim barvilm (Kubista in sod., 2006).

Hidrolizne sonde ali sonde TaqMan®, molekularne svetilke, hibridizacijske sonde in škorpijoni (Arya in sod., 2005) so označeni z barvilm in dušilcem, ki delujeta kot donor in prejemnik. Energija poteka iz aktivnega donorja na prejemnika, kadar je razdalja med njima 10–100 Å (Kubista in sod., 2006). To je mehanizem fluorescenčnega resonančnega prenosa energije z donorske molekule na prejemnika (FRET, angl. fluorescence resonance energy transfer). Ko se razdalja med poročevalskim barvilm in dušilcem poveča na več kot 100 Å, bodisi zaradi hidrolize sonde ali zaradi strukturne spremembe v sondi, mehanizem FRET preneha delovati in donor začne ob vzbujanju oddajati energijo v obliki fluorescence.

Hidrolizne sonde ali sonde TaqMan® so osnovane tako, da imajo na 5' koncu poročevalsko barvilo, ki oddaja energijo preko mehanizma dušilcu FRET, ki je vezan na 3' koncu (slika 10).

Dušilec je drug fluorofor, ki oddaja prejeto energijo v obliki svetlobe druge valovne dolžine, vendar le-te ne merimo. Pri načrtovanju sonde TaqMan® je priporočena dolžina sonde 20–30 bp, na mestu vezave poročevalskega barvila pa se izogibamo gvaninu, ki deluje kot naravni dušilec. Najprimernejši čas za branje signala je med fazo podaljševanja verige. Metoda RT-PCR v realnem času z uporabo hidroliznih sond je robustna in se velikokrat uporablja pri dokazovanju virusov v veterinarski medicini (Belak, 2007).



Slika 10: Potek RT-PCR v realnem času z uporabo hidrolizne sonde.

Figure 10: Real time RT-PCR using hydrolysing probe.

2.9.6.5 Kvantitativno in kvalitativno določanje produktov RT-PCR v realnem času

Produkte RT-PCR v realnem času lahko določamo kvalitativno in kvantitativno. Kvalitativen pristop določanja produktov RT-PCR v realnem času nam odgovori na vprašanje, ali je nukleinska kislina iskanega organizma prisotna v testiranem vzorcu. Kvalitativno določanje produktov RT-PCR v realnem času uporabljamo tudi v primerih, ko želimo razlikovati med različnimi virusnimi sevi (Wakeley in sod., 2005).

S kvantitativnim pristopom lahko določimo količino iskanega organizma v testiranem vzorcu. Pri tem lahko uporabljamo absolutno in relativno kvantifikacijo. Pri absolutni kvantifikaciji določamo točno število kopij v testiranem vzorcu (Mackay in sod., 2002). S testiranjem serij razredčin standarda pripravimo standardno umeritveno krivuljo, iz katere lahko določimo natančno število kopij. Vrednost Cq je namreč obratno sorazmerna logaritmu začetnega števila tarčnih molekul (Bustin, 2000). Pri metodi kvantifikacije s standardom lahko pride do napak zaradi prisotnosti inhibitorjev v bioloških vzorcih (Nolan in sod., 2006). Drugi princip je relativna kvantifikacija. Pri relativni kvantifikaciji količina standarda ni podana, zato količino tarče določimo glede na izbrani kalibrator.

2.9.6.6 Uporaba metode RT-PCR v realnem času v diagnostiki stekline

Metoda RT-PCR v realnem času je hitra, visoko občutljiva, ponovljiva in specifična (Fooks in sod., 2009). Večina opisanih postopkov RT-PCR v realnem času za dokazovanje virusov stekline temelji na uporabi hidroliznih sond ali sond TaqMan® (Hughes in sod., 2004; Shankar in sod., 2004; Wakeley in sod., 2005; Nagaraj in sod., 2006; Orlowska in sod., 2008; Wacharapluesadee in sod., 2008; Fooks in sod., 2009).

Z metodo RT-PCR v realnem času lahko dokazujemo in razlikujemo vrste EBLV 1, EBLV 2 in RABV (Wakeley in sod., 2005). V objavljenem postopku so za pomnoževanje virusne nukleinske kisline uporabili dva začetna oligonukleotida in tri različne sonde, specifične za posamezno vrsto. Metoda je zelo specifična, kljub temu pa se pojavljajo tudi lažno negativni rezultati pri vzorcih, v katerih se nahajajo virusi, ki na odseku za vezavo sonde nimajo popolnoma komplementarnega zaporedja nukleotidov (Hughes in sod., 2004).

2.9.6.7 Genetsko razvrščanje virusov stekline

Z določanjem nukleotidnega zaporedja lahko ugotavljamo genetske značilnosti virusov stekline in jih razvrščamo v različne razrede. Dobljena nukleotidna zaporedja določenega odseka virusnega genoma primerjamo z nukleotidnimi zaporedji različnih sevov, ki so dostopna v podatkovni banki GenBank. Z metodo primerjanja nukleotidnih zaporedij,

vsakega z vsakim, določimo za vsak par odstotek identičnosti in divergence. Odstotek identičnosti in divergence nukleotidnih zaporedij virusov stekline je kriterij za filogenetsko razvrščanje v razrede znotraj 11 vrst virusov stekline.

Prve filogenetske analize virusov stekline so opravili na odsekih gena za nukleoprotein in nato šele leta 1981 na odsekih gena za RVG (Brookes in sod., 2004). Gena za nukleoprotein in RVG so izbrali, saj njuna produkta izzoveta imunski odziv organizma. Za razlikovanje virusov stekline med različnimi geografskimi področji so znanstveniki določili analizo nukleotidnega zaporedja psevdogena, gena za nukleoprotein, gena za RVG in gena za fosfoprotein (Brookes in sod., 2004). Za natančno genetsko razvrstitev virusov pa so znanstveniki določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov virusov stekline. Ugotovili so, da je nukleoprotein virusa stekline najbolje ohranjen protein in je zato najbolj primeren za filogenetske primerjave (Nadin-Davis in sod., 1994; Kissi in sod., 1995).

Na podlagi proučevanja in primerjanja nukleotidnih zaporedij genov za nukleoprotein virusov stekline iz različnih delov sveta so izdelali tudi filogenetska drevesa, s katerimi so predstavili raznolikost RABV (Badrane in Tordo, 2001; Bourhy in sod., 2008; Kissi in sod., 1995; Nadin-Davis in sod., 2002). Bourhy in sodelavci (1999) so virusnim sevom RABV, dokazanim v Evropi, določili nukleotidna zaporedja odseka na genu za nukleoprotein. Virusne seve so nato razvrstili v štiri razrede. Razrede so poimenovali glede na geografsko lokacijo sevov v razred severozahodnoevropskih sevov, razred zahodnoevropskih sevov, razred vzhodnoevropskih sevov in razred centralnoevropskih sevov. V omenjeni študiji so tudi prvič določili nukleotidno zaporedje dveh slovenskih virusnih sevov 9494SLN (U43008) in 94100SLN (U43009). Sev 9494SLN so ugotovili pri rdeči lisici, sev 94100SLN pa pri konju leta 1994. Slovenska seva so uvrstili v razred zahodnoevropskih sevov (Bourhy in sod., 1999). Podobno razvrstitev virusov stekline iz področja nekdanje Sovjetske zveze so izvedli Kuzmin in sodelavci (2004). Na osnovi nukleotidnih zaporedij odsekov v genu za nukleoprotein so razdelili virusne seve iz nekdanje Sovjetske zveze v razrede A, B, C, D in E (Kuzmin in sod., 2004). Seve, ki so jih opisali na področju Arktike, so glede na nukleotidna zaporedja odsekov v genu za nukleoprotein razdelili v dva razreda, in sicer v razred arktičnih sevov in razred sevov podobnih arktičnim sevom (Mansfield in sod., 2006). Vse analize so pokazale, da se

virusni sevi, ki se pojavljajo na isti geografski lokaciji, uvrščajo v isti razred (Metlin in sod., 2007).

Nadin-Davis in sodelavci (2011) so opravili obsežno primerjavo nukleotidnih zaporedij RABV, opisanih po vsem svetu. Glede na geografsko lokacijo opisanih sevov so seve uvrstili v sedem razredov. Prvi razred so avtohtoni ameriški sevi, opisani pri žužkojedih in krvosesih netopirjih ter pri neletečih sesalcih. Drugi razred so indijski sevi, opisani pri psih, zlasti iz področja južne Indije in Šri Lanke. Tretji razred predstavljajo sevi iz Azije, opisani pri psih iz Kitajske, jugovzhodne Azije, Filipinov in Indonezije. Razred Afrika 2 predstavljajo sevi iz zahodne in centralne Afrike, razred Afrika 3 predstavljajo sevi opisani pri mungih iz južne Afrike. Šesti razred predstavljajo sevi, sorodni arktičnim, opisani pri arktičnih lisicah in psih iz področja centralne in zahodne Azije. Sedmi razred je kozmopolitanski in je opisan pri živalih in ljudeh iz Afrike, Amerike, Srednjega vzhoda in Evrope.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

3.1.1 Vzorci za proučevanje molekularno-epidemioloških značilnosti virusov stekline

V preiskavo smo vključili izbrane vzorce možganov divjih in domačih živali. Vzorci so bili predhodno testirani s testom dIF in opredeljeni kot pozitivni na virus stekline. Izbranih 93 vzorcev izvira iz različnih geografskih področij v Sloveniji, odvzeti pa so bili med letoma 1994 in 2012. Največ pozitivnih vzorcev izvira od lisic (82), preostali vzorci izvirajo od goveda (3), jazbecev (3), psov (2), konja (1), mačke (1) in kune (1). V tabeli 4 so predstavljeni virusni sevi, živalske vrste, geografska lokacija (občina) in leto ugotovitve virusa stekline.

Tabela 4: Vzorci za proučevanje molekularno-epidemioloških značilnosti virusov stekline.

Table 4: Samples for molecular-epidemiological analysis of rabies viruses.

Št. vzorca	Ime virusnega seva	Živalska vrsta	Geografska lokacija (občina)	Leto ugotovitve
1	202-94SVN	govedo	Jesenice	1994
2	498-94SVN	lisica	Ribnica	1994
3	587-94SVN	kuna	Sežana	1994
4	696-15-94SVN	lisica	Ilirska Bistrica	1994
5	709-95SVN	pes	Kamnik	1995
6	882-95SVN	mačka	Cerknica	1995
7	1229-95SVN	lisica	Krško	1995
8	590-96SVN	lisica	Litija	1996
9	1116-00SVN	jazbec	Novo mesto	2000
10	1339-00SVN	lisica	Litija	2000
11	2457-01SVN	lisica	Koper	2001
12	315-02SVN	lisica	Laško	2002
13	664-02SVN	lisica	Videm pri Ptuju	2002
14	199-03SVN	lisica	Brežice	2003
15	1386-04SVN	lisica	Ilirska Bistrica	2004

Št. vzorca	Ime virusnega seva	Živalska vrsta	Geografska lokacija (občina)	Leto ugotovitve
16	675-05SVN	lisica	Polzela	2005
17	1039-06SVN	lisica	Črnomelj	2006
18	1647-07SVN	lisica	Šmarje pri Jelšah	2007
19	117-08SVN	lisica	Majšperk	2008
20	127-08SVN	lisica	Šmarje pri Jelšah	2008
21	177-08SVN	lisica	Majšperk	2008
22	244-08SVN	lisica	Ptuj	2008
23	275-08SVN	lisica	Brežice	2008
24	303-08SVN	lisica	Rogatec	2008
25	332-08SVN	pes	Brežice	2008
26	335-08SVN	lisica	Majšperk	2008
27	339-08SVN	lisica	Mirna Peč	2008
28	347-08SVN	lisica	Majšperk	2008
29	348-08SVN	jazbec	Majšperk	2008
30	413-08SVN	lisica	Šmarje pri Jelšah	2008
31	511-08SVN	lisica	Brežice	2008
32	537-08SVN	lisica	Šentjur	2008
33	543-08SVN	lisica	Cirkulane	2008
34	569-08SVN	lisica	Gorišnica	2008
35	589-08SVN	lisica	Zavrč	2008
36	817-08SVN	lisica	Makole	2008
37	1090-08SVN	lisica	Šmarje pri Jelšah	2008
38	1209-08SVN	jazbec	Videm pri Ptuju	2008
39	1868-08SVN	lisica	Slovenska Bistrica	2008
40	2254-08SVN	lisica	Kanal na Soči	2008
41	2441-08SVN	konj	Videm pri Ptuju	2008
42	2526-08SVN	lisica	Postojna	2008
43	3212-08SVN	lisica	Metlika	2008
44	370-09SVN	lisica	Ilirska Bistrica	2009
45	371-09SVN	govedo	Ilirska Bistrica	2009

Št. vzorca	Ime virusnega seva	Živalska vrsta	Geografska lokacija (občina)	Leto ugotovitve
46	538-09SVN	lisica	Loški Potok	2009
47	806-09SVN	lisica	Majšperk	2009
48	846-09SVN	lisica	Videm pri Ptuju	2009
49	866-09SVN	lisica	Kozina	2009
50	928-09SVN	lisica	Ilirska Bistrica	2009
51	938-09SVN	lisica	Rogaška Slatina	2009
52	940-09SVN	lisica	Rogaška Slatina	2009
53	994-09SVN	lisica	Videm pri Ptuju	2009
54	1010-09SVN	lisica	Loški Potok	2009
55	1085-09SVN	lisica	Koper	2009
56	1123-09SVN	lisica	Ilirska Bistrica	2009
57	1220-09SVN	lisica	Ptuj	2009
58	1223-09SVN	lisica	Makole	2009
59	1229-09SVN	lisica	Loški Potok	2009
60	1262-09SVN	lisica	Loški Potok	2009
61	1263-09SVN	lisica	Loški Potok	2009
62	1282-09SVN	lisica	Metlika	2009
63	1341-09SVN	lisica	Kozina	2009
64	2076-09SVN	lisica	Rogaška Slatina	2009
65	2199-09SVN	lisica	Videm pri Ptuju	2009
66	2201-09SVN	lisica	Rogaška Slatina	2009
67	2203-09SVN	lisica	Središče ob Dravi	2009
68	2204-09SVN	lisica	Sveta Trojica	2009
69	2315-09SVN	lisica	Ljutomer	2009
70	2384-09SVN	lisica	Majšperk	2009
71	2414-09SVN	lisica	Podsreda	2009
72	2415-09SVN	lisica	Rogaška Slatina	2009
73	2440-09SVN	lisica	Šmarje pri Jelšah	2009
74	2660-09SVN	lisica	Majšperk	2009
75	3000-09SVN	lisica	Slovenske Konjice	2009

Št. vzorca	Ime virusnega seva	Živalska vrsta	Geografska lokacija (občina)	Leto ugotovitve
76	3283-09SVN	lisica	Šmarje pri Jelšah	2009
77	3501-09SVN	lisica	Poljčane	2009
78	52-10SVN	lisica	Poljčane	2010
79	755-10SVN	govedo	Žetale	2010
80	1084-10SVN	lisica	Cerknica	2010
81	1327-10SVN	lisica	Rogatec	2010
82	1466-10SVN	lisica	Slovenske Konjice	2010
83	1710-10SVN	lisica	Ptuj	2010
84	1938-10SVN	lisica	Makole	2010
85	2153-10SVN	lisica	Rogaška Slatina	2010
86	2156-10SVN	lisica	Šmarje pri Jelšah	2010
87	4476-10SVN	lisica	Podlehnik	2010
88	5533-10SVN	lisica	Rače	2010
89	5761-10SVN	lisica	Ptuj	2010
90	7288-10SVN	lisica	Rače	2010
91	7448-10SVN	lisica	Podlehnik	2010
92	467-12SVN	lisica	Cirkulane	2012
93	3511-12SVN	lisica	Most na Soči	2012

Z modro so označeni vzorci, pri katerih smo analizirali nukleotidno zaporedje odseka na genu za RVG.

Samples where partial RVG gene was analyzed are labelled with blue colour.

Nukleotidna zaporedja sevov iz podatkovne zbirke GenBank, ki smo jih vključili v filogenetsko primerjavo, so opisana v tabeli 5.

Tabela 5: Nukleotidna zaporedja virusov stekline iz podatkovne zbirke GenBank.

Table 5: Rabies virus nucleotide sequences obtained from GenBank data collection.

Ime	Živalska vrsta	Država	Leto izolacije	Referenca	Koda za odsek na genu za nukleoprotein	Koda za odsek na genu za RVG
08RS-1981/Udine/2008	lisica	Italija	2008	De Benedictis in sod., 2008	FJ424484	-
Dog/09RS-1459/Udine/2009	pes	Italija	2009	-	GQ478245	-
86111YOU	lisica	Bosna in Hercegovina	1986	Bourhy in sod., 1999	U42706	-
8653YOU	volk	Bosna in Hercegovina	1986	Bourhy in sod., 1999	U42704	AF134341
8661FRA	jež	Francija	1984	Bourhy in sod., 1999	U43434	-
9202ALL	lisica	Nemčija	1991	Bourhy in sod., 1999	U42701	AF134338
9244FRA	lisica	Francija	1992	Bourhy in sod., 1999	U42607	AF134342
86106YOU	lisica	bivša Jugoslavija	1972	Kissi in sod., 1995	U22839	-
86107YOU	lisica	bivša Jugoslavija	1976	Bourhy in sod., 1999	U42703	AF134345
SAD B 19	cepivo	-	-	Geue in sod., 2008	EF206709	EF206709
SAD Bern	cepivo	-	-	Geue in sod., 2008	EF206708	EF206708
9339EST	rakunji pes	Estonija	1991	Bourhy in sod., 1999	-	AF134335

3.1.2 Vzorci za ugotavljanje občutljivosti in robustnosti metod dIF, IVCK in RT-PCR

Za primerjavo občutljivosti metod dIF, IVCK in RT-PCR smo izbrali 12 vzorcev možganov, ki so pri rutinski preiskavi s testom dIF reagirali pozitivno na virus stekline (tabela 6). Vzorce smo hranili pri temperaturi pod -15 °C. Tri pozitivne vzorce (1466-10SVN, 2153-10SVN in 2156-10SVN) smo razdelili na dva dela, enega smo hranili pri temperaturi pod -15 °C, drugega pa pri temperaturi pod -50 °C (1466-10SVNa, 2153-10SVNa, 2156-10SVNa). Pripravili smo desetkratne razredčine iz originalnega vzorca (od 10^{-1} do 10^{-10}), tako da smo 1 g posameznega vzorca združili z 10 ml 5-odstotne suspenzije možganov, negativnih na virus stekline, pripravljene z RPMI (Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA).

Za testiranje robustnosti metod dIF, IVCK in RT-PCR smo uporabili dva vzorca možganov, pozitivnih na virus stekline (404-10SVN in 2153-10SVN). Suspenzijo smo pripravili tako, da smo združili 1 g posameznega vzorca in 10 ml RPMI (Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA). Suspenziji smo razdelili na sedem enakih delov in jih nato hranili pri sobni temperaturi 0, 5, 10, 15, 20, 25 in 30 dni.

Tabela 6: Vzorci za primerjavo občutljivosti metod dIF, IVCK in RT-PCR.

Table 6: Samples for comparison of dIF, IVCK, and RT-PCR methods sensitivity.

Zaporedna številka	Ime vzorca možganov	Leto ugotovitve	Hranjen pri temperaturi	Čas hranjenja (v mesecih)
1	1254-00SVN	2000	pod -15 °c	130
2	404-03SVN	2003	pod -15 °c	94
3	2337-03SVN	2003	pod -15 °c	90
4	1386-04SVN	2004	pod -15 °c	74
5	675-05SVN	2005	pod -15 °c	62
6	1090-08SVN	2008	pod -15 °c	36
7	2440-09SVN	2009	pod -15 °c	32
8	3283-09SVN	2009	pod -15 °c	32
9	1327-10SVN	2010	pod -15 °c	20
10	1466-10SVN	2010	pod -15 °c	19
11	2153-10SVN	2010	pod -15 °c	19
12	2156-10SVN	2010	pod -15 °c	17
13	1466-10SVNa	2010	pod -50 °c	19
14	2153-10SVNa	2010	pod -50 °c	19
15	2156-10SVNa	2010	pod -50 °c	17

3.1.3 Referenčni material za validacijo postopkov RT-PCR v realnem času

Za validacijo različnih postopkov RT-PCR v realnem času za dokazovanje in razlikovanje RABV, EBLV 1, EBLV 2 in cepnih sevov virusov stekline smo uporabili skupno 55 vzorcev možganov ali ekstrahirane RNA. Triindvajset vzorcev smo izbrali iz treh medlaboratorijskih testiranj, ki jih je med letoma 2009 in 2011 organiziral Evropski referenčni laboratorij (EURL) za diagnostiko stekline (Nancy, Francija). Devetindvajset vzorcev ekstrahirane RNA smo dobili iz Inštituta Friedricha Loefflerja (Fridrich Loeffler Institut, FLI, Nemčija) v okviru evropske raziskovalne mreže Epizone (<http://www.epizone-eu.net>) v letu 2011. Uporabili smo tudi tri cepiva: Fuchsoral, Lysvulpen in Bio 10. Za validacijo postopkov RT-PCR v realnem času smo uporabili tudi 8 negativnih vzorcev možganov in ekstrahirane RNA, 33 virusnih sevov RABV, 4 virusne seve EBLV 1, 4 virusne seve EBLV 2, 2 virusna seva ABLV in 4 cepne virusne seve (tabela 7).

Tabela 7: Vzorci, uporabljeni za validacijo metod RT-PCR v realnem času.

Table 7: Samples used for real time RT-PCR validation.

Zap. št.	Ime vzorca	Virusni sev	Leto izolacije	Poreklo	Vrsta vzorca
1	7094550	/	/	/	suspenzija možganov
2	7095208	Vrsta EBLV 1	2002	Francija	suspenzija možganov
3	7098627	Vrsta EBLV 2	2002	Velika Britanija	suspenzija možganov
4	7099850	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov
5	7091286	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov
6	7096980	/	/	/	suspenzija možganov
7	7097451	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov
8	L39 5101103	Vrsta ABLV	1997	Australija	suspenzija možganov
9	L39 5101491	/	/	/	suspenzija možganov
10	L39 5104285	/	/	/	suspenzija možganov
11	L39 5104840	Vrsta EBLV 2	2002	Velika Britanija	suspenzija možganov
12	L39 5105609	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov
13	L39 5109291	Vrsta EBLV 1	2002	Francija	suspenzija možganov
14	1103A9845	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov (razredčina 1 : 100)

Zap. št.	Ime vzorca	Virusni sev	Leto izolacije	Poreklo	Vrsta vzorca
15	1103A9973	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov (razredčina 1 : 8)
16	1103A2847	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov (razredčina 1 : 500)
17	1103A4533	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov
18	1103A4376	/	/	/	suspenzija možganov
19	1103B9942	/	/	/	suspenzija možganov
20	1103B2378	Vrsta ABLV	1997	Avstralija	suspenzija možganov
21	1103B7824	Vrsta EBLV 2	2002	Velika Britanija	suspenzija možganov
22	1103B3463	Vrsta RABV	1986	Francija	suspenzija možganov
23	1103B4622	Vrsta EBLV 1	2002	Francija	suspenzija možganov
24	L1	Vrsta RABV	2001	Estonija	RNA
25	L2	Vrsta RABV	1991	Združeni arabski emirati	RNA
26	L3	Vrsta RABV	2006	Afganistan	RNA
27	L4	Vrsta RABV	2009	Irak	RNA
28	L5	Vrsta RABV	1973	Čile	RNA
29	L6	Vrsta RABV	2008	Irak	RNA (razredčitev 1 : 10)
30	L7	/	/	/	RNA
31	L8	Vrsta RABV	1991	Finska	RNA
32	L9	Vrsta RABV	1989	Nigerija	RNA

Zap. št.	Ime vzorca	Virusni sev	Leto izolacije	Poreklo	Vrsta vzorca
33	L10	Vrsta RABV	2006	Afganistan	RNA
34	L11	Vrsta RABV	2009	Irak	RNA
35	L12	Vrsta RABV	1979	Čile	RNA
36	L13	Vrsta RABV	1981	ZDA	RNA
37	L14	Vrsta RABV	1990	Savdska Arabija	RNA
38	L15	Vrsta RABV	1989	Nigerija	RNA
39	L16	Vrsta RABV	2008	Irak	RNA
40	L18	Vrsta EBLV 1	1968	Nemčija	RNA
41	L19	Vrsta RABV	2008	Irak	RNA
42	L20	Vrsta RABV	1995	Bulgarija	RNA
43	L21	Vrsta RABV	1981	ZDA	RNA
44	L22	Vrsta RABV	2008	Irak	RNA
45	L23	Vrsta RABV (cepni sev)	1991	Nemčija	RNA
46	L24	Vrsta EBLV 2	1985	Finska	RNA
47	L25	/	/	/	RNA
48	L26	Vrsta RABV	1985	Kitajska	RNA
49	L27	Vrsta RABV	2008	Irak	RNA (razredčitev 1 : 100)
50	L28	Vrsta RABV	2008	Irak	RNA (razredčitev 1 : 1000)
51	L29	Vrsta RABV	1986	Kanada	RNA
52	L30	Vrsta RABV	2008	Irak	RNA
53	Fuchsoral	Vrsta RABV (cepni sev)	2011	Slovenija	cepivo
54	Lysvulpen	Vrsta RABV (cepni sev)	2005	Slovenija	cepivo
55	Bio 10	Vrsta RABV (cepni sev)	2011	Hrvaška	cepivo

Z rumeno barvo so označeni vzorci vrste RABV in cepni sevi, z zeleno vzorci vrste EBLV 1, z modro vzorci vrste EBLV 2, z oranžno vzorci vrste ABLV, z belo pa negativni vzorci.

Samples containing RABV species and vaccine strains are labelled with yellow, samples containing EBLV 1 are labelled with green, samples containing EBLV 2 are labelled with blue, samples containing ABLV are labelled with orange, negative samples are white.

3.2 METODE

3.2.1 Test direktnje imunofluorescence (dIF)

Uporabljali smo komercialni konjugat proizvajalca Bio Rad (Marnes-la-coquette, Francija) proti nukleoproteinu virusa stekline. Pri vsakem testu smo vključili tudi dve kontroli. Negativno kontrolo (NK) smo pripravili iz možganskega tkiva, negativnega na virus stekline. Pozitivno kontrolo (PK) smo pripravili iz možganskega tkiva, pozitivnega na virus stekline.

Navodila za izvajanje testa dIF:

- Za testiranje robustnosti in občutljivost testa dIF smo pripravili suspenzije vzorcev možganov. Za posamezni vzorec suspenzije možganov smo pripravili dva odtisa z gumijastim zamaškom na predmetno stekelce in ju sušili 15–30 minut v zaščitni mikrobiološki komori pri sobni temperaturi.
- Pripravljeni odtisi na predmetnih stekelcih smo fiksirali 30 minut v hladnem acetonu (pod –15 °C).
- Po fiksaciji smo ponovili postopek sušenja (15–30 minut pri sobni temperaturi).
- Na odtise smo nanesli komercialni konjugat z imenom "Lyophilised, adsorbed Anti-Rabies nucleocapsid conjugate" (Bio Rad, Marnes-la-coquette, Francija). Vzorce s konjugatom smo inkubirali 30 minut v vlažni komori pri temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Konjugat smo sprali z raztopino PBS (angl. phosphate buffered saline), pH = 7,4.
- Predmetna stekelca smo 10 minut spirali v kopeli s PBS, jih nato pazljivo sprali z deionizirano vodo in sušili 10 minut pri sobni temperaturi.
- Na vsak odtis smo dodali kapljico 50-odstotnega glicerola (50 % glicerola in 50 % PBS) in pokrili s krovnim steklcem. Rezultate smo ovrednotili s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse 80i, Japonska) pri povečavi 40 x 10. Vzorce, pri katerih smo ugotovili prisotnost zelenoobarvanih inkluzij različnih velikosti, smo ovrednotili kot pozitivne na virus stekline, vzorce, pri katerih nismo ugotovili zelenoobarvanih inkluzij, smo ovrednotili kot negativne na virus stekline.

3.2.2 Izolacija virusa na celični kulturi (IVCK)

IVCK smo izvajali po navodilih in priporočilih OIE ter EURL-ja za diagnostiko stekline (WHO, 2004). Uporabili smo celično kulturo N2a (ATCC, CCL-131). Za določanje občutljivosti testa IVCK smo testirali razredčine 15 izbranih vzorcev možganov (opisani v tabeli 6). Za določanje robustnosti testa IVCK smo testirali dva vzorca možganov (404-10SVN in 2153-10SVN), ki smo ju hranili pri sobni temperaturi od 0 do 30 dni. Pri izvajanju IVCK smo vključili dve kontroli. NK smo pripravili iz 1 g možganskega tkiva, negativnega na virus stekline, in 10 ml RPMI. PK smo pripravili iz 1 g možganskega tkiva, pozitivnega na virus stekline, in 10 ml RPMI.

Navodilo za izvajanje IVCK:

- Pripravili smo homogeno suspenzijo vzorca možganov, tako da smo združili 1 del vzorca in 9 delov RPMI (Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA). Suspenzijo smo centrifugirali 15 minut pri 25.000 x g in za IVCK uporabili le supernatant.
- Supernatantu smo dodali 1 % mešanice antibiotika in antimikotika (Antibiotic/Antimycotic Solution, Gibco®, Invitrogen CorporationTM, ZDA).
- Tako pripravljene supernatante smo redčili v gojišču za gojenje celic N2a v razmerjih 1 : 2, 1 : 4 in 1 : 8.
- Pripravili smo suspenzijo celic N2a v gostoti 5×10^5 celic/ml.
- V vsako vdolbinico 96-mestne mikrotiterske plošče (TPP, Švica) smo nanesli 200 µl suspenzije celic.
- V vdolbinice s suspenzijo celic N2a smo dodali 100 µl posamezne redčine supernatanta suspenzije vzorca.
- Mikrotiterske plošče smo inkubirali 96 ur pri 37 °C in 5 % CO₂.
- Vsak dan inkubacije smo s svetlobnim mikroskopom preverili stanje celic, morebitni toksični efekt ali kontaminacijo s plesnimi.
- Po končani inkubaciji smo s pipeto odstranili suspenzijo iz vdolbinic. Mikrotitersko ploščo smo sušili 30 minut pri sobni temperaturi v zaščitni mikrobiološki komori.
- Po sušenju smo na sloj celic nanesli 200 µl 85-odstotnega hladnega acetona in inkubirali 30 minut pri temperaturi nižji od -15 °C.

- Aceton smo odstranili in mikrotitersko ploščo sprali s 300 µl raztopine PBS.
- V vsako vdolbinico mikroplošče smo nanesli 50 µl monoklonalnih protiteles FITC anti-rabies monoclonal globulin (FDI, ZDA) proti antigenu virusa stekline, označenih s fluorescein izotiocianatom.
- Rezultate smo ovrednotili s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse 80i, Japonska). Vzorce, pri katerih smo ugotovili prisotnost zeleno obarvanih inkluzij različnih velikosti v citoplazmi celic, smo ovrednotili kot pozitivne na virus stekline, vzorce, pri katerih nismo ugotovili zeleno obarvanih inkluzij, smo ovrednotili kot negativne na virus stekline.

Če smo dobili negativen rezultat, smo pripravili še dve pasaži vzorca na celični kulturi.

3.2.3 Tipizacija virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi

Tipizacijo virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi smo izvajali po postopku, razvitem v Inštitutu Friedricha Loefflerja (Wusterhausen, Nemčija). Za potrjevanje laboratorijskih, cepnih, evropskih lisičjih, pasjih in polarnih sevov ter MOKV, LBV, DUVV in sevov EBLV 1 ali EBLV 2 smo uporabili monoklonalna protitelesa W239.17. Za potrjevanje laboratorijskih, evropskih lisičjih, pasjih in polarnih sevov smo uporabili monoklonalna protitelesa MW187.6.1. Analizirali smo štiri vzorce (537-08SVN, 7448-10SVN, 467-12SVN, 3511-12SVN) in tri kontrole (NK, cepivo SAD B19, PK). NK smo pripravili iz 1 g možganskega tkiva, negativnega na virus stekline, in 10 ml RPMI. PK smo pripravili iz 1 g možganskega tkiva, pozitivnega na virus stekline, in 10 ml RPMI. Najprej smo izvedli IVCK in sloj celic fiksirali s hladnim 85-odstotnim acetonom 30 minut pri temperaturi nižji od -15 °C.

Navodilo za tipizacijo virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi:

- IVCK smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2.
- Fiksiran sloj celic smo sprali s PBS, pH=7,4.
- Nanesli smo 50 µl monoklonalnih protiteles W239.17 v razredčini 1 : 80 oziroma MW187.6.1 v razredčini 1 : 10.
- Sledila je inkubacija 1 uro pri 37 °C in nato spiranje s PBS.

- Nanesli smo označena protitelesa FITC antirabies monoclonal globulin (FDI, ZDA) in inkubirali 1 uro pri 37 °C.
- Sledilo je spiranje s PBS.
- Rezultate smo ovrednotili s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse 80i, Japonska). Vzorce, pri katerih smo ugotovili prisotnost zeleno obarvanih inkluzij različnih velikosti v citoplazmi celic, smo ovrednotili kot pozitivne na virus stekline, vzorce, pri katerih nismo ugotovili zeleno obarvanih inkluzij, smo ovrednotili kot negativne na virus stekline.

3.2.4 Molekularne metode

3.2.4.1 Izolacija RNA

Pred začetkom izolacije RNA smo najprej pripravili homogeno suspenzijo vzorcev možganov v raztopini RPMI (Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA) v razmerju 1 del možganov in 10 delov RPMI. Za izolacijo RNA smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Nemčija). Pri tej metodi se RNA selektivno veže na membrano iz silikatnega gela v koloni, ki je sestavni del kompleta reagentov. S postopkom spiranja odstranimo nečistoče in na koncu z raztopino AVE sprostimo vezano RNA iz kolone v epruveto.

Postopek izolacije smo izvajali po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta reagentov:

- Pripravili smo ustrezno količino mešanice pufra AVL in "Carrier RNA" in jo po 560 µl prenesli v 1,5 ml epruvete (Eppendorf, Nemčija).
- Dodali smo 140 µl pripravljene suspenzije vzorca in vsebino epruvete dobro premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. S postopkom kratkega centrifugiranja smo odstranili vsebino s pokrova epruvete.
- Vsebini epruvete smo dodali 560 µl absolutnega etanola (96–100-odstotnega, Merck, ZDA). Vsebino smo nato premešali in kratko centrifugirali.
- 630 µl mešanice smo nanesli na kolono in centrifugirali 1 minuto pri 6.000 x g. Filtrat v zbirni epruveti smo zavrgli in postopek ponovili.

- Na kolono smo nanesli 500 µl pufra AW1 in centrifugirali 1 minuto pri 6.000 x g. Filtrat smo zavrgli, zamenjali zbirno epruveto in nanesli še 500 µl pufra AW2. Sledilo je centrifugiranje 3 minute pri 20.000 x g.
- Kolono smo prenesli v novo epruveto in na membrano kolone nanesli 60 µl pufra AVE. Sledila je inkubacija 1 minuto in nato centrifugiranje 1 minuto pri 6.000 x g. Kolono smo zavrgli, izolirano RNA pa shranili pri temperaturi nižji od -50 °C.

3.2.4.2 Metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR)

Metodo RT-PCR smo izvajali v eni stopnji. Uporabljali smo komplet komercialnih reagentov One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Germany).

Začetne oligonukleotide so sintetizirali v podjetju Evrofins MWG Synthesis GmbH (Nemčija). Pri vsakem izvajanju RT-PCR smo vključili dve kontroli. NK smo pripravili iz 5 g možganskega tkiva, negativnega na virus stekline, in 50 ml RPMI. PK smo pripravili iz 5 g možganskega tkiva, pozitivnega na virus stekline, in 50 ml RPMI.

Reakcijsko mešanico smo pripravljali v volumnu 25 µl. Reakcijska mešanica je vsebovala:

- 15 µl DEPC vode,
- 5 µl 5 x pufra PCR,
- 1 µl 10 mM mešanice dNTP-jev,
- 0,5 µl 20 pmol/µl vsakega od začetnih oligonukleotidov,
- 1 µl mešanice encimov RT-PCR.

Reakcijski mešanici smo dodali 2 µl izolirane RNA.

Pomnoževanje odsekov na genu, ki kodira nukleoprotein

Nukleotidno zaporedje odseka gena, ki kodira nukleoprotein, smo določili 93 virusnim sevom (tabela 4). Uporabili smo dva para začetnih oligonukleotidov (tabela 8). Par začetnih oligonukleotidov N7 in N4 (Bourhy in sod., 1993) smo uporabili za pomnoževanje 1313 bp dolgega odseka. Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov N4 in N7 v programu pomnoževanja je bila 52 °C.

Par začetnih oligonukleotidov GRAB1F in GRAB1R (Vasquez-Moron in sod., 2006) pa smo uporabili za pomnoževanje 373 bp dolgega odseka v genu za nukleoprotein. Za določitev občutljivosti smo testirali razredčine izbranih 15 vzorcev (opisanih v tabeli 6). Za določitev robustnosti pa smo testirali dva vzorca (404-10SVN in 2153-10SVN), ki smo ju hranili pri sobni temperaturi 0–30 dni. Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov GRAB1F in GRAB1R v programu pomnoževanja je bila 53 °C.

Tabela 8: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odsekov na genu, ki kodira nukleoprotein.

Table 8: Primers for partial nucleoprotein gene amplification.

Ime	Nukleotidno zaporedje v smeri 5' – 3'	Dolžina v nt	Pozicija v genomu (glede na sev PV)
N7	ATG TAA CAC CTC TAC AAT G	19	55-73
N4	GTC TGA TGA TTG GAA CT	17	1368-1352
GRAB1F	AAR ATN GTR GAR CAY CAC AC	20	538-557
GRAB1R	GCR TTS GAN GAR TAA GGA GA	20	911-892

Pomnoževanje odseka v genu, ki kodira terminalni del nukleoproteina in začetni del fosfoproteina

Za pomnoževanje 418 bp dolgega odseka v genu, ki kodira terminalni del nukleoproteina in začetni del fosfoproteina, smo uporabili par začetnih oligonukleotidov N1161P in N1579M (East in sod., 2001). Za pomnoževanje izbranega odseka smo izbrali štiri vzorce (537-08SVN, 7448-10SVN, 467-12SVN, 3511-12SVN) in tri kontrole (NK, cepivo SAD B19, PK). Dobljene produkte smo obdelali z metodo RFLP (opisano v poglavju 3.2.4.6), s katero smo razlikovali med cepnimi in divjimi sevi virusov stekline. Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 56 °C. Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov je opisano v tabeli 9.

Tabela 9: Začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka na genu, ki kodira terminalni del nukleoproteina in začetni del fosfoproteina.

Table 9: Primers for amplification of terminal part of nucleoprotein and initial part of phosphoprotein.

Ime	Nukleotidno zaporedje v smeri 5' – 3'	Dolžina v nt	Pozicija v genomu (glede na sev PV)
N1161P	AAG AAC TTC AAG AAT ACG AGG C	22	1161-1182
N1579M	TTC AGC CAT CTC AAG ATC GG	20	1579-1560

Začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka na genu, ki kodira glikoprotein RVG

Za pomnoževanje v odseku gena, ki kodira RVG, smo uporabili par začetnih oligonukleotidov GH3 in GH4 (Kissi in sod., 1995). S tem parom začetnih oligonukleotidov smo pomnožili 730 bp dolge odseke 30 virusnim sevom (tabela 4). Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov GH3 in GH4 v programu pomnoževanja je bila 56 °C. Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov je navedeno v tabeli 10.

Tabela 10: Začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka na genu za RVG.

Table 10: Primers for partial RVG gene amplification.

Ime	Nukleotidno zaporedje v smeri 5' – 3'	Dolžina v nt	Pozicija v genomu (glede na sev PV)
GH3	CTA ACC ACG ATT ACA CCA TTT	21	3891-3908
GH4	CAA AAT CCT CAG CCT CGT C	19	4621-4602

Pomnoževanje produktov RT-PCR pri vseh štirih postopkih je potekalo v avtomatskem termopomnoževalniku T3 ali T1 (Biometra, Nemčija). Program pomnoževanja se je pri različnih postopkih razlikoval v temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov.

Program pomnoževanja:

- 1 cikel 30 minut pri 50 °C,
- 1 cikel 15 minut pri 95 °C,
- 40 ciklov
 - 15 sekund pri 94 °C,
 - 30 sekund pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov,
 - 1 minuta pri 72 °C,
- 1 cikel 10 minut pri 72 °C,
- ohranjanje reakcije pri 4 °C.

3.2.4.3 Analiza produktov RT-PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Za analizo produktov RT-PCR smo pripravili 1,8-odstotni agarozni gel tako, da smo 100 ml 1 x pufra TAE (Tris-acetat EDTA) dodali 1,8 g agaroze v prahu (Merck, ZDA). S segrevanjem v mikrovalovni pečici smo agarozo raztopili in jo ohlajeno na 50–60 °C zlili v nosilec z nameščenim glavničkom. Po 30 minutah se je gel strdil. Z nosilcem smo ga vstavili v kadičko z 1 x pufrom TAE in odstranili glavniček. V posamezno vdolbinico smo nanesli 12 µl produkta RT-PCR, pomešanega s 3 µl 6-kratnega nanašalnega pufra (0,025 % brom-fenol modro, 0,25 % ksilen cianol, 40 % saharoza v EDTA). V eno vdolbinico smo nanesli molekularni označevalce DNA (GenRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, Nemčija). Elektroforeza je potekala pri napetosti 105 volтов 45 minut. Po končani elektroforezi smo produkte RT-PCR obarvali z etidijevim bromidom tako, da smo vstavili gel v kadičko z raztopino etidijevega bromida (0,5 µg/ml) za 15 minut. Etidijev bromid se je v tem času vezal med baze v dvojni vijačnici DNA. Obarvani gel smo sprali z vodo in ga prenesli v UV-transiluminator E-BOX VX2 (Vilber Lourmat, Nemčija) ter z računalniškim programom in kamero dokumentirali rezultate.

Velikost produktov RT-PCR smo določili s primerjavo velikosti produktov molekularnega označevalca DNA in pozitivne kontrole.

Rezultate smo ovrednotili glede na pričakovano dolžino produkta RT-PCR. Če smo dobili produkt pričakovane velikosti, smo rezultat ocenili kot pozitiven, če produkta ni bilo ali pa je bil nespecifične velikosti, smo rezultat ocenili kot negativen.

3.2.4.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje v odseku gena za nukleoprotein (z začetnima oligonukleotidoma N4 in N7) smo določili 93 virusnim sevom, v odseku gena za RVG pa 30 virusnim sevom (tabela 4). Specifične produkte RT-PCR smo pred določanjem nukleotidnega zaporedja očistili s komercialnim kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Nemčija). Metoda temelji na vezavi molekul DNA na delce silicijevega dioksida v membrani kolone.

Postopek čiščenja produktov RT-PCR smo izvajali po navodilih proizvajalca:

- Po končani elektroforezi v agaroznem gelu smo produkte RT-PCR iz gela izrezali in jih vstavili v 1,5 ml epruvete.
- Izrezane produkte v agaroznem gelu smo stehtali in na 100 mg teže dodali 600 µl pufra QG. Mešanico smo inkubirali 10 minut pri 50 °C v termopomnoževalniku T3 ali T1 (Biometra, Nemčija), pomešali in kratko centrifugirali.
- Na 100 mg gela smo dodali 100 µl izopropanola (Merck, ZDA). Vsebino smo vstavili v kolono in centrifugirali 1 minuto.
- Filtrat smo zavrgli, na kolono dodali 500 µl pufra QG in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi.
- Ponovno smo centrifugirali, zavrgli filtrat in na kolono nanesli 750 µl pufra PE.
- Sledilo je centrifugiranje 1 minuto na 10.000 x g, odstranjevanje filtrata in ponovno centrifugiranje.
- Kolono smo vstavili v čisto 1,5 ml epruveto, dodali 30 µl pufra EB, inkubirali 4 minute pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 minuto.
- Kolono smo po čiščenju zavrgli, filtrat pa ponovno analizirali z elektroforezo na agaroznem gelu in ga do nadaljnje uporabe shranili pri temperaturi pod –15 °C.

Določanje nukleotidnega zaporedja so izvedli v podjetju Macrogen (Amsterdam, Nizozemska).

3.2.4.5 Analiza nukleotidnih zaporedij

Analizirali smo odseke ne genu za nukleoprotein, dolge 1092 nukleotidov, in odseke na genu za glikoprotein, dolge 672 nukleotidov. Kromatografe nukleotidnih zaporedij smo pregledali in uredili s programi SeqMan II in EditSeq, ki so del računalniškega paketa DNASTAR (verzija 5.05; DNASTAR Inc., ZDA). Urejena nukleotidna zaporedja smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji, objavljenimi v podatkovni zbirki GenBank, s spletnim orodjem BLAST (angl. Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Nukleotidna zaporedja slovenskih sevov virusov stekline smo poslali v podatkovno zbirko GenBank, kjer so jim podelili kodo (angl. accession number).

Zaporedja smo poravnali med seboj s programom Clustal X (verzija 1.83) (Thompson in sod., 1997), pri čemer smo izbrali kriterij Neighbour-joining. S programom MegAlign (DNASTAR, ZDA) smo določili odstotek identičnosti in divergence med nukleotidnimi zaporedji. S programi računalniškega paketa Phylip program (Felsenstein, 1989) smo izrisali filogenetska drevesa.

3.2.4.6 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP)

Metodo RFLP smo izvajali po postopku Inštituta Friedricha Loefflerja (Wusterhausen, Nemčija). Z metodo RFLP smo analizirali štiri produkte RT-PCR (537-08SVN, 7448-10SVN, 467-12SVN, 3511-12SVN) in tri kontrole (NK, cepivo SAD B19, PK). Metoda omogoča razlikovanje med cepnimi in divjimi sevi virusa stekline. Produkte RT-PCR v specifični velikosti 418 bp smo razrezali z restrikcijskim encimom *Tsp45I* (NmuCl, Fermentas, Nemčija), ki specifično prepozna zaporedje 5'- GTGAC-3'.

Reakcijska mešanica za RFLP je vsebovala:

- 18 µl vode DEPC,
- 2 µl 10 x pufra B,
- 0,4 µl encima *Tsp45I*.

Reakcijski mešanici smo dodali 2 µl produkta RT-PCR in inkubirali 1 uro pri temperaturi 37 °C. Sledila je inkubacija 20 minut pri 65 °C. Po končani reakciji smo izvedli elektroforezo v agaroznem gelu. Rezultate smo ocenili glede na število in specifično velikost produktov. Če je bil v vzorcu prisoten virusni sev skupine SAD, smo dobili dva produkta velikosti 259 in 159 bp. Pri vzorcih, v katerih so bili prisotni divji sevi virusa stekline, pa smo dobili samo en produkt v velikosti 418 bp.

3.2.4.7 Metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) v realnem času

3.2.4.7.1 Začetni oligonukleotidi in sonde za razlikovanje med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2

Za razlikovanje med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2 smo uporabili postopek po Wakeleyu in sodelavcih (2005). Za dokazovanje RABV, EBLV 1 in EBLV 2 smo uporabili RT-PCR v realnem času z začetnima oligonukleotidoma JW12 in N165-146 (Wakeley in sod., 2005). Pomnoževali smo 100 bp na genu za nukleoprotein. Za razlikovanje med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2 smo uporabili tri sonde (Wakeley in sod., 2005). Sonda LysGT1 je specifična za RABV, sonda LysGT5 za EBLV 1 in sonda LysGT6 za EBLV 2. Sonde smo označili z barvili FAM-TAMRA (LysGT1), Cy5-BHQ2 (LysGT5) in Cy3-BHQ1 (LysGT6). RT-PCR v realnem času smo izvajali v treh ločenih reakcijah.

Pri vseh treh postopkih RT-PCR v realnem času smo uporabili tudi notranjo kontrolo. Kadar smo analizirali isti vzorec z vsemi tremi metodami, smo zaradi znižanja stroškov izvedbe notranjo kontrolo vključili le pri metodi za dokazovanje EBLV 1. Za notranjo kontrolo smo uporabili pomnoževanje gena za β-aktin, ki je prisoten v vseh celicah sesalcev. Uporabili smo

začetna oligonukleotida β -act intronic , β -act reverse in sondu β -act (Wakeley in sod., 2005).

Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov in sond je opisano v tabeli 11.

RT-PCR v realnem času za razlikovanje med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2 smo izvajali v treh ločenih reakcijah, in sicer reakcija za RABV, reakcija za EBLV 1 in β -aktin ter reakcija za EBLV 2.

Tabela 11: Začetni oligonukleotidi in sonde za dokazovanje RABV, EBLV 1 in EBLV 2.

Table 11: Primers and probes for RABV, EBLV 1 and EBLV 2 detection.

Ime	Nukleotidno zaporedje v smeri 5' – 3'	Pozicija v genomu (glede na sev PV)
JW12	ATG TAA CAC CYC TAC AAT G	55-73
N165-146	GCA GGG TAY TTR TAC TCA TA	165-146
LysGT1	FAM-ACA AGA TTG TAT TCA AAG TCA ATA ATC AG- TAMRA	81-109
LysGT5	Cy5-AAC ARG GTT GTT TTY AAG GTC CAT CC-BHQ2	80-105
LysGT6	Cy3-ACA RAA TTG TCT TCA ARG TCC ATA ATC AG-BHQ1	81-109
β act intronic	CGA TGA AGA TCA ART CAT TGC	1051-1072
β act reverse	AAG CAT TTG CGG TGG AC	1204-1188
β -act	JOE-TCC ACC TTC CAG CAG ATG TGG ATC AGC AAG-BHQ1	1128-1157

3.2.4.7.2 Začetna oligonukleotida in sonda za dokazovanje cepnih sevov virusov stekline

Metodo RT-PCR v realnem času za dokazovanje cepnih sevov virusov stekline smo razvili za razlikovanje cepnih in divjih sevov virusov stekline. Nukleotidna zaporedja na genu za nukleoprotein 15 divjih in 3 cepnih sevov virusa stekline, iz podatkovne zbirke GenBank, smo poravnali s programom Clustal X (verzija 1.83) (Thompson in sod., 1997). Poiskali smo odseke na genu za nukleoprotein, na katerih se cepni sevi razlikujejo od divjih sevov. Določili smo tarčno zaporedje za sondu za dokazovanje cepnih sevov. V neposredni bližini tarčnega zaporedja sonde smo poiskali ohranjena mesta za načrtovanje začetnih oligonukleotidov. Pri načrtovanju postopka RT-PCR v realnem času smo upoštevali osnovna priporočila (Bustin, 2004; Mackay in sod., 2007).

Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov in sonde smo uporabljali spletno orodje OligoAnalyzer 3.1 ([IDTSciTools,http://eu.idtdna.com/analyser/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx](http://eu.idtdna.com/analyser/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx)). Preverili smo nastanek sekundarnih struktur in upoštevali termodinamske kriterije. Le-ti določajo, da morajo biti talilne temperature sekundarnih struktur nizke pri prosti Gibbsovi energiji (ΔG), ki ne sme biti nižja od -3 kcal/mol. S programom Primer Express (verzija 2.0) (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) smo preverili ustreznost izbrane kombinacije začetnih oligonukleotidov in sonda. Specifičnost načrtovanih oligonukleotidov in sonda smo preverili *in silico* s poizvedbo v iskalniku BLAST. Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov in sonda, ki smo jih načrtovali, je opisano v tabeli 12.

Tabela 12: Začetna oligonukleotida in sonda za dokazovanje cepnih sevov virusov stekline.

Table 12: Primers and probe for rabies vaccine strains detection.

Ime	Nukleotidno zaporedje v smeri 5' – 3'	Pozicija v genomu (glede na sev PV)
STK V1	TGA GTA CAA GTA CCC TGC C	148-166
STK V2	AAA TAG GAA CAT ACA TCG	291-274
STK V3	FAM- TAA AGC ATA CAA GTC AGT TTT GTC AGG CAT GAG CGC C-TAMRA	220-256

Poudarjeno so označeni nukleotidi, ki so specifični za vakcinalne seve.

Nucleotides indicated in bold are specific for vaccine strains.

3.2.4.7.3 Enostopenjski RT-PCR v realnem času

Za izvajanje RT-PCR v realnem času smo uporabljali komercialni komplet reagentov SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen) in aparaturo MX3005P (Stratagene). Reakcijsko mešanico za en vzorec smo pripravili v volumnu $24\text{ }\mu\text{l}$, ki smo mu dodali $1\text{ }\mu\text{l}$ izolirane RNA.

Reakcijska mešanica za dokazovanje RABV je vsebovala:

- $7,5\text{ }\mu\text{l}$ vode DEPC,
- $12,5\text{ }\mu\text{l}$ 2 x reakcijske mešanice,
- $0,5\text{ }\mu\text{l}$ 50mM MgSO_4 ,

- 1 µl začetnega oligonukleotida JW12 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida N165-146 (20 pmol/µl),
- 0,5 µl sonde LysGT1 (5 pmol/µl),
- 0,5 µl referenčnega barvila ROX, redčenega 1 : 10,
- 0,5 µl mešanice encimov SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix.

Reakcijska mešanica za dokazovanje EBLV 1 in β-actina je vsebovala:

- 4,5 µl vode DEPC,
- 12,5 µl 2 x reakcijske mešanice,
- 0,5 µl 50 mM MgSO₄,
- 1 µl začetnega oligonukleotida JW12 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida N165-146 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida β-act intronic (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida β-act reverse (20 pmol/µl),
- 0,5 µl sonde LysGT5 (5 pmol/µl),
- 0,5 µl sonde β-act (5 pmol/µl),
- 0,5 µl referenčnega barvila ROX, redčenega 1:10,
- 0,5 µl mešanice encimov SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix.

Reakcijska mešanica za dokazovanje EBLV 2 je vsebovala:

- 7,5 µl vode DEPC,
- 12,5 µl 2 x reakcijske mešanice,
- 0,5 µl 50 mM MgSO₄,
- 1 µl začetnega oligonukleotida JW12 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida N165-146 (20 pmol/µl),
- 0,5 µl sonde LysGT6 (5 pmol/µl),
- 0,5 µl referenčnega barvila ROX, redčenega 1:10,
- 0,5 µl mešanice encimov SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix.

Reakcijska mešanica za dokazovanje cepnih sevov je vsebovala:

- 7,5 µl vode DEPC,
- 12,5 µl 2 x reakcijske mešanice,
- 0,5 µl 50 mM MgSO₄,
- 1 µl začetnega oligonukleotida STK V1 (20 pmol/µl),
- 1 µl začetnega oligonukleotida STK V2 (20 pmol/µl),
- 0,5 µl sonde STK V3 (5 pmol/µl),
- 0,5 µl referenčnega barvila ROX, redčenega 1 : 10,
- 0,5 µl mešanice encimov SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix.

Pomnoževanje je potekalo:

- reverzna transkripcija 15 minut pri 50 °C,
- denaturacija 2 minuti pri 95 °C,
- 45 ciklov pomnoževanja
 - 15 sekund 95 °C,
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov in sond.

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov in sond je bila za RT-PCR v realnem času za dokazovanje cepnih sevov 60 °C, za dokazovanje RABV, EBLV 1 in β-aktina ter za dokazovanje EBLV 2 55 °C.

3.2.4.7.4 Določanje optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond

Za posamezno metodo RT-PCR v realnem času smo določili optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde v posamezni reakcijski mešanici. Uporabili smo referenčne virusne seve 1103B3463, 1103B4622, 1103B7824 in SAD B19. Matrika različnih kombinacij koncentracij začetnih oligonukleotidov in sonde je prikazana v tabeli 13.

Pri določanju optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde za posamezni postopek RT-PCR v realnem času smo izbrali tisto, ki je med pomnoževanjem izražala najvišjo normirano fluorescenco poročevalskega barvila (ΔRn) pri najnižji vrednosti Cq.

Tabela 13: Testirane koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde.

Table 13: Tested primers and probe concentration.

Koncentracija začetnega oligonukleotida (v pmol/μl)	Koncentracija sonde (v pmol/μl)
200	50
400	50
800	50
200	100
400	100
800	100
200	200
400	200
800	200

Z modro je označena optimalna koncentracija začetnih oligonukleotidov in sond.

Optimal primers and probe concentration is labelled with blue colour.

3.2.4.7.5 Določanje optimalne koncentracije MgSO₄

Optimalno koncentracijo MgSO₄ smo določali za štiri ločene postopke RT-PCR v realnem času, in sicer za dokazovanje RABV, za dokazovanje EBLV 1 in β-aktina, za dokazovanje EBLV 2 ter za dokazovanje cepnih sevov. Preverili smo vpliv različnih koncentracij MgSO₄: 4 pmol/μl, 5 pmol/μl in 6 pmol/μl. Uporabili smo referenčne virusne seve 1103B3463, 1103B4622, 1103B7824 in SAD B19. Izbrali smo tisto koncentracijo MgSO₄, pri kateri je bila vrednost ΔRn najvišja in vrednost Cq najnižja.

3.2.4.7.6 Preverjanje pravilnosti, specifičnosti in zanesljivosti metode RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV, EBLV 1, EBLV 2 in cepnih sevov

Pravilnost postopkov RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV, EBLV 1, EBLV 2 in cepnih sevov smo preverjali s 55 vzorci, opisanimi v tabeli 7. Rezultat smo ocenili kot pravilen, kadar smo z metodo RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV, ali EBLV 1, ali EBLV 2 ,ali cepnih sevov dobili pozitiven rezultat pri vzorcih, ki so vsebovali virusne seve vrste RABV, ali EBLV 1, ali EBLV 2, ali cepne seve. Rezultat smo ocenili kot nepravilen, kadar smo dobili negativen

rezultat pri vzorcih, ki so vsebovali virusne seve vrste RABV, ali EBLV 1, ali EBLV 2, ali cepne seve. Rezultat smo ocenili kot nepravilen tudi, ko smo dobili pozitiven rezultat pri vzorcih, ki niso vsebovali virusnih sevov vrste RABV ali EBLV 1 ali EBLV 2 ali cepnih sevov.

3.2.4.7.7 Preverjanje ponovljivosti rezultatov RT-PCR v realnem času

Ponovljivost rezultatov postopkov RT-PCR v realnem času smo preverili tako, da smo primerjali rezultate osmih zaporednih preiskav znanega referenčnega virusnega seva. Za dokazovanje RABV smo uporabili referenčni virusni sev 1103B3463, za dokazovanje EBLV 1 referenčni virusni sev 1103B4622, za dokazovanje EBLV 2 referenčni virusni sev 1103B7824, za dokazovanje cepnih sevov pa virusni sev SAD B19. V enem poskusu smo posamezno reakcijo ponovili osemkrat in iz vrednosti Cq med ponovitvami izračunali standardno deviacijo (SD) ter iz nje koeficient variacije (KV).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - X_p)^2}{N - 1}}$$

$$KV = \frac{SD}{X_p} \times 100$$

X_i = vrednost posamezne meritve,

N = število meritev,

X_p = povprečna vrednost meritev.

3.2.4.7.8 Določitev meje zaznavnosti postopkov RT-PCR v realnem času

Mejo zaznavnosti RT-PCR v realnem času smo določili tako, da smo testirali 10-kratne razredčine referenčnih virusnih sevov 110B3463, 110B4622, 110B4622, 110B7824 in cepnega seva SAD B19 v štirih ponovitvah. Mejo zaznavnosti smo izračunali po metodi za določanje titra virusa, ki sta jo opisala Reed in Muench (1938). Za posamezni postopek smo iz regresijske krivulje izračunali tudi učinkovitost reakcije po formuli:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{K}\right)} - 1$$

K = naklon regresijske premice.

3.2.4.7.9 Preverjanje robustnosti postopkov RT-PCR v realnem času

Iz referenčnih virusnih sevov 110B3463, 110B4622, 110B4622, 110B7824 in cepnega seva SAD B19 smo pripravili homogene suspenzije (1 : 10), ki smo jih razdelili na sedem enakih delov. Serijo sedmih vzorcev smo nato hranili pri sobni temperaturi 0, 5, 10, 15, 20, 25 in 30 dni. Vzorce smo testirali s postopki RT-PCR v realnem času in ovrednotili rezultate kot pozitivne ali negativne.

3.2.4.7.10 Določanje diagnostične specifičnosti in občutljivosti postopkov RT-PCR v realnem času

Na osnovi preverjanja pravilnosti postopkov RT-PCR v realnem času smo določili število pravilno opredeljenih rezultatov in nepravilno opredeljenih rezultatov, to je število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Za vsak postopek smo nato izračunali diagnostično specifičnost in diagnostično občutljivost.

Diagnostično specifičnost metode smo izrazili kot odstotek znano negativnih vzorcev, pri katerih je bil rezultat negativen. Enačba za izračun diagnostične specifičnosti:

$$\text{Diagnostična specifičnost} = \frac{\text{pravilni negativni rezultati}}{(\text{pravilni negativni rezultati} + \text{lažno pozitivni rezultati})}$$

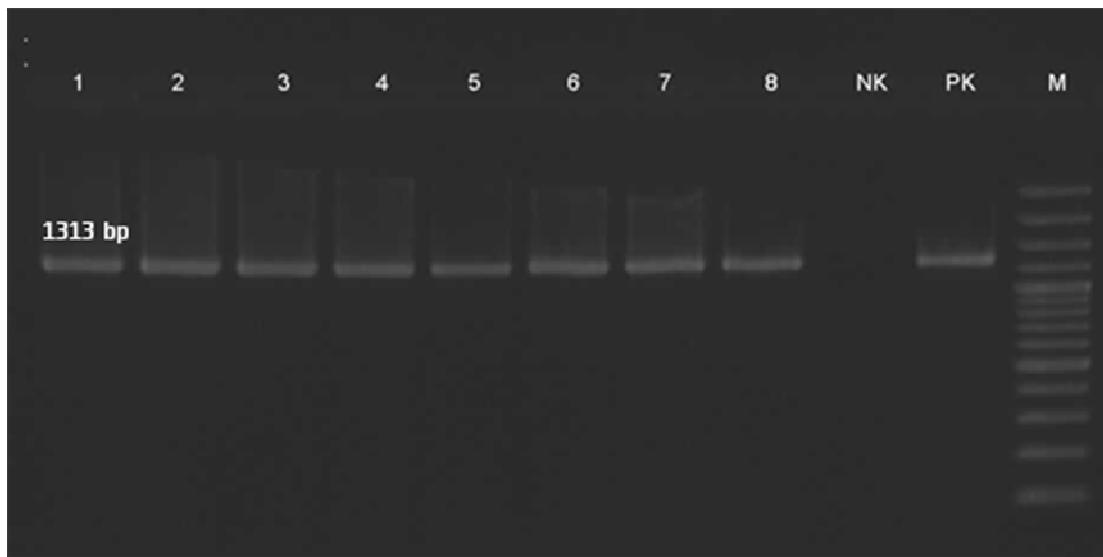
Diagnostično občutljivost smo izrazili kot odstotek znano pozitivnih vzorcev, pri katerih je bil rezultat pozitiven. Enačba za izračun diagnostične občutljivosti:

$$\text{Diagnostična občutljivost} = \frac{\text{pravilni pozitivni rezultati}}{(\text{pravilni pozitivni rezultati} + \text{lažno negativni rezultati})}$$

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI PROUČEVANJA MOLEKULARNO-EPIDEMIOLOŠKIH ZNAČILNOSTI VIRUSOV STEKLINE

V okviru proučevanja molekularno-epidemioloških značilnosti virusov stekline v Sloveniji smo analizirali 93 virusnih sevov, opisanih v tabeli 4. Kriteriji za izbor virusnih sevov so bili leto najdbe, živalska vrsta in geografska lokacija. Izbrane arhivske virusne seve smo testirali z metodo RT-PCR za pomnoževanje odseka na genu za nukleoprotein. Pri vseh 93 virusnih sevih smo dobili produkt specifične velikosti 1313 bp (slika 11). Vsem produktom RT-PCR smo določili nukleotidna zaporedja in jih uredili s programi SeqMan in EditSeq. Geografska lokacija 93 virusnih sevov je prikazana na sliki 12.

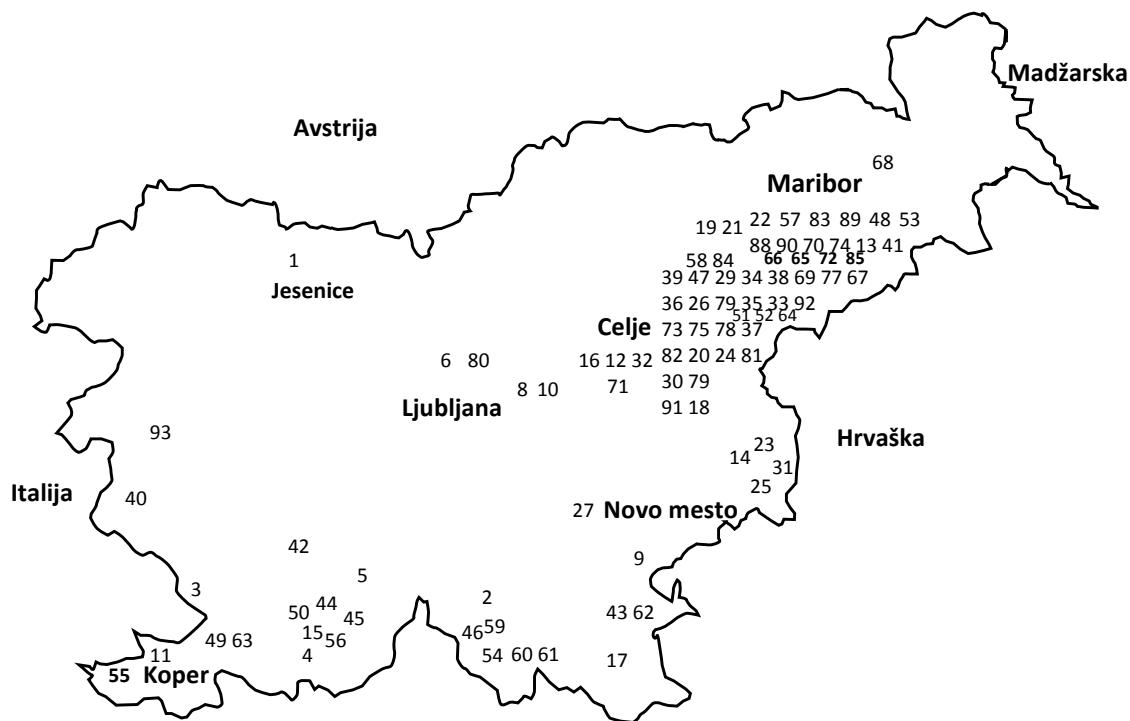


Slika 11: Analiza produktov pomnoževanja 1313 bp odseka, ki kodira nukleoprotein, na 1,8-odstotnem agaroznem gelu.

Figure 11: Analysis of 1313 bp long amplification products of nucleoprotein coding region on 1.8 % agarose gel.

1: 202-94SVN, 2: 498-94SVN, 3: 587-94SVN, 4: 696-15-94SVN, 5: 709-95SVN, 6: 882-95SVN, 7: 1229-95SVN, 8: 590-96SVN, NK: negativna kontrola, PK: pozitivna kontrola, M: molekularni označevalec (100 bp).

1: 202-94SVN, 2: 498-94SVN, 3: 587-94SVN, 4: 696-15-94SVN, 5: 709-95SVN, 6: 882-95SVN, 7: 1229-95SVN, 8: 590-96SVN, NK: negative control, PK: positive control, M: molecular marker (100 bp).



Slika 12: Geografska lokacija analiziranih sevov virusov stekline.

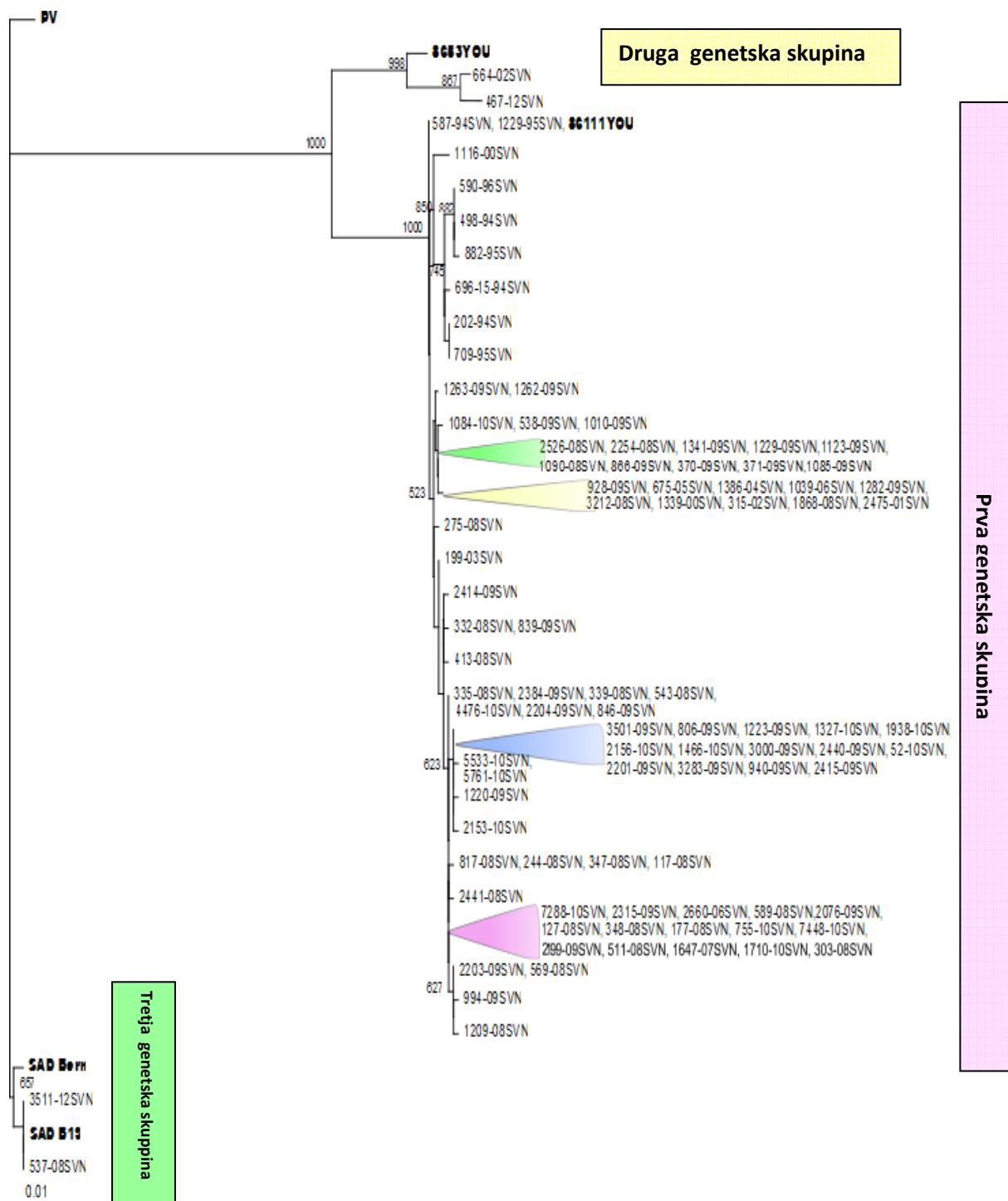
Figure 12: Geographical location of analyzed rabies viruses.

Številke označujejo imena virusnih sevov, opisanih v tabeli 4.

Numbers indicate names of virus strains described in Table 4.

Primerjali smo 1092 nt vseh 93 slovenskih sevov in sevov, ki so dostopni v podatkovni zbirki GenBank. Ugotovili smo, da spadajo vsi slovenski sevi virusa stekline med RABV.

Pripravili smo tudi filogenetsko analizo, v katero smo vključili nukleotidna zaporedja vseh 93 slovenskih virusnih sevov. S programom Phyliп smo izrisali filogenetsko drevo (slika 13). Analizirani slovenski sevi oblikujejo tri genetsko sorodne skupine. Prvo genetsko skupino predstavlja 89 virusnih sevov, drugo predstavlja virusna seva 664-02SVN in 467-12SVN, tretjo pa virusna seva 537-08SVN in 3511-12SVN, ki sta identična cepnim sevom skupine SAD. Pri primerjavi ostalih 91 virusnih sevov s cepnim sevom SAD B19 smo ugotovili 91,8–92,5-odstotno podobnost (rezultati niso prikazani). Prva in druga genetska skupina sta si podobni v 95,9–96,4 %, prva in tretja pa v 91,8–92,3 % (rezultati niso prikazani). Druga in tretja genetska skupina sta si podobni v 92,5 % (rezultati niso prikazani).



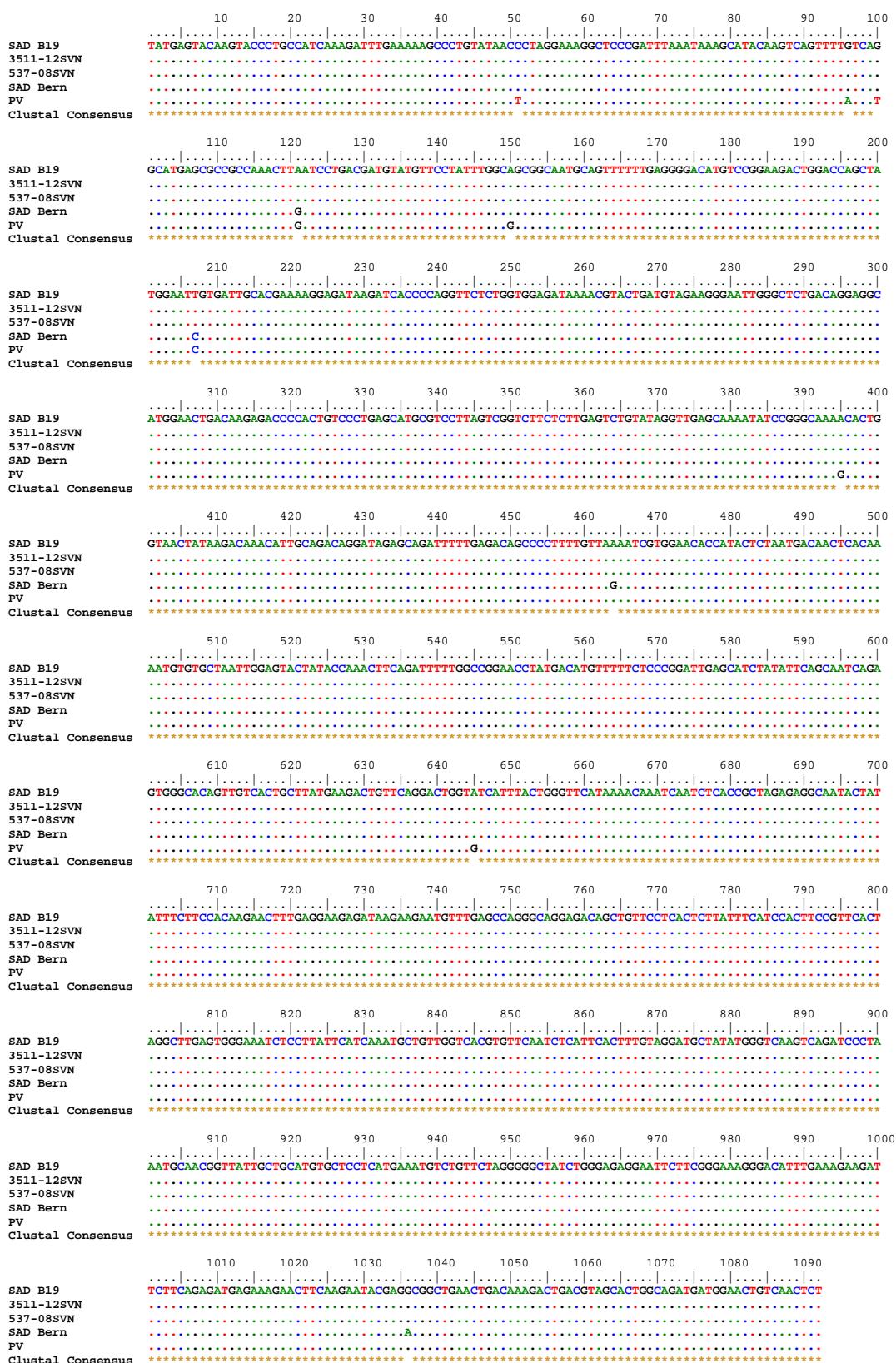
Slika 13: Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij odseka za nukleoprotein.

Figure 13: Phylogenetic tree of nucleoprotein gene region nucleotide sequences.

Vključenih je 93 slovenskih sevov virusov stekline in pet sevov iz GenBank (8653YOU, 86111YOU, PV, SAD B19 in SAD Bern).

93 Slovenian rabies viruses and five strains from GenBank (8653YOU, 86111YOU, PV, SAD B19, and SAD Bern) are included.

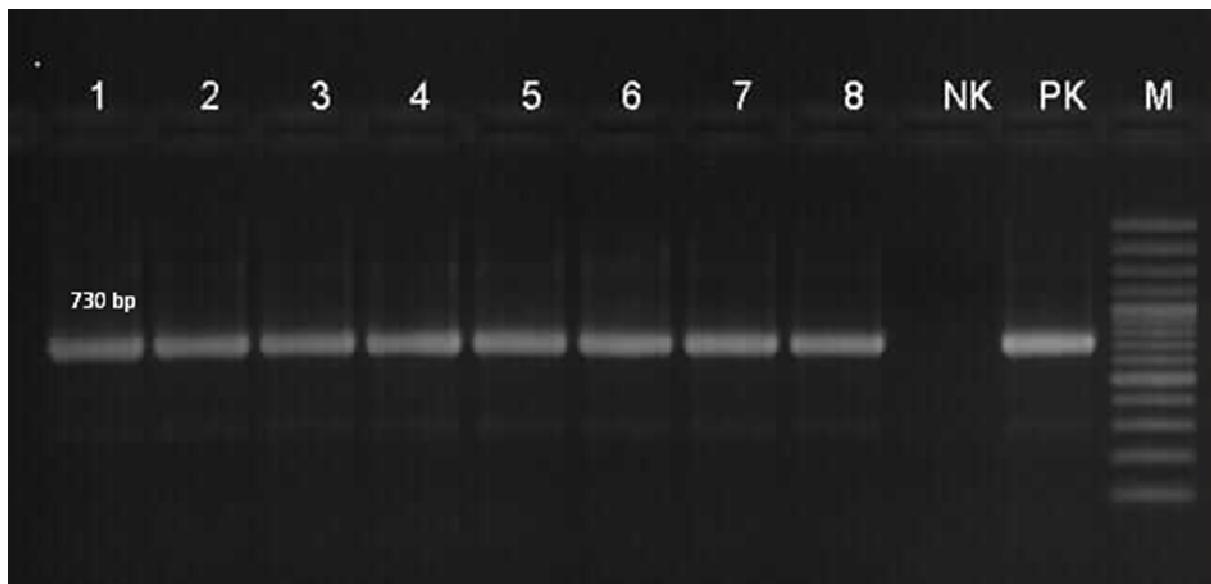
Nukleotidni zaporedji virusnih sevov 537-08SVN in 3511-12SVN sta povsem enaki z nukleotidnim zaporedjem cepnega seva SAD B19, od cepnega seva SAD Bern se razlikujeta v štirih nukleotidih (razlike so na 121., 207., 464. mestu in na mestu 1036), od seva PV pa v 8 nukleotidih (razlike so na 51., 96., 100., 121., 150., 207., 395. in 645. mestu) (slika 14).



Slika 14: Primerjava nukleotidnih zaporedij odseka na genu za nukleoprotein slovenskih sevov 537-08SVN, 3511-12SVN in cepnih sevov SAD B19, SAD Bern in PV (146–1238 glede na sev PV).

Figure 14: Comparison of nucleoprotein gene region nucleotide sequences of Slovenian strains 537-08SVN, 3511-12SVN and vaccine strains SAD B19, SAD Bern and PV (146 – 1238 according to strain PV).

Želeli smo preveriti, kako se virusni sevi razvrstijo v filogenetskih drevesih, ko primerjamo nukleotidna zaporedja odseka na genu za nukleoprotein in nukleotidna zaporedja odseka na genu za RVG. Izbrali smo 30 virusnih sevov, ki se razlikujejo glede na geografsko lokacijo, živalsko vrsto in leto najdbe. Le-te smo pomnožili tudi z metodo RT-PCR v odseku gena za RVG. Pri vseh virusnih sevih smo dobili produkt specifične velikosti 730 bp (slika 15). Vsem produktom smo določili nukleotidna zaporedja in jih uredili s programi SeqMan in EditSeq.



Slika 15: Analiza produktov pomnoževanja 730 bp dolgega odseka, ki kodira RVG, na 1,8-odstotnem agaroznem gelu.

Figure 15: Analysis of 730 bp long amplification products of RVG coding region on 1.8 % agarose gel.

1: 202-94SVN, 2: 498-94SVN, 3: 587-94SVN, 4: 696-15-94SVN, 5: 709-95SVN, 6: 882-95SVN, 7: 1229-95SVN, 8: 590-96SVN, NK: negativna kontrola, PK: pozitivna kontrola, M: molekularni označevalci (100 bp).

1: 202-94SVN, 2: 498-94SVN, 3: 587-94SVN, 4: 696-15-94SVN, 5: 709-95SVN, 6: 882-95SVN, 7: 1229-95SVN, 8: 590-96SVN, NK: negative control, PK: positive control, M: molecular marker (100 bp).

Nukleotidna zaporedja 23 različnih slovenskih sevov virusov stekline smo poslali v podatkovno zbirkovo GenBank, kjer so jim dodelili individualno kodo (tabela 14).

Tabela 14: Kode (accession number) nukleotidnih zaporedij odseka v genu za nukleoprotein in odseka v genu za RVG slovenskih sevov stekline v podatkovni zbirki GenBank.

Table 14: Accession numbers of nucleoprotein gene region sequences and RVG gene region sequences of Slovenian rabies virus strains in GenBank data collection.

Ime virusnega seva	Koda (accession number) za nukleotidno zaporedje odseka v genu za nukleoprotein	Koda (accession number) za nukleotidno zaporedje odseka v genu za RVG
202-94SVN	HM852150	HM852173
498-94SVN	HM852146	HM852169
587-94SVN	HM852152	HM852175
696-15-94SVN	HM852149	HM852172
882-95SVN	HM852148	HM852171
1229-95SVN	HM852153	HM852176
590-96SVN	HM852147	HM852170
1116-00SVN	HM852151	HM852174
315-02SVN	HM852164	HM852187
664-02SVN	HM852145	HM852168
199-03SVN	HM852155	HM852178
1386-04SVN	HM852165	HM852188
1674-07SVN	HM852161	HM852184
275-08SVN	HM852154	HM852177
332-08SVN	HM852156	HM852179
339-08SVN	HM852157	HM852180
348-08SVN	HM852159	HM852182
1209-08SVN	HM852160	HM852183
2441-08SVN	HM852162	HM852185
371-09SVN	HM852167	HM852190
1085-09SVN	HM852166	HM852198
52-10SVN	HM852163	HM852186
775-10SVN	HM852158	HM852181

Urejena nukleotidna zaporedja izbranih trideset slovenskih sevov virusov stekline smo primerjali med seboj in z nukleotidnimi zaporedji sevov, dostopnih v podatkovni zbirki GenBank (tabela 5).

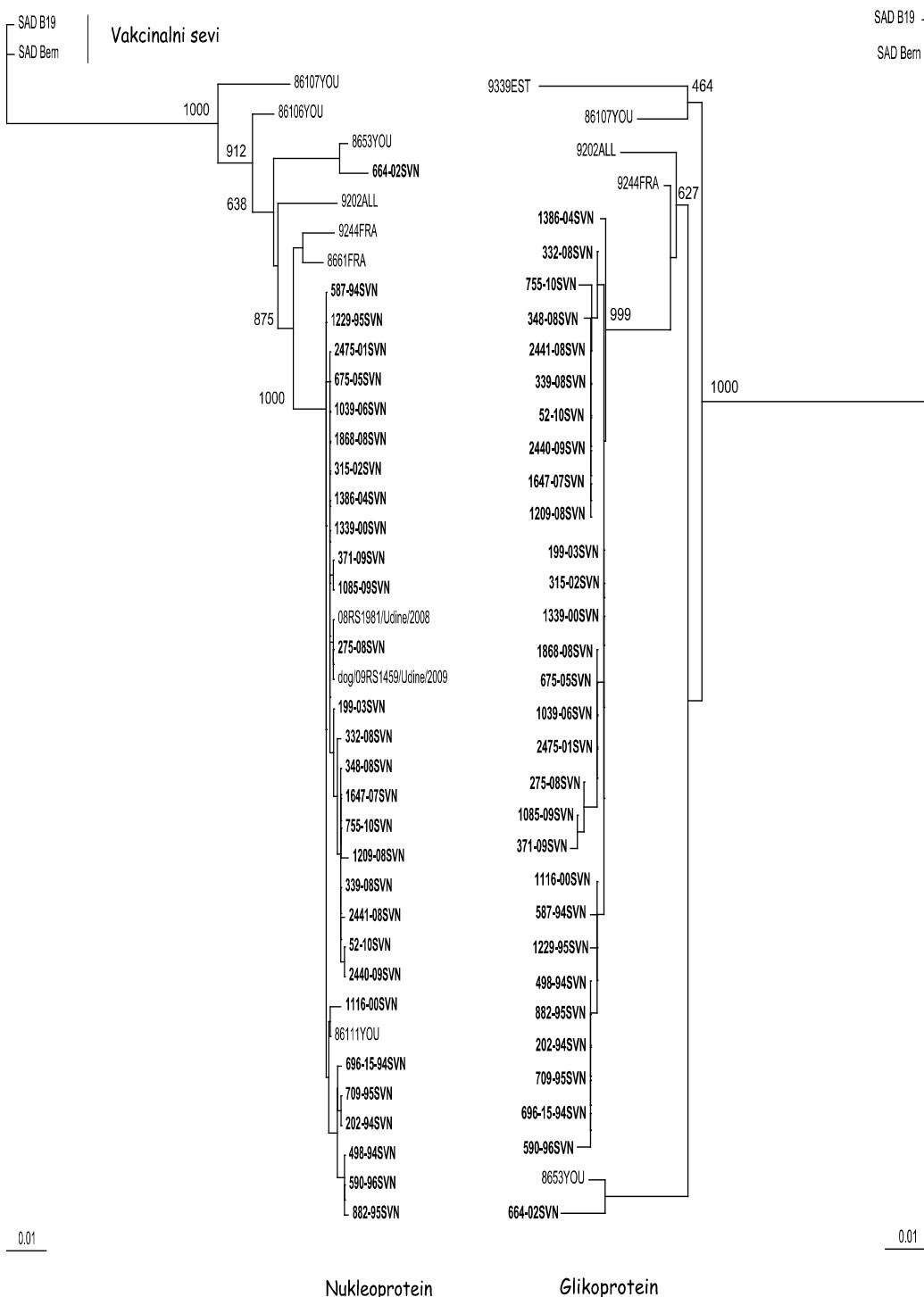
Pripravili smo dve filogenetski analizi s programom Phylip. V prvo smo vključili 41 nukleotidnih zaporedij 1092 nt dolgega odseka gena za nukleoprotein, v drugo pa 37 nukleotidnih zaporedij 672 nt dolgega odseka v genu za RVG (tabela 5, tabela 14). Statistično moč izdelanih dreves in zanesljivost postavljenih vej smo preverili s 1.000-kratnimi ponovitvami (angl. bootstrapping). Razporeditev virusnih sevov je v obeh filogenetskih drevesih skoraj povsem enaka (slika 16).

V obeh filogenetskih drevesih so se slovenski virusni sevi uvrstili v dve genetsko sorodni skupini (slika 16). Trideset nukleotidnih zaporedij odseka za nukleoprotein slovenskih virusnih sevov je enakih v 95,9–100 %. Njihova podobnost z devetimi virusnimi sevi iz podatkovne zbirke GenBank (08RS-1981/Udine/2008, Dog/09RS-1459/Udine/2009, 86111YOU, 8653YOU, 8661FRA, 9202ALL, 9244FRA, 86106YOU, 86107YOU) (tabela 5) je 94,8–100-odstotna.

Znotraj ene genetske skupine je 29 nukleotidnih zaporedij odseka za nukleoprotein enakih v 99,0–100 %, od virusnega seva 86111YOU, ki izvira iz Bosne in Hercegovine (tabela 5), pa se razlikuje le 0,1–0,5-odstotno. Nukleotidno zaporedje slovenskega virusnega seva 275-08SVN je povsem enako zaporedjema 08RS-1981/Udine/2008 in Dog/09RS-1459/Udine/2009, ki izvirata iz Italije (slika 16).

V drugo genetsko skupino se je uvrstil le en slovenski virusni sev, in sicer sev 664-02SVN, ki je v 99,31 % enak sevu 8653YOU, ki so ga ugotovili pri volku leta 1986 v Bosni in Hercegovini (tabela 5).

Trideset nukleotidnih zaporedij odseka za RVG slovenskih sevov je enakih v 94,6–100 %. Njihova podobnost s petimi virusnimi sevi iz podatkovne zbirke GenBank (9202ALL, 9244FRA, 86107YOU, 9339EST in 8653YOU) (tabela 5) je 93,8–98,4 %.



Slika 16: Filogenetski drevesi, ki vključujeta nukleotidna zaporedja tridesetih izbranih slovenskih sevov virusov stekline in sevov iz GenBank.

Figure 16: Phylogenetic trees including nucleotide sequences of 30 selected Slovenian rabies virus strains and strains from GenBank.

Slovenski sevi so označeni poudarjeno.

Slovenian strains are in bold.

Nukleotidna zaporedja odsekov na genu za nukleoprotein sedmih slovenskih sevov (498-94SVN, 696-15-95SVN, 1116-00SVN, 1339-00SVN, 275-08SVN, 1085-09SVN, 52-10SVN) smo primerjali tudi s hrvaškim sevom CRO_09SK (Lojkič in sod., 2009) in ugotovili 99,5–100-odstotno podobnost (slika 17).

	1	2	3	4	5	6	7	8	
1		99.5	99.1	99.2	99.5	99.2	99.6	99.8	1
2	0.5		99.4	99.5	99.8	99.5	99.9	99.8	2
3	0.9	0.6		99.7	99.4	99.4	99.5	99.5	3
4	0.8	0.6	0.3		99.5	99.3	99.5	99.8	4
5	0.5	0.2	0.6	0.6		99.5	99.9	99.8	5
6	0.8	0.6	0.6	0.7	0.6		99.5	100.0	6
7	0.4	0.1	0.6	0.5	0.1	0.5		99.8	7
8	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.0	0.2		8
	1	2	3	4	5	6	7	8	

52-10SVN
275-08SVN
398-94SVN
696-15-
94SVN
1085-09SVN
1116-00SVN
1339-00SVN
CRO_09SK

Slika 17: Podobnost nukleotidnih zaporedij sedmih slovenskih sevov in hrvaškega seva CRO_09SK.

Figure 17: Nucleotide similarity of seven Slovenian strains and Croatian strain CRO_09SK.

Podobnost med nukleotidnimi zaporedji slovenskih sevov virusa stekline in cepnih sevov SAD B19 in SAD Bern je bila 91,8–92,5-odstotna v odseku na genu za nukleoprotein in 91,7–93,1-odstotna v odseku na genu za RVG.

Nukleotidna zaporedja na odseku gena za nukleoprotein in na odseku gena za RVG smo prevedli v aminokislinska zaporedja in jih primerjali. Zaporedja aminokislin na nukleoproteinu 29 slovenskih sevov in sevov 08RS-1981/Udine/2008, Dog/09RS-1459/Udine/2009 in 86111YOU so bila popolnoma enaka. Pri slovenskem sevu 664-02SVN smo ugotovili zamenjavo aminokisline Asp-35 z Asn-35 in zamenjavo Ala-101 s Ser-101 (štetje glede na sev SAD B19) (slika 18).

35				100							
Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Gly	Ala	Lys	Ile	Thr	Pro	
.	2475-01SVN
.	52-10SVN
.	199-03SVN
.	202-94SVN
.	275-08SVN
.	315-02SVN
.	332-08SVN
.	339-08SVN
.	348-08SVN
.	371-09SVN
.	498-94SVN
.	587-94SVN
.	590-96SVN
Asn	Ser	664-02SVN
.	675-05SVN
.	696-15-94SVN
.	709-95SVN
.	755-10SVN
.	882-95SVN
.	1039-06SVN
.	1085-09SVN
.	1116-00SVN
.	1209-08SVN
.	1229-95SVN
.	1339-00SVN
.	1386-04SVN
.	1647-07SVN
.	1868-08SVN
.	2440-09SVN
.	2441-08SVN
.	86111YOU
.	Asp	SAD_B19
.	08RS-1981/Udine/2008
.	Dog/09RS-1459/Udine/2009

Slika 18: Primerjava prevedenih aminokislinskih zaporedij dela nukleoproteina tridesetih slovenskih sevov in štirih sevov iz GenBank.

Figure 18: Comparison of deduced amino acid sequences of a part of nucleoprotein of 30 Slovenian strains and four strains from GenBank.

Pri RVG smo pri slovenskem sevu 1386-04SVN ugotovili zamenjavo Leu-202 s Pro-202. Pri slovenskih sevih 52-10SVN, 332-08SVN, 339-08SVN, 348-08SVN, 755-10SVN, 1209-08SVN, 1647-07SVN, 2440-09SVN in 2441-08SVN smo ugotovili zamenjavo His-250 z Leu-250. Pri sevu 664-02SVN pa smo ugotovili zamenjavo Ala-206 z Thr-206 (slika 19).

205										250										
Pro	Arg	Leu	Gly	Thr	Ser	Cys	XXX	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Met	Asp	Gly	Thr	Trp	
.	1339 -00SVN
.	52-10SVN
.	199 -03SVN
.	202 -94SVN
.	275 -08SVN
.	315 -02SVN
.	332 -08SVN
.	339 -08SVN
.	348 -08SVN
.	371 -09SVN
.	489 -94SVN
.	587 -94SVN
.	590 -96SVN
.	664 -02SVN
.	675 -05SVN
.	696 -15-94SVN
.	709 -95SVN
.	755 -10SVN
.	882 -95SVN
.	1039 -06SVN
.	1085 -09SVN
.	1116 -00SVN
.	1209 -08SVN
.	1229 -95SVN
.	2475 -01SVN
Leu	1386 -04SVN
.	1647 -07SVN
.	1868 -08SVN
.	2440 -09SVN
.	2441 -08SVN
.	.	.	Met	SAD B19

Slika 19: Primerjava prevedenih aminokislinskih zaporedij dela RVG tridesetih slovenskih sevov in seva SAD B19.

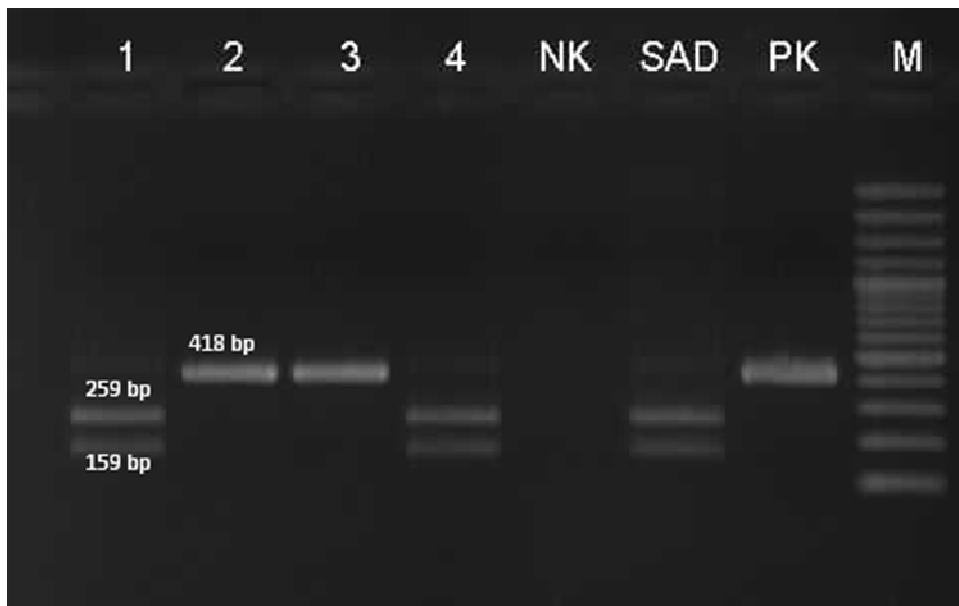
Figure 19: Comparison of deduced amino acid sequences of a part of RVG of 30 Slovenian strains and SAD B19.

4.1.1 Rezultat analize cepnih sevov z monoklonalnimi protitelesi in RFLP

Z monoklonalnim protitelesom W239.17, ki prepozna laboratorijske, cepne, evropske lisičje, pasje in polarne seve ter MOKV, LBV, DUVV in seve EBLV 1 in EBLV 2, smo dobili pozitiven rezultat pri štirih vzorcih (537-08SVN, 7448-10SVN, 467-12SVN, 3511-12SVN) in pri dveh kontrolah (cepivo SAD B19 in PK). Z monoklonalnim protitelesom MW187.6.1, ki prepozna laboratorijske, evropske lisičje, pasje in polarne seve, smo dobili pozitiven rezultat pri dveh vzorcih (7448-10SVN, 467-12SVN) in pri PK. Iz rezultatov analize z monoklonalnimi protitelesi W239.17 in MW187.6.1 lahko sklenemo, da sta vzorca 537-08SVN, 3511-12SVN enaka cepnemu sevu SAD B19.

Pri restrikcijski analizi odseka, ki kodira terminalni del gena za nukleoprotein in začetni del gena za fosfoprotein, z encimom *Tsp45I*, smo dobili dva produkta velikosti 259 bp in 159 bp

pri virusnih sevih 537-08SVN, 3511-12SVN in cepilnem sevu SAD B19. En sam produkt v velikosti 418 bp smo dobili pri virusnih sevih 7488-10SVN, 467-12SVN in PK. Iz rezultatov RFLP (slika 20) lahko sklepamo, da sta virusna seva 537-08SVN in 3511-12SVN cepna seva virusa stekline tako kot sev SAD B19.



Slika 20: Analiza produktov RFLP na 1,8-odstotnem agaroznem gelu.

Figure 20: Analysis of RFLP products on 1.8 % agarose gel.

1: 537-08SVN, 2: 7488-10SVN, 3: 467-12SVN, 4: 3511-12SVN, NK: negativna kontrola, SAD: cepivo SAD B19, PK: pozitivna kontrola, M: molekularni označevalec (100 bp).

1: 537-08SVN, 2: 7488-10SVN, 3: 467-12SVN, 4: 3511-12SVN, NK: negative control, SAD: vaccine SAD B19, PK: positive control, M: molecular marker (100 bp).

4.2 REZULTATI PRIMERJAVE OBČUTLJIVOSTI IN ROBUSTNOSTI METOD DIF, IVCK IN RT-PCR

4.2.1 Občutljivost testa direktnje imunofluorescence (dIF)

Testirali smo razredčine izbranih 15 vzorcev (opisanih v tabeli 6). Testirane vzorce, hranjene pri temperaturi nižji od -15°C (od 17 mesecev do 11 let) smo ovrednotili kot pozitivne do razredčitve 10^{-1} (1254-10SVN), 10^{-2} (404-03SVN, 2337-03SVN, 1090-08SVN, 3283-09SVN), 10^{-3} (1386-04SVN, 675-05SVN, 2440-09SVN, 1327-10SVN, 2153-10SVN), 10^{-4} (2156-10SVN) in 10^{-5} (1466-10SVN) (tabela 15). Vzorce hranjene pri temperaturi nižji od -50°C (od 17 do 19

mesecev) smo ovrednotili kot pozitivne do razredčitve 10^{-3} (2153-10SVNa), 10^{-4} (2156-10SVNa) in 10^{-5} (1466-10SVNa) (tabela 15).

Tabela 15: Določanje občutljivosti testa dIF.

Table 15: Sensitivity determination of dIF test.

Zap. Št.	Ime vzorca	razredčitev									
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	1254-00SVN	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	404-03SVN	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2337-03SVN	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1386-04SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	675-05SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	1090-08SVN	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	2440-09SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	3283-09SVN	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1327-10SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	1466-10SVN	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11	2153-10SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	2156-10SVN	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
13	1466-10SVNa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
14	2153-10SVNa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
15	2156-10SVNa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+ : pozitiven rezultat; -: negativen rezultat

+ : positive result; -: negative result

4.2.2 Robustnost testa direktne imunofluorescence (dIF)

Za določitev robustnosti testa dIF smo testirali dva vzorca (404-10SVN in 2153-10SVN), ki smo ju hranili pri sobni temperaturi 0–30 dni. Test smo izvedli v sedmih časovnih obdobjih, in sicer takoj, po 5, 10, 15, 20, 25 in 30 dneh. Rezultat testiranja obeh vzorcev s testom dIF je bil pozitiven pri obeh vzorcih, ki sta bila hranjena 0 in 5 dni pri sobni temperaturi, po desetih dneh in kasneje pa je bil rezultat negativen (tabela 16). Test dIF ni primeren za analizo

vzorcev, ki jih hranimo pri sobni temperaturi več kot 5 dni. Sobno temperaturo smo izmerili vsak dan testiranja ob 14. uri. Sobna temperatura je bila med 24 in 27 °C.

Tabela 16: Določanje robustnosti testa dIF.

Table 16: Robustness determination of dIF test.

Čas hrانjenja pri sobni temperaturi	Rezultat testa dIF za vzorec 404-10SVN	Rezultat testa dIF za vzorec 2153-10SVN
0	pozitiven	pozitiven
5	pozitiven	pozitiven
10	negativen	negativen
15	negativen	negativen
20	negativen	negativen
25	negativen	negativen
30	negativen	negativen

Z zeleno barvo so označeni vzorci, pri katerih smo dobili pozitiven rezultat.

Samples with positive result are labelled with green colour.

4.2.3 Občutljivost metode IVCK

Za določitev občutljivosti metode IVCK smo testirali razredčine izbranih 15 vzorcev (opisanih v tabeli 6). Testirane vzorce, hranjene pri temperaturi nižji od -15 °C, smo ovrednotili kot negativne v vseh razredčitvah od 10^{-1} do 10^{-10} . Vzorce hranjene pri temperaturi nižji od -50 °C smo ovrednotili kot pozitivne do razredčitve 10^{-1} (2153-10SVNa, 2156-10SVNa) in 10^{-3} (1466-10SVNa) (tabela 17).

Tabela 17: Določanje občutljivosti metode IVCK.

Table 17: Sensitivity determination of virus isolation method.

Ime vzorca	Rezultat IVCK	Čas hranjenja (v mesecih)	Temperatura hranjenja
1254-00SVN	negativno	130	pod-15 °C
404-03SVN	negativno	94	pod-15 °C
2337-03SVN	negativno	90	pod-15 °C
1386-04SVN	negativno	74	pod-15 °C
675-05SVN	negativno	62	pod-15 °C
1090-08SVN	negativno	36	pod-15 °C
2440-09SVN	negativno	32	pod-15 °C
3283-09SVN	negativno	32	pod-15 °C
1327-10SVN	negativno	20	pod-15 °C
1466-10SVN	negativno	19	pod-15 °C
2153-10SVN	negativno	19	pod-15 °C
2156-10SVN	negativno	17	pod-15 °C
1466-10SVNa	pozitivno	19	pod-50 °C
2153-10SVNa	pozitivno	19	pod-50 °C
2156-10SVNa	pozitivno	17	pod-50 °C

Z zeleno barvo so označeni vzorci, pri katerih smo dobili pozitiven rezultat.

Samples with positive result are labelled with green colour.

4.2.4 Robustnost metode IVCK

Testirali smo dva vzorca (404-10SVN in 2153-10SVN), ki smo ju hranili pri sobni temperaturi 0, 5, 10, 15, 20, 25 in 30 dni. Sobno temperaturo smo izmerili vsak dan testiranja ob 14. uri. Sobna temperatura je bila med 24 in 27 °C. Do začetka testiranja sta bila vzorca 404-10SVN in 2153-10SVN hranjena pri temperaturi nižji od -50 °C. Z metodo IVCK smo dokazali virus le v vzorcu, ki smo ga takoj nanesli na celično kulturo, iz vseh ostalih vzorcev, ki smo jih hranili pri sobni temperaturi 5 dni in več, pa virusa nismo izolirali.

4.2.5 Občutljivost metode RT-PCR

Testirali smo razredčine 15 izbranih vzorcev (opisani v tabeli 6). Vzorce, hranjene pri temperaturi nižji od -15 °C (tabela 18), smo z metodo RT-PCR ovrednotili kot pozitivne v razredčitvah 10^{-2} (1254/00SVN), 10^{-3} (404-03SVN, 2337-03SVN, 1090-08SVN, 3283-09SVN), 10^{-4} (1386-04SVN, 675-05SVN, 2440-09SVN), 10^{-5} (1327-10SVN, 2153-10SVN, 2156-10SVN) in 10^{-6} (1466-10SVN). Vzorce, hranjene pri temperaturi nižji od -50 °C, smo z metodo RT-PCR ovrednotili kot pozitivne v razredčitvah 10^{-5} (2153-10SVNa, 2156-10SVNa) in 10^{-6} (1466-10SVNa).

Tabela 18: Določanje občutljivosti metode RT-PCR.

Zap.	Ime vzorca	razredčitev									
Št.		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	1254-00SVN	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Table 18: Sensitivity determination of RT-PCR method.											
2	404-03SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	2337-03SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	1386-04SVN	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5	675-05SVN	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	1090-08SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	2440-09SVN	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	3283-09SVN	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	1327-10SVN	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10	1466-10SVN	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
11	2153-10SVN	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
12	2156-10SVN	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
13	1466-10SVNa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
14	2153-10SVNa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
15	2156-10SVNa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+ : pozitiven rezultat; - : negativen rezultat

+ : positive result; - : negative result

4.2.6 Robustnost metode RT-PCR

Testirali smo dva vzorca (404-10SVN in 2153-10SVN), ki smo ju hranili pri sobni temperaturi 0, 5, 10, 15, 20, 25 in 30 dni. Sobno temperaturo smo izmerili vsak dan testiranja ob 14. uri. Sobna temperatura je bila med 24 in 27 °C. Rezultati testiranja vzorcev z metodo RT-PCR so bili pozitivni v vseh obdobjih testiranja, to je vseh 30 dni ob hranjenju pri sobni temperaturi (tabela 19).

Tabela 19: Rezultati preverjanja robustnosti metode RT-PCR.

Table 19: Results of robustness testing of RT-PCR method.

Dnevi hranjenja pri sobni temperaturi	Rezultat RT-PCR vzorca 404-10SVN	Rezultat RT-PCR vzorca 2153-10SVN
0	pozitiven	pozitiven
5	pozitiven	pozitiven
10	pozitiven	pozitiven
15	pozitiven	pozitiven
20	pozitiven	pozitiven
25	pozitiven	pozitiven
30	pozitiven	pozitiven

4.3 REZULTATI VALIDACIJE IN OPTIMIZACIJE METOD RT-PCR V REALNEM ČASU

4.3.1 Rezultati določanja optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond

Optimalno koncentracijo začetnih oligonukleotidov in sonde smo določali za štiri ločene postopke RT-PCR v realnem času, in sicer za dokazovanje RABV, EBLV 1 in β -aktina, EBLV 2 ter za dokazovanje cepnih sevov. Za posamezni test smo izbrali tiste koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde (tabela 12), ki so med pomnoževanjem izražali najvišjo normalizirano fluorescenco poročevalskega barvila (ΔR_n) pri najnižji vrednosti Cq (tabela 20). Pri vseh testih RT-PCR v realnem času smo dobili najvišjo vrednost ΔR_n in najnižjo vrednost Cq pri 800 pmol/ μ l vsakega začetnega oligonukleotida in 100 pmol/ μ l sonde.

Tabela 20: Določanje optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond.

Table 20: Determination of primers and probe optimal concentration.

Postopek RT-PCR v realnem času	Optimalna koncentracija sonde/koncentracija začetnih oligonukleotidov	Vrednost ΔRn	Vrednost Cq
Za dokazovanje RABV	800 pmol/µl / 100 pmol/µl	0,9	14,14
Za dokazovanje EBLV 1	800 pmol/µl / 100 pmol/µl	0,5	16,05
Za dokazovanje EBLV 2	800 pmol/µl / 100 pmol/µl	0,5	17,10
Za dokazovanje cepnih sevov	800 pmol/µl / 100 pmol/µl	0,9	20,54

4.3.2 Rezultati določanja optimalne koncentracije MgSO₄

Optimalno koncentracijo MgSO₄ smo določali za štiri ločene postopke RT-PCR v realnem času, in sicer za dokazovanje RABV, EBLV 1 in β-aktina, EBLV 2 ter za dokazovanje cepnih sevov. Pri določanju optimalne koncentracije MgSO₄ smo izbrali tisto koncentracijo, pri kateri je bila vrednost ΔRn najvišja in vrednost Cq najnižja (tabela 20). Pri vseh testih RT-PCR smo dobili najvišjo vrednost ΔRn in najnižjo vrednost Cq pri koncentraciji 4 pmol/µl MgSO₄.

4.3.3 Rezultati preverjanja pravilnosti postopkov RT-PCR v realnem času

Pravilnost štirih ločenih postopkov RT-PCR v realnem času smo ugotavljali s 55 zanimi vzorci, opisanimi v tabeli 7. Rezultati so prikazani v tabeli 21.

V testiranje smo vključili tudi vzorce suspenzij možganov in ekstrahirane RNA, ki niso vsebovali virusa stekline oziroma nukleinske kisline virusa stekline.

Tabela 21: Rezultati postopkov RT-PCR v realnem času.

Table 21: Results of real time RT-PCR protocols.

Ime vzorca	Virusni sev (referenčni rezultat)	Rezultati testa		Rezultati testa		Rezultati testa	
		RT-PCR v realnem času	za dokazovanje	RT-PCR v realnem času za dokazovanje	EBLV 1	RT-PCR v realnem času za dokazovanje	EBLV 2
7094550	/	-	-	-	-	-	-
7095208	EBLV 1	-	+	-	-	-	-
7098627	EBLV 2	-	-	+	-	-	-
7099850	RABV	+	-	-	-	-	-
7091286	RABV	+	-	-	-	-	-
7096980	/	-	-	-	-	-	-
7097451	RABV	+	-	-	-	-	-
L39 5101103	ABLV	-	-	-	-	-	-
L39 5101491	/	-	-	-	-	-	-
L39 5104285	/	-	-	-	-	-	-
L39 5104840	EBLV 2	-	-	-	+	-	-
L39 5105609	RABV	+	-	-	-	-	-
L39 5109291	EBLV 1	-	+	-	-	-	-
1103A9845	RABV	+	-	-	-	-	-
1103A9973	RABV	+	-	-	-	-	-
1103A2847	RABV	+	-	-	-	-	-
1103A4533	RABV	+	-	-	-	-	-
1103A4376	/	-	-	-	-	-	-
1103B9942	/	-	-	-	-	-	-
1103B2378	ABLV	-	-	-	-	-	-
1103B7824	EBLV 2	-	-	-	+	-	-
1103B3463	RABV	+	-	-	-	-	-
1103B4622	EBLV 1	-	+	-	-	-	-
L1	RABV	+	-	-	-	-	-

Ime vzorca	Virusni sev (referenčni rezultat)	Rezultati testa		Rezultati testa		Rezultati testa	
		RT-PCR v realnem času za dokazovanje	RABV	RT-PCR v realnem času za dokazovanje	EBLV 1	RT-PCR v realnem času za dokazovanje	EBLV 2
L2	RABV	+	-	-	-	-	-
L3	RABV	+	-	-	-	-	-
L4	RABV	+	-	-	-	-	-
L5	RABV	-	-	-	-	-	-
L6	RABV	+	-	-	-	-	-
L7	/	-	-	-	-	-	-
L8	RABV	+	-	-	-	-	-
L9	RABV	+	-	-	-	-	-
L10	RABV	+	-	-	-	-	-
L11	RABV	+	-	-	-	-	-
L12	RABV	-	-	-	-	-	-
L13	RABV	+	-	-	-	-	-
L14	RABV	+	-	-	-	-	-
L15	RABV	+	-	-	-	-	-
L16	RABV	+	-	-	-	-	-
L18	EBLV 1	-	+	-	-	-	-
L19	RABV	+	-	-	-	-	-
L20	RABV	+	-	-	-	-	-
L21	RABV	+	-	-	-	-	-
L22	RABV	+	-	-	-	-	-
L23	RABV (SAD B19)	+	-	-	-	-	+
L24	EBLV 2	-	-	-	+	-	-
L25	/	-	-	-	-	-	-
L26	RABV	+	-	-	-	-	-
L27	RABV	+	-	-	-	-	-

Ime vzorca	Virusni sev (referenčni rezultat)	Rezultati testa		Rezultati testa		Rezultati testa	
		RT-PCR v realnem času za dokazovanje	EBLV 1	RT-PCR v realnem času za dokazovanje	EBLV 2	RT-PCR v realnem času za dokazovanje	cepnih sevov
L28	RABV	+	-	-	-	-	
L29	RABV	-	-	-	-	-	
L30	RABV	+	-	-	-	-	
Fuchsoral	Vrsta RABV (cepni sev)	+	-	-	-	-	
Lysvulpen	Vrsta RABV (cepni sev)	+	-	-	-	-	
Bio 10	Vrsta RABV (cepni sev)	+	-	-	-	-	

Z rumeno barvo so označeni vzorci vrste RABV in cepni sevi, z zeleno vzorci vrste EBLV 1, z modro vzorci vrste EBLV 2, z oranžno vzorci vrste ABLV, z belo pa negativni vzorci. Lažno negativni rezultati so označeni z roza barvo.

Samples containing RABV species and vaccine strains are labelled with yellow, samples containing EBLV 1 are labelled with green, samples containing EBLV 2 are labelled with blue, samples containing ABLV are labelled with orange, negative samples are white. False negative results are labelled with pink colour.

Rezultate RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV smo ovrednotili kot pozitivne pri tridesetih virusnih sevih RABV in pri štirih cepnih sevih. Pri treh virusnih sevih RABV (L5, L12 in L29) smo dobili negativen rezultat. Prav tako smo dobili negativen rezultat pri ostalih sevih, ki ne spadajo med RABV.

Rezultate RT-PCR v realnem času za dokazovanje EBLV 1 smo ovrednotili kot pozitivne pri štirih virusnih sevih EBLV 1 (7095208, L39 5109291, 1103B4622 in L18), pri ostalih sevih, ki ne spadajo med EBLV 1, smo dobili negativen rezultat.

Rezultate RT-PCR v realnem času za dokazovanje vrste EBLV 2 smo ovrednotili kot pozitivne pri štirih virusnih sevih EBLV 2 (7098627, L39 5104840, 1103B7824 in L24) in negativne pri vseh ostalih 51 vzorcih, ki ne sodijo v vrsto EBLV 2.

Rezultate postopka RT-PCR v realnem času za dokazovanje cepnih sevov virusa stekline smo ovrednotili kot pozitivne pri virusnih sevih L23, Fucshoral, Lysvulpen in Bio 10 in kot negativne pri vseh ostalih 51 vzorcih.

Gen za β -aktin smo dokazali v vseh vzorcih, ki so vsebovali suspenzijo možganov.

4.3.4 Rezultati določanja ponovljivosti metode RT-PCR v realnem času

Ponovljivost rezultatov smo preverili tako, da smo primerjali rezultate osmih ponovitev vseh štirih RT-PCR v realnem času za znane referenčne vzorce. Uporabili smo referenčne virusne seve 1103B3463, 1103B4622, 1103B7824 in cepivo SAD B19. Dobili smo pozitiven rezultat v vseh osmih ponovitvah za vse referenčne virusne seve.

Standardna deviacija (tabela 22) za RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV je 0,59, za EBLV 1 in EBLV 2 0,37, za dokazovanje cepnih sevov pa 0,32. Koeficient variacije je najvišji pri testu za dokazovanje EBLV 2, saj je 8,2 %. Najnižji je pri testu za dokazovanje cepnih sevov, in sicer 1,5 %.

Najboljšo ponovljivost in najnižji koeficient variacije ima metoda RT-PCR v realnem času za dokazovanje cepnih sevov, najslabšo ponovljivost in najvišji koeficient variacije pa metoda RT-PCR v realnem času za dokazovanje EBLV 2.

Tabela 22: Standardna deviacija in koeficient variacije pri preverjanju ponovljivosti rezultatov RT-PCR v realnem času.

Table 22: Standard deviation and variation coefficient in repeatability testing of real time RT-PCR results.

Test RT-PCR v realnem času (ime vzorca)	Standardna deviacija	Koeficient variacije (%)	Vrednost Cq
za dokazovanje RABV (1103B3463)	0,59	3,0	16,26-17,48
za dokazovanje EBLV 1 (1103B4622)	0,37	2,0	14,86-15,90
za dokazovanje EBLV 2 (1103B7824)	0,37	8,2	16,23-17,40
za dokazovanje cepnih sevov (cepivo SAD B19)	0,32	1,5	20,54-21,73

4.3.5 Rezultati določanja občutljivosti RT-PCR v realnem času

Občutljivost metode RT-PCR v realnem času smo določili tako, da smo testirali 10-kratne razredčine vzorcev (1103B3463, 1103B4622, 1103B7824 in cepivo SAD B19). Za dokazovanje RABV smo uporabili vzorec 110B3463 s titrom $10^{-5,875}$ TCID50/ml. Virusno nukleinsko kislino smo določili pri razredčitvi $10^{-6,25}$. Učinkovitost reakcije (E) je bila 0,86 (tabela 23).

Za dokazovanje EBLV 1 smo uporabili vzorec 110B4622 s titrom $10^{-4,75}$ TCID50/ml. Virusno nukleinsko kislino smo določili pri razredčitvi $10^{-6,75}$. Učinkovitost reakcije (E) je bila 0,92 (tabela 23).

Za dokazovanje EBLV 2 smo uporabili vzorec 110B7824 s titrom $10^{-5,5}$ TCID50/ml. Virusno nukleinsko kislino smo določili pri razredčitvi $10^{-5,25}$. Učinkovitost reakcije (E) je bila 0,97 (tabela 23).

Za dokazovanje cepnih sevov smo uporabili cepivo SAD B19 s titrom $10^{-3,875}$ TCID50/ml. Virusno nukleinsko kislino smo določili pri razredčitvi 10^{-4} . Učinkovitost reakcije (E) je bila 0,91 (tabela 23).

Tabela 23: Določanje občutljivosti metod RT-PCR v realnem času.

Table 23: Sensitivity determination of real time RT-PCR methods.

Postopek RT-PCR v realnem času	Razredčitev								E
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	
za dokazovanje RABV	+	+	+	+	-	-	-	-	
za dokazovanje RABV	+	+	+	+	+	-	-	-	
za dokazovanje RABV	+	+	+	+	+	-	-	-	0,86
za dokazovanje RABV	+	+	+	+	+	-	-	-	
za dokazovanje EBLV 1	+	+	+	+	+	+	-	-	
za dokazovanje EBLV 1	+	+	+	+	+	-	-	-	0,92
za dokazovanje EBLV 1	+	+	+	+	+	-	-	-	
za dokazovanje EBLV 1	+	+	+	+	+	-	-	-	
za dokazovanje EBLV 2	+	+	+	-	-	-	-	-	
za dokazovanje EBLV 2	+	+	+	+	-	-	-	-	0,97
za dokazovanje EBLV 2	+	+	+	+	-	-	-	-	
za dokazovanje EBLV 2	+	+	+	+	-	-	-	-	
za dokazovanje cepnih sevov	+	+	+	-	-	-	-	-	
za dokazovanje cepnih sevov	+	+	+	-	-	-	-	-	0,91
za dokazovanje cepnih sevov	+	+	-	-	-	-	-	-	
za dokazovanje cepnih sevov	+	+	-	-	-	-	-	-	

+ : pozitiven rezultat; - : negativen rezultat

+ : positive result; - : negative result

4.3.6 Rezultati preverjanja robustnosti postopkov RT-PCR v realnem času

Nukleinsko kislino RABV, EBLV 1, EBLV 2 in cepne seve virusov stekline smo dokazali s specifičnimi ločenimi postopki RT-PCR v realnem času v vseh vzorcih, hranjenih pri sobni temperaturi 0, 5, 10, 15, 20, 25 in 30 dni.

Za vsak test smo izračunali standardno deviacijo in koeficient variacije (tabela 24).

Tabela 24: Standardna deviacija in koeficient variacije pri preverjanju robustnosti postopkov RT-PCR v realnem času.

Table 24: Standard deviation and variation coefficient in robustness testing of real time RT-PCR protocols.

Test RT-PCR v realnem času	Vrednost Cq po hranjenju pri sobni temperaturi (št. дни)								Standardna deviacija	Koeficient variacije (%)
	0	5	10	15	20	25	30			
za dokazovanje RABV	12,20	12,24	12,78	13,43	13,63	13,69	14,40	0,81	6,1	
za dokazovanje EBLV 1	11,64	11,95	12,64	12,65	12,66	12,69	13,38	0,56	4,4	
za dokazovanje EBLV 2	15,27	16,30	16,37	16,57	16,64	16,65	17,03	0,55	3,3	
za dokazovanje cepnih sevov	17,46	17,91	18,21	18,38	19,37	19,46	19,64	0,85	4,5	

Daljši, kot je bil čas hranjenja vzorcev pri sobni temperaturi, višje so bile vrednosti Cq. Standardna deviacija je bila najvišja pri postopku RT-PCR v realnem času za dokazovanje cepnih sevov virusov stekline. Koeficient varijacije je bil med 3,3 in 6,1 %.

4.3.7 Rezultati preverjanja specifičnosti postopkov RT-PCR v realnem času

Na osnovi preverjanja pravilnosti štirih ločenih postopkov RT-PCR v realnem času smo določili število pravilno opredeljenih rezultatov in nepravilno opredeljenih rezultatov, to je število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Za preverjanje specifičnosti postopkov RT-PCR v realnem času za dokazovanje EBLV1, EBLV 2 in cepnih sevov smo uporabili 55 vzorcev, opisanih v tabeli 7. Za preverjanje specifičnosti postopka RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV smo uporabili le 52 vzorcev (tabela 7). Izključili smo tri vzorce, ki izvirajo iz Amerike. Za vsak postopek smo izračunali diagnostično specifičnost in diagnostično občutljivost.

Pri postopkih RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV, EBLV 1, EBLV 2 in cepnih sevov sta bili diagnostična specifičnost in diagnostična občutljivost enaki 1.

5 RAZPRAVA

5.1 PROUČEVANJE MOLEKULARNO-EPIDEMIOLOŠKIH ZNAČILNOSTI VIRUSA STEKLINE

Prvič so molekularno-epidemiološke značilnosti virusov stekline na področju Evrope proučevali že leta 1999 (Bourhy in sod., 1999). V raziskavo so vključili 95 sevov iz 26 različnih držav in ugotovili, da so med divjimi in domačimi živalmi najpogosteje prisotni klasični sevi virusa stekline (RABV). Na področju Evrope so poleg vrste RABV ugotovili tudi vrsti EBLV 1 in EBLV 2, ki sta primarno razširjeni med žužkojedimi netopirji. Prvič so določili tudi nukleotidno zaporedje dveh slovenskih virusnih sevov (9494SLN, 94100SLN). Nukleotidno zaporedje odseka na genu za nukleoprotein so prvič objavili leta 1999 (Bourhy in sod., 1999). V omenjeni študiji so virusne seve, dokazane v Evropi, razvrstili glede na geografsko lokacijo v štiri razrede. Slovenska seva 9494SLN in 94100SLN so razvrstili v razred zahodnoevropskih sevov.

Poglobljeno molekularno-epidemiološko raziskavo virusnih sevov stekline, ki smo jih zbrali med letoma 1994 in 2010 pri divjih in domačih živalih v Sloveniji, smo objavili leta 2011 (Rihtarič in sod., 2011). Raziskavo smo kasneje še razširili na večje število sevov. Pregledali smo 93 sevov, izoliranih pri različnih vrstah živali, in ugotovili, da sodijo vsi slovenski sevi virusov stekline v vrsto RABV.

V filogenetsko analizo smo vključili trideset virusnih sevov. Izbrali smo jih glede na geografsko lokacijo, živalsko vrsto in leto najdbe (slika 16). Proučevali smo dva različna dela genoma, in sicer odsek na genu za nukleoprotein in odsek na genu za RVG. Gen za nukleoprotein smo izbrali, ker je po podatkih iz literature najbolje ohranjen v genomu virusa stekline in je zato primeren za ugotavljanje epidemioloških in evolucijskih sorodnosti med virusi stekline (Smith in sod., 1992; Nadin-Davis in sod., 1994; Kissi in sod., 1995). Gen za RVG smo izbrali za razlikovanje med cepnimi in divjimi sevi virusov stekline. Iz literature je znano, da določene mutacije na genu za RVG lahko vplivajo na virulenco virusa. Tako se lahko namesto aminokisline arginin ali lizin na mestu 333 pojavi glutamin, izolevcin, glicin, metionin ali serin, kar naj bi zmanjšalo virulenco virusa (Dietzschold in sod., 1983; Seif in sod., 1985; Tuffereau in sod., 1989).

Razporeditev virusnih sevov v filogenetskih drevesih je bila skoraj identična (slika 16). Ugotovili smo, da lahko za zanesljivo filogenetsko primerjavo virusov stekline uporabimo tako odsek gena za nukleoprotein kot tudi odsek gena za RVG.

Viruse stekline smo dokazali pri različnih živalskih vrstah, večinoma pri rdeči lisici, ki je glavni rezervoar virusa stekline v Sloveniji (Hostnik in Bidovec 1999). Pri domačih živalih, ki so bile okužene z virusom stekline, smo v večini primerov ugotovili, da so bile v stiku z lisico. Prav tako so molekularne analize nukleotidnih zaporedij obeh genov pokazale, da so virusni sevi dokazani pri različnih domačih in divjih živalih zelo podobni ali pa celo povsem enaki virusnim sevom, izoliranim pri rdeči lisici (slika 13).

V filogenetskem drevesu (slika 13), v katerem smo primerjali 93 sevov, so se slovenski virusni sevi razvrstili v tri genetsko sorodne skupine. V prvo genetsko skupino je uvrščenih 89 virusnih sevov, v drugo virusna seva 664-02SVN in 467-12SVN in v tretjo virusna seva 537-08SVN in 3511-12SVN. Virusne seve, uvrščene v prvo genetsko skupino, lahko razvrstimo glede na geografsko lokacijo v razred zahodnoevropskih sevov virusov stekline (Bourhy in sod., 1999).

Virusna seva, uvrščena v drugo genetsko skupino, sta sorodna virusnemu sevu 8653YOU, ki so ga izolirali pri volku iz Bosne in Hercegovine leta 1986. Na nivoju nukleotidnih zaporedij tako v genu za nukleoprotein kot v genu za RVG lahko opazimo zelo veliko podobnost med virusnimi sevi 664-02SVN, 467-12SVN in 8653YOU (slika 13). Predpostavljamo, da virusna seva 664-02SVN in 467-12SVN izvirata iz Bosne in Hercegovine, v Slovenijo pa sta prišla z naravnimi premiki živali preko Hrvaške. Glede na geografsko lokacijo lahko razvrstimo seva 664-02SVN in 467-12SVN v razred vzhodnoevropskih sevov virusov stekline (Bourhy in sod., 1999). Virusni sevi, ki so uvrščeni v tretjo genetsko skupino, spadajo med cepne seve virusov stekline iz skupine SAD.

S filogenetsko analizo virusov stekline smo ugotovili, da slovenski sevi spadajo v tri genetsko sorodne skupine: zahodnoevropski sevi (prva genetska skupina), vzhodnoevropski sevi (druga genetska skupina) in cepni sevi (tretja genetska skupina) (slika 13).

Številne primere stekline smo v zadnjem desetletju v Sloveniji ugotovili v bližini hrvaške meje. V tem obdobju sosednja Hrvaška še ni izvajala programa peroralnega cepljenja lisic. Lojkić in sodelavci (2009) poročajo, da je 20 odstotkov vseh testiranih vzorcev lisic pozitivnih na steklino. Ugotovili so silvatično obliko bolezni, pri kateri je rdeča lisica glavni rezervoar bolezni. V naši raziskavi smo primerjali nukleotidna zaporedja 422 nt dolgega odseka gena za nukleoprotein sedmih slovenskih virusnih sevov (498-94SVN, 696-15-95SVN, 1116-00SVN, 1339-00SVN, 275-08SVN, 1085-09SVN, 52-10SVN) in enega hrvaškega seva CRO_09SK (Lojkić in sod., 2009) ter potrdili 99,5–100-odstotno podobnost (slika 17). Iz tega lahko sklenemo, da so slovenski sevi zelo sorodni hrvaškemu predstavniku CRO_09SK. Pričakujemo lahko, da bodo na Hrvaškem ugotavljali podobne seve kot v Sloveniji.

Steklino so v sosednji Italiji izkoreninili leta 1995, vendar so oktobra leta 2008 potrdili nov primer bolezni v provinci Udine. V istem letu so ugotovili še osem primerov stekline pri lisicah. Zaradi potrjenih primerov bolezni so januarja in februarja leta 2009 v Italiji začeli izvajati program peroralnega cepljenja lisic (Capello in sod., 2010). Položili so 35.000 vab z virusnim sevom SAG2 na področju 1.618 km², na katerem so bili ugotovljeni primeri bolezni (DeBenedictis in sod., 2009). Program peroralnega cepljenja so zasnovali tako, da so zajeli žarišča bolezni in 20-kilometrski varnostni pas. Kljub peroralnemu cepljenju lisic so leta 2009 ugotovili 68 novih primerov bolezni, leta 2010 pa 131. Dva italijanska seva, 08RS-1981/Udine/2008 in Dog/09RS-1459/Udine/2009, ki so ju v tem obdobju izolirali v Italiji, smo primerjali s 93 slovenskimi sevi (slika 16) in ugotovili 91,8–100-odstotno podobnost (ni prikazano). Iz opravljenе molekularno-epidemiološke primerjave lahko domnevamo, da se je steklina v letu 2008 razširila z naravnimi premiki živali iz Slovenije v Italijo.

5.2 CEPNA SEVA VIRUSA STEKLINE PRI LISICAH V SLOVENIJI

Program peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji izvajamo že od leta 1988. V obdobju 1988–2006 smo uporabljali dve različni cepivi, in sicer Lysvulpen (Bioveta, Češka), ki vsebuje sev SAD Bern, in Fuchsoral (IDT Biologika GmbH, Nemčija), ki vsebuje sev SAD B19. Zahodno od Ljubljane smo uporabljali cepivo Lysvulpen, vzhodno od Ljubljane pa cepivo Fuchsoral. Po letu 2006 v Sloveniji uporabljamo le cepivo Fuchsoral (Hostnik in sod., 2011).

Cepni sev skupine SAD nima nevropatogenih lastnosti, zato ga pri cepljeni živali ne moremo izolirati iz možganov. Vendar so na področju Avstrije in Nemčije opisali šest primerov, pri katerih so iz možganov lisic izolirali tudi cepni sev virusa stekline (Muller in sod., 2009a). Vsa cepiva, ki so jih uporabili v teh državah, so vsebovala sev SAD B19, ki ni patogen za lisice, a je v opisanih primerih vseeno povzročil bolezen. Cepiva z modificiranimi živimi virusi lahko v določenih okoliščinah povzročijo nastanek bolezni, kar je bilo opisano tudi za humano peroralno cepivo s poliovirusom in cepivo proti pasji kugi (Carpenter in sod., 1976; Bush in sod., 1976; Kazacos in sod., 1981; Wane in sod., 1987; Durchfeld in sod., 1990; Driesel in sod., 1995; Georgescu in sod., 1997; Cherkasova in sod., 2002).

V naši raziskavi smo ugotovili dva primera okužb s cepnim virusom stekline pri lisicah. Cepni virusni sev (537-08SVN) smo potrdili pri mladi lisici, ki je poginila na dvorišču v Gornjih Dramljah v občini Šentjur. Lisica je poginila februarja leta 2008 pred spomladanskim polaganjem vab. Drugi primer cepnega virusnega seva (3511-12SVN) smo potrdili pri lisici, stari manj kot eno leto. Lisico so zaradi nenavadnega vedenja odstrelili lovci maja 2012 v krajevni skupnosti Most na Soči. Prvi primer cepnega seva virusa stekline smo potrdili v možganih lisice tri mesece po polaganju vab, drugi primer pa med izvajanjem peroralnega cepljenja lisic. Ugotavljamo, da na območju polaganja vab v Sloveniji občasno lahko potrdimo tudi posamezne primere cepnega seva virusa stekline v možganih lisic.

Muller in sodelavci (2009a) so z metodami IVCK in RT-PCR ugotovili tri cepne seve virusov stekline, ki so jih v testu dIF ovrednotili kot negativne. Predpostavljajo, da je vzrok za lažno negativne rezultate nizko število virusnih delcev v vzorcu možganov (Muller in sod., 2009a). V našem primeru smo cepna virusna seva 537-08SVN in 3511-12SVN potrdili tudi s testom dIF. Sklenemo lahko, da je bilo število virusnih delcev v vzorcih možganov dovolj veliko, da smo jih lahko dokazali s testom dIF.

Različna monoklonalna protitelesa proti nukleoproteinu virusa stekline uporabljamo za razlikovanje med različnimi vrstami virusov stekline. Razlikovala naj bi tudi med divjimi in cepnimi sevi stekline. Številni znanstveniki ugotavljajo, da je tipizacija z monoklonalnimi protitelesi večkrat nezanesljiva (Cox in sod., 1992; Schneider in sod., 1985; Matouch in sod.,

2007). Kljub temu da je Muller s sodelavci (2009b) dokazal cepni sev z monoklonalnimi protitelesi MW187.6.1., pa priporoča, da rezultate tipizacije virusov stekline z monoklonalnimi protitelesi primerjamo še z rezultati drugih metod za tipizacijo virusov (RFLP, sekvenciranje). Slovenska cepna seva 537-08SVN in 3511-12SVN smo dokazali z monoklonalnimi protitelesi W239.17, nismo pa ju uspeli dokazati z monoklonalnimi protitelesi MW187.6.1., ki ne prepozna cepnih sevov. Iz rezultatov tipizacije z monoklonalnimi protitelesi lahko potrdimo, da sta seva 537-08SVN in 3511-12SVN cepna seva.

Za tipizacijo RABV lahko uporabljamo tudi metodo RFLP (Fooks in sod., 2009). Pri analizi slovenskih cepnih virusnih sevov z metodo RFLP smo dobili dva produkta specifičnih velikosti 259 bp in 159 bp (slika 20) in tako potrdili, da sta virusna seva 537-08SVN in 3511-12SVN v resnici cepna seva virusa stekline.

Tudi z analizo nukleotidnih zaporedij odseka v genu za nukleoprotein smo potrdili, da sta virusna seva 537-08SVN in 3511-12SVN enaka cepnemu sevu SAD B19 (slika 14), ki ga v Sloveniji uporabljamo za peroralno cepljenje lisic že od leta 1988.

Čeprav so znanstveniki že potrdili rekombinacije med cepnimi in divjimi sevi virusa stekline (Chare in sod., 2003), pa se le-te pojavljajo bolj redko. Z molekularno-epidemiološkimi raziskavami so potrdili rekombinacije med divjimi sevi stekline in cepnimi sevi SAD B19, SAD Bern, SAD P5/88 in ERA (Wandeler 1988; Fehlner-Gardiner in sod., 2008; Muller in sod., 2009a). Ugotovili so, da je na 333. mestu v proteinu RVG pri divjih sevih prisoten glutamin, izolevcin, glicin, metionin ali serin. Te aminokisline so odgovorne tudi za patogenost virusa stekline (Dietzschold in sod., 1983; Seif in sod., 1985; Tuffereau in sod., 1989).

Pojav cepnega seva v možganih lisic, ki jih uplenimo na področjih, na katerih izvajamo peroralno cepljenje, je zelo redek. Razlogov za take primere je več. Prvi razlog je lahko ostanek patogenosti cepiva SAD B19 za glodavce. Znanstveniki so potrdili, da cepljenje s cepivom SAD B19 ni povzročilo bolezni na vzorcu 200 testiranih živali, vključno z gravidnimi lisicami in lisičjimi mladiči (Muller in sod., 2002b; Neubert in sod., 2001; Schuster in sod.,

2001). V varnostnih analizah so mlade in odrasle lisice izpostavili izjemno visokim dozam cepiva. Doze cepiva so stokrat presegale minimalno infektivno dozo, vendar živali niso razvile bolezni (Vos in sod., 1999).

Drugi razlog za pojav tovrstnih primerov je lahko ta, da cepimo živali z oslabljenim imunskim sistemom. Znanstveniki so potrdili, da je cepivo, ki vsebuje sev SAD Bern ali SAD B19, lahko patogeno za živali z oslabljenim imunskim sistemom (Pastoret in sod., 1999; Vos in sod., 1999; Wandeler, 2000; Have in sod., 2002). Pri obeh primerih, pri katerih smo potrdili cepni sev v možganih lisic v Sloveniji, lahko predvidevamo, da sta imeli mladi lisici oslabljen imunski sistem, zato je zaužitje vabe z virusnim sevom SAD B19 lahko povzročilo nastanek bolezni in pigin živali.

Tretji razlog za pojav bolezni bi lahko bil, da cepni sev lahko znova pridobi virulenco. Za viruse z RNA je značilna visoka stopnja mutacij zaradi odsotnosti kontrolnega mehanizma encima RNA polimeraze. S proučevanjem mutacij in genetske stabilnosti cepnega seva SAD B19 skozi več pasaž pa so znanstveniki potrdili genetsko stabilnost seva, zato je teorija o tem, da cepni virus lahko ponovno pridobi virulenco le malo verjetna (Beckert in sod., 2009).

Opisana primera, pri katerih smo potrdili cepni sev v možganih lisic v Sloveniji, po naši oceni nimata velikega epidemiološkega pomena. V situaciji, ko ima 70–80 odstotkov populacije lisic specifična protitelesa proti virusu stekline, ne pričakujemo, da bi se razvilo novo žarišče bolezni.

Prvič smo ugotovili cepni sev v možganih lisice leta 2008. Poginjeno lisico smo našli znotraj naselja. Podatka o nenavadnem vedenju živali nismo dobili. Drugi primer cepnega seva v možganih lisice smo ugotovili leta 2012. Lisica se je v dnevnem času sprehajala po naselju, ni bila boječa, bila je napadalna in njena hoja ni bila koordinirana. Na osnovi anamnestičnih podatkov in rezultatov laboratorijskih preiskav lahko sklepamo, da cepni virus SAD B19 pri lisici izzove tudi klinično obliko stekline in smrt. Znanstveniki še niso uspeli odgovoriti na vprašanje, ali je lisica, okužena s cepnim virusom SAD B19, lahko vir okužbe za neokužene živali. Pri primeru cepnega seva v možganih lisice iz leta 2012 smo nukleinsko kislino virusa

SAD B19 dokazali tudi v tkivu žleze slinavke (rezultati niso prikazani). Sklepamo lahko, da je bil virus prisoten tudi v slini živali, kar pomeni, da bi lisica lahko potencialno okužbo prenesla naprej. Znanstveniki predvidevajo, da lahko ti primeri zaradi dolge inkubacijske dobe povzročijo nova žarišča bolezni. V državah, v katerih so izvajali program izkoreninjenja stekline s sevom SAD B19, so v končni fazi potrdili nova žarišča bolezni. V Franciji in Švici so program izkoreninjenja bolezni končali s cepivom, ki vsebuje virusni sev SAG (Aubert in sod., 2004; Bugnon in sod., 2004).

5.3 PRIMERJAVA OBČUTLJIVOSTI IN ROBUSTNOSTI METOD DIF, IVCK IN RT-PCR

Za kontrolo in diagnostiko stekline so pomembne hitre in zanesljive laboratorijske metode. Ena izmed prvih razvitih imunohistoloških metod je barvanje histoloških preparatov možganov po Sellerju (Tierkel in Atanasiu, 1996). Z omenjeno metodo potrjujemo prisotnost Negrijevih telesc v možganih živali, vendar je zaradi nizke specifičnosti in občutljivosti svetovna zdravstvena organizacija ne priporoča več (WHO, 2005). Test dIF je hiter in zanesljiv, boljša je tudi njegova specifičnost in občutljivost. V številnih laboratorijih ga uporabljajo kot referenčno metodo za diagnostiko stekline (Beauregard in sod., 1965). V diagnostiki stekline najprej ugotavljamo prisotnost virusa v možganskem tkivu živali s testom dIF, ki traja manj kot dve uri. Izvedba je enostavna, njeni stroški pa so nizki. Občutljivost testa dIF smo preverili na izbranih arhivskih vzorcih, ki smo jih hranili pri temperaturi nižji od -15°C . Njegova občutljivost je bila od 10^{-1} (1254/00SVN) do 10^{-5} (1466-10SVN) (tabela 15). Najnižja občutljivost je bila pri najstarejšem vzorcu (10^{-1} pri vzorcu 1254/00SVN), najvišja pa pri vzorcu iz leta 2010 (10^{-5} pri vzorcu 1466-10SVN). Testirali smo tudi vzorce, ki smo jih hranili pri temperaturi nižji od -15°C in nižji od -50°C (tabela 5). Rezultati občutljivosti testa so bili enaki pri vzorcih, ki smo jih hranili pri temperaturi nižji od -15°C eno leto, kot tudi pri vzorcih, ki smo jih hranili pri temperaturi nižji od -50°C daljše časovno obdobje.

Vzorce možganskega tkiva pregledamo s testom dIF v 48 urah ali pa jih hranimo v zamrzovalniku pri temperaturi pod -15°C (CDC, 2006). Odstopanje od predpisanega načina hranjenja vzorca in večkratno zamrzovanje in tajanje vzorca zmanjša zanesljivost dobljenega rezultata (CDC, 2006).

Hranjenje vzorca pri sobni temperaturi več kot 5 dni močno vpliva na rezultat (tabela 16). Podobno so ugotovili tudi Rojas in sodelavci (2006); pozitivne vzorce so hrани pri temperaturi 25–27 °C do 26 dni in jih testirali s testom dIF 1., 2., 3., 4., 7., 10., 12., 16., 18., 23. in 26. dan. Pozitiven rezultat so dobili le do 7. dneva.

V zgodnji fazì okužbe z virusom stekline lahko s testom dIF dobimo negativne rezultate, saj je število virusnih delcev v tem času še tako nizko, da jih s to metodo ne moremo določiti. Dean in sodelavci (1996) so 0,05 % vzorcev ovrednotili s testom dIF kot negativne, z metodo IVCK pa kot pozitivne. Kadar postavimo sum na steklino, z metodo dIF pa dobimo negativen rezultat, vzorec pregledamo še z drugo metodo (Cliquet in Barrat, 2008). Sum na steklino pri živalih postavimo na osnovi kliničnih znakov bolezni, vendar je klinična slika stekline diferencialno diagnostično podobna pasji kugi in bolezni Aujeszkega (Frolich in sod., 2000). Z metodo IVCK dokazujemo zmožnost razmnoževanja virusa stekline na celični kulturi. Lahko jo izvajamo na posebnih predmetnih stekelcih (angl. Labtek chamber slides) ali na mikrotiterskih ploščah. Odločili smo se za uporabo mikrotiterskih plošč, saj so enostavne za uporabo, omogočajo pregled večjega števila vzorcev in so cenovno ugodnejše. Dovzetnih celičnih kultur je veliko, vendar najpogosteje uporabljamo kulture N2a, MNA, Na42/13 (podatki CRL, Nancy, Francija). Odločili smo se za uporabo kulture celic N2a. Priprava suspenzije vzorcev se med laboratoriji razlikuje, najpogosteje pa uporablja supernatant 10-odstotne suspenzije vzorca v RPMI (Gibco®, Invitrogen CorporationTM, ZDA). Tudi razmerje med številom celic in količino inokuluma je različno. Upoštevali smo priporočila EURL in uporabili 100 µl 10-odstotne suspenzije vzorca in 200 µl suspenzije celic z gostoto 5×10^5 celic/ml. Čas inkubacije je odvisen od hitrosti rasti celic. Priporočen čas inkubacije je 48–120 ur. V našem primeru smo upoštevali priporočila EURL in inkubirali 96 ur. Za vzorce, ki smo jih z metodo IVCK ovrednotili kot negativne na virus stekline, smo pripravili še dve pasaži na celični kulturi.

CDC (2006) navaja, da so za preiskavo z metodo IVCK primerni le sveži vzorci. Pri vseh vzorcih, ki smo jih hrani več kot eno leto pri temperaturi pod –15 °C, smo tudi mi dobili negativen rezultat. Le pri treh vzorcih, ki smo jih hrani pod –50 °C, smo dobili pozitivnega

(tabela 17). Sklenemo lahko, da vzorci, ki jih hranimo več kot 17 mesecev pri temperaturi pod -15°C , niso primerni za dokazovanje virusa stekline z metodo IVCK.

Robustnost metode IVCK smo ugotavljali tako, da smo dva vzorca hrani pri sobni temperaturi 0–30 dni. Negativen rezultat smo dobili pri vseh vzorcih, ki smo jih hrani pet dni in več pri sobni temperaturi. Ugotovimo lahko, da vzorci, ki jih hranimo pri sobni temperaturi pet ali več dni, niso primerni za analizo z metodo IVCK.

Zaradi potreb po vse hitrejši diagnostiki stekline v številnih laboratorijih že uporabljajo molekularne metode. Za diagnostiko stekline najpogosteje uporabljajo metodo RT-PCR za določanje nukleinske kisline virusa stekline, ki pomnožuje odseke v genu za nukleoprotein (Fooks in sod., 2009). Metodo RT-PCR za dokaz nukleinske kisline virusa stekline uporabljajo tudi za analizo vzorcev, ki niso bili primo shranjeni (Whitby in sod., 1997; David in sod., 2002; Araujo in sod., 2008) in za arhivske vzorce (Kulonen in sod., 1999). V naši raziskavi smo z metodo RT-PCR dobili pozitiven rezultat pri vseh vzorcih, ki smo jih hrani pri temperaturi pod -15°C .

Določili smo tudi mejo zaznavanja, ki je bila v razredčitvi od 10^{-2} (1254/00SVN) do 10^{-6} (1466-10SVN). Najnižjo mejo zaznavanja smo določili pri najstarejšem vzorcu iz leta 2000, najvišjo pa pri vzorcu iz leta 2010 (tabela 18). Tudi pri vzorcih, ki smo jih hrani pri temperaturi pod -50°C , smo dokazali virusno nukleinsko kislino, meja zaznavanja pa je bila identična kot pri vzorcih, ki smo jih hrani pod -15°C (tabela 18).

Kamolvarin in sodelavci (1993) so opisali postopek RT-PCR z dodatnim pomnoževanjem z notranjimi začetnimi oligonukleotidi za vzorce, ki niso bili shranjeni po priporočilih CDC. Meja zaznavnosti te metode je ena kopija virusne nukleinske kisline. Zaradi dodatnega pomnoževanja nukleinske kisline pa obstaja velika možnost navzkrižne kontaminacije pri izvajanju te metode (Reubel in Studdert, 1998). Zaradi opisanih problemov smo v naši raziskavi izbrali metodo RT-PCR, ki poteka v eni stopnji.

Metoda RT-PCR je zanesljiva in učinkovita le takrat, kadar pri pomnoževanju uporabljam začetne oligonukleotide, ki so komplementarni odseku na genomu virusne RNA. Lažno negativne rezultate RT-PCR so dobili, ko so uporabljali začetne oligonukleotide, ki so pomnoževali le nekatere seve virusov stekline iz vrste RABV (Kulonen in sod., 1999). Negativne rezultate so dobili pri vzorcih netopirja in rakunjih psov, okuženimi s sevi stekline, ki ne sodijo v vrsto RABV. V naši raziskavi smo zato izbrali postopek RT-PCR za dokazovanje vseh enajstih vrst virusov stekline (Vasquez-Moron in sod., 2006). Za pomnoževanje smo izbrali gen za nukleoprotein, ki je pri vseh vrstah virusov stekline najbolj ohranjen (Smith in sod., 1992; Nadin-Davis in sod., 1994; Kissi in sod., 1995).

Metoda RT-PCR se je izkazala za primerno tudi pri preiskavi vzorcev možganov, ki jih hranimo do 30 dni pri sobni temperaturi. Med vsemi metodami, ki smo jih uporabili za dokazovanje virusa stekline v vzorcih hranjenih pri sobni temperaturi, je najbolj robustna metoda RT-PCR (tabela 19), sledi ji metoda dIF (do 5 dni) (tabela 16). Najmanj je robustna metoda IVCK in je primerna le za sveže vzorce.

V povprečju je metoda RT-PCR 10-krat bolj občutljiva kot metoda dIF. Le v dveh primerih, ko smo vzorca možganov hranili le krajši čas pri temperaturi pod -15 °C in pod -50 °C, je bila občutljivost obeh testov enaka (tabela 15, tabela 18). Ugotovili smo, da je metoda RT-PCR izmed vseh treh metod tudi najbolj robustna in zato primerna za preiskavo vzorcev, ki jih hranimo do trideset dni pri sobni temperaturi (tabela 19). Hranjenje vzorcev bistveno vpliva na rezultate testov dIF in IVCK, medtem ko tega vpliva na rezultate RT-PCR nismo opazili. Sklepamo lahko, da lipoproteinska ovojnica virusa stekline ščiti virusno nukleinsko kislino, zato smo jo v naši raziskavi z metodo RT-PCR lahko dokazali tudi v vzorcih, ki smo jih hranili do trideset dni pri sobni temperaturi. Araujo in sodelavci (2008) so proučevali vpliv hranjenja vzorcev možganov pri temperaturi -20 °C na rezultat RT-PCR. V svoji raziskavi so vzorce testirali z metodo RT-PCR po štirih in petih letih hranjenja. Po štirih letih hranjenja vzorcev pri -20 °C so dobili lažno negativne rezultate pri 33,3 % testiranih vzorcev, po petih letih hranjenja pa pri 50 % testiranih vzorcev. V naši raziskavi smo vzorce hranili pri temperaturi pod -15 °C do 11 let (1254-00SVN). Z metodo RT-PCR smo potrdili nukleinsko kislino pri vseh

testiranih vzorcih (tabela 18). Sklenemo lahko, da je metoda RT-PCR, ki smo jo uporabili v naši raziskavi, občutljivejša od metode RT-PCR, ki so jo uporabili Araujo in sodelavci.

V vzorcih možganov, ki jih hranimo pri sobni temperaturi, poteka avtoliza tkiv, kar vpliva tudi na obstojnost virusa stekline v teh tkivih. S hranjenjem vzorcev možganov pri sobni temperaturi 0–30 dni smo simulirali naravne pogoje, ki so podobni tistim, ko živali najdemo poginjene v naravi, čas pogina pa nam ni znan. Prav tako lahko z omenjenim poskusom posnemamo pogoje transporta vzorcev v laboratorij, ki traja dalj časa pri sobni temperaturi. Kadar hranimo vzorce pri sobni temperaturi več kot pet dni, lahko s testom dIF dobimo lažno negativen rezultat. Pri avtolizi vzorca zaradi hranjenja pri sobni temperaturi nastajajo tudi produkti, ki so toksični za kulturo celic in zavirajo njihovo razmnoževanje (Rubb in Trimarchi, 1989). Metodi IVCK in dIF torej za dokazovanje virusov stekline v neprimerno hranjenih vzorcih nista primerni. V takih primerih se je izkazala za uporabno le metoda RT-PCR.

Na osnovi primerjave občutljivosti in robustnosti treh metod za diagnostiko stekline lahko sklenemo, da lahko metodo IVCK uporabimo le, kadar v laboratorij prejmemo sveže vzorce možganov. Za analizo vzorcev, katerih transport traja do pet dni pri sobni temperaturi, lahko uporabimo metodo dIF. Za vzorce, ki jih hranimo dalj časa pri sobni temperaturi, pa je najbolj primerna metoda RT-PCR. Velikokrat v laboratorij prejmemo vzorce, za katere nimamo podatkov, koliko časa je preteklo od pogina živali do prihoda vzorcev v laboratorij. V takih primerih uporabimo metodo RT-PCR. Vzorec živali, ki je ugriznila človeka, tudi testiramo z metodo RT-PCR, saj je izmed testiranih metod najbolj občutljiva in zanesljiva.

5.4 RT-PCR V REALNEM ČASU ZA RAZLIKOVANJE MED VRSTAMI RABV, EBLV 1, EBLV 2 IN CEPNIMI SEVI

Z razvojem metode RT-PCR v realnem času so se pojavili tudi številni opisi postopkov za razlikovanje med različnimi vrstami virusov stekline (Wakeley in sod., 2005) ali pa za hkratno dokazovanje več vrst virusov stekline (Coertse in sod., 2010; Hoffman in sod., 2010). Opisani postopki so bolj občutljivi od klasičnih metod RT-PCR (Haymann in sod., 2011), vendar pa za izvedbo potrebujemo veliko različnih začetnih oligonukleotidov in specifičnih sond za

prepoznavanje tarčnih zaporedij. Mnenja glede uporabe metode RT-PCR v realnem času kot referenčne metode v diagnostiki stekline so različna, saj gre za metodo z visoko mejo zaznavnosti. OIE in WHO še vedno ne priporočata izvajanja RT-PCR v realnem času v rutinski diagnostiki stekline, saj s številnimi opisanimi postopki ni mogoče dokazovati vseh vrst virusov stekline. Uporabo metode RT-PCR v realnem času priporočajo v tistih laboratorijih, v katerih so virusne seve glede na geografsko področje že molekularno analizirali in metoda služi le za razlikovanje med vrstami virusov stekline (Fooks in sod., 2009). V takem primeru lahko s specifično metodo RT-PCR v realnem času, ki jo predhodno validiramo, nadomestimo metodo določanja nukleotidnega zaporedja (Hughes in sod., 2004).

Zaradi težje dostopnosti do različnih sevov virusov stekline so številne postopke RT-PCR v realnem času validirali na majhnem številu sevov (Shankar in sod., 2004; Hughes in sod., 2004, Orlowska in sod., 2008; Wacharapluesadee in sod., 2008). Vključitev v evropsko raziskovalno mrežo Epizone (<http://www.epizone-eu.net>) nam je omogočila dostop do širokega spektra različnih sevov virusov stekline, s katerimi smo lahko testirali štiri različne postopke RT-PCR v realnem času. Sevi virusov stekline so izvirali iz 16 različnih držav, in sicer iz Francije, Velike Britanije, Avstralije, Estonije, Združenih arabskih emiratov, Afganistana, Iraka, Čila, Finske, Nigerije, ZDA, Saudske Arabije, Nemčije, Bolgarije, Kitajske in Kanade. Uporabili smo metodo RT-PCR v realnem času, ki so jo razvili Wakeley in sodelavci (2005). Z metodo smo razlikovali med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2. Za dokazovanje virusne nukleinske kisline smo uporabili dva začetna oligonukleotida in tri sonde, specifične za posamezno vrsto, ter dva začetna oligonukleotida in eno specifično sondu za kontrolo pomnoževanja. Postopek smo nekoliko modificirali. Sonde smo označili z različnimi poročevalskimi barvili, da bi tako lahko razlikovali med vsemi tremi vrstami virusov stekline v eni sami reakcijski mešanici. Z izvajanjem metode v eni sami reakcijski mešanici nismo dobili pravilnih rezultatov, zato smo se odločili, da bomo metodo izvajali v treh različnih reakcijskih mešanicah. Podobne izkušnje so opisali tudi drugi raziskovalci (Black in sod., 2002).

Postopek, ki smo ga uporabili v naši raziskavi, so leta 2010 modificirali tudi Hoffmann in sodelavci (2010). Uporabili so isti par začetnih oligonukleotidov (JW12 in N165-146) in sondu (LysGT1) za dokazovanje vrste RABV. Testirali so še dodaten par začetnih oligonukleotidov

(RV-N_F in RV-N_R) in sondu (RabGT1-B-FAM), vendar s postopkom, ki so ga razvili sami, niso zaznali nekaterih arktičnih, azijskih in afriških sevov. Da bi se izognili lažno negativnim rezultatom, so Hoffman in sodelavci (2010) predlagali združitev obeh postopkov.

Opisan postopek (Wakeley in sod., 2005) so modificirali tudi Haymann in sodelavci (2011). Oblikovali so metodo RT-PCR v realnem času z barvilom SybrGreen. Uporabili so samo začetne oligonukleotide in s tako modificiranim postopkom dokazali vse vrste virusov stekline (Haymann in sod., 2011).

Za razlikovanje cepnih sevov virusov stekline od ostalih RABV smo načrtovali dva začetna oligonukleotida STK V1 in STK V2 in sondu STK V3 (tabela 12) na odseku gena za nukleoprotein. Začetni oligonukleotid STK V1 ima eno neujemanje na 19. mestu nukleotidnega zaporedja med cepnimi in divjimi sevi, STK V2 ima dve neujemanji na 3. in 18. mestu. S sondou TaqMan lahko razlikujemo nukleotidna zaporedja že v enem neujemanju (Hughes in sod., 2004), zato smo pri načrtovanju sonde iskali odsek s čim več neujemanji nukleotidov divjih in cepnih sevov RABV. Sonda STK V3 ima šest neujemanj v nukleotidnem zaporedju na 1., 19., 21., 32., 33. in 36. mestu, glede na divje seve, s cepnimi sevi SAD B19, SAD Bern pa ima 100-odstotno ujemanje.

Vsem štirim postopkom RT-PCR v realnem času smo določili optimalno koncentracijo začetnih oligonukleotidov, sond in MgSO₄. Pri tem smo upoštevali najvišjo vrednost ΔRn pri najnižji vrednosti Cq. Izbrali smo koncentracijo začetnih oligonukleotidov 800 pmol/µl. Prav tako so koncentracijo za začetne oligonukleotide izbrali tudi Wakeley in sodelavci (2005). Medtem ko je Wakeley s sodelavci (2005) izbral za sondu koncentracijo 200 pmol/µl, smo mi ugotovili, da je enako učinkovita tudi nižja koncentracija 100 pmol/µl. Tako smo znižali količino reagentov v reakcijski mešanici in tudi stroške same metode.

Pri preverjanju pravilnosti oziroma zanesljivosti vseh štirih postopkov RT-PCR v realnem času smo pri treh postopkih dobili pričakovane rezultate, pri postopku za dokazovanje vrste RABV, pa smo dobili pri treh sevih lažno negativen rezultat (tabela 21). Vsi trije sevi izvirajo iz Južne in Severne Amerike, in sicer vzorec L5 so izolirali leta 1973 v Čilu, vzorec L12 so izolirali leta

1979 prav tako v Čilu in vzorec L29 leta 1986 v Kanadi. Sklenemo lahko, da postopek RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV ni primeren za dokazovanje sevov RABV, ki izvirajo iz Amerike. Dokazali smo, da je postopek RT-PCR v realnem času za dokazovanje RABV primeren za dokazovanje sevov RABV, ki so razširjeni v drugih predelih sveta. Metodo smo v našem laboratoriju uvedli izključno za razlikovanje med evropskimi vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2, za dokazovanje vseh sevov RABV vključno z ameriškimi sevi pa bi morali postopek modificirati.

Z vsemi štirimi postopki RT-PCR v realnem času smo v osmih ponovitvah testirali poznane vzorce. Pri vseh testiranih vzorcih smo dobili pričakovano ponovljivost. Vse postopke RT-PCR v realnem času smo uporabili izključno za namen razlikovanja med vrstami RABV, EBLV 1, EBLV 2 in cepnih sevov, zato smo rezultate vrednotili le kvalitativno. Na osnovi rezultatov lahko ugotovimo, da imajo vsi postopki RT-PCR v realnem času dobro ponovljivost (tabela 22).

Občutljivost metode ali meja zaznavnosti pomeni tisto koncentracijo oziroma razredčino tarčne molekule, pri kateri je več kot 50 % rezultatov pozitivnih. Mejo zaznavnosti smo določali z redčenjem vzorcev z znanim titrom virusa stekline. Meja zaznavnosti za dokazovanje vrst RABV je $10^{-6,25}$, za EBLV 1 je $10^{-6,75}$, za EBLV 2 je $10^{-5,25}$, za cepne seve je 10^{-4} (tabela 23). Na osnovi določenih mej zaznavnosti, lahko sklepamo, da imajo vsi štirje postopki visoko občutljivost. Podobno je ugotovila tudi Orlowska s sodelavci (2008). Dokazali so, da je metoda RT-PCR v realnem času 10-krat bolj občutljiva od metode vgnezdeno RT-PCR.

Za ugotavljanje robustnosti metod RT-PCR v realnem času smo testirali referenčne vzorce možganov, ki smo jih hranili pri sobni temperaturi 0, 5, 10, 15, 20, 25 in 30 dni. Vse testirane vzorce smo ovrednotili pozitivno (tabela 24). Ugotovimo lahko, da so vsi štirje postopki RT-PCR v realnem času robustni in primerni tudi za testiranje vzorcev, ki jih daljši čas hranimo pri sobni temperaturi.

Pri vseh štirih postopkih RT-PCR v realnem času smo izračunali tudi diagnostično specifičnost in diagnostično občutljivost. Diagnostična specifičnost za vse štiri postopke je 1. Sklenemo lahko, da je diagnostična specifičnost zelo dobra, saj nismo dobili nobenega lažno pozitivnega rezultata. Diagnostična občutljivost za postopke RT-PCR v realnem času za dokazovanje vrst RABV, EBLV 1 in EBLV 2 ter za dokazovanje cepnih sevov je 1. Na osnovi izračuna lahko ugotovimo, da imajo dobro diagnostično občutljivost vsi štirje postopki RT-PCR v realnem času. Z razvitim postopkom RT-PCR v realnem času za dokazovanje cepnih sevov pa lahko razlikujemo med cepnimi in divjimi sevi virusa stekline. Postopki RT-PCR v realnem času, ki smo jih uvedli v našem laboratoriju, so primerni za testiranje evropskih sevov stekline. Primerne vzorce možganov vedno najprej testiramo s testom dIF, nato pa pozitivne vzorce še tipiziramo z uvedenimi postopki RT-PCR v realnem času.

6 ZAKLJUČKI

- Z molekularnimi metodami smo analizirali 93 virusnih sevov stekline in ugotovili, da sodijo slovenski sevi, zbrani med letoma 1994 in 2012, med klasične evropske seve virusov stekline (RABV).
- Na osnovi primerjave nukleotidnih zaporedij 93 virusov stekline, ki smo jih dokazali pri različnih živalskih vrstah, lahko potrdimo, da je v Sloveniji glavni rezervoar virusa stekline rdeča lisica.
- Iz primerjave dveh filogenetskih dreves, ki smo ju izrisali na podlagi odseka gena za nukleoprotein in odseka gena za RVG, lahko sklepamo, da sta za zanesljivo filogenetsko razvrstitev virusov stekline uporabna odseka obeh genov, saj je bila razporeditev tridesetih virusnih sevov v obeh filogenetskih drevesih skoraj identična.
- Z molekularno-epidemiološko analizo smo 93 virusnih sevov stekline razvrstili v tri genetske skupine. V prvo (89 virusnih sevov) in drugo (dva virusna seva) genetsko skupino smo uvrstili divje viruse stekline, v tretjo genetsko skupino pa smo uvrstili dva virusna seva, ki sta sorodna cepnemu sevu virusa stekline.
- Nukleotidno zaporedje odseka v genu za nukleoprotein (1092 nt) se je pri dveh virusnih sevih (537-08SVN, 3511-12SVN) iz tretje genetske skupine 100-odstotno ujemalo z nukleotidnim zaporedjem cepnega seva SAD B19, ki ga uporabljam za peroralno cepljenje lisic.
- Pri primerjavi rezultatov metod dIF, IVCK in RT-PCR smo ugotovili, da ima najvišjo občutljivost metoda RT-PCR.
- Primerjava rezultatov metod dIF, IVCK in RT-PCR je pokazala, da je metoda RT-PCR imed vseh najbolj robustna, zlasti v primerih, ko viruse stekline dokazujemo v vzorcih, ki so bili dalj časa hranjeni pri sobni temperaturi.
- Za razlikovanje med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2 smo uporabili modificirani postopek po Wakeleyu in sodelavcih (2005), za dokazovanje cepnih sevov pa smo razvili nov postopek RT-PCR v realnem času. Diagnostična specifičnost za vse štiri postopke je 1. Prav tako je diagnostična občutljivost za vse štiri postopke enaka 1.

7 POVZETEK

V preteklem desetletju so v Evropi opravili številne molekularno-epidemiološke študije virusa stekline, s katerimi so potrdili, da so sevi RABV najbolj razširjeni pri sesalcih, vrsti EBLV 1 in EBLV 2 pa sta prisotni predvsem med žužkojedimi netopirji. V raziskavi smo določili molekularno-epidemiološke značilnosti virusov stekline, ki smo jih dokazali pri divjih in domačih živalih v Sloveniji. Ugotovili smo, da sodijo slovenski sevi med klasične evropske seve, v vrsto RABV. Primerjali smo nukleotidna zaporedja odseka za nukleoprotein 93 virusov stekline, ki smo jih izolirali pri različnih živalskih vrstah med letoma 1994 in 2012. S filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij smo ugotovili, da slovenski sevi oblikujejo tri genetske skupine. V prvo genetsko skupino je razvrščenih 89 virusnih sevov, v drugo dva virusna seva in v tretjo prav tako dva virusna seva.

Natančnejšo filogenetsko analizo smo izvedli pri tridesetih virusnih sevih, ki smo jih izbrali glede na geografsko lokacijo, živalsko vrsto in leto najdbe. Proučevali smo dva različna dela genoma, in sicer odsek gena za nukleoprotein in odsek gena za RVG. Izrisali smo dve filogenetski drevesi in ugotovili, da je razporeditev virusnih sevov v obeh skoraj identična. Iz tega lahko sklenemo, da lahko za razvrščanje virusov stekline v genetske skupine uporabimo oba odseka virusnega genoma.

Številni primeri stekline, ki smo jih v zadnjem desetletju ugotovili v Sloveniji, so bili v bližini hrvaške meje. Primerjali smo nukleotidna zaporedja odseka gena za nukleoprotein sedmih slovenskih in enega hrvaškega seva in potrdili 99,5–100-odstotno ujemanje. Pričakujemo lahko, da bodo na Hrvaškem ugotavljalni podobne seve kot v Sloveniji.

Steklino so v sosednji Italiji izkoreninili leta 1995, vendar so oktobra leta 2008 potrdili nov primer bolezni. Nukleotidni zaporedji odseka gena za nukleoprotein dveh italijanskih sevov (08RS-1981/Udine/2008 in Dog/09RS-1459/Udine/2009) smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji slovenskih sevov in ugotovili 99–100-odstotno ujemanje. Iz opravljene molekularno-epidemiološke primerjave lahko sklepamo, da je prvi primer stekline v Italiji v letu 2008 izviral iz Slovenije ali Hrvaške.

Program peroralnega cepljenja izvajamo v Sloveniji od leta 1988. V obdobju 1988–2006 smo uporabljali dve različni cepivi, in sicer Lysvulpen (Bioveta, Češka), ki vsebuje sev SAD Bern, in Fuchsoral (IDT Biologika GmbH, Nemčija), ki vsebuje sev SAD B19. Po letu 2006 uporabljamo v Sloveniji le cepivo Fuchsoral. Med 93 sevi virusa stekline smo iz nukleotidnih zaporedij odseka na genu za nukleoprotein potrdili dva primera cepnih sevov virusov stekline. Opisana primera cepnih sevov virusa stekline, ki smo ju dokazali v možganih lisic, po naši oceni nimata velikega epidemiološkega pomena.

Za kontrolo in diagnostiko stekline so pomembne hitre in zanesljive laboratorijske metode. V naši raziskavi smo preverili občutljivost in robustnost metod dIF, IVCK in RT-PCR. Ugotovili smo, da je med testiranimi metodami najbolj občutljiva metoda RT-PCR. Ko smo primerjali meje zaznavanja metod dIF in RT-PCR, smo ugotovili, da je metoda RT-PCR v povprečju 10-krat bolj občutljiva od metode dIF. Pri testiranju občutljivosti metode IVCK smo pri vseh 12 vzorcih, ki smo jih hranili od 17 do 130 mesecev pri temperaturi nižji od –15 °C, dobili negativen rezultat, z metodama dIF in RT-PCR pa smo dobili pozitiven rezultat. Pri treh vzorcih, ki smo jih hranili od 17 do 19 mesecev pri temperaturi nižji od –50 °C, smo z metodo IVCK dobili pozitiven rezultat. Zato lahko sklenemo, da so za preiskavo IVCK primerni le sveži oziroma primerno shranjeni vzorci. Pri testiranju vzorcev možganov, ki smo jih hranili pri sobni temperaturi 0, 5, 10, 15, 20, 25 in 30 dni, smo ugotovili, da je najbolj robustna metoda RT-PCR, sledi dIF (uporabna le za vzorce, ki so hranjeni pri sobni temperaturi do 5 dni) in IVCK (uporabna le za sveže vzorce).

V rutinski diagnostiki stekline se vse bolj uveljavlja metoda RT-PCR v realnem času. Če uporabimo specifične sonde, lahko z metodo RT-PCR v realnem času razlikujemo med različnimi vrstami virusov stekline brez določanja nukleotidnega zaporedja. Za razlikovanje med vrstami RABV, EBLV 1 in EBLV 2 smo modificirali postopek po Wakeleyu in sodelavcih (2005), za dokazovanje cepnih sevov pa smo razvili nov postopek RT-PCR v realnem času. S tremi postopki RT-PCR (EBLV 1, EBLV 2, cepni sevi) v realnem času smo testirali 55 vzorcev in dobili pričakovane rezultate, pri postopku za dokazovanje vrste RABV pa smo pri treh vzorcih dobili lažno negativne rezultate. Vsi trije vzorci so izvirali iz Južne in Severne Amerike. Postopke RT-PCR v realnem času, ki smo jih razvili in testirali v naši raziskavi, smo uporabili le

za tipizacijo virusov stekline vrst RABV, EBLV 1, EBLV 2 in cepnih sevov. Z novouvedenimi metodami RT-PCR v realnem času lahko hitro in zanesljivo tipiziramo evropske seve virusov stekline.

8 SUMMARY

By molecular-epidemiological analyses of rabies viruses from different European countries, scientists confirmed that RABV species is most commonly found in mammals, EBLV 1 and EBLV 2 species are most commonly found in insectivore bats. In doctoral thesis, the molecular-epidemiological characteristics of rabies virus in wild and domestic animals were determined. We discovered that Slovenian rabies viruses belong to classical European strains within RABV species. We compared nucleotide sequences of 93 rabies viruses, isolated from different animal species collected between 1994 and 2012. By phylogenetic analysis of nucleotide sequences, we discovered that Slovenian strains form three genetic groups. Within the first genetic group, 89 samples were classified, within the second two samples and in the third also two samples.

Precise phylogenetic analysis was conducted on 30 virus strains selected according to geographical location, animal species, and year of collection. Two different parts of genome were compared; partial nucleoprotein gene and partial RVG gene. Two phylogenetic trees were drawn. We observed that virus strains distribution in both phylogenetic was almost identical. We can conclude that for rabies virus classification into genetic groups both genome regions can be used.

Within the last decade, the majority of rabies cases in Slovenia are detected along the border area with Croatia. The comparison of nucleotide sequences of partial nucleoprotein gene of seven Slovenian and one Croatian strain revealed 99.5–100% nucleotide identity. We can expect that in Croatia similar strains will be found.

In 1995, rabies was eradicated from Italy, but in October 2008 new rabies cases nearby Udine were detected. We compared partial nucleoprotein gene region nucleotide sequences of two Italian strains (08RS-1981/Udine/2008 and Dog/09RS-1459/Udine/2009) with nucleotide sequences of Slovenian strains and discovered 99–100% identity. From conducted molecular-epidemiological study, we can conclude that rabies in Italy in 2008 originated from Slovenia or Croatia.

In Slovenia, an oral vaccination program has been running since 1988. During the period 1988–2006, two different vaccines were used; Lysvulpen (Bioveta, Czech Republic), which contains SAD Bern, and Fuchsoral (IDT Biologika GmbH, Germany), which contains SAD B19. Since 2006, we have used only Fuchsoral in Slovenia. Within 93 nucleotide sequences of partial nucleoprotein gene of rabies virus strains, we have confirmed two rabies vaccine strains. In our opinion, the described cases of vaccine strains from fox brains have little significance.

For rabies, control and diagnosis fast and reliable laboratory methods are required. Within our research, we have examined the sensitivity and robustness of dIF, VI, and RT-PCR. We have discovered that RT-PCR has the highest sensitivity within all tested methods. By comparison dIF and RT-PCR limit detection, we have discovered that RT-PCR is approximately 10 times more sensitive than dIF. When testing sensitivity of VI we have confirmed that all 12 samples stored for 17 up to 130 months at <-15 °C were negative, while testing by dIF and RT-PCR the same samples were positive. In three samples stored from 17 up to 130 months at <-50 °C, we have confirmed positive result by VI, therefore, only fresh or properly stored samples are suitable for VI. For testing samples stored at room temperature for 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days, the most robust method is RT-PCR, then dIF (suitable only for samples stored at room temperature up to 5 days), and VI (suitable only for fresh samples).

In routine rabies diagnostics, real time PCR assays have gained relevance. When using specific probes in real time RT-PCR we can differentiate between different species of rabies virus without nucleotide sequence determination. We have modified protocol from Wakely et al. (2005), to distinguish between species RABV, EBLV 1, and EBLV 2. To detect vaccine strains we developed new real time RT-PCR protocol. By testing 55 samples, we have obtained expected results with three real time RT-PCR protocols (EBLV 1, EBLV 2, vaccine strains), with protocol for detecting RABV we obtained three false negative results. All three samples originated from South and North America. Modified and new developed real time RT-PCR protocols were used for typing of rabies virus species RABV, EBLV 1, EBLV 2 and

vaccine strains. With newly established real time RT-PCR method, we can reliably type European rabies virus strains in short period.

9 ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem mentorjema prof. dr. Petru Hostniku in viš. znan. sod. dr. Ivanu Toplaku za strokovno vodstvo in koristne nasvete. Z mano sta nesebično delila svoje znanje in mi odgovorila na vprašanja, ki jim nisem bila kos.

Zahvaljujem se članom komisije prof. dr. Jožetu Gromu, prof. dr. Darji Barlič-Maganja, prof., dr. Srečku Korenu in doc. dr Gorazdu Venguštu za prispevek k izboljšanju naloge.

UVHVVR se zahvaljujem za soglasje za uporabo vzorcev, ki so last UVHVVR.

Za financiranje študija se lepo zahvaljujem Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo na Veterinarski fakulteti.

Zahvaljujem se Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo, ki mi je v okviru javnega razpisa »Inovativna shema za sofinanciranje doktorskega študija za spodbujanje sodelovanja z gospodarstvom in reševanja aktualnih družbenih izzivov – generacija 2010 Univerza v Ljubljani« sofinanciralo doktorski študij.

Za pregled literature se zahvaljujem mag. Brigit Grics Smole. Za lektoriranje se zahvaljujem Vidi Meško in Margit Berlič Ferlinc.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in sodelavcem v virološkem laboratoriju, da so mi stali ob strani in me vzpodbujali.

10 LITERATURA

1. Acton CHW, Harvey MWF. The nature and specificity of Negri bodies. *Parasitology* 1925; 4: 225–72.
2. Albertini AVA, Ruigrok RWH, Blondel D. Rabies virus transcription and replication. In: Jackson AC, eds. *Research advances in rabies*. London: Elsevier, 2011: 2–22.
3. Allworth A, Murray K, Morgan J. A human case of encephalitis due to a lyssavirus recently identified in fruit bats. *Commun Dis Intell* 1996; 20(24): 504.
4. Amengual B, Whitby JE, King A, Serra-Cobo J, Bourhy H. Evolution of European bat lyssaviruses. *J Gen Virol* 1997; 78(9): 2319–28.
5. Amengual B, Bourhy H, Lopez-Roig M, Serra-Cobo J. Temporal dynamics of European bat lyssavirus type 1 and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. *PLoS ONE* 2007; 2: e566 (13 str.)
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0000566> (10. dec. 2011)
6. Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythii*), Kyrgyzstan. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(12): 1623–5.
7. Araujo DB, Langoni H, Almeida MF, Megid J. Heminested reverse-transcription polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. *BMC Res Notes* 2008; 1: e17 (1–6).
<http://www.biomedcentral.com1756-0500/1/17> (10. dec. 2011)
8. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209–19.
9. Aubert MF, Masson E, Artois M, Barrat J. Oral wildlife rabies vaccination field trials in Europe, with recent emphasis on France. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 187: 219–43.
10. Aubert MFA, Cliquet F, Smak JA, et al. Rabies in France, the Netherlands, Belgium, Luxembourg and Switzerland. In: King AA, Fooks AR, Aubert M, eds. *Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean basin*. Paris: OIE, 2004: 129–45.

11. Badrane H, Tordo N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J Virol* 2001; 75: 8096–104.
12. Baer GM, Bales GL. Experimental rabies infection in the Mexican freetail bat. *J Infect Dis* 1967; 117: 82–90.
13. Baer GM, Abelseth MK, Debbie JG. Oral vaccination of foxes against rabies. *Am J Epidemiol* 1971; 93: 487–90.
14. Ballantyne E, O'Donoghue J. Rabies control in Alberta. *J Am Vet Med Assoc* 1954; 125: 316–26.
15. Banyard AC, Johnson N, Voller K, et al. Repeated detection of European bat lyssavirus type 2 in dead bats found at a single roost site in the UK. *Arch Virol* 2009; 154: 1847–50.
16. Banyard AC, Hayman D, Johnson N, McElhinney LM, Fooks AR. Bats and lyssaviruses. In: Jackson AC, eds. *Research advances in rabies*. London: Elsevier, 2011: 239–89.
17. Barge A, Gaudin Y, Coulon P, Ruigrok RW. Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *J Virol* 1993; 67: 7246–53.
18. Beauregard M, Boulanger P, Webster WA. The use of fluorescent antibody staining in the diagnosis of rabies. *Can J Comp Med Vet Sci* 1965; 29: 141–7.
19. Beckert A, Geue L, Vos A, Neubert A, Freuling C, Muller T. Genetic stability (*in vivo*) of the attenuated oral rabies virus vaccine SAD B19. *Microbiol Immunol* 2009; 53: 16–21.
20. Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Goudin Y, Flamand A. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* 1991; 65: 4198–203.
21. Benmansour A, Brahimi M, Tuffereau C, Coulon P, Lafay F, Flamand A. Rapid sequence evolution of street rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the viral population. *Virology* 1992; 187: 33–45.
22. Belak S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects: a view from the OIE collaborating centre for the application of polymerase chain reaction methods for diagnosis of viral disease in veterinary medicine. *Vaccine* 2007; 25: 5444–52.
23. Belikov SI, Leonova GN, Kondratov IG, Romanova EV, Pavlenko EV. Isolation and genetic characterisation of a new lyssavirus strain in the Primorskiy kray.

- East Siberian J Infect Pathol 2009; 16: 68–9.
24. Black JG, Lawson KF. Sylvatic rabies studies in the silver fox (*Vulpes vulpes*): susceptibility and immune response. Can J Comp Med 1970; 34: 309–11.
 25. Black EM, Lowings JP, Smith J, Heaton PR, McElhinney LM. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. J Virol Methods 2002; 105: 25–35.
 26. Blancou J. Vaccines and vaccination against rabies for domestic and wild animals in Europe. Rev Sci Tech OIE 1985; 4: 249–59.
 27. Blumberg BM, Giorgi C, Kolakofsky D. N protein of vesicular stomatitis virus selectively encapsidates leader RNA in vitro. Cell 1983; 32: 559–67.
 28. Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. Virology 1993; 194: 70–81.
 29. Bourhy H, Kissi B, Audry L, et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. J Gen Virol 1999; 80: 2545–57.
 30. Bourhy H, Reynes JM, Dunham EJ, et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. J Gen Virol 2008; 89: 2673–81.
 31. Bourhy H, Dautry-Varsat A, Hotez PJ, Salomon J. Rabies, still neglected after 125 Years of vaccination. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(11): e839 (1–4)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2994912/> (10. dec. 2011)
 32. Botvinkin A, Selnikova OP, Anotonova LA, Moiseeva AB, Nesterenko EY. Human rabies case caused from a bat bite in Ukraine. Rabies Bull Eur 2005; 29: 5–7.
 33. Brass DA. Rabies in bats — natural history and public health implications. Ridgefield: Livia Press, 1994: 352 str.
 34. Breitenmoser U, Kaphegyi T, Kappeler A, Zanoni R. Significance of young foxes for the persistence of rabies in northwestern Switzerland. In: Proceedings of the 3rd Congress of the European Society of Veterinary Virology. Interlaken, 1994: 391–6.
 35. Breitenmoser U, Muller U, Kappeler A, Zanoni RG. The final phase of the rabies epizootic in Switzerland. Schweiz Arch Tierheilkd 2000; 142: 447–54.
 36. Brochier B, Deschamps P, Costy F, et al. Elimination of sylvatic rabies in Belgium by oral vaccination of the red fox (*Vulpes vulpes*). Ann Med Vet 2001; 145: 293–305.

37. Brookes SM, McElhinney JM, Johnson H, Badrane H, Tordo N, Fooks AR. Rabies virus variants and molecular epidemiology in Europe. In: King AA, Fooks AR, Aubert M, eds. Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean basin. Paris: OIE, 2004: 243–58.
38. Brookes SM, Healy DM, Fooks AR. Ability of rabies vaccine strains to elicit cross-neutralising antibodies. *Dev Biol (Basel)* 2006; 125: 185–93.
39. Bugnon P, Breitenmoser U, Peterhans E, Zanoni R. Efficacy of oral vaccination in the final stage of fox rabies elimination in Switzerland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Publ Health* 2004; 51: 433–37.
40. Burrage TG, Tignor GH, Hawrot E, Smith A, Lentz TL. Co-localization of rabies virus and regions of high density acetylcholine receptors. *J Cell Biol* 1982; 95: 620–30.
41. Bush M, Montali RJ, Brownstein D, James AE Jr, Appel MJ. Vaccine-induced canine distemper in a lesser panda. *J Am Vet Med Assoc* 1967; 169: 959–60.
42. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2): 169–93.
43. Capello K, Mulatti P, Comin A, et al. Impact of emergency oral rabies vaccination of foxes in northeastern Italy, 28 December 2009–20 January 2010: preliminary evaluation. *Euro Surveill* 2010; 15(28): pii=19617.
<http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N28/V15N28.pdf> (10. dec. 2011)
44. Carpenter JW, Appel MJ, Erickson RC, Novilla MN. Fatal vaccine-induced canine distemper virus infection in black-footed ferrets. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169: 961–4.
45. Centers for Disease Control and Prevention. Protocol for postmortem diagnosis of rabies in animals by direct fluorescent antibody testing: a minimum standard for rabies diagnosis in the United States. Atlanta: CDC, 2006: 1–20
<http://www.cdc.gov/rabies/pdf/rabiesdfaspv2.pdf> (10. dec. 2011)
46. Centers for Disease Control and Prevention. Human rabies prevention—United States, 2008. Recommendations of the Advisory Committee on immunization practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57(RR-3): 1–28.

47. Chare ER, Gould EA, Holmes EC. Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *J Gen Virol* 2003; 84: 2691–703.
48. Charlton KM. The Pathogenesis of rabies. In: Campbell JB, Charlton KM, eds. *Rabies*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988: 101–50.
49. Charlton KM. The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. In: Rupprecht CE, Dietzschold B, Koprowski H, eds. *Lyssaviruses*. Berlin: Springer-Verlag, 1994: 95–115.
50. Chenik M, Chebli K, Gaudin Y, Blondel D. In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N), existence of two N binding sites on P protein. *J Gen Virol* 1994; 75: 2889–96.
51. Cherkasova EA, Korotkova EA, Yakovenko ML, et al. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol* 2002; 76: 6791–9.
52. Cliquet F, Aubert M. Elimination of terrestrial rabies in western European countries. *Dev Biol (Basel)* 2004; 119: 185–204.
53. Cliquet F, Barrat J. Rabies. In: OIE. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 6th ed. Paris: World Organisation for Animal Health, 2008: 304–22.
54. Coertse J, Weyer J, Nel LH, Markotter W. Improved PCR methods for the detection of African rabies and rabies-related lyssaviruses. *J Clin Microbiol* 2010; 48(413): 3949–55.
55. Conzelmann KK, Cox JH, Schneider LG, Thiel HJ. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* 1990; 175(2): 485–99.
56. Conzelmann KK, Cox JH, Schneider LG, Thiel HJ. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* 1999; 175: 485–99.
57. Cox HJ, Schneider L, Muller WW. Eine antigenvariante der fuchstollwut ins Europa. *Tierarztl Umsch* 1992; 47: 824–8.
58. Crepin P, Audrey L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1117–21.

59. Curk A, Carpenter TE. Efficacy of the first oral vaccination against fox rabies in Slovenia. *Rev Sci Techn* 1994; 13: 763–75.
60. Dacheux L, Larrous F, Mailles A, et al. European bat lyssavirus transmission among cats, Europe. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 280–4.
61. David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dveres N, Davidson I, Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet Microbiol* 2002; 87: 111–8.
62. Davis PL, Holmes EC, Larrous F, et al. Phylogeography, population dynamics, and molecular evolution of European bat lyssaviruses. *J Virol* 2005; 79: 10487–97.
63. Davis PL, Bourhy H, Holmes EC. The evolutionary history and dynamics of bat rabies virus. *Infect Genet Evol* 2006; 6: 464–73.
64. DeBenedictis P, Capua I, Mutinelli F, Wernij JM, Arič T, Hostnik P. Update on fox rabies in Italy and Slovenia. *Rabies Bull Eur* 2009; 33: 7–9.
65. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1996: 88–95.
66. Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, et al. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 70–4.
67. Dietzschold B, Lafon M, Wang H, et al. Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus interna N nad NS proteins. *Virus Res* 1987; 8: 103–25.
68. Dietzschold B, Rupprecht CE, Tollis M, et al. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 785–98.
69. Dietzschold B, Schnell M, Koprowski H. Pathogenesis of rabies. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 292: 45–56.
70. Djuričić B, Petrović M, Panjević D, Valčić M. Epizootološka situacija besnila u Jugoslaviji u periodu od 1977. do 1987. godine. *Vet Glasn* 1988; 42(8): 483–93.

71. Diesel G, Diedrich S, Kunkel U, Schreier E. Vaccine-associated cases of poliomyelitis over a 30 year period in East Germany. *Eur J Epidemiol* 1995; 11: 647–54.
72. Dupont JR, Earle KM. Human rabies encephalitis: a study of forty nine fatal cases with a review of a literature. *Neurology* 1965; 15:1023–34.
73. Durchfeld B, Baugartner W, Herbst W, Brahm R. Vaccine-associated canine distemper infection in a litter of African hunting dogs (*Lycaon pictus*). *J Vet Med Biol* 1990; 37: 203–12.
74. East ML, Hofer H, Cox JH, Wulle U, Wiik H, Pitra C. Regular exposure to rabies virus and lack of symptomatic disease in Sergenti spotted hyenas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(26): 15026–31.
75. Echevarria JE, Avellon A, Juste J, Vera M, Ibanez C. Screening of active lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3678–83.
76. Eismann A, Ewingmann T, Just F, Müller T, Freuling C. Rabies in Bavaria (Germany) in an imported puppy from Bosnia-Herzegovina. *Rabies Bull Eur* 2010; 34(2): 5–6.
77. Fekadu M. Atypical rabies in Ethiopia. *Ethiop Med J* 1972; 10: 79–86.
78. Fekadu M. Asymptomatic non-fatal canine rabies. *Lancet* 1975; 1(7906): 569.
79. Fehlner-Gardiner C, Nadin-Davis S, Armstrong J, Muldoon F, Bachmann P, Wandeler A. ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J Wildl Dis* 2008; 44: 74–85.
80. Felsenstein J. Phylogenetic inference package (version 3.5.c). *Cladistics* 1989; 5: 164–6.
81. Findley D. Mad dogs: the new rabies plague. College Station: Texas A&M University Press, 1988: 14–25.
82. Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 1980a; 48: 97–104.
83. Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins. II. The glycoprotein. *J Gen Virol* 1980b; 48: 105–9.

84. Fooks AR, McElhinney LM, Pounder DJ, et al. Case report: isolation of a European bat lyssavirus type 2a from a fatal human case of rabies encephalitis.
J Med Virol 2003; 71: 281–9.
85. Fooks AR, Johnson N, Freuling CM, et al. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century.
PLoS Negl Trop Dis 2009; 9(3): e530 (1–14)
<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000530> (10. dec. 2011)
86. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 475–86.
87. Freuling C, Grossmann E, Conraths FJ, et al. First isolation of EBLV-2 in Germany.
Vet Microbiol 2008; 131: 26–34.
88. Frolich K, Czupalla O, Haas L, Hentschke J, Dedek J, Fickel J. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores in Germany.
Vet Microbiol 2000; 74: 283–92.
89. Fu ZF, Zheng Y, Wunner WH, Koprowski H, Dietzschold B. Both the N- and the C-terminal domains of the nominal phosphoprotein of rabies virus are involved in binding to the nucleoprotein. *Virology* 1994; 200: 590–7.
90. Georgescu MM, Balanant J, Macadam A, et al. Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 1997; 71: 7758–68.
91. Geue L, Schares S, Schnick C, et al. Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife. *Vaccine* 2008; 26(26): 3227–35.
92. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30(6): 503–12.
93. Gode GR, Bhide NK. Two rabies deaths after corneal grafts from one donor.
Lancet 1988; 2(8614): 791.
94. Goldwasser RA, Kissling RE, Carski TR, Hosty TS. Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. *Bull WHO* 1959; 20: 579–88.

95. Goodpasture EW. A study of rabies with reference to a neural transmission of the virus in rabbits, and the structure and significance of Negri bodies.
Am J Pathol 1925; 1: 547–81.
96. Gosztonyi G. Reproduction of lyssaviruses: ultrastructural composition of lyssavirus and functional aspects of pathogenesis.
Curr Topics Microbiol Immunol 1994; 187: 43–68.
97. Hamir AN, Summers BA, Rupprecht CE. Concurrent rabies and canine distemper encephalitis in a raccoon (*Procyon lotor*). *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 194–6.
98. Hampson K, Dushoff J, Cleavelan, et al. Transmission dynamics and prospects for the elimination of canine rabies. *PLoS Biol* 2009; 7(3): e53 (16 str.)
<http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.1000053>
(10. dec. 2011)
99. Hanlon CA, Kuzmin IV, Blanton JD, Weldon WC, Manangan JS, Rupprecht CE. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res* 2005; 111: 44–54.
100. Hanna JN, Carney IK, Smith GA, et al. Australian bat lyssavirus infection: a second human case, with a long incubation period. *Med J Aust* 2000; 172: 597–9.
101. Harris SL, Aegeater JN, Brookes SM, et al. Targeted surveillance for European bat lyssaviruses in English bats (2003–06). *J Wildl Dis* 2009; 45: 1030–41.
102. Have P, Aubert M, Breitenmoser U, et al. The oral vaccination of foxes against rabies. Report of the Scientific committee on animal health and animal welfare. Brussels: European Commision, 2002: 1–55.
103. Haymann DTS, Banyard AC, Wakeley PR, et al. A universal real-time assay for the detection of lyssaviruses. *J Virol Methods* 2011; 177: 87–93.
104. Hellenbrand W, Meyer C, Rasch G, Steffens I, Ammon A. Cases of rabies in Germany following organ transplantation. *Euro Surveill* 2005; 10: E050224.6.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2917> (10. dec. 2011)
105. Heaton PR, Johnstone P, McElhinney LM, Cowley R, O'Sullivan E, Whitby JE. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses.
J Clin Microbiol 1997; 35: 2762–6.
106. Herzog E. Histopathologic diagnosis of rabies. *Arch Pathol* 1945; 39: 279–80.

107. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11(9): 1026–30.
108. Hiramatsu K, Mannen K, Mifune K, Nishizono A, Takita-Sonda Y. Comparative sequence analysis of the M gene among rabies virus strains and its expression by recombinant vaccinia virus. *Virus Genes* 1993; 7: 83–8.
109. Hoffmann B, Freuling CM, Wakeley PR, et al. Improved safety for molecular diagnosis of classical rabies virus by use of TaqMan reverse transcription-PCR »Double check« strategy. *J Clin Microbiol* 2010; 48(11): 3970–8.
110. Holloway BP, Obejeski JF. Rabies virus-induced RNA synthesis in BHK-21 cells. *J Gen Virol* 1980; 49: 181–95.
111. Hooper DC, Roy A, Barkhouse DA, Li J, Kean RB. Rabies clearance from the central nervous system. In: Jackson AC, eds. *Research advances in rabies*. London: Elsevier, 2011: 55–71.
112. Hostnik P, Bidovec A. Sodobne metode zatiranja stekline – deset let peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji. *Zb Vet Fak* 1999; 36(2): 235–42.
113. Hostnik P, Bidovec A, Barlič-Maganja D, Grom J. Rabies: doubtful and discordant results in fluorescent antibody test. *Med Pregl* 2001; 54(1): 29–31.
114. Hostnik P, Barlič-Maganja D, Toplak I, Grom J. The persistence of rabies virus antibodies in the sera of fox cubs. *J Vet Med B* 2003; 50 (4): 204–6.
115. Hostnik P, Toplak I, Barlič-Maganja D, Grom J, Bidovec A. Control of rabies in Slovenia. *J Wildl Dis* 2006; 42(2): 459–65.
116. Hostnik P, Rihtarič D, Presetnik P, Podgorelec M, Stantič-Pavlinič M, Toplak I. Ugotavljanje lisavirusov pri netopirjih v Sloveniji. *Zdrav Vestn* 2010; 79(3): 265–71.
117. Hostnik P, Rihtarič D, Grom J, Malovrh T, Toplak I. Maintenance and control of vaccination belt along neighbouring rabies infected area. *Acta Vet (Beogr)* 2011; 61(2/3): 163–74.
118. Hughes GJ, Smith JS, Hanlon CA, Rupprecht CE. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 299–306.

119. Hughes GJ, Kuzmin IV, Schmitz A, et al. Experimental infection of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) with European bat lyssaviruses Aravan, Khujand and Irkut virus. *Arch Virol* 2006; 151: 2012–35.
120. Inseni F, Barge A, Baudin F, Blondel D, Ruigrok RWH. Characterization of rabies virus nucleocapsida and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol* 1998; 79: 2909–19.
121. Iverson LE, Rose JK. Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* 1981; 23: 477–84.
122. Ito Y, Nishizono A, Mannen K, Hiramatsu K, Mifune K. Rabies virus M protein expressed in Escherichia coli and its regulatory role in virion-associated transcriptase activity. *Arch Virol* 1996; 141: 671–83.
123. Ito M, Itou T, Shoji Y, et al. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptasepolymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Virol* 2003; 26: 317–30.
124. Iwasaki Y, Tobita M. Pathology. In: Jackson AC, Wunner WH, eds. *Rabies*. San Diego: Academic Press, 2002: 283–306.
125. Jackson AC. Biological basis of rabies virus neurovirulence in mice: comparative pathogenesis study using the immunoperoxidase technique. *J Virol* 1991; 65: 537–40.
126. Jackson AC. Pathogenesis. In: Jackson AC, Wunner WH, eds. *Rabies*. San Diego: Academic Press, 2002: 246–82.
127. Jackson AC, Johannsen EC. Rabies and other rhabdovirus infections. In: Fauci AS, eds. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. Vol. 1. New York: Mc Graw-Hill, 2008: 1222–6.
128. Jacob Y, Badrane H, Ceccalci PE, Tordo N. Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol* 2000; 74: 474–82.
129. Jakava-Viljanen M, Lilley T, Kyheroinen EM, Huovilainen A. First encounter of European bat lyssavirus type 2 (EBLV-2) in a bat in Finland. *Epidemiol Infect* 2010; 138: 1581–5.

130. Kamolvarin N, Tirawatnpong T, Rattanasiwamoke R, Tirawatnpong S, Panpanich T, Hemachudha T. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J Infect Dis* 1993; 167: 207–10.
131. Kazacos KR, Thacker HL, Shivaprasad HL, Burger PP. Vaccination induced distemper in kinkajous. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 179: 1166–9.
132. King A, Crick J. Rabies-related viruses. In: Charlton KM, eds. *Rabies*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988: 177–200.
133. Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology* 1995; 209: 526–37.
134. Kodrnja E. Flury LEP vakcina bjesnoce. *Vetserum* 1969; 17(2): 89–97.
135. Kodrnja E. Deset godina suzbijanja bjesnoce. *Vet Arh* 1959; 29(5/6): 132–44.
136. Konfred R, Konfred S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 631–64.
137. Kouznetznoff A, Buckle M, Tordo N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. *J Gen Virol* 1998; 79: 1005–13.
138. Kovač Z. Epizootiologija silvatične stekline v Republiki Sloveniji v letih 1970-1990. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1993. Magistrska naloga
139. Krebs J, Wilson WML, Childs JE. Rabies: epidemiology, prevention and future research. *J Mammal* 1995; 76: 681–94.
140. Krebs JW, Wheeling JT, Childs JE. Rabies surveillance in the United States during 2002. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1736–48.
141. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95–125.
142. Kucera P, Dolivo M, Coulon P, Flamand A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. *J Virol* 1985; 55: 159–62.
143. Kulonen K, Boldina I. Differentiation of two rabies strains in Estonia with reference to recent finish isolates. *J Wildl Dis* 1993; 29: 209–13.
144. Kulonen K, Fekadu M, Whitfield S, Warner CK. An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival carnoy-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *Zentralbl Veterinarmed B* 1999; 46: 151–5.

145. Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, et al. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res* 2003; 97: 65–79.
146. Kuzmin IV, Botvinkin AD, McElhinney LM, et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J Wildl Dis* 2004; 40: 617–31.
147. Kuzmin IV, Hughes GJ, Botvinkin AD, Orciari LA, Rupprecht CE. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the *Lyssavirus* genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res* 2005; 111: 28–43.
148. Kuzmin IV, Wu X, Tordo N, Rupprecht CE. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions. *Virus Res* 2008; 136: 81–90.
149. Kuzmin IV, Mayer AE, Niezgoda M, et al. Shimoni bat virus, a new representative of the *Lyssavirus* genus. *Virus Res* 2010; 149: 197–210.
150. Lafay F, Coulon P, Astic L, et al. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology* 1991; 183: 320–33.
151. Lafon M. Bat rabies – the Achilles heel of a viral killer? *Lancet* 2005; 366(9489): 876–7.
152. Le Mercier P, Jacob Y, Tordo N. The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 1997; 79(7): 1571–6.
153. Lojkic I, Galic M, Cač Ž, et al. Bites of a rabid wolf in 67-old man in north-eastern part of Croatia. *Rabies Bull Eur* 2009; 3(33): 5–7.
154. Lumio J, Hillbom M, Roine R, et al. Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet* 1986; 1(8477): 378.
155. Lyles DS, McKenzie M, Kaptur PE, Grant KW, Jerome, JG. Complementation of M gene mutants of vesicular stomatitis virus by plasmid-derived M protein converts spherical extracellular particles into native bullet shapes. *Virology* 1996; 217: 76–87.
156. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292–305.

157. Mackay IM, Mackay JF, Nissen MD, Sloots TP. Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: Mackay IM, eds. Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Wymondham: Caister Academic Press, 2007: 1–69.
158. Mansfield KL, McElhinney LM, Hubschle O, et al. A molecular epidemiological study of rabies epizootics in kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) in Namibia.
BMC Vet Res 2006; 2: e2 (1–10)
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/2> (13.1. 2006)
159. Marsh M, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res* 1989; 36: 107–51.
160. Markotter W, Van Eeden C, Kuzmin IV, et al. Epidemiology and pathogenicity of African bat lyssaviruses. *Dev Biol (Basel)* 2008; 131: 317–25.
161. Marston DA, McElhinney LM, Johnson N, et al. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 nad type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *J Gen Virol* 2007; 88: 1302–14.
162. Matouch O, Vitasek J, Semerad Z, Malena M. Rabies-free status of the Czech Republic after 15 years of oral vaccination. *Rev Sci Tech OIE* 2007; 26: 577–84.
163. Matouch O. The rabies situation in Eastern Europe. *Dev Biol (Basel)*, 2008; 131: 27–35.
164. Matsumoto S, Schneider LG, Kawai A, Yonezawa T. Further studies on the replication of rabies and rabies-like viruses in organized cultures of mammalian neurla tissues.
J Virol 1974; 14: 981–96.
165. Matsumoto S. Electron microscope studies of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology* 1962; 17: 198–202.
166. Matsumoto S, Myamoto K. Electron-microscopic studies on rabies virus multiplication and the nature of the Negri body. In: International symposium on rabies. Basel: Karger, 1966: 45–54.
167. Mayo MA, Pringle CR. Virus taxonomy-1997. *J Gen Virol* 1998; 79: 649–57.
168. Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann KK. Matrix protein of rabies virus s responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol* 1999; 73: 242–50.

169. Mebatsion T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg 333 in the G protein. *J Virol* 2001; 75: 11496–502.
170. Meldrum KC. Rabies contingency plans in the United Kingdom. *Parasitologia* 1988; 30: 97–103.
171. Metlin AE, Rybakov S, Gruzdev K, Neuvonen E, Huovilainen A. Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses. *Arch Virol* 2007; 152: 1645–54.
172. Metlin A, Paulin L, Suomalainen S, et al. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res* 2008; 132: 242–7.
173. Miklos H, Laszlo S, Zsolt B, Andras B. Effects of oral immunisation against rabies on the dynamics of the fox population. *Magy Allatorv Lap* 2000; 122: 612–7.
174. Milovanović V. Medicinski godišnjak Kraljevine Jugoslavije. Beograd: Jugoreklam, 1933: 346–50.
175. Mohr W. Die Tollwut. *Med Klin* 1957; 52: 1057–60.
176. Morganti L, Prosperi S. Ricerche su focolai naturali di alcune malattie infettive. In: Atti del Convegno Italo-Sovietico. Bologna, 1972: 532–41.
177. Muller T, Schluter H. Oral immunization of red foxes (*Vulpes vulpes*) against rabies: a review. *J Etlik Vet Microbiol Ankara* 1988; 9: 35–59.
178. Muller T, Schuster P, Wenzel U, Vos A, Selhorst T, Neubert AA. Maternal immunity and the immune response of fox cubs (*Vulpes vulpes*) to oral vaccination against rabies. In: 10th Annual Rabies in the Americas Meeting: abstracts. San Diego, 1999: 83.
179. Muller T, Cox J, Peter W, et al. Infection of a stone marten with European bat lyssa virus (EBLV1). *Rabies Bull Eur* 2002a; 25: 9–11.
180. Muller T, Selhorst T, Schuster P, Vos A, Wenzel U, Neubert A. Kinetics of maternal immunity against rabies in fox cubs (*Vulpes vulpes*). *BMC Infect Dis* 2002b; 2: e10 (6 str.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC116597/> (10. dec. 2011)
181. Muller T, Batza H J, Beckert A, et al. Analysis of vaccine-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral vaccination campaigns in Germany and Austria. *Arch Virol* 2009a; 154 (7): 1081–91.

182. Muller T, Dietzschold B, Ertl H, et al. Developement of a mouse monoclonal antibody coctail for post-exposure prophylaxis in humans.
PLoS Negl Trop Dis 2009b; 3(11): e542 (13 str.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2765635/> (10. dec. 2011)
183. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction.
Sci Am 1990; 262: 56–65.
184. Murphy FA, Bauer SP, Harrison AK, Winn WC. Comparative pathogenesis of rabies virus and rabies-like viruses: viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. Lab Invest 1973; 28: 361–76.
185. Murphy FA, Harrison AK. Electron microscopy of the rhabdoviruses of animals. In: Bishop DHL. Rhabdoviruses. Vol 1. Boca Raton: CRC press 1979: 65–106.
186. Mutinelli F, Vernier E. Bat rabies surveillance in Italy. Rabies Bull Eur 1993; 17: 15.
187. Mutinelli F. Rabies control in Italy. In: WHO Meeting of Rabies Control in Middle and East European Countries: abstract book. Košice, Slovakia: WHO, 2002: 85.
188. Mutinelli F. Rabies and feral cat colonies in Italy. Vet Rec 2010; 166(17): 537–8.
189. Nadin-Davis SA, Casey GA, Wandeler A. A molecular epidemiological study of rabies virus in central Ontario and western Qubec. J Gen Virol 1994; 75: 2575–83.
190. Nadin-Davis SA, Abdel-Malik M, Armstrong J, Wandeler AI. Lyssavirus P gene characterisation provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein.
Virology 2002; 298: 286–305.
191. Nadin-Davis SA, Real LA. Molecular phylogenetics of the lyssaviruses-insight from a coalescent aproach. In: Jackson AC, eds. Research advances in rabies. London: Elsevier, 2011: 204–38.
192. Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. J Clin Virol 2006; 36: 17–23.
193. Negri A. Zur Aetiologie der Tollwuth: die Diagnose der Tollwuth auf grund der neuren befunde. Z Hyg Infektkrankh 1903; 44: 519–40.

194. Negri A. Über die Morphologie und der entwicklungszyklus des Parasiten der Tollwut (*Neurocytes hydrophobia celkins*). Z Hyg Infektkrankh 1909; 63: 421–40.
195. Nel LH, Rupprecht CE. Emergence of lyssaviruses in the old world: the case of Africa. Curr Top Microbiol Immunol 2007; 315: 161–93.
196. Neubert A, Schuster P, Müller T, Vos A, Pommerening E. Immunogenicity and efficacy of the oral rabies vaccine SAD B19 in foxes. J Vet Med B 2001; 48: 179–83.
197. Nieuwenhuijs JH. Veterinary chief inspection for public health. Rabies in bats. Tijdschr Diergeneeskd 1987; 112: 1193–7.
198. Noah DL, Drenzek CL, Smith JS, et al. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. Ann Intern Med 1998; 128: 922–30.
199. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protocols 2006; 1(3): 1559–82.
200. Orlowska A, Smreczak M, Trebas P, Zmudzinski JF. Comparison of realtime PCR and heminested RT-PCR methods in the detection of rabies virus infection in bats and terrestrial animals. Bull Vet Inst Pulawy 2008; 52: 313–8.
201. Pastoret PP, Boulanger D, Brochier B. The rabies situation in Europe. Vet Annu 1985; 35: 1–17.
202. Pastoret PP, Brochier B. Epidemiology and control of fox rabies in Europe. Vaccine 1999; 17: 1750–4.
203. Pastoret P, Kappeler A, Aubert M. European rabies control and its history. In: King AA, eds. Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean basin. Paris: World Organization for Animal Health OIE, 2004: 337–50.
204. Pawan JL. Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and the latency of infection. Ann Trop Med Parasitol 1936; 30:410–22.
205. Petrovec M. Rhabdovirusi. In: Poljak M, Petrovec M. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2011: 275–82.
206. Petrović M. Besnilo u Jugoslaviji od 1970. do 1973. godine. Vet Glasn 1974; 28: 531–41.
207. Petrović M, Panjević D, Pauković C, Železnik Z. Besnilo u Jugoslaviji – epizootiološka situacija i suzbijanje. Vet Glasn 1980; 34(7): 621–32.

208. Plotkin SA. Rabies. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 4–12.
209. Poch O, Blumberg BM, Bougueret L, Tordo N. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: Theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 1990; 71: 1153–62.
210. Pravilnik o okrepilih za ugotavljanje, preprečevanje širjenja in zatiranje stekline - Rabies (lyssa). Ur List RS 2006; 16(139): 16295 (10. dec. 2011)
211. Pravilnik o veterinarskih pogojih, ki morajo biti izpolnjeni za nekomercialne premike hišnih živali, in o modelu potnega lista, ki spremišča te živali.
Ur List RS 2008; 18(25): 2460 (10. dec. 2011)
212. Raux H, Flammand A, Blondel D. Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *J Virol* 2000; 74: 10212–6.
213. Rayssiguier C, Cioe L, Withers E, Wunner WH, Curtis PJ. Cloning of the rabies virus matrix protein mRNA and determination of its amino acid sequence.
Virus Res 1986; 5: 177–90.
214. Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA. Theory and applications of the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1990; 93 (1): 49–54.
215. Remlinger P, Bailey J. Sur la présence des virus rabique et pseudorabique dans les membranes et mulleux de l'œil. *Ann Inst Pasteur* 1940; 64: 40–6.
216. Reubel GH, Studdert MJ. Benefits and limitations of polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Bull* 1998; 68: 505–15.
217. Rihtarič D, Hostnik P, Grom J, Toplak I. Molecular epidemiology of rabies virus isolates in Slovenia 1994–2010. *Vet Microbiol* 2011; 152(1/2): 181–6.
218. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154–60.
219. Rojas AE, Loza-rubio E, Banda RVM, Hernandez BE. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determinate the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18: 98–101.
220. Ronsholt L, Sorensen KJ, Bruschke CJM, et al. Clinically silent rabies infection in (zoo) bats. *Vet Rec* 1998; 142: 519–20.
221. Ronsholt L. A new case of European bat lyssavirus (EBL) infection in Danish sheep.

- Rabies Bull Eur 2002; 2: 15.
222. Roine RO, Hillbom M, Valle M, et al. Fatal encephalitis caused by a bat-borne rabies-related virus. Clinical findings. *Brain* 1988; 111: 1505–16.
223. Rubb R, Trimarchi CV. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2522–8.
224. Rukavina L. Pojava bjesnila kod životinja u sjeveroistočnoj Bosni sa osvrtom na faktore koji su pogodovali odrzavanju i sirenju infekcije. *Vet Glasn* 1973; 27(10): 743–50.
225. Sacramento H, Bourhy H, Tordo N. PCR techniques as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol Cell Probes* 1991; 6: 229–40.
226. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350–4.
227. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487–91.
228. Satpathy DM, Sahu T, Behera TR. Equine rabies immunoglobulin: a study on its clinical safety. *J Indian Med Assoc* 2005; 103(238): 241–2.
229. Schneider LG, Barnard BJH, Schneider HP. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigations and oral vaccination studies. III. Oral rabies vaccine. In: Kuwert E, eds. *Rabies in tropics*. Berlin: Springer, 1985: 47–59.
230. Schneider LG, Cox JH. Bat lyssaviruses in Europe. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 187: 207–18.
231. Schuster P, Muller T, Vos A, Selhorst T, Neubert L, Pommerening E. Comparative immunogenicity and efficacy studies with oral rabies virus vaccine SAD P5/88 in raccoon dogs and red foxes. *Acta Vet Hung* 2001; 49: 285–90.
232. Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A. Rabies virus virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J Virol* 1985; 53: 926–35.

233. Selimov MA, Tatarov AG, Botvinkin AD, Klueva EV, Kulikova LG, Khismatullina NA. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol* 1989; 33: 542–6.
234. Serra-Cobo J, Amengual B, Abellan C, Bourhy H. European bat lyssavirus infection in Spanish bat populations. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 413–20.
235. Shankar V, Bowen RA, Davis AD, Rupprecht CE, O'Shea TJ. Rabies in a captive colony of big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *J Wildl Dis* 2004; 40: 403–13.
236. Simons K, Garoff H. The budding mechanisms of enveloped animal viruses. *J Gen Virol* 1980; 50: 1–21.
237. Smith JS. Rabies virus epitopic variation: use in ecological studies. *Adv Virus Res* 1989; 36: 215–53.
238. Smith JS, Orciari LA, Yager PA, Seidel HD, Warner CK. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. *J Infect Dis* 1992; 166: 296–307.
239. Smith GC. Modelling rabies control in the UK: The inclusion of vaccination. *Mammalia* 1995; 59: 629–37.
240. Smith GC, Cheeseman CL. A mathematical model for the control of diseases in wildlife populations: culling, vaccination and fertility control. *Ecol Model* 2002; 150: 45–53.
241. Smith GC. The role of the badger (*Meles meles*) in rabies epizootiology and the implications for Great Britain. *Mammal Rev* 2002; 32: 12–25.
242. Smith JM, McDonald RA. Emerging viral infections in transplantation. *Pediatr Transplant* 2006; 10: 838–43.
243. Steck F, Wandeler A, Bichsel P, Capt S, Schneider L. Oral immunization of foxes against rabies. *Zbl Vet Med B* 1982; 29: 372–96.
244. Storm G, Sanderson G. Effect of medroxyprogesterone acetate (Provera) on productivity in captive foxes. *J Mammal* 1969a ; 50: 147–9.
245. Storm G, Sanderson G. Results of a field test to control striped skunks with diethylstilbestrol. *Trans Ill State Acad Sci* 1969b ; 62: 193–7.
246. Superti F, Derer M, Tsiang H . Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *J Gen Virol* 1984; 65: 781–9.

247. Suppo C, Naulin JM, Langlais M, Artois M. A modelling approach to vaccination and contraception programmes for rabies control in fox populations.
Proc Roy Soc Lond 2000; 267: 1575–82.
248. Stantič-Pavlinič M, Hostnik P. Poškodbe in cepljenja proti steklini.
Zdrav Vestn 2002; 10(71): 615–9.
249. Stohr K, Meslin FX. Progress and setbacks in the oral immunisation of foxes against rabies in Europe. *Vet Rec* 1996; 139: 32–5.
250. Surreau P, Ravisse P, Rollin PE. Rabies diagnosis by animal inoculation, identification of Negri bodies, or ELISA. In: Baed GM, eds. *The natural history of rabies*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1991: 203–17.
251. Tan GS, Preuss MA, Williams JC, Schnell MJ. The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription.
Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 7229–34.
252. Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases.
Clin Chem 1997; 43: 2021–38.
253. Tepsumethanon V, Wilde H, Meslin FX. Six criteria for rabies diagnosis in living dogs.
J Med Assoc Thai 2005; 88: 419–22.
254. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 24: 4876–82.
255. Thouluze MI, Lafarge M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* 1998; 72: 7181–90.
256. Tierkel ES, Atanasiu P. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological tests. In: Meslin FX, eds. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996: 55–65.
257. Topely WWC, Wilson G. Principles of bacteriology, virology and immunity.
Vol. 4: *Virology*. 7th ed. London: E Arnold, 1984: 472–86.
258. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies virus genome: segmented homology with VSV.
Nucleic Acid Res 1986a; 14: 2671–83.

259. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986b; 83: 3914–8.
260. Tordo N, Poch O. Structure of rabies virus. In: Campbell JB, eds. *Rabies*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988: 25–45.
261. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of segmented negative-strand RNA viruses. *Virology* 1988; 193: 59–69.
262. Tordo N, De Hann P, Goldbach R, Poch O. Evolution of negative-stranded RNA genomes. *Semin Virol* 1992; 3: 341–57.
263. Tsiang H, Derer M, Taxi J. An in vivo and in vitro study of rabies virus infection of the rat superior cervical ganglia. *Arch Virol* 1983; 76: 231–43.
264. Tsiang H, De la Porte S, Ambroise DJ, Derer M, Koenig J. Infection of culture rat myotubes and neurons from the spinal cord by rabies virus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986; 45: 28–42.
265. Tuffereau C, Leblois H, Benejean J, Coulon P, Lafay F, Flamand A. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 1989; 172: 206–12.
266. Tuffereau C, Benegian J, Blondel D, Kieffer G, Flammand A. Low-affinity nerve growth factor receptor (P75NTR) can serve as receptor for rabies virus. *EMBO J* 1998; 17: 7250–9.
267. Turcu MA, Barboi G, Vuta V, et al. Molecular epidemiology of rabies virus in Romania provides evidence for a high degree of heterogeneity and virus diversity. *Virus Res* 2010; 150: 28–33.
268. Turner J Jr, Kirkpatrick J. New methods for selective contraception in wildlife. In: Cohn P, eds. *Contraception in wildlife*. Lewiston: The Edwin Mellen Press, 1996: 191–208.
269. Vasquez-Moron S, Avello A, Echevarria JE. RT-PCR for detection of all seven genotypes of lyssavirus genus. *J Virol Methods* 2006; 135: 281–7.
270. Vaughn JB, Gerhardt P, Peterson J. Excretion of street rabies virus in saliva of cats. *J Am Med Assoc* 1963; 184: 705–8.

271. Vogl D. The reinfection of rabies of Karnten (Carinthia) in Austria – the run of events. *Rabies Bull Eur* 2002; 26(1): 10–1.
272. Vos A, Neubert A, Aylan O, et al. An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species. *Epidemiol Infect* 1999; 123: 165–75.
273. Vos A, Muller T, Schuster P, Shluter H, Neubert A. Oral vaccination of foxes against rabies with SAD B19 in Europe, 1983–1998: a review. *Vet Bull* 2000; 70: 1–6.
274. Vos A, Muller T, Selhorst T, Schuster P, Neubert A, Schluter H. Optimising spring oral vaccination campaigns of foxes against rabies. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2001; 108: 55–9.
275. Wacharapluesadee S, Sutipanya J, Damrongwatanapokin S, et al. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. *J Virol Methods* 2008; 151: 317–20.
276. Wakeley PR, Johnson N, McElhinney LM, Marston D, Sawyer J, Fooks AR. Development of a real-time, TaqMan Reverse transcription – PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5 and 6. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2786–92.
277. Wandeler AI. Control of wildlife rabies. In: Campbell JB, eds. *Rabies*. Boston: Kluwer Academic Publisher, 1988: 365–80.
278. Wandeler AI. Oral immunization against rabies: afterthoughts and foresight. *Swiss Arch Vet Med* 2000; 142: 455–62.
279. Warrel MJ, Looaresesawan S, Manatsathit S, et al. Rapid diagnosis of rabies and post-vaccinal encephalitides. *Clin Exp Immunol* 1988; 71: 229–34.
280. Wane BM, Wassilak SG, Orenstein WA, et al. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis. United States: 1973 through 1984. *J Am Med Assoc* 1987; 257: 1335–40.
281. Webster LT, Dawson JR. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation: measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc Soc Exp Biol Med* 1935; 32: 570–3.
282. Whelan SP. Response to “Non-segmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo”. *Virology* 2008; 371: 234–7.
283. Whitby JE, Johnstone P, Sillero-Zubiri C. Rabies virus in the decomposed brain of an Ethiopian wolf detection by nested reverse transcription-polymerase chain reaction.

- J Wildl Dis 1997; 33: 912–5.
284. Whitby JE, Heaton PR, Black EM, Wooldridge M, McElhinney LM, Johnstone P. First isolation of a rabies-related virus from a Daubenton's bat in the United Kingdom. Vet Rec 2000; 147: 385–8.
285. Wiktor TJ, Koprowski H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. Proc Natl Acad Sci U S A 1978; 75: 3938–42.
286. Wilde H, Chomchey P, Prakongsri S, Puyaratabandhu P, Chutivongse S. Adverse effects of equine rabies immune globulin. Vaccine 1989; 7: 10–1.
287. Wilde H. Failures of post exposure prophylaxis. Vaccine 2007; 25: 7605–9.
288. Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. N Engl J Med 2005; 352(24): 2508–14.
289. Wilkinson L. History. In: Jackson AA, eds. Rabies. San Diego: Academic Press, 2002: 1–21.
290. Winkler WG. A review of the development of the oral vaccination technique for immunizing wildlife against rabies. In: Bogel K, eds. Wildlife rabies control. Kent, England: Wells Medical, 1992: 82–96.
291. World Health Organisation (WHO). Report of WHO Consultation on requirements and criteria for field trials on oral rabies vaccination of dogs and wild carnivores. Geneva: WHO, 1989: 15 str.
292. World Health Organisation (WHO). Laboratory biosafety manual. 3rd ed. Geneva: WHO, 2004: 9–27.
293. World Health Organisation (WHO). Expert consultation on rabies: first report. Geneva: WHO, 2005: 121 str. (Tech Rep Ser No. 931)
294. Yang J, Koprowski H, Dietzschold B, Fu ZF. Phosphorylation of rabies virus nucleoprotein regulates viral RNA transcription and replication by modulating leader RNA encapsidation. J Virol 1999; 73: 1661–4.
295. Zanoni RG, Kappeler A, Muller UM, Muller C, Wandeler AI, Breitenmoser U. Tollwutfreiheit der Schweiz nach 30 Jahren Fuchstollwut. Schweiz Arch Tierheilkd 2000; 142: 423–9.

296. Železnik Z, Janc M. Silvatična bjesnoča u Sloveniji. In: IV Simpozijum Savremeni problemi virusnih infekcija: kratki sadržaj radova. Vrnjačka Banja, 1997: 12–4.

11 PRILOGE

PRILOGA A: Izvirni znanstveni članek

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect



Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Short communication

Molecular epidemiology of the rabies virus in Slovenia 1994–2010

D. Rihtarič, P. Hostnik, J. Grom, I. Toplak*

University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Institute of Microbiology and Parasitology, Virology Unit, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana, Slovenia

ARTICLE INFO**Article history:**

Received 15 December 2010

Received in revised form 4 April 2011

Accepted 14 April 2011

Keywords:

Rabies virus

Sequencing

Molecular epidemiology

Slovenia

ABSTRACT

A molecular epidemiology study was performed on a selection of 30 rabies-positive brain samples collected between 1994 and 2010 in Slovenia and originating from the red fox ($n = 19$), badger ($n = 3$), cattle ($n = 3$), dog ($n = 2$), cat ($n = 1$), marten ($n = 1$) and horse ($n = 1$). Based on the comparison of 1092 and 672 nucleotide sequences of nucleoprotein (N) and partial glycoprotein (G) gene regions, a low genetic diversity of the circulating strains was detected, but both phylogenetic trees were consistent with the topology where partial nucleoprotein or glycoprotein genes were used. A high sequence identity in the N and G gene to rabies virus isolates from neighbouring countries was found. The Slovenian strains were clearly different from the vaccine strains SAD B19 and SAD Bern, which have been used in Slovenia since 1988.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rabies virus is a member of the genus *Lyssavirus* within the family *Rhabdoviridae* of the order *Mononegavirales* (Virus taxonomy, 2005). The *Lyssavirus* genus is further divided into eleven species. Species 1 is the most widespread and comprises the classical rabies virus including field, laboratory and vaccine strains. Species 2, 3 and 4, with the prototypes Lagos bat virus, Mokola virus and Duvenhage virus, respectively are found in Africa. Viruses isolated from bats in Europe are classified within species 5 and 6, while the Australian bat lyssavirus represents species 7 (Gould et al., 2002). Four recent lyssavirus isolates from bats of Eurasia, designated Aravan virus (ARAV), Khujand virus (KHUV), Irkut virus (IRKV) and West Caucasian bat virus (WCBV), are classified within species 8, 9, 10 and 11 (Kuzmin et al., 2003, 2005).

The rabies virus genome is a single-stranded, negative-sense RNA molecule of about 12 kb, which encodes five major viral proteins (N, P, M, G, L). Nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), RNA-dependent RNA-polymerase (L) and genomic RNA form a unique ribonucleoprotein

complex (RNP) for viral infection. The RNP unit is connected by the matrix (M) protein and surrounded by the membrane with inserted glycoprotein. Glycoprotein (G) contains the domains responsible for host cell receptor recognition (Thoulose et al., 1998; Tuffereau et al., 1998) and membrane fusion (Durrer et al., 1995), which is crucial for viral neurotropism (Badrane et al., 2001) and pathogenicity (Morimoto et al., 1999; Faber et al., 2005).

In Slovenia, wildlife-mediated rabies has been present since 1973; it was first detected in the north-eastern part of the country and has been endemic since then. A second wave of sylvatic rabies reached Slovenia in 1979 from Austria. Thousands of rabies-positive animals were detected each year from 1979 to 1995. Oral vaccination against rabies is the most effective method of preventing rabies virus infection in wild animals (Pastoret and Brochier, 1998). In Slovenia, an oral vaccination programme of foxes has been running since 1988. During the period 1998–2004, the vaccines containing strains SAD Bern and SAD B19 were used, but since 2005, only vaccine containing SAD B19 has been used. In the rabies surveillance program in 1995, 1089 rabies-positive animals were detected, but in the period between 1998 and 2007, the number of positive samples decreased from 15 to 2 cases per year (Hostnik et al., 2006). The majority of rabies cases in the years 2008 (55 positive), 2009 (35

* Corresponding author. Tel.: +386 1 47 79 180; fax: +386 1 47 79 352.
E-mail address: ivan.toplak@vf.uni-lj.si (I. Toplak).

positive) and 2010 (16 positive) were detected along the border with Croatia, where vaccination is not performed. The vaccination of dogs against rabies has been compulsory in Slovenia since 1947, and dog-mediated rabies was eradicated in 1954. The last human case of rabies was recorded in 1950.

Our neighbouring country Italy was classified as rabies free between 1997 and 2008. In October 2008, the National Reference Centre for rabies at the Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie in Legnaro (Padova) diagnosed rabies in a red fox in the municipality of Resia (northeastern part of Italy). In 2008, another eight rabies-positive wildlife cases were detected. As a consequence of the reintroduction of rabies, in January and February 2009 an emergency oral vaccination programme was organized in the infected area (De Benedictis et al., 2009).

Rabies molecular epidemiology studies have recently gained relevance in Slovenia, in order to investigate the dynamics of geographical and inter-species transmission. Therefore, the goal of the present study was to characterize selected rabies viruses collected from different locations in Slovenia to identify which phylogenetic groups have been circulating in the country and to establish possible epidemiological associations to rabies virus variants occurring in neighbouring countries.

2. Materials and methods

Between 1994 and 2010, 33,799 brain samples from different animal species were tested and 2616 were found to be positive by a fluorescent antibody test (FAT) (Dean et al., 1996) using a commercial rabies anti-nucleocapsid conjugate (BioRad, France), according to manufacturer's instructions. Thirty positive samples were selected according to the availability of the original archive brain samples, the year of collection, the geographical location and in order to cover different species of origin (Fig. 1 and Table 1) and were compared with other 9 (for N gene) and 5 (for G gene) rabies virus strains and 2 vaccine strains from GenBank. This study included rabies field viruses from the red fox ($n = 19$), badger ($n = 3$), cattle ($n = 3$), dog ($n = 2$), cat

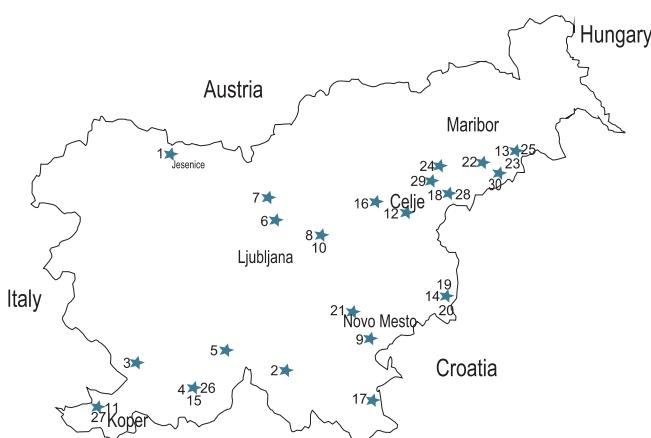


Fig. 1. The geographical locations of the rabies-positive samples from this study are presented on a map of Slovenia. Stars indicate the precise location where each sample was collected, the numbers (1–30) indicate the virus numbers according to Table 1.

($n = 1$), marten ($n = 1$) and horse ($n = 1$). The geographical distribution of the 30 strains from Slovenia is shown in Fig. 1. The majority of the collected samples were detected in a 20 km wide belt near the border with Croatia, but samples with virus numbers 1, 6, 7, 8 and 10 originated from other locations (Fig. 1 and Table 1).

Total viral RNA was extracted from the original host brain samples using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was eluted in 60 μ l of elution buffer and stored at -70°C until analysis. Reverse transcription (RT) with polymerase chain reaction (PCR) was performed in one tube (One-Step RT-PCR Kit, Qiagen, Germany) with the primer sets N7 (5'-ATG TAA CAC CTC TAC AAT G-3') and N4 (5'-GTC TGA TGA TTG GAA CT-3') to amplify 1313 bp products of nucleoprotein genes (Bourhy et al., 1993). To amplify 730 bp products of glycoprotein genes, the modified primer sets GH3 (5'-CTA ACC ACG ATT ACA CCA TTT G-3') and GH4 (5'-CAA AAT CCT CAG CCT CGT C-3') were used (Kissi et al., 1999). The RT-PCR reaction was carried out in a volume of 50 μ l. The reaction mixture consisted of 5× PCR buffer, 10 mM dNTP mix, 20 nM of each primer, the RT-PCR enzyme mix and 4 μ l of eluted RNA. A thermo-cycling profile of 1 cycle of 30 s at 50°C , 1 cycle of 15 min at 95°C , 40 cycles of 30 s at 94°C , 30 s at 52°C (for nucleoprotein) or 56°C (for glycoprotein), and 1 min at 72°C was employed followed by a final incubation at 72°C for 10 min. The amplified products were visualized on 1.8% agarose gel with ethidium bromide. The amplicons were purified with the commercial QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany) and directly sequenced from PCR products with the same primers (Bourhy et al., 1993; Kissi et al., 1999). The obtained nucleotide sequences of the positive samples were assembled using the DNASTAR (version 5.05) program and compared to the known sequences of N and G genes in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program. The phylogenetic analysis was conducted by comparing 1092 bp of N gene and 672 bp of G gene nucleotide sequences with other rabies viruses obtained from GenBank. A multiple alignment of the nucleotide and protein coding sequences was performed using Clustal W and neighbour-joining criteria. The final phylogenetic tree was constructed using the Phylip program (Felsenstein, 1989). The partial G gene and N gene sequences determined during this study have been submitted to GenBank with assigned accession numbers (Table 1).

3. Results and discussion

This is the first molecular epidemiology study on rabies-positive samples collected in Slovenia. The phylogenetic analysis conducted with the Slovenian-positive samples showed that all belonged to classical rabies virus. The topology of the obtained sequences on both phylogenetic trees was almost identical, confirming that the N gene or the G gene can be used for reliable genotyping. A comparison of the sequences obtained from different animal species (red fox, badger, cattle, dog, cat, marten and horse) revealed the historical transmission from the red fox, as a reservoir of the rabies virus, to domestic and wild

Table 1

Rabies field viruses from Slovenia (virus numbers 1–30) and isolates representing classical rabies virus from GenBank (virus numbers 31–42) used for the phylogenetic analysis. Virus codes describe laboratory sample number, year of detection, and SVN is for Slovenia.

Virus number	Virus code	Host species	Geographical location	Year of isolation	Reference	GenBank accession no. for nucleoprotein	GenBank accession no. for glycoprotein
1	202-94SVN	Cattle	Jesenice	1994	This article	HM852150	HM852173
2	498-94SVN	Fox	Ribnica	1994	This article	HM852146	HM852169
3	587-94SVN	Marten	Sežana	1994	This article	HM852152	HM852175
4	696-15-94SVN	Fox	Ilirska Bistrica	1994	This article	HM852149	HM852172
5	882-95SVN	Cat	Cerknica	1995	This article	HM852148	HM852171
6	1229-95SVN	Fox	Domžale	1995	This article	HM852153	HM852176
7	709-95SVN	Dog	Kamnik	1995	This article	–	–
8	590-96SVN	Fox	Litija	1996	This article	HM852147	HM852170
9	1116-00SVN	Badger	Novo Mesto	2000	This article	HM852151	HM852174
10	1339-00SVN	Fox	Litija	2000	This article	–	–
11	2475-01SVN	Fox	Koper	2001	This article	–	–
12	315-02SVN	Fox	Laško	2002	This article	HM852164	HM852187
13	664-02SVN	Fox	Videm near Ptuj	2002	This article	HM852145	HM852168
14	199-03SVN	Fox	Brežice	2003	This article	HM852155	HM852178
15	1386-04SVN	Fox	Ilirska Bistrica	2004	This article	HM852165	HM852188
16	675-05SVN	Fox	Polzela	2005	This article	–	–
17	1039-06SVN	Fox	Črnomelj	2006	This article	–	–
18	1647-07SVN	Fox	Šmarje near Jelše	2007	This article	HM852161	HM852184
19	275-08SVN	Fox	Brežice	2008	This article	HM852154	HM852177
20	332-08SVN	Dog	Brežice	2008	This article	HM852156	HM852179
21	339-08SVN	Fox	Mirna peč	2008	This article	HM852157	HM852180
22	348-08SVN	Badger	Majšperk	2008	This article	HM852159	HM852182
23	1209-08SVN	Badger	Videm near Ptuj	2008	This article	HM852160	HM852183
24	1868-08SVN	Fox	Slovenska Bistrica	2008	This article	–	–
25	2441-08SVN	Horse	Videm near Ptuj	2008	This article	HM852162	HM852185
26	371-09SVN	Cattle	Ilirska Bistrica	2009	This article	HM852167	HM852190
27	1085-09SVN	Fox	Koper	2009	This article	HM852166	HM852198
28	2440-09SVN	Fox	Šmarje near Jelše	2009	This article	–	–
29	52-10SVN	Fox	Poljčane	2010	This article	HM852163	HM852186
30	755-10SVN	Cattle	Žetale	2010	This article	HM852158	HM852181
31	red fox/08RS-1981/ Udine/2008	Red fox	Italy	2008	De Benedictis et al. (2008)	FJ424484	–
32	dog/09RS-1459/ Udine/2009	Dog	Italy	2009	–	GQ478245	–
33	86111YOU	Red fox	Bosnia-Herzegovina	1986	Bourhy et al. (1999)	U42706	–
34	8653YOU	Wolf	Bosnia-Herzegovina	1986	Bourhy et al. (1999)	U42704	AF134341
35	8661FRA	Hedgehog	France	1984	Bourhy et al. (1999)	U43434	–
36	9202ALL	Red fox	Germany	1991	Bourhy et al. (1999)	U42701	AF134338
37	9244FRA	Red fox	France	1992	Bourhy et al. (1999)	U42607	AF134342
38	86106YOU	Red fox	Former Yugoslavia	1972	Kissi et al. (1995)	U22839	–
39	86107YOU	Red fox	Former Yugoslavia	1976	Bourhy et al. (1999)	U42703	AF134345
40	SAD B19	Vaccine	–	–	Geue et al. (2008)	EF206709	EF206709
41	SAD Bern	Vaccine	–	–	Geue et al. (2008)	EF206708	EF206708
42	9339EST	Raccoon dog	Estonia	1991	Bourhy et al. (1999)	–	AF134335

animals by direct contact. This data was also confirmed, in most cases, with epidemiological investigations, where domestic animals had been diagnosed as rabid.

A specific RT-PCR product of 1313 nucleotides (nt) was amplified from all 30 selected samples for genotyping. For all 30 samples, N gene sequences 1092 nucleotides long were determined and compared to 11 sequences representing classical rabies virus (Table 1 and Fig. 2). Phylogenetic analysis of the N gene sequences showed that Slovenian samples formed two genetic groups of closely related strains. Rabies-positive samples from Slovenia showed 95.9–100% nucleotide homology to each other and 94.8–100% nucleotide homology to the other European isolates (strains: 86107YOU, 86106YOU, 8653YOU, 9202ALL, 9244FRA, 8661FRA, red fox/08RS-1981/Udine/2008, dog/09RS-1459/Udine/2009 and 86111YOU) (Bourhy et al., 1999; De Benedictis et al., 2008). Twenty-nine positive

samples were found to share 99.0–100% nucleotide identity to each other and 99.5–99.9% identity to the closely related strain 86111YOU in GenBank, isolated in the year 1986 in Bosnia-Herzegovina. With recent outbreaks in Italy, where strains red fox/08RS-1981/Udine/2008 and dog/09RS-1459/Udine/2009 were sequenced, strain 275-08SVN found in Brežice in 2008 shared a 100% identity. Strain 664-02SVN was found to share a 99.1% identity with strain 8653YOU, isolated from a wolf in 1986 in Bosnia-Herzegovina (Bourhy et al., 1999).

A specific RT-PCR product of 730 nt of the G gene was amplified from all 30 selected samples. Sequences of 672 nt from these 30 samples were determined and compared to 7 isolates representing classical rabies virus. When comparing the phylogenetic tree of the G gene to the tree of the N gene sequences, they were found to show similar topology (Fig. 2). The partial G gene sequences (672 nt)

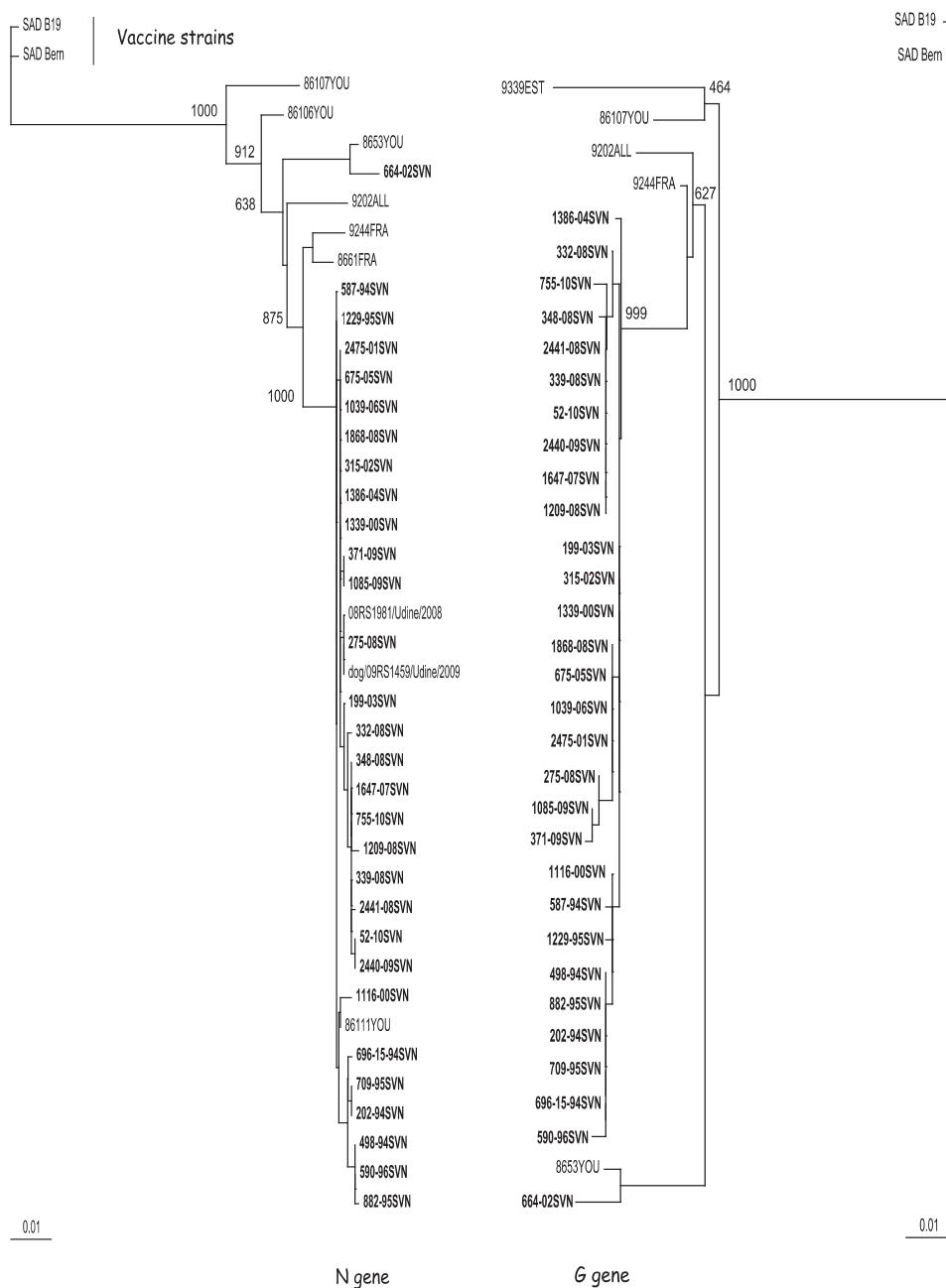


Fig. 2. The phylogenetic trees based on a 1092 nucleotide sequence (146–1238, numbering of nucleotide positions according to strain SAD B19) of the N gene and 672 nucleotides of the G gene (3914–4582, numbering of nucleotide positions according to strain SAD B19) were constructed using the Phylophil program by using the maximum likelihood algorithm with strain SAD B19 as outgroup. Bootstrap values were obtained for 1000 datasets.

showed 94.6–100% nucleotide homology to each other and formed two genetic groups. When compared to five European isolates (strains 9202ALL 9244FRA, 86107YOU, 9339EST and 8653YOU) (Bourhy et al., 1999), our positive samples were found to share a 93.8–98.4% nucleotide homology (Fig. 2).

Slovenian rabies field viruses formed two genetic groups of closely related strains belonging to Western Europe (WE) and the Eastern Europe (EE) group according to Bourhy et al. (1999). Although initially used to clarify spatial information, the different nomenclature used by previous authors may result in confusion when more diverse information is available (Bourhy et al., 1999;

Kuzmin et al., 2004). Rabies virus has now been eliminated from whole of Western Europe and therefore it is not appropriate to describe future virus isolations with nomenclatures according to geographical locations (Turcitu et al., 2010).

In order to analyse the amino acid (AA) variability between the 30 Slovenian strains and other rabies viruses, the partial N and G gene AA sequences were aligned and compared with the published field strains and two vaccine strains (data not shown). In the N gene no AA difference was observed between the group of 29 Slovenian strains and the strains red fox/08RS-1981/Udine/2008 (De Benedictis et al., 2008), dog/09RS-1459/Udine/2009, 86111YOU (Bourhy

et al., 1999) (Table 1). When comparing strains 664-02SVN and 8653YOU, the replacement of Asp with Asn at positions 35 (numbered according to strain SAD B19) and Asp to Ser at position 101 was observed. The 29 G protein amino acid sequences of our strains showed two differences in AA changes at position 202: Leu for Pro (strain 1386-04SVN); and His for Leu at position 250 for samples 52-10SVN, 332-08SVN, 339-08SVN, 348-08SVN, 755-10SVN, 1209-08SVN, 1647-07SVN, 2440-09SVN, 2441-08SVN, detected between 2007 and 2010 (Table 1). One AA change between strain 664-02SVN and 8653YOU (Bourhy et al., 1999) occurred at position 206 (Ala for Met).

Slovenia has a 670 km long border with Croatia and the majority of rabies cases within the last decade were detected in the vaccination zone along the border with Croatia. The first result of a successful vaccination strategy was confirmed in 1998, when we detected only a few rabid animals (Hostnik et al., 2006). According to the data submitted to the Rabies Bulletin Europe, rabies is an increasing problem in Croatia, and almost 20% of the fox brain samples analysed in a laboratory of Croatian Veterinary Institute during 2001 and 2006 were found to be positive (Lojkić et al., 2009). Rabies in Croatia is strictly sylvatic, with the red fox as the main reservoir, and in the last 10 years the disease has become enzootic. A phylogenetic analysis of a 422 nucleotide sequence (data not shown) of the isolate CRO_09SK (GU134624) (Lojkić et al., 2009) from a wolf in Croatia in 2009 revealed that this strain shared a 99.5–100% homology with the Slovenian strains 498-94SVN, 696-15-95SVN, 1116-00SVN, 1339-00SVN, 275-08SVN, 1085-09SVN and 52-10SVN (Table 1). This observation confirmed that the positive samples from Slovenia were genetically closely related to the sequenced field strain CRO_09SK, circulating in Croatia.

After the reintroduction of rabies in Italy the oral vaccination was based on locations of confirmed rabies cases, including a protection zone, but later new positive rabies cases were detected among wildlife and domestic animals, with tendency of spreading the infection (De Benedictis et al., 2009). The sequences of the two published strains red fox/08RS-1981/Udine/2008 and dog/09RS-1459/Udine/2009 (Fig. 2) are closely related to our strains, which were detected in the same period.

According to the results of our phylogenetic study, there was no evidence for the detection of the vaccine strain among the 30 rabies-positive animals in the field, or the vaccine strain recombination in the sequenced region. The positive Slovenian samples were only found to share a 91.81–92.5% (for partial nucleoprotein) and a 91.7–93.1% (for partial glycoprotein) nucleotide homology with the vaccine strains SAD Bern and SAD B19 (Geue et al., 2008), confirming that the vaccine strains were not detected among the selected field samples and that they had not reverted back to their native pathogenic form.

This study provides a detailed molecular epidemiology of 30 rabies isolates in Slovenia between 1994 and 2010. Phylogenetic analysis showed that the Slovenian isolates formed two groups of closely related strains, which have been genetically stable and epidemically present in

Slovenia for at least 16 years. Further studies on rabies viruses in the neighbouring countries of former Yugoslavia, such as Croatia, Serbia and Bosnia-Herzegovina, are needed to explain the dynamics of circulating rabies strains in the west Balkan part of Europe.

Acknowledgements

The study was supported by the Veterinary Administration of Republic Slovenia (VARS) and by the Slovenian Research Agency (ARRS).

References

- Badrane, H., Bahloul, C., Perrin, P., Tordo, N., 2001. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* 75, 3268–3276.
- Bourhy, H., Kissi, B., Tordo, N., 1993. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* 194, 70–81.
- Bourhy, H., Kissi, B., Audry, L., Smreczak, M., Sadkowska-Todys, M., Kuolonen, K., Tordo, N., Zmudzinski, J.F., Holmes, E.C., 1999. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J. Gen. Virol.* 80, 2545–2557.
- Dean, D.J., Abelseth, M.K., Atanasius, P., 1996. The fluorescent antibody test. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. fourth ed. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, pp. 88–95.
- De Benedictis, P., Gallo, T., Iob, A., Coassini, R., Squecco, G., Ferri, G., D'Ancona, F., Marangon, S., Capua, I., Mutinelli, F., 2008. Emergence of fox rabies in north-eastern Italy. *Euro Surveill.* 13 (45 PII), 19033.
- De Benedictis, P., Capua, I., Mutinelli, F., Wernig, J.M., Arič, T., Hostnik, P., 2009. Update on fox rabies in Italy and Slovenia. *Rab. Bull. Eur.* 1 (3), 5–7.
- Durrer, P., Gaudin, Y., Ruigrok, R.W.H., Graf, R., Brunner, J., 1995. Photo-labeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis virus. *J. Biol. Chem.* 270, 17474–174781.
- Faber, M., Faber, M.L., Papaneri, A., Bette, M., Weihe, E., Dietzschold, B., Schnell, M.J., 2005. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.* 79, 14141–14148.
- Felsenstein, J., 1989. Phylip phylogeny inference package (version 3.5c). *Cladistics* 5, 164–166.
- Geue, L., Schares, S., Schnick, C., Kliemt, J., Beckert, A., Freuling, C., Conraths, F.J., Hoffmann, B., Zanoni, R., Marston, D., McElhinney, L., Johnson, N., Fooks, A.R., Tordo, N., Muller, T., 2008. Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife. *Vaccine* 26 (26), 3227–3235.
- Gould, A.R., Hyatt, A.D., Lunt, R., Kattenbelt, J.A., Hengstberger, S., Blacksell, S.D., 2002. Characterization of a novel lyssavirus isolated from pteropod bats in Australia. *Virus Res.* 54, 165–187.
- Hostnik, P., Toplak, I., Barlič-Maganja, D., Grom, J., Bidovec, A., 2006. Control of rabies in Slovenia. *J. Wild. Dis.* 42 (2), 492–495.
- Kissi, B., Tordo, N., Bourhy, H., 1995. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology* 209, 526–537.
- Kissi, B., Badrane, H., Audry, L., Lavenu, A., Tordo, N., Brahim, M., Bourhy, H., 1999. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. *J. Gen. Virol.* 80, 2041–2050.
- Kuzmin, I.V., Orciari, L.A., Arai, Y.T., Smith, J.S., Hanlon, C.A., Kameoka, Y., Rupprecht, C.E., 2003. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res.* 97, 65–79.
- Kuzmin, I.V., Botvinkin, A.D., McElhinney, L.M., Smith, J.S., Orciari, L.A., Hughes, G.J., Fooks, A.R., Rupprecht, C.E., 2004. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J. Wild. Dis.* 40 (4), 617–631.
- Kuzmin, I.V., Hughes, G.J., Botvinkin, A.D., Orciari, A.L., Rupprecht, C.E., 2005. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res.* 111, 28–43.
- Lojkić, I., Galić, M., Čać, Ž., Jelić, I., Bedeković, T., Lojkić, M., Cvjetnić, Ž., 2009. Bites of a rabid wolf in 67-old man in north-eastern part of Croatia. *Rab. Bull. Eur.* 3 (33), 5–7.
- Morimoto, K., Hooper, D.C., Spitisin, S., Koprowski, H., Dietzschold, B., 1999. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely cor-

- relates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* 73, 510–518.
- Pastoret, P.P., Brochier, B., 1998. Epidemiology and elimination of rabies in Western Europe. *Vet. J.* 156, 83–90.
- Thouloze, M.I., Lafage, M., Schachnet, M., Hartmann, U., Cremer, H., Lafon, M., 1998. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J. Virol.* 72, 7181–7190.
- Tuffereau, C., Benejean, J., Roque Alfonso, A.M., Flamand, A., Fishman, M.C., 1998. Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surface of lepidopteran cells. *J. Virol.* 72, 108–191.
- Turcitu, M.A., Barboi, G., Vuta, V., Mihai, I., Boncea, D., Dumitrescu, F., Codreanu, M.D., Johnson, N., Fooks, A.R., Müller, T., Freuling, C.M., 2010. Molecular epidemiology of rabies virus in Romania provides evidence for a high degree of heterogeneity and virus diversity. *Virus Res.* 150, 28–33.
- Virus taxonomy, 2005. Classification and nomenclature of viruses: the Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), Part II – The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 609–614.