

MIŠJA MRZLICA IN VIRUS DOBRAVA V SLOVENIJI

Hemorrhagic Fever and the Dobrava Virus in Slovenia

Miha Likar* UDK 578:616.98

Povzetek

*Virus Dobrava so nedavno osamili iz pljučnega tkiva rumenogrdle poljske miši (*Apodemus flavicollis*), ki so jo ujeli v okolici slovenske vasi Dobrava, kjer je bilo več hudih bolnikov. S serološkimi testi in prebavo z restrikcijskim encimom odseka gena, pomnoženega s PCR, je postalo očitno, da je virus Dobrava soroden znanim hantavirusom. Njuno sorodnost so raziskovali tako, da so odsek genoma (M) virusa Dobrava pomnožili s PCR in določili zaporedje nukleotidov. Primerjanje zaporedja nukleotidov ustreznega odseka drugih hantavirusov je pokazalo podobnost pri 41,7 %. Na podlagi tega so sestavili filogenetično drevo (dendrogram), ki dokazuje, da je virus Dobrava genetično poseben in najbrž nov virus rodu hantavirus iz družine Bunyaviridae.*

Abstract

Following introductory remarks on hemorrhagic fever with renal syndrome in the former Yugoslavia and present-day Slovenia the article describes a new hantavirus, referred to by Avšič-

Županc as "virus Dobrava". It is postulated that the Dobrava virus could be an important agent of HFRS in Europe.

*The Dobrava virus was recently isolated from a yellowneck field mouse (*Apodemus flavicollis*) captured near the village of Dobrava in northern Slovenia, where severe cases of HFRS were registered.*

Serology and restriction enzyme digestion of PCR amplified gene segments showed that the virus is related to previously identified hantaviruses. To investigate further the relationship of this new isolate to other hantaviruses, a portion of the medium (M) genome segment of the Dobrava virus was amplified by PCR and the nucleotide sequence was determined. A comparison of the nucleotide sequence with the corresponding nucleotide sequences of other hantaviruses revealed an overall homology of 41,7 %. A phylogenetic tree based on pairwise sequence similarity clearly showed that the Dobrava virus is genetically distinct and probably represents a new virus of the genus hantaviruses of the family Bunyaviridae.

Vročinske bolezni s krvavitvami in bolezenskimi znamenji na ledvicah so spoznali v Evraziji že na začetku 20. stoletja, podobne bolezni pa so bile opisane že v starem veku. Bolezen so imenovali različno: hemoragični nefrozonefritis ali mišja mrzlica, epidemije pa so opisovali pri vojaki in civilistih. Že pred drugo svetovno vojno so bolezen intenzivno raziskovali v nekdanji Sovjetski zvezi in Mandžuriji. Že na začetku 40. let so vedeli, da se bolezen prenaša na ljudi - prostovoljce, če se jim vbrizga filtrat bolnikove krvi ali seča, pa tudi z izvlečki tkiv poljskih miši iz rodu *Apodemus*.

Preglednica 1. Hemoragična mrzlica z ledvičnim sindromom od leta 1987 do 1996 po podatkih laboratorijskih preiskav

Table 1. Hemorrhagic fever with renal syndrome according to data from the viral laboratory at the Institute for Microbiology (1987-1996)

leto year	bolniki patients		umrli fatal		outcome
	IVZ	IM	IVZ	IM	
1987	9	13	0	1	
1988	7				
1989	10	11	0	1	
1990	7	12	0	0	
1991	1	3	0	1	
1992	10	19	0	1*	ali 0
1993	9	11	0	0	
1994	4	6	0	0	
1995	9	14	0	1	
1996		6	0	0	

* Razlike so nastale, ker so pri nekaterih bolnikih bolezni laboratorijsko ugotavili s časovnim zamikom.

* Differences are due to late laboratory diagnosis for a number of cases.

IVZ - Institut za varovanje zdravja / Institute for the Protection of health

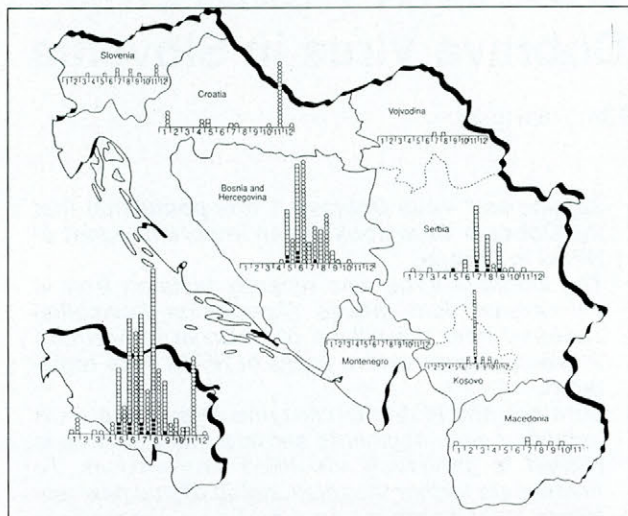
IM - Institut za mikrobiologijo / Institute for Microbiology

Incidenca bolezni je bila vedno največja ob koncu poletja, ko je bilo miši največ. Skoraj ob istem času so v Skandinaviji opisali vročinsko bolezen z bolečinami v trebuhu, hrbtu in okvaro ledvic. Poimenovali so jo nephropathia epidemica. Bolezen je imelo tudi veliko vojakov med drugo svetovno vojno.

V zgodnjih 50. letih so med korejsko vojno opisali več tisoč bolnikov s korejsko hemoragično mrzlico. Naše zanimanje za bolezen je vzbudil Carleton Gajdušek, ameriški virolog slovaškega rodu, ki je v tistem času večkrat obiskal naš laboratorij. Raziskoval je korejsko hemoragično mrzlico med ameriški vojniki v Južni Koreji. Gajdušek, poznejši Nobelovec, je tedaj pripovedoval, kako si je prizadeval, da bi bolezen prenesel na poskusne živali. Ni mu uspelo. Ob neki priložnosti je potoval iz New Yorka v Seul v vojaškem transportnem letalu z gorilo, ki jo je posodil živalski vrt v newyorškem predmestju Bronx, da bi poskusili bolezen prenesti na antigensko človeku najbolj podobno žival, gorilo. Tako bi dokazali povzročitelja. Sredi Pacifika je gorila razmaknila palice svoje kletke, se približala Gajdušku (v letalu sta bila sama) in ga natančno pretipala po obrazu. Gajdušek se ni ganil in gorila je nekako razočarana odkorakala nazaj v kletko. Oba sta se zbudila zjutraj v Seulu.

Šele 1981. leta so iz krvi bolnikov s korejsko hemoragično mrzlico uspešno vzgajali virus, ki so ga imenovala Hantaan po reki na Koreji. Virus so uvrstili v družino Bunyaviridae kot nov član rodu Hantaan. Skoraj hkrati so podoben virus osamili na Finskem in ga imenovali virus Puumala, v Združenih državah pa so podoben virus imenovali virus Prospect Hill. Virusi so v Skandinaviji povzročali blago obliko hemoragične mrzlice in so jo zato imenovali hemoragična mrzlica z ledvičnim sindromom (HFRS = po angl. hemorrhagic fever with renal syndrome).

V Sloveniji so prvi primer te bolezni opisali 1952 leta. 1962. leta je izbruhnila epidemija te bolezni v vojaškem taboru na Fruški gori, kjer je zbolelo skoraj 50 vojakov. Leta 1967 sta bili dve epidemiji v osrednji in zahodni Bosni ter na Plitvičkih jezerih.



Slika 1. Bolniki s hemoragično mrzlico z ledvičnim sindromom med epidemijo 1989 v Jugoslaviji
Figure 1. Distribution of HFRS cases in Yugoslavia during the 1989 epidemic

Vsak serološko dokazan primer so tipizirali (□ serotip Hantaan, ■ smrtni primer s tipom Hantaan, ○ serotip Puumala, ● smrtni primeri s tipom Puumala, po mesecih). Each serologically confirmed case was serotyped (□ Hantaan serotype, ■ fatal case with Hantaan serotype, ○ Puumala serotype, ● fatal case with Puumala serotype, displayed according to month of occurrence).

Vir: Gligić, Stojanović, Obradović, Hlača, Dimković, Diglišić, Lukac, Ler, Bogdanović, Antonijević, Ropac, Avšič-Zupanc, LeDuc, Ksiazek, Yaganigihara, Gajdusek, 5 1992.

Veliko pozornost pri nas in v tujini je izzvala epidemija hemoragične mrzlice z ledvičnim sindromom, ki je prizadela vse nekdanje jugoslovanske republike leta 1986. Laboratorijsko so preiskali 609 hospitaliziranih bolnikov z značilnimi znamenji te hude bolezni. Hkrati so preiskali tudi serume in tkiva drobnih sesalcev, pri katerih so dokazali okužbo s hantavirusi po protitelesih in antigenih (12).

Serološko so potrdili 226 bolnikov, 182 iz Bosne in Hercegovine ali Srbije. Bolezen je bila v različnih delih Jugoslavije različna, ponekod je bila blaga in ni imela posledic, drugod je bila huda in so morali bolniki uporabljati dializo. Njihove ledvice so bile nepopravljivo poškodovane. V tej epidemiji je umrlo 15 bolnikov ali 6,6 % okuženih. Bolniki južnih območij Balkanskega polotoka so imeli po splošnem vtisu zdravnikov hujšo obliko bolezni kakor bolniki iz severnih pokrajin. Preiskovali so tudi užete male sesalce in serološko ugotavljali virus HFRS pri miših, zlasti pri rumenoglavi poljski miši in gozdni miši (*Apodemus flavicollis* in *A. sylvaticus*).

Prvi primer bolnika z mišjo mrzlico v Sloveniji je v literaturi opisan leta 1954 (Radošević in Mohaček). Opisani so štirje bolniki z akutnim vnetjem ledvic neznane etiologije. Eden se je okužil v gozdovih na Pohorju, kjer je delal kot sezonski gozdar. Bedjanič je tudi v tistem času zdravil bolnika z značilnimi znamenji ledvičnega vnetja in krvavitvami po koži in nekaterih organih. Doma je bil iz okolice Kamnika (18).

Epidemiološka služba je primere HFRS registrirala od leta 1952, vendar temeljijo podatki do druge polovice 80. let na kliničnem opazovanju brez laboratorijskih dokazov, zato so dokaj nezanesljivi.

Podatki Inštituta za varovanje zdravja se ne ujemajo docela s podatki virusnega laboratorija inštituta za mikrobiologijo medicinske fakultete, kjer so sredi 80. let uvedli

nove metode za ugotavljanje okužbe z virusom HFRS. Avšičeva je tedaj pri nas uvedla dokazovanje specifičnih protiteles s testom indirektna imunofluorescence in nevtralizacijskim testom. Metoda je dokaj preprosta.

Kloniran sev celic Vero E-6 se okuži z virusom HFRS in uporabi kot antigen. Avšičeva je od vsega začetka uporabljala več sevov HFRS, od sevov Hantaan do sevov Pumala Prospect Hill in Seul.

Preglednici 2 in 3 kažeta ugotovitve seroloških preiskav prvih bolnikov v Sloveniji (2). Preglednica 2 predstavlja spoznanja pri treh bolnikih z značilnimi znamenji HFRS: odpovedjo ledvic in vročinskim stanjem. Bolniki z mišjo mrzlico imajo tudi hude bolečine v trebuhem in ledvenem predelu (11). Mišja mrzlica ali HFRS pa se ne kaže vedno s krvavitvami, kajti številni bolniki imajo blago obliko (3), ki se začne nenadno, podobno kakor gripa z mrzlico, glavobolom in bolečinami v trebuhu in ledvenem predelu.

V preglednici 3 so ugotovitve laboratorijskih testov pri dveh bolnikih, pri katerih so večkrat preiskovali serum na protitelesa proti tedaj znanim sevom HFRS: sevom HTN, CG, Tch in PH-1 iz ZDA in sevom Fojnica in Vranica, ki so ju osamili v Jugoslaviji.

Slika 3 kaže zemljepisno razdelitev prvih 33 serološko potrjenih bolnikov s HFRS v Sloveniji (6). Raziskava je bila pomembna, kajti po ugotovitvah testov je bilo sklepati, da je v Sloveniji navzočih več tipov hantavirusov, ne le dveh, ki so ju odkrili v Jugoslaviji (4).

Spoznanje je bilo zanimivo, kajti nakazovalo je, da bi lahko različne klinične podobe HFRS povzročali različni tipi hantavirusov. S pomočjo republiškega zavoda za zdravstveno varstvo in epidemiologov vojaškega inštituta za epidemiologijo iz Beograda smo začeli raziskovati ali so mali sesalci v Sloveniji okuženi z virusi rodu Hantaan podobno kakor so že dokazali za male sesalce v drugih republikah Jugoslavije (12).

Raziskave malih sesalcev

Raziskave malih sesalcev, zlasti glodalcev, so bile nadvse plodne (8). Postal je očitno, da sta pri nas najbolj pomembna nosilca in rezervoarja hantavirusov rumenogrla poljska miš (*Apodemus flavicollis*) in gozdna krtica (*Clethrionomys glareolus*).

Tako so ugotovili naravna žarišča hemoragične mrzlice z ledvičnim sindromom ali mišje mrzlice, v katerih so okužene z virusi številne živali, med njimi pa prevladujejo glodalci (10). Število laboratorijsko pozitivnih malih sesalcev se je povsem ujemale z območji, kjer so bili tudi bolniki. Prevladujejo kraji v Prekmurju in na Dolenjskem.

V tistem času smo postali pozorni tudi na razlike med serološkimi testi, na razločke med imunskim odzivom pri ljudeh na okužbo in bolezen. Razlike se niso vedno ujemale s tem, ali je bila bolezen huda ali blaga. Začeli smo sumiti, da je povzročitelj več tipov hantavirusa, ne le dva, kakor so do tedaj zatrjevali raziskovalci s Hrvaškega in iz Srbije, ki so imeli vendar več izkušenj.

Izolacija virusa Dobrava

Iz ujetih malih sesalcev smo poskušali osamiti hantaviruse in dobili smo več zanimivih izolatov. Enega med njimi so pozneje nadrobneje raziskali. Avšič-Zupančeva ga je imenovala virus Dobrava - po vasi, v bližini katere so ujeli rumenogrla poljsko miš; iz njenih pljuč smo osamili virus.

Testi z imunofluorescentnimi protitelesi humanih rekonvalescentnih serumov in monoklonskimi protitelesi proti skupini hantavirusov so pokazali, da je izoliran poseben virus (5). Preglednica 5 predstavlja ugotovitve testov z monoklonskimi protitelesi (7, 9).

Preglednica 2. Prvi laboratorijsko dokazani bolniki s HFRS v Sloveniji**Table 2. First patients with HFRS proven by laboratory tests in Slovenia**

serum št. serum no.	spol sex	odvzeta kri blood taken	diagnoza diagnosis	protitelesa proti sevu Hantaan Puumala antibodies against strain Hantaan Puumala	
1. V.T	m m	18. 2. 1985	akutna odpoved ledvic / Acute kidney failure	1:1024	1:512
2 V.T.	m m	22 .5. 1985	akutna odpoved ledvic / Acute kidney failure	1:1024	1:512
3. P.H.	ž f	22. 4. 1985	glomerulonefritis / Glomerulonephritis	1:16	1:1
4. B.H.	m m	21. 5. 1985	vročinsko stanje, oligurija / Febrile state, oliguria	1:16	1:16

Vir: Avšič-Županc, Gligič, Čušman, Likar, 1985

Preglednica 3. Titri protiteles proti hantavirusom pri bolnikih s HFRS v Sloveniji**Table 3. Anti-hantavirus antibody titers in patients with HFRS in Slovenia**

ime Name	HTN	CG	Tch	PH-1	Fojnica	Vranica
V.T.	256	16	256	64	NT	NT
	256	32	256	128	128	16
J.H.	512	32	128	256	16	256
	512	32	128	256	NT	NT
	1024	256	128	1024	512	32

NT=ni testirano, HTN=sev Hantaan, CG=sev iz Belgije, Tch=sev iz ZDA, Ph-1=sev Prospect Hill iz ZDA, Fojnica in Vranica=seva, izolirana v Jugoslaviji

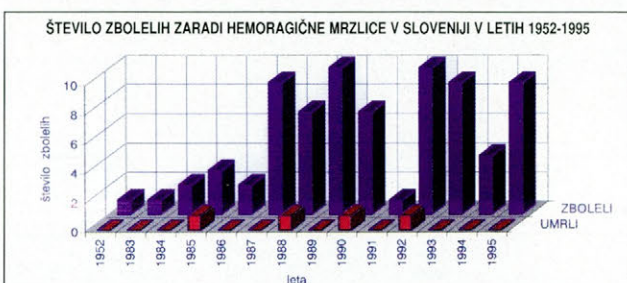
NT=not tested, HTN=strain Hantaan, CG=strain from Belgium, Tch=strain from USA, Fojnica and Vranica=strains isolated in Jugoslavia.

Vir: Avšič-Županc, 1987

Preiskava virusa Dobrava z monoklonskimi protitelesi proti virusu je pokazala, da virus reagira z monoklonskimi protitelesi proti virusoma Hantaan in Seul, ne pa z virusom Puumala. Reaktivnost virusa Dobrava je očitno posebna. Virus Dobrava je bil zanimiv tudi za raziskovalce hantavirusov v evropskem središču za te viruse pod vodstvom van der Groena. V inštitutu za tropsko medicino v belgijskem Antwerpnu in na inštitutu za javno zdravstvo v Bilthovenu na Nizozemskem je Avšič-Župančeva primerjala v skupini z encimskim imunskim testom tri skupine serumov ljudi: serume iz nekdanje Jugoslavije in Slovenije, serume laboratorijsko okuženih ljudi in serume bolnikov s HFRS iz Belgije in Nizozemske (14), pri katerih je bil izvid indirektnega imunofluorescentnega testa pozitiven.

Testi v Belgiji in na Nizozemskem so bili za raziskave v Sloveniji nadvse dragoceni, kajti dokazali so, da je imunski odziv pri nas poseben in se razlikuje od imunskega odziva bolnikov v zahodni Evropi.

Raziskava je izzvala veliko zanimanje raziskovalcev in poznavalcev hantavirusov, kajti izšla je v ugledni reviji Lancet (14). Prispevek v Lancetu je Avšič-Župančeva omogočil nadaljnje raziskave virusa Dobrava v ZDA. To pa je bilo zelo pomembno, kajti na začetku 1990. let je bilo možno razrešiti vprašanje, ali je virus Dobrava res nov virus iz skupine hantavirusov, samo v ZDA. V evropskih laboratorijih so nekatere nove molekularno-virološke teste šele uvajali.



Slika 2. Bolniki s HFRS v Sloveniji od leta 1952 do 1995; podatki Inštituta za varovanje zdravja

Figure 2. Patients with HFRS in Slovenia from 1952-1995. Data of the Institute for the Protection of Health

Identifikacija virusa Dobrava

Na tej stopnji raziskav so bili opravljeni že vsi testi, ki so bili možno pri nas, in Avšičeva je nadaljevala nadrobno analizo in identifikacijo virusa Dobrava na inštitutu za raziskavo nalezljivih bolezni ameriške vojske v kraju Frederick v ameriški državi Maryland.

Treba je bilo uporabiti molekularno biološki test - verižno reakcijo s polimerazo, ki omogoči določen odsek virusovega genoma pomnožiti v velikem številu kopij. Hantavirusi imajo genom iz enovijačne verige RNA v treh delih. Uporabili so tako imenovano verižno reakcijo s polimerazo in reverzno transkriptazo. Pri tej metodi najprej prevedejo RNA v komplementarno DNA s pomočjo encima reverzno transkriptaze in nato pomnožijo izbrani odsek cDNA.

Z več variantami metode RT-PCR jim je uspelo dokazati, da je virus Dobrava nov tip iz rodu hantavirusov. Uporabili so par začetnih oligonukleotidov v skladnih odsekih genomov vseh pomembnih predstavnikov hantavirusov in odseke pomnožili. Tip so virusu določili po značilnih odsekih pomnožene cDNA s pomočjo restriktivne endonukleaze. Na podlagi primerjanja tako pridobljenih pomnoženih odsekov cDNA virusa Dobrava z odseki predstavnikov hantavirusov so ugotovili, da je virus Dobrava res poseben.

Analiza zaporedja nukleinskih baz pomnoženega odseka cDNA virusa Dobrava in primerjanje z vzporedno analizo genomov vseh pomembnih predstavnikov hantavirusov, je pokazala, da ima virus Dobrava posebno zaporedje nukleinskih baz in ga lahko prištejemo v nov tip hantavirusov (16).

Slika 5 in dendrogram predstavnikov hantavirusov ponazarjata, da je virus Dobrava poseben predstavnik te velike skupine virusov. Postalo je tudi jasno, da se sevi med seboj razlikujejo. Za virus Dobrava so izračunali, da se od seva Hantaan razlikuje v 41,7 % od sestave genoma (16).

Nadrobna identifikacija sevov hantavirusov ima velik praktičen pomen. Olajšuje spoznavanje teh virusov v naravi in iskanje naravnih rezervoarjev virusa. Zanimivo je, da so že sredi 80. let predvidevali, da je tudi oblika bolezni delno

odvisna od seva, ki jo je povzročil. Najhujše oblike bolezni so navadno povezane s tipom Hantaan, vendar pa so v zadnjih letih našli tudi virus Dobrava pri hudih bolnikih, ki so umrli. Blažje so navadno okužbe s tipom Puumala, pa tudi za te

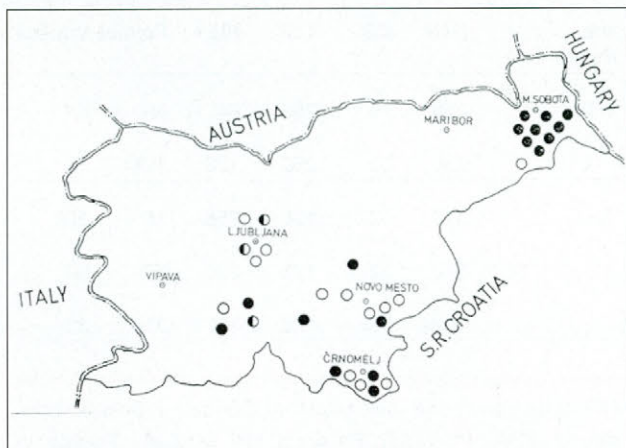
primere so že opisali izjeme. Prav iz teh vzrokov je natančno ugotavljanje tipa hantavirusa, ki povzroči bolezen za epidemiologijo in zdravnike s klinik nadvse pomembno.

Odziv na virus Dobrava po svetu

Prvi so se odzvali srbski raziskovalci pod vodstvom Gligičeve, ki je sodelovala v začetnih poskusih identifikacije virusa Dobrava. Virus Dobrava so nenadoma predstavili kakor virus Beograd, ki povzroča HFRS pri ljudeh, prvotni virus Dobrava pa je bil do tedaj osamljen le iz rumenogrlje poljske miši, ne pa pri ljudeh (13). Virus Beograd ima za virologe nekaj pomanjkljivosti. Virus Dobrava je Gligičeva dobila od Avšičeve ob neki priložnosti med raziskavami. Hujše pa je, da je virus Beograd "preveč" podoben virusu Dobrava, saj se razlikuje le v 1%! Virus Beograd bi se moral po nekaj pasažah pri poskusnih živalih in celičnih kulturah precej bolj razlikovati (17). Ali je virus Beograd v bistvu virus Dobrava?

Raziskovalce na Inštitutu za mikrobiologijo v Ljubljani pa je razveselil prispevek grških virologov iz Soluna, ki govorijo že o variantah virusa Dobrava, ki so jih osamili pri bolnikih v Grčiji in Albaniji. Pišejo, da je virus Dobrava poglaviti povzročitelj HFRS na Balkanu (1). Virusni izolati iz Grčije in Albanije se razlikujejo od prvotnega virusa Dobrava precej bolj, čeprav jih še vedno prištevajo med viruse Dobrava.

Vedno bolj se je začelo med raziskovalci utrjevati prepričanje, da so bile prvotne identifikacije tipov hantavirusov v Jugoslaviji površne in da je pravzaprav virus Dobrava poglaviti povzročitelj HFRS na Balkanu. Izolacija virusa Dobrava v Sloveniji je le sprožila plaz in zadela v polno.



Slika 3. Zemljepisna razdelitev 33 bolnikov s HFRS v Sloveniji

Figure 3. Geographic distribution of 33 patients with HFRS in Slovenia

○ Hantaan serološki tip, ● Puumala serološki tip, ◐ neidentificiran serološki tip

○ Hantaan serotype, ● Puumala serotype, ◐ unidentified serotype

Vir: Avšič-Zupanc, Likar, Novakovič, Čizman, Kraigher, van der Groen, Stojanovič, Obradovič, Gligič in Le Duc, 1990

Preglednica 4. Pogostost hantavirusnih protiteles pri malih sesalcih, ujetih v različnih delih Slovenije
Table 4. Prevalence of hantavirus antibodies in small mammals caught in different regions of Slovenia

red/order	območje/region					
	Prekmurje	Dolenjska	Notranjska	Primorska	Gorenjska	Ljubljana
Isectivora						
Crocidura leucodon		1/0*				
Crocidura suaveolens		10/0				
Sorex araneus	3/0	1/0	19/0			
Neomys fodiens		1/0				
Chiroptera						
Nyctalus hipposiderus						1/0
Rhinolopus hipposiderus					2/0	
Plecotus auritus		1/0				
Rodentia						
Apodemus flavicollis	21/2	136/2	2/0	6/1		
Apodemus sylvaticus	23/0	37/2	2/0	6/1		
Apodemus microps	2/0	1/0				
Apodemus agrarius	2/0	11/0		7/4		
Clethrionomys glareolus	34/10	13/0	11/0			
Mus musculus	3/0	14/3		13/2		
Microtus agrestis	4/0	10/2				
Microtus arvalis		4/1				
Pitymys suterreanus		1/0				
Rattus norvegicus						10/2
Rattus rattus		1/0				
Glis glis				36/2		
Carnivora						
Felis silvestris		1/0				
Martes daina		8/1				
Artidactyla						
Capreolus capreolus				9/4		
Rupicapra rupicapra				1/0		

*število preiskanih/število pozitivnih
*number of tested/number of positives

Vir: Avšič-Zupanc, Trilar, Poljak, Likar, 1992

Preglednica 5. Reaktivnost monoklonskih protiteles proti virusom Hantaan, Seoul, Puumala, Prospect Hill in virusom Vranica in Dobrava

Table 5. Reactivity of monoclonal antibodies with strains of Hantaan, Seoul, Prospect Hill and Vranica and Dobrava

monoklonska protitelesa monoclonal antibodies	virusi/ viruses				
	76-118	SR-11	Hallnas	Vranica	PHV Dobrava
Hantaan					
D3-4-6	+	+	+	+	+
G5-8-4	+	+	-	-	+
C8-11-8	+	+	-	-	+
Seoul					
D9-5-8	+	+	+	+	+
A7-4-4	+	+	+	+	+
B1-4-4	-	+	-	-	-
Puumala					
5N7	-	+	+	+	-
3G5	-	-	+	+	+
5A2	-	-	+	+	-
4G2	-	-	+	+	-

Monoklonska protitelesa so od dr. Sugiyama in dr. Yamanisjaj; uporabili so jih v razredčenju 1:16.

Monoclonal antibodies were obtained from dr. Sugiyama and Yamanishi and were used at dilution 1:16.

Vir: Avšič-Županc, Shu-Yuan Xiao, Stojanović, Gligić, van der Groen, Le Duc, 1992

Prav nedavno so presenetili virologe v Evropi finski raziskovalci, ki so našli viruse iz skupine Dobrava v Estoniji in odkrito zapisali, da je virus Dobrava med najbolj razširjenimi povzročitelji HFERS v Evropi (15). Nadvse razveseljav razvoj dogodkov za slovenske virologe, zlasti za Avšič-Župančevu.

Razplet po izolaciji virusa Dobrava v Sloveniji ima poseben pomen, kajti Avšičeva se je temeljnih metod naučila od srbskih in hrvaških virologov, danes pa je očitno, da so bile njihove metode pomanjkljive. Prejšnje identifikacije tipov hantavirusov v Jugoslaviji so pravilne le toliko, da so opisale bolezen hemoragično mrzlico z ledvičnim sindromom, veliko bolezenskih oblik pa je skoraj zanesljivo povzročila tudi skupina virusov, ki so enaki ali sorodni virusu Dobrava, čeprav so na Balkanu tudi drugi tipi hantavirusov.

Razpravljanje

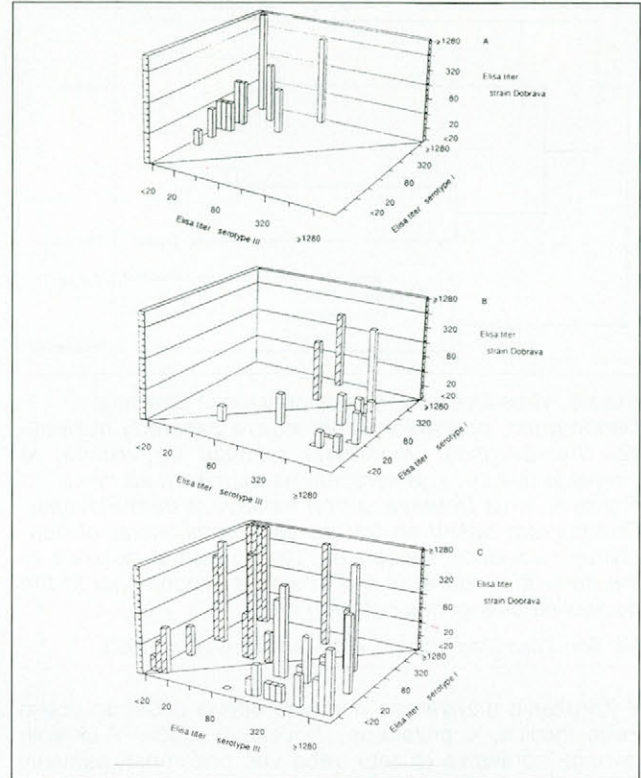
Virus HFERS povzroča epidemijo hude bolezni, ki se pogosto konča s trajno okvaro bolnikovih ledvic. Številni bolniki so za vedno priklenjeni na dializo.

Mišja mrzlica je izrazito povezana z žarišči v naravi, ki so trajna grožnja krajevnim prebivalcem, zlasti pa so nevarna za obiskovalce. Ni naključje, da je Avšičeva opravila veliko dela z virusom Dobrava na ameriških vojaških ustanovah, ki jih bolezen zelo zanima, saj je izrazito "vojaška okužba": okužijo se pogosto vojaki, ki živijo v zasilnih bivališčih v naravi.

Bolezen prenašajo glodalci, zlasti miši in njihovi sorodniki. Nalezljivi so živalski seč in iztrebki, virus pa pride na človeka prek onesnaženih živil, pa žal tudi po zraku.

Pot širjenja okužbe kaže, da je preprečevanje težavno in zahteva skrajno previdno ravnanje z živali in pitno vodo ter z vsemi kraji in prostori, kjer miši lahko pridejo do živil. Pri iskanju hrane pa so glodalci veliki specialisti in pogosto presežejo človekove ukrepe za preprečevanje mišje mrzlice.

Slovenija je kar posejana z žarišči te okužbe. Doslej so znana in raziskana le nekatera, iz katerih prihajajo bolniki redno vsako leto.



Slika 4. Titer protiteles humanih serumov z encimsko imunskim testom (ELISA) za tipe I, II in Dobrava

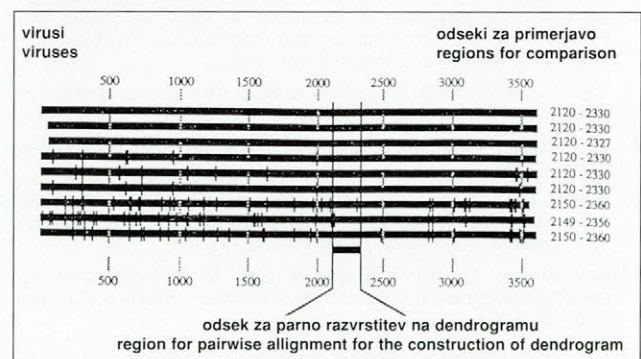
Figure 4. Antibody titers of human sera in ELISA measured against serotype I, serotype II and Dobrava strain

A=11 serum ljudi z laboratorijsko okužbo, B=16 serumov bolnikov iz Belgije in Nizozemske
C=32 serumov bolnikov iz Jugoslavije

A=11 sera from laboratory associated cases and B=16 sera from non-laboratory associated cases in Belgium and the Netherlands, and C=32 sera from non laboratory associated cases in Yugoslavia

Viri: Groen, Osterhaus, Avšič-Županc, Van den Groen, Clement, Lefèvre, Jordans, 1991.

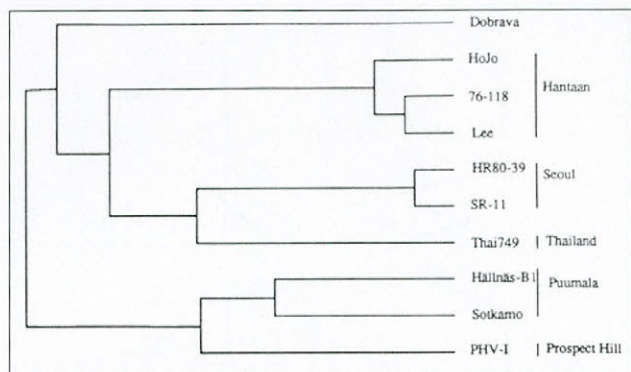
Virologi smo nadyse ponosni, da smo pretežno po prizadevanjih dr. Avšič-Župančeve dodali seznamu povzročiteljev mišje mrzlice sev Dobrava, ki je po zadnjih spoznanjih zelo pomemben tudi drugod po Evropi, kajti prispevki, ki ga opisujejo, se hitro množijo.



Slika 5. Identifikacije spoznavnega odseka za primerjanje zaporedij nukleotidov in izdelavo dendrograma; zaporedja so bila urejena proti sevu Hantaan na odsekih 76-118

Figure 5. Identification of cognate region for sequence of nucleotides comparison and dendrogram construction. The sequences were aligned against that of the strain Hantaan in the regions 76-118

Viri: Shu-Yuan Xiao, Diglišić, Avšič-Županc in Le Duc, 1993



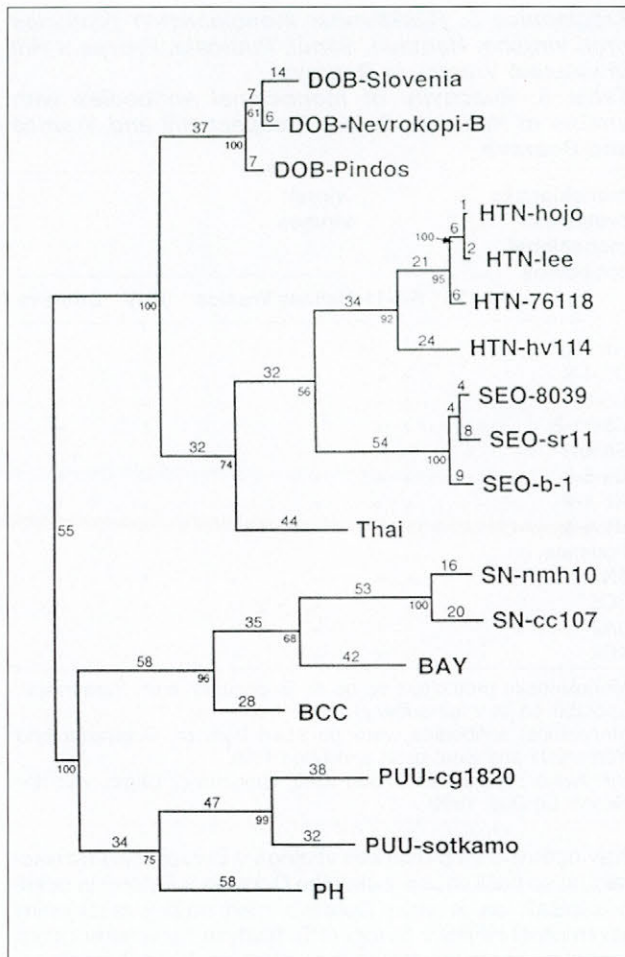
Slika 6. Virus Dobrava, novi hantavirus iz Slovenije Dendrogram, pripravljen s primerjavo zaporedij nukleotidov hantavirusov; vodoravna razdalja do vozliča, ki povezuje dva seva, je sorazmerna razmiku med njima Figure 6. Virus Dobrava, a new hantavirus from Slovenia Dendrogram based on the pairwise comparison of hantavirus nucleotide sequences; the horizontal distance to the node that connects two strains is proportional to the nucleotide divergence between them

Vir: Shu-Yuan Xiao, Diglišić, Avšič-Županc, Le Duc, 1993

V Združenih državah so nedavno opisali posebno obliko mišje mrzlice, ki prizadene človekova pljuča. V ukrepih javnega zdravstva je zato treba več pozornosti nameniti nekaterim nepojasnenim pljučnicam, ki bi lahko bile tudi pri nas povezane z okužbami s hantavirusi.

Literatura

1. Antoniadis A, Stylianakis A, Papa A, Alexiu-Daniel, Lamproloulos A, Nichol ST, Peters CJ, Spiropolopou SF. Direct genetic detection of Dobrava virus in Greek and Albanian patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Inf Dis* 174:407-10, 1996
2. Avšič-Županc T, Gligić A, Čižman B, Likar M. Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (HFRS) v Sloveniji. *Posvetovanje Inst Mikrobiol*, 95-97, 1985.
3. Avšič-Županc T. Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom. *Zdrav Vestn* 56:441-4, 1987.
4. Avšič-Županc T, Gligić A, van der Groen G, Likar M. Serological evidence for the presence of different hantavirus serotypes in Slovenia. *Conf Young Virologists, Smolenice* 17-20, 1987.
5. Avšič-Županc T, Hoof G, van der Groen G, Gligić A. Partial characterization of hantavirus isolated from Apodemus flavicollis captured in Slovenia - Yugoslavia. *Internat Symp on Hantaviruses, Malkidiki, sept 1988*.
6. Avšič-Županc T, Likar M, Novakovič S, Čižman B, Kraigher A, van der Groen G, Stojanović R, Obradović M, Gligić A, LeDuc WJ. Evidence of the presence of two hantaviruses in Slovenia-Yugoslavia. *Arch Virol (Suppl 1):87-94, 1990*.
7. Avšič-Županc T. 1990. Antigeneske lastnosti hantavirusov izoliranih v Jugoslaviji. *Posvetovanje Inst Mikrobiol*, 122-126, 1990.
8. Avšič-Županc T. Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom. *Zdrav. Vestn.* 60:469-71, 1991.
9. Avšič-Županc T, Shu-Yuan Xiao, Stojanović R, Gligić A, van der Groen G, LeDuc WJ. Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* 38:132-137.
10. Avšič-Županc T, Trilar T, Poljak M, Likar M. Biologija uzročnika hemoragične groznice s bubrežnim sindromom. *Praxis Veterinaria* 41:37-43, 1993.
11. Čižman B, Ferluga D, Kaplan-Pavlovčič S, Kozelj M, Drinovec J, Avšič T. Renal involvement in hantavirus disease. *Drugs, systemic diseases and the kidney. Plenum Publ Corp* 173-180, 1989.
12. Gligić A, Stojanović R, Obradović M, Hlača D, Dimković N, Diglišić G, Lukac V, Ler Z, Bogdanović R, Antonijević B, Ropac D, Avšič-Županc T, LeDuc WJ, Ksiazek T, Yamagihara R, Gajdusek DC. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: Epidemiologic and epizootiologic features of a nationwide outbreak in 1989. *Euro J Epidemiol* 8:816-825, 1992.
13. Gligić A, Dimković N, Shu-Yuan Xiao, Buckle GJ, Jovanović D, Velimirović D, Stojanović R, Obradović M, Diglišić G, Mičić J, Asher



Slika 7. Dendrogram hantavirusov Vodoravne dolžine med sevi kažejo razlike v sekvencah nukleotidov. Navedene so poddružine: hantavirusi, ki jih prenašajo miši Murinae (Dobrava DOB), Hantaan (HTN) Seoul (SEO) in Thailand (Thai), ali voluharji Arvicolinae (Puumala PUU in Prospect Hill (PH) ter Sigmodontinae (Sin Nombre, Bayu, BAY) in Black Creek Canal (BBC).

Figure 7. Dendrogram of hantaviruses The horizontal distances to the nodes that connect two strains are proportional to the nucleotide sequence divergence between them. Ordines: hantaviruses transmitted by field mice. Murinae (Dobrava, DOB), Hantaan (HTN), Seoul (SEO) and Thailand (Thai) or Arvicolinae (Puumala, PUU) and Prospect Hill (PH) or Sigmodontinae (Sin Nombre, Bayu, BAY and Black Creek Canal).

Vir: Antoniadis, Stylianakis, Papa, Alexiu-Daniel, Nichol, Lamproloulos, Peters, Spiropoulou 1996

- DM, LeDuc WJ, Yamagihara R, Gajdusek DC, Belgrade virus: a new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J Inf Dis* 166:113-20, 1992.
14. Groen J, Osterhaus ADME, Avšič-Županc T, van der Groen G, Clement JP, Lefcvre A, Jordans JGM. Different hantavirus serotypes in western Europe. *Lancet* 8741 March 9, 1991.
15. Plyusin A, Vapalahti O, Vasilenko V, Hentonen J, Vaheri A. Dobrava Hantavirus in Estonia: does the virus exist throughout Europe? *Lancet*, May 10, 1997.
16. Shu-Yuan Xiao, Diglišić G, Avšič-Županc T, LeDuc WJ. Dobrava virus as a new hantavirus: evidence by comparative sequence analysis. *J Med Virol* 39:152-155, 1993.
17. Tallar Ali M, Shu-Yuan Xiao, Godec M, Gligić A, Avšič-Županc T, Goldfarb LG, Yamagihara R, Asher DM. Belgrade virus, a cause of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Balkans is closely related to Dobrava virus in Field mice. *J Inf Dis* 168:750-3, 1993.
18. Bedjanič, M., osebno sporočilo.