Prisutnost virusa u populacijama šišmiša u Hrvatskoj

Šimić, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:093402

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Šimić

PRISUTNOST VIRUSA U POPULACIJAMA ŠIŠMIŠA U HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivana Šimić

THE PRESENCE OF VIRUSES IN BATS POPULATIONS IN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Hrvatskom veterinarskom institutu, pod vodstvom dr.sc. Tomislava Bedekovića, znanstvenog savjetnika, i dr.sc. Kreše Bendelje, višeg znanstvenog suradnika, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tomislav Bedeković je diplomirao na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2005. godine. Nakon dvogodišnjeg rada u veterinarskoj praksi, 2007. godine započeo je raditi u Laboratoriju za bjesnoću i opću virologiju Hrvatskog veterinarskog instituta. Doktorirao je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2011. godine. Razvio je nove metode dijagnostke bolesti sluznice goveda i bjesnoće. Bio je voditelj IPA projekta *IPA 2008 Testing of dead or hunted animals* i HRZZ projekta *Aktivni nadzor bjesnoće u šišmiša – bitan faktor za procjenu buduće prijetnje (BatsRabTrack)*. Tijekom 2016. godine organizirao je i vodio program nadziranja uspješnosti cijepljenja protiv bolesti kvrgave kože. Objavio je 32 originalna znanstvena članka uz h-indeks 5.

Krešo Bendelja je diplomirao na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1997. godine. Od 1998. godine radi na Imunološkom zavodu, a od 2013. godine voditelj je Laboratorija za imunologiju Centra za istražvanje i prijenos znanja u biotehnologiji. Doktorirao je 2007. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. U dva navrata boravio je u Medical Oncology Department, Rhode Island Hospital, Providence, RI, SAD. Objavio je 31 originalni znanstveni članak uz h-indeks 11.

ZAHVALE

Smatram da profesionalno posebnu i najveću zahvalnost dugujem dr.sc. Tomislavu Bedekoviću. Hvala Vam na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i na brojnim savjetima kako u svakodnevnom radu tako i prilikom izrade ove disertacije!

Zahvaljujem dr.sc. Kreši Bendelji za vođenje, savjete i čitanje disertacije.

Kolegi dr.sc. Draganu Brniću veliko hvala jer sam uz tvoju pomoć napravila prve molekularne korake koji su mi omogućili da napravim dobar dio doktorata. Hvala ti i na brojnim savjetima u pisanju i radu.

Kolegici Ines Ugrin, puno hvala za uvođenje u staničnu kulturu i VNT, koji su mi omogućili da izvedem testove u ovoj disertaciji.

Hvala dr.sc. Ivani Lojkić za sekvenciranje i za pustolovine prilikom lova.

Kolegici dr.sc. Nina Krešić, hvala za mnoge savjete prilikom pisanja doktorata uključujući i traganje za prikladnim hrvatskim izrazima i rečeničnim konstrukcijama, hvala što si me vozila po terenu i sa mnom bila u lovu.

Kolegici Mirjani Frljužec, dipl.ing., hvala što si bila u lovu i što si me naučila kako se radi FAT.

Zahvaljujem dr.sc. Igoru Pavliniću i dr.sc. Maji Đaković koji su, makar nakratko, bili dio ekipe za lov na šišmiše. Ogromno hvala Vidi Zrnčić, mag.oecol.et prot.nat, i Anđeli Ćukušić, mag.oecol.et prot.nat, s kojima sam pohvatala većinu šišmiša.

Zahvaljujem kolegici Ivani Prajdić, na pomoći u mnogo situacija kada si nisam bila najbolja s aparatima i reagensima.

Tomaž Mark Zorec, hvala za bioinformatičku obradu podataka...spasio si me!

Zahvaljujem dr.sc. Nadici Maltar Strmečki, za statističku obradu podataka!

Zahvaljujem Hrvatskom veterinarskom institutu na ustupljenoj opremi i reagensima.

Mama, Ivane i baka, kume i kuma kada bih vam zahvaljivala za sve što ste učinili za mene svih ovih godina… premašilo bi broj stranica ovog doktorata. Stoga samo kratko…hvala za sve ove godine koje ste bili uz mene i što ste naučili mnoge moje ispite sa mnom.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

PRISUTNOST VIRUSA U POPULACIJAMA ŠIŠMIŠA U HRVATSKOJ

IVANA ŠIMIĆ

Hrvatski veterinarski institut

Šišmiši su prepoznati kao rezervoari raznih virusa, uključujući i one zoonotskog potencijala diljem svijeta. U Hrvatskoj dosad nije bilo sustavnog pretraživanja virusa šišmiša te je cilj ovog istraživanja bio razotkriti virom šišmiša i utvrditi njihov javnozdravstveni značaj.

U ovom istraživanju utvrđivana je prisutnost specifičnih protutijela za virus bjesnoće u krvi šišmiša virus neutralizacijskim testom te je određivana prisutnost genoma lyssavirusa u obriscima sluznice usne šupljine lančanom reakcijom polimerazom. Utvrđivana je i prisutnost drugih virusnih porodica u obriscima usne šupljine, fecesu i gvanu sekvenciranjem nove generacije.

Iako genom lyssavirusa nije utvrđen u obriscima usne šupljine, po prvi puta je u Hrvatskoj utvrđena seroprevalencija specifičnih protutijela za virus EBLV-1 od 5,71% čime je utvrđeno da šišmiši predstavljaju malu, ali ne i zanemarivu javnozdravstvenu prijetnju. Iako su sekvenciranjem nove generacije pronađene 63 virusne porodice, utvrđeni su i genomi adeno-associated virusa, ambidensovirusa, iflavirusa i circo-like virusa, međutim nisu otkriveni drugi zoonotski patogeni.
(140 stranica, 27 slika, 11 tablica, 135 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: šišmiši, virusi, bjesnoća, sekvenciranje nove generacije, Hrvatska

Mentori: dr.sc. Tomislav Bedeković, znanstveni savjetnik, i dr.sc. Krešo Bendelja, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači:

doc.dr.sc. Silvija Černi

doc.dr.sc. Snježana Židovec Lepej

izv.prof.dr.sc. Lorena Jemeršić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

THE PRESENCE OF VIRUSES IN BATS POPULATIONS IN CROATIA

IVANA ŠIMIĆ

Croatian Veterinary Institute

Bats are recognized as reservoirs of many viruses with special emphasis on those with zoonotic potential. There was no systematic research of bats' viruses in Croatia so the aim of the present study was to reveal the virome of bats and their public health relevance.

In this research specific antilyssaviral antibodies were detected in blood by virus neutralization test and the presence of lyssavirus genome was investigated using polymerase chain reaction by testing bats oral swabs. Furthermore, the presence of other virus families was investigated by next generation sequencing of oral swab samples, feces and guano.

Although the presence of lyssavirus genom was not recorded, for the first time in Croatia antilyssaviral antibodies were detected in 5.7% of tested animals, suggesting that bats present small but not negligible threat to public health. Furthermore, 63 viral families were detected by next generation sequencing, with genomes of adeno-associated virus, ambidensovirus, iflavirus and circo-like virus, however, no other zoonotic pathogens were found.

(140 pages, 27 figures, 11 tables, 135 references, original in Croatian)

Keywords: bats, viruses, rabies, next generation sequencing, Croatia

Supervisors: Tomislav Bedeković, PhD, research adviser, and Krešo Bendelja, PhD, senior research associate

Reviewers:

Assistant professor Silvija Černi, PhD

Assistant professor Snježana Židovec Lepej, PhD

Assocaite professor Lorena Jemeršić, PhD

SADRŽAJ

1 Uvod 1

2 Literaturni pregled 4

2.1 Rasprostranjenost šišmiša 4

2.2 Anatomija, fiziologija i biologija šišmiša 7

2.3 Šišmiši i patogeni 11

2.4 Virusi šišmiša 14

2.5 Bjesnoća 18

2.5.1 Povijest bjesnoće 18

2.5.2 Taksonomski pregled roda *Lyssavirus* 21

2.5.3 Epizootiologija bjesnoće 23

2.5.4 Građa lyssavirusa 33

2.5.5 Patogeneza bjesnoće 36

2.5.6 Klinička slika bjesnoće 38

2.5.7 Patohistološke promjene 39

2.5.8 Dijagnostika bjesnoće 39

2.5.9 Prevencija bjesnoće 42

3 Materijal i metode 44

3.1 Popis kemikalija 44

3.2 Popis pribora i aparature 45

3.3 Biološki uzorci 47

3.4 Postupak uzorkovanja 51

3.4.1 Obrisak sluznice usne šupljine (obrisak) 51

3.4.2 Krv 52

3.4.3 Feces 54

3.4.4 Gvano 54

3.5 Priprema uzoraka 54

3.5.1 Priprema obrisaka sluznice usne šupljine za lančanu reakciju polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) za dokazivanje genoma lyssavirusa i lančanu reakciju polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju u stvarnom vremenu (RT-qPCR) za dokazivanje gena za beta-aktin 54

3.5.2 Priprema uzoraka za tehnologiju sekvenciranja nove generacije (NGS) 55

3.5.3 Priprema uzoraka za virus neutralizacijski test (VNT) 56

3.6 Metode 56

3.6.1 Molekularne metode 57

3.6.2 Serološke metode 67

4 Rezultati 76

4.1 Uzorkovanje 76

4.2 Rezultati molekularnih metoda 79

4.2.1 Rezultati dokazivanja odsječka gena za nukleoprotein virusa EBLV-1 79

4.2.2 Rezultati sekvenciranja metodom NGS 80

4.3 Rezultati seroloških metoda 94

4.3.1 Rezultati dokazivanja protutijela za EBLV-1 virus neutralizacijskim testom (mFAVN) 94

5 Rasprava 97

6 Zaključci 105

7 Popis literature 106

8 Životopis 119

POPIS SLIKA

Slika 1. Globalna rasprostranjenost i zastupljenost vrsta šišmiša. 4
Slika 2. Anatomski prikaz ekstremiteta šišmiša. 8
Slika 3. Zastupljenost virusnih porodica u šišmiša u Europi. 15
Slika 4. Negrijeva tjelešca. 19
Slika 5. Geografska rasprostranjenost vrsta roda *Lyssavirus* utvrđenih u šišmiša. 23
Slika 6. Rasprostranjenost noćnjaka i slučajeva bjesnoće. 26
Slika 7. Rasprostranjenost riječnog šišmiša 28
Slika 8. Građa viriona lyssavirusa.. 34
Slika 9. Pojednostavljeni prikaz replikativnog ciklusa virusa bjesnoće u stanici. 38
Slika 10. Pozitivan imunofluorescencijski test (FAT). 41
Slika 11. Vrste šišmiša uključene u ovo istraživanje 48
Slika 12. Prikaz lokacija uzorkovanja tijekom 2016. i 2017. godine. 50
Slika 13. Uzimanje obriska sluznice usne šupljine 52
Slika 14. Uzorkovanje krvi. 53
Slika 15. Sažeti prikaz uzorkovanja i metoda korištenih u ovom istraživanju. 57
Slika 16. Sažeti prikaz principa sekvenciranja nove generacije. 66
Slika 17. Neubauerova komorica. 69
Slika 18. Pločica za titraciju virusa. 70
Slika 19. Organizacija kontrolne ploče u virus neutralizacijskom testu. 73
Slika 20. Organizacija ploče s uzorcima 75
Slika 21. Učestalost pojedinih vrsta šišmiša zastupljenih u ovom istraživanju. 76
Slika 22. Rezultati umnožavanja gena za nukleoprotein lyssavirusa reakcijom RT-PCR. 79
Slika 23. Grafički prikaz zastupljenosti virusnih kontigova (narančasto) u pojedinim uzorcima. 82
Slika 24. Filogenetska povezanost hrvatskog izolata adeno-asocciated virus 89
Slika 25. Filogenetska povezanost cijelog genoma hrvatskog izolata ambidensovirusa 91
Slika 26. Filogenetska povezanost hrvatskog izolata circo-like virusa 93
Slika 27. Lokacije na kojima su pronađeni seropozitivni šišmiši. 95

POPIS TABLICA

Tablica 1. Popis hrvatskih vrsta šišmiša.. 5
Tablica 2. Taksonomski pregled vrsta unutar roda *Lyssavirus*..... 21
Tablica 3. Sažeti prikaz provedenih istraživanja virusa EBLV-1 i EBLV-2 te patogeneze u šišmiša..... 30
Tablica 4. Slučajevi bjesnoće šišmišjeg podrijetla kod ljudi u Europi 32
Tablica 5. Broj šišmiša i uzoraka po vrstama, spolu i lokaciji.. 53
Tablica 6. Raspodjela šišmiša prema sezoni i godini uzorkovanja te spolu. 77
Tablica 7. Raspodjela šišmiša prema vrsti, lokaciji i spolu s naznačenim brojem jedinki prema vrsti i lokaciji.. 77
Tablica 8. Sažeti pregled uzoraka, lokacija, vrsta uzoraka i šišmiša pretraženih metodom NGS s istaknutim brojem ukupnih očitanja (nukleotidni slijedovi) i brojem virusnih očitanja..... 80
Tablica 9. Broj virusnih porodica utvrđenih u šišmiša metodom NGS po lokacijama..... 84
Tablica 10. Virusne porodice..... 85
Tablica 11. Zbirni prikaz serološki pretraženih jedinki virus neutralizacijskim testom na prisutnost protutijela za EBLV-1, po vrstama i spolu..... 96

1 UVOD

Šišmiši se opisuju kao rezervoari raznih virusa od kojih najviše pažnje privlače oni sa sposobnošću prelaska vrsne barijere, a osobito oni sa zoonotskim potencijalom. No, virusi koji su iznimno patogeni za druge sisavce, u šišmiša često ne izazivaju bolest. To je dovelo do pretpostavki kako su šišmiši jedinstveni rezervoari virusa i da ključ njihove otpornosti leži u brojnim anatomskim i fiziološkim specifičnostima koje ih razlikuju od drugih sisavaca (O'Shea i sur., 2014., Vos i sur., 2007.). Nadalje, kohabitacija šišmiša i ljudi te domaćih životinja stvara priliku za prijenos bolesti. Ukoliko se patogen prenosi s čovjeka na čovjeka, uz moderan način života i veliku globalnu povezanost, lokalna epizootija lako preraste u pandemiju. U svijetu su zabilježena brojna prelijevanja virusa šišmiša u populaciju domaćih životinja i ljudi, ponekad s devastirajućim posljedicama (Epstein i Field, 2015.).

Šišmiši su u svijetu prepoznati kao rezervoari različitih zoonotskih virusa koji pripadaju porodicama *Paramyxoviridae* (virus Nipah, Menangle i Hendra), *Coronaviridae* (koronavirusi SARS i MERS), *Filoviridae* (virusi Ebola i Marburg) i *Rhabdoviridae* (virusi bjesnoće) (Moratelli i Calisher, 2015.). U Europi su otkriveni pripadnici tih porodica, neki kao sekvenca, a neki su izdvojeni i na linijskim staničnim kulturama. Primjerice, nađene su nukleotidne sekvence virusa SARS- i MERS-like-CoV te virusa Lloviu (*Filoviridae*) nepoznatog zoonotskog potencijala koje, zbog svrstavanja u porodice s visoko patogenim mikrobima i sklonosti virusa mutacijama, treba pratiti (Kohl i Kurth, 2014.).

U Europi je bjesnoća trenutno jedina zoonoza šišmišjeg podrijetla, pa su pripadnici porodice *Rhabdoviridae*, roda *Lyssavirus*, kao najveća prijetnja zdravlju ljudi i životinja, najbolje istraženi (Kohl i Kurth, 2014., Mühldorfer i sur., 2011.). Prvi slučaj bjesnoće šišmiša na europskom tlu zabilježen je 1954. godine u Njemačkoj (Vos i sur., 2007.). Mnoge države, uključujući i Hrvatsku, su primjenom obveznog cijepljenja pasa protiv bjesnoće i programa oralne vakcinacije divljih životinja uspješno iskorijenile „zemaljski'' oblik bolesti (Müller i sur., 2015.). No, trenutno dostupnim načinima imunizacije nije moguće cijepiti šišmiše protiv bjesnoće, pa bolest nije moguće kontrolirati te je svakako potrebno njezino praćenje (Fooks i sur., 2003., Rupprecht i Kuzmin, 2015., Warrell i Warrell, 2004.).

Bjesnoća je jedna od najvažnijih virusnih zoonoza koju karakteriziraju akutni encefalitis ili meningoencefalitis sisavaca, globalna rasprostranjenost, visoki troškovi menadžmenta u veterinarskoj i humanoj medicini te visoka smrtnost (Hanlon i Childs, 2013.). Bolest godišnje u svijetu odnosi preko 60 000 ljudskih života, a procjenjuje se da preko 20 milijuna ljudi godišnje primi postekspozicijsku zaštitu nakon izlaganja potencijalno zaraženim životinjama (Jackson, 2016., WHO, 2013.). Za bolest ne postoji lijek, a dostupna cjepiva ne pružaju učinkovitu zaštitu protiv svih virusa bjesnoće (Banyard i sur., 2013.).

I dok je na američkom kontinentu u šišmiša utvrđen virus RABV (*Rabies virus*), u Europi su u šišmiša utvrđeni virusi: European bat lyssavirus tip - 1 (EBLV-1) i EBLV-2, Bokeloh bat lyssavirus (BBLV), West Caucasian bat lyssavirus (WCBV), Lleida bat lyssavirus (LLEBV) i Kotalahti bat lyssavirus (KBLV), koji je najnoviji predloženi pripadnik roda (Banyard i sur., 2013., Aréchiga Ceballos i sur., 2013., Nadin-Davis, 2013., Nokireki i sur., 2018.). Virus EBLV-1 je utvrđen u 97% slučajeva bjesnoće šišmiša i uglavnom se veže uz kasnog noćnjaka (lat. *Eptesicus serotinus*), a EBLV-2 uz vrste roda *Myotis*. Virus EBLV-1 je u nekoliko navrata prešao vrsnu barijeru te inficirao domaće i divlje životinje te ljude (Banyard i sur., 2013.), dok je virus EBLV-2 zabilježen samo u ljudi. Ostali navedeni virusi su utvrđeni sporadički.

Za razliku od drugih virusnih bolesti infekcija lyssavirusima u nekim slučajevima izaziva uginuće u šišmiša, a ponekad imunosni odgovor sa stvaranjem protutijela. Pretpostavlja se da je najučestaliji način prijenosa virusa EBLV među šišmišima putem ugriza. Inkubacijski period je promjenjiv i nepoznat u prirodnim uvjetima. Klinički znakovi bjesnoće u šišmiša se često očituju kao gubitak tjelesne težine, nedostatak koordinacije, mišićni spazam, agitacija, učestalije glasanje i agresija (Banyard i sur., 2013., Harris i sur., 2006., Vos i sur., 2007.).

U Hrvatskoj virusi šišmiša dosada nisu istraženi, a mali je broj uzoraka pretražen samo na bjesnoću, stoga ne postoje reprezentativni epidemiološki podaci koji bi ukazivali na javnozdravstveni značaj šišmiša te koliko njih same određeni virusni patogeni ugrožavaju.

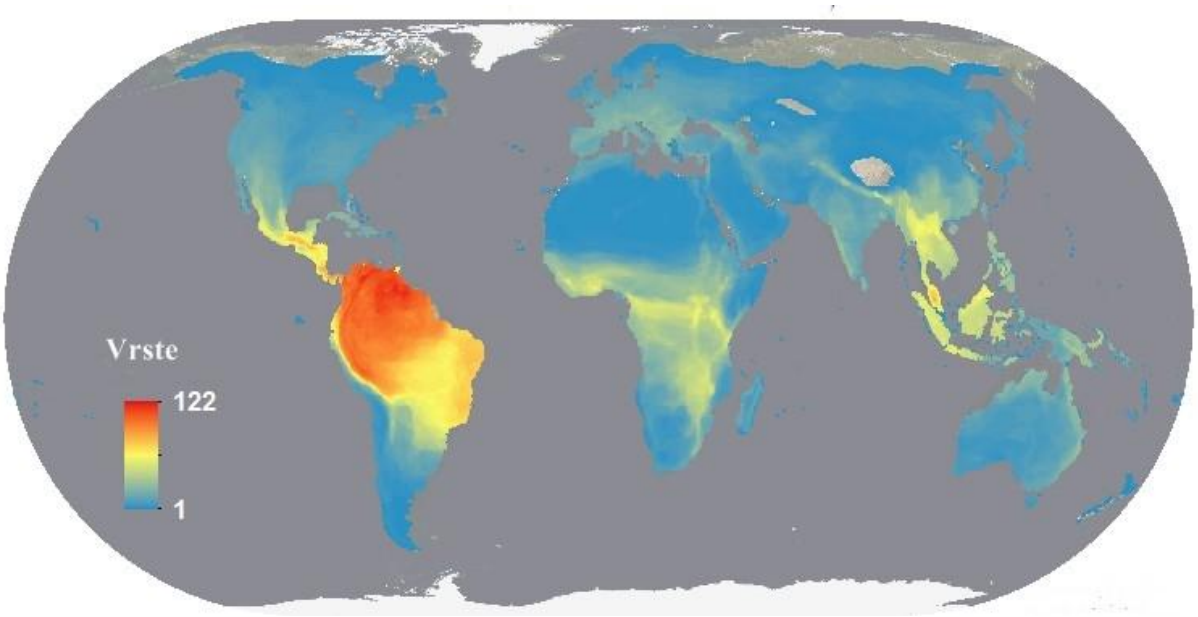
Cilj disertacije je po prvi puta u Hrvatskoj utvrditi prisutnost i učestalost zoonotskih virusa u šišmiša korištenjem seroloških i molekularnih metoda (lančane reakcije polimerazom i sekvenciranja nove generacije).

Pretpostavka je bila da serološka prevalencija specifičnih protutijela za virus EBLV-1 neće biti veća od 10%, da je vjerojatnost utvrđivanja aktivnog izlučivanja virusa bjesnoće u obriscima usne šupljine niska te da će biti utvrđene sekvence drugih potencijalno zoonotskih virusa koji će zahtijevati daljnje praćenje.

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Rasprostranjenost šišmiša

Šišmiši (netopiri) su noćne životinje svrstane u razred sisavaca (lat. *Mammalia*) i red šišmiša (lat. *Chiroptera*) (Moratelli i Calisher, 2015.). Smatra se da su se prvi put pojavili u ranom paleocenu (prije 64 milijuna godina) (Racey, 2015.). Sa više od 1 300 vrsta, šišmiši čine 20% svih sisavaca te ih brojem premašuju jedino glodavci (Altringham, 2011., Harris i sur., 2006., Moratelli i Calisher, 2015.). Nastanjuju raznolike ekološke niše i sve kontinente izuzev Antarktike (Slika 1) (Jones i sur., 2009., Moratelli i Calisher, 2015.). Najveći broj vrsta nalazi se u tropskom i suptropskom pojasu, dok prema polovima broj vrsta opada (Altringham, 2011.) (Slika 1). Oko četvrtina šišmiša je globalno ugrožena, uglavnom kao rezultat gubitka ili fragmentacije staništa ili gubitka skloništa (zbog intenzifikacije poljoprivrede), prekomjerne uporabe pesticida, izgradnje vjetroelektrana, svjetlosnog zagađenja, ometanja u skloništima i neodgovarajućeg upravljanja vodama i šumama (MZOIP, Racey, 2015.).



Slika 1. Globalna rasprostranjenost i zastupljenost vrsta šišmiša. Preuzeto s http://biodiversitymapping.org/wordpress/index.php/mammals/.

U Hrvatskoj, najstariji zapisi o šišmišima su rezultat rada stranih istraživača i trgovaca koji su prikupljali životinje uzduž jadranske obale za prirodoslovne muzeje u Austriji, Italiji i

Njemačkoj. Profesori Juraj Kolombatović (1843. – 1908.) i Beatrica Đulić (1924. – 2000.) dali su značajan doprinos poznavanju ekologije i rasprostranjenosti šišmiša u Hrvatskoj (Pavlinić i sur., 2010.).

Sve 34 hrvatske vrste (Pavlinić i sur., 2010.) zaštićene su Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/2013) (Tablica 1). Hrvatska je i potpisnica Bernske (Konvencija o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa) i Bonske konvencije (Konvencija o zaštiti migratornih vrsta divljih životinja) te Sporazuma o zaštiti europskih populacija šišmiša (EUROBATS). Gotovo polovica hrvatskih vrsta nalazi se u nekoj od kategorija ugroženosti prema Međunarodnoj uniji za zaštitu prirode (engl. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*, IUCN) (Tablica 1).

Tablica 1. Popis hrvatskih vrsta šišmiša. EN (engl. *Endangered*) - ugrožene, VU (engl. *Vulnerable*) – rizične, DD (engl. *Data Deficient*) – nedovoljno poznate vjerojatno ugrožene vrste (Antolović i sur., 2006., Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama).

Porodica	**Vrsta – latinski naziv**	**Vrsta – hrvatski naziv**	**Ugroženost**
Molossidae	*Tadarida teniotis*	sredozemni slobodnorepac	
Rhinolophidae	*Rhinolophus blassi*	Blazijev potkovnjak	VU
	Rhinolophus euryale	južni potkovnjak	VU
	Rhinolophus ferrumequinum	veliki potkovnjak	
	Rhinolophus hipposideros	mali potkovnjak	
Vespertilionidae	*Barbastella barbastellus*	širokouhi mračnjak	DD
	Eptesicus nilssonii	sjeverni noćnjak	
	Eptesicus serotinus	kasni noćnjak	
	Hypsugo savii	primorski šišmiš	
	Miniopterus schreibersii	dugokrili pršnjak	EN
	Myotis alcathoe	mali brkati šišmiš	
	Myotis aurascens	primorski brkati šišmiš	

Tablica 1. (nastavak)

	Myotis bechsteinii	velikouhi šišmiš	VU
	Myotis blythii	oštrouhi šišmiš	
	Myotis brandtii	Brandtov šišmiš	
	Myotis capaccinii	dugonogi šišmiš	EN
	Myotis dasycneme	močvarni šišmiš	DD
	Myotis daubentonii	riječni šišmiš	
	Myotis emarginatus	riđi šišmiš	
	Myotis	veliki šišmiš	
	Myotis mystacinus	brkati šišmiš	
	Myotis nattereri	resasti šišmiš	
	Nyctalus lasiopterus	veliki večernjak	DD
	Nyctalus leisleri	mali večernjak	
	Nyctalus noctula	rani večernjak	
	Pipistrellus kuhlii	bjelorubi šišmiš	
	Pipistrellus nathusii	mali šumski šišmiš	
	Pipistrellus	patuljasti šišmiš	
	Pipistrellus pygmaeus	patuljasti močvarni šišmiš	
	Plecotus austriacus	sivi dugoušan	EN
	Plecotus auritus	smeđi dugoušan	
	Plecotus kolombatovici	Kolombatovićev dugoušan	DD
	Plecotus macrobullaris	gorski dugoušan	DD
	Vespertilio murinus	dvobojni šišmiš	

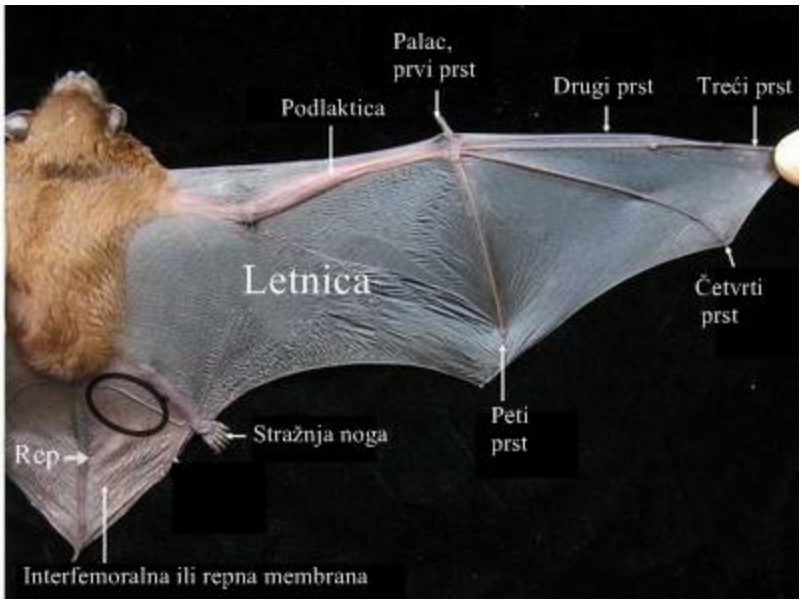
2.2 Anatomija, fiziologija i biologija šišmiša

Šišmiši su anatomski i fiziološki u mnogočemu jedinstveni među sisavcima.

Tjelesna masa kreće se od 2 grama u šišmiša bumbara (lat. *Craseonycteris thonglongyai*) do 1 kilograma u letećih lisica (lat. *Pteropus* spp.) čiji raspon krila može dosegnuti do 2 metra (Altringham, 2011., Moratelli i Calisher, 2015.).

Šišmiši u prosjeku žive do 3,5 puta dulje nego neleteći placentalni sisavci slične veličine, a s obzirom na svoju veličinu žive dulje nego bilo koji drugi sisavac. Prosječan životni vijek šišmiša je 16,1 godinu, ali neke vrste žive i preko 30 godina (Racey, 2015.).

Tijekom mirovanja šišmiši vise glavom prema dolje što im u slučaju potrebe omogućava brzi bijeg. Da bi mogli tako visiti stopala su im okrenuta prema nazad, a noge su rotirane u koljenu prema gore i prema van (Slika 2). Izdužene i tanke kosti prstiju, metkarpusa i podlaktice (koja se sastoji samo od palčane kosti (lat. *radius*)) spojene su s tijelom dvostrukim kožnim opnama, letnicama (lat. *patagium*). Letnice daju šišmišima karakterističan izgled i omogućuju letenje pa su tako šišmiši jedini leteći sisavci (Slika 2). Općenito mala veličina i tjelesna težina šišmiša prilagodbe su za let, ali kao sitne životinje, imaju relativno veliku površinu tijela u odnosu na obujam, pa gube mnogo topline, a da bi se gubitci smanjili tijelo im je pokriveno gustom dlakom (Slika 2) (Racey, 2015.).



Slika 2. Anatomski prikaz ekstremiteta šišmiša. Šišmiši imaju samo na palcu kandžu koja služi za penjanje, uređivanje i ponekad za borbu. Letnica se formira između tijela, ekstremiteta i repa. Neke vrste koriste interfemoralnu (repnu) membranu za hvatanje plijena. Istaknuta je uropatagijalna vena iz koje sam vadila krv (zaokruženo). Preuzeto: http://smallscience.hbcse.tifr.res.in/how-bats-fly/.

Veliki broj vrsta šišmiša koristi eholokaciju koja im omogućava snalaženje u prostoru neovisno o dnevnom svjetlu i omogućuje da iskoriste noć kao svoju hranidbenu nišu. Većina šišmiša stvara zvuk u grkljanu, a usnama i specijaliziranim kožnim naborima na nosu usmjeravaju odlazne signale. Zvučni valovi se odbijaju od zapreke (objekt, plijen), a prima ih i obrađuje slušni aparat životinje te joj daje informaciju o udaljenosti, smjeru, veličini, strukturi i kretanju objekta odnosno plijena u okolišu. Jedino se pripadnici porodice *Pteropodidae* (izuzetak rod *Rousettus* koji eholocira klikom jezika) ne koriste eholokacijom nego vidom i njuhom za orijentaciju i pronalaženje hrane (Altringham, 2011., Racey, 2015.).

Kada nastupe nepovoljni hranidbeni i klimatski uvjeti šišmiši migriraju (do 7% šišmiša) ili hiberniraju. Prilikom migracije neke vrste prelaze tisuće kilometara, dok se regionalni migranti kreću unutar nekoliko stotina kilometara. Postoje i sedentarne ili stacionirane vrste koje prevaljuju tek desetke kilometara između zimskog i ljetnog skloništa. Homeotermija, tipična osobina ptica i sisavaca, je oblik termoregulacije karakteriziran stalnom temperaturom tijela, bez obzira na temperaturu okoliša. Sposobnost koja omogućuje šišmišima da nastane umjereni klimatski pojas i prežive za njih nepovoljne uvjete je heterotermija. Heterotermiju karakterizira

pad tjelesne temperature, ponekad i na okolišne vrijednosti, kako bi se štedjela energija, a zatim slijedi spontano zagrijavanje te obuhvaća torpor i hibernaciju. U torporu se temperatura tijela kreće između 15°C i 25°C (Racey, 2015.), a traje manje od 24 sata. Dolaskom nepovoljnih uvjeta razdoblja torpora se produljuju pa traju danima ili tjednima (između 100 i 1000 sati) kako šišmiši ulaze u stanje mirovanja (hibernaciju) gdje tjelesna temperatura varira između 0°C i 10°C. Hibernacija se prekida povremenim buđenjima čija učestalost ovisi o okolišnim uvjetima (Yuan i sur., 2011.).

U šišmiša koji hiberniraju kopulacija se zbiva u jesen, a ovulacija i oplodnja slijede odmah nakon čega se plod usporeno razvija tijekom zime ili se sperma pohranjuje do proljeća nakon čega se događa ovulacija, oplodnja i razvoj ploda. Šišmiši većine vrsta imaju jedno mlado koje se rađa, u proljeće ili početkom ljeta (u umjerenom pojasu) odnosno kada se stvore povoljni uvjeti za podizanje potomstva (Mortelli i Calisher, 2015.). Naime, u sisavaca je u pravilu gestacijski period ustaljen i neovisan o okolišnim čimbenicima. Nasuprot tomu, u šišmiša može biti produljen ili skraćen ovisno o temperaturi okoliša i dostupnosti hrane (Racey, 2015.). Postotak smrtnosti novorođenih iznosi i više od 50%, pa se stoga populacije pojedinih vrsta vrlo teško oporavljaju nakon pada brojnosti uzrokovanog različitim čimbenicima (HAOP). Poznavanje spolnog ciklusa je važno sa stajališta uzorkovanja. Naime, uzorkovanje je dozvoljeno dok su ženke u ranom stadiju graviditeta što je u našim uvjetima od travnja do polovice svibnja. Tijekom ljeta, kada ženke podižu potomstvo, uznemiravanje je strogo zabranjeno. U kasno ljeto (krajem kolovoza i rujan) je vrijeme parenja pa dolazi do rojenja odnosno potrage za pogodnim mjestom za parenje i hibernaciju. Mužjaci tada stvaraju hareme koje čine tri do pet ženki i uzorkovanje je opet dozvoljeno. Tijekom zime, kada šišmiši hiberniraju uznemiravanje hibernacijskih kolonija je također zabranjeno.

Kao sklonište šišmiši koriste špilje, šume i nadzemne objekte (antropogene tvorevine – kuće, zgrade, dvorce, crkve) u kojima mogu formirati kolonije. Ovisno o vrsti, broj jedinki u koloniji može znatno varirati. U svijetu su poznate kolonije koje broje i više milijuna jedinki, poput one u Bracken Cave u Teksasu, koja broji 20 milijuna slobodnorepih šišmiša (lat. *Tadarida brasiliensis*) (http://tragus.hr/zbog-povecanja-prosjecne-temperature-sismisi-migriraju-sve-ranije/). U Hrvatskoj su najveće poznate kolonije u podzemnim objektima (špilje, jame, rudnici, željeznički tuneli i tuneli za odvodnju) (Hamidović, 2017.). Posebno se ističe špilja

Trbušnjak u kojoj je najveća trenutno poznata kolonija, a za koju se procjenjuje da obuhvaća oko 30 000 jedinki (https://www.pszupanija.hr/arhiva-novosti/60-ured-upana/novosti/313-pakraka-pilja-trbunjak-najvea-kolonija-imia-u-nas.html). No, šišmiši u Hrvatskoj se tek počinju intenzivnije istraživati i može se očekivati otkrivanje novih kolonija.

Postoji više tipova kolonija. Porodiljne kolonije se formiraju u proljeće, pretežno ih tvore gravidne ženke, ali ovisno o vrsti u tim se kolonijama mogu zateći i mužjaci, iako u znatno manjem broju. Nakon porođaja kolonija se sastoji od ženki u laktaciji i njihova potomstva. Po odbiću mladunci napuštaju koloniju i ona se raspada. Porodiljne kolonije su česte u umjerenom pojasu zbog temperaturnih pogodnosti koje pružaju za jedinku. Naime, grupiranje većeg broja životinja omogućuje održavanje stalno visoke tjelesne temperature uz manji energetski utrošak za jedinku, a sve kako bi se izbjegao torpor koji usporava razvoj fetusa i smanjuje proizvodnju mlijeka. Kako su gestacijski i laktacijski period u umjerenom pojasu kratki, svako njihovo odgađanje bi moglo rezultirati nepripremljenošću za hibernaciju (Dietz i Kalko, 2006.). U vrsta gdje mužjaci nisu u koloniji sa ženkama oni formiraju tzv. ljetne kolonije. Unutar jednog skloništa mogu se naći kolonije više različitih vrsta šišmiša.

Osim na temelju biološke klasifikacije, šišmiši se klasificiraju i prema svojim prehrambenim navikama pa se razlikuju hematofagni, voćojedni ili frugivorni i kukcojedni ili insektivorni šišmiši. Postoje samo tri vrste hematofagnih šišmiša koji su jedini sisavci čija se prehrana u potpunosti sastoji od krvi i svi žive isključivo u Srednjoj i Južnoj Americi. Voćojedni šišmiši, koji su rasprostranjeni diljem svijeta, hraneći se plodovima i nektarom raznose sjemenke, oprašuju biljke i tako doprinose obnavljanju šuma i ogoljenih područja. Većina šišmiša svijeta uključujući i sve europske su insektivorni, a konzumirajući insekte, među kojima i poljoprivredne štetnike, doprinose očuvanju poljoprivrednih kultura i smanjuju potrebu za insekticidima. Tek manji broj vrsta se hrani ribama ili manjim sisavcima, gmazovima i vodozemcima (mesojedi). Šišmiši su važni bioindikatori kvalitete staništa i promjena u ekosustavu koje nastaju antropogenim djelovanjem (Altringham, 2011., Racey, 2015.).

Uz navedene koristi, šišmišji gvano (feces, urin, odbačeni dijelovi hrane), koji se nakuplja ispod kolonija, koristi se kao gnojivo koje je iznimno bogato dušikom i fosfatima te može poboljšati kvalitetu tla (Racey, 2015.).

2.3 Šišmiši i patogeni

Emergentne zarazne bolesti su nove bolesti na nekom području, bolesti izazvane novim sojem poznatog uzročnika ili u novoj vrsti domaćina. Većina njih su zoonoze (60,3%), a između 60 i 80% ih potječe od divljih životinja (Barbić i sur., 2015., Jones i sur., 2008., Wu i sur., 2016., Kuzmin i sur., 2011.). Povećanje ljudske populacije, povećana mobilnost ljudi i životinja kao posljedica sve bolje globalne povezanosti, intenzifikacija poljoprivrede uz uništavanje okoliša i zadiranje u staništa divljih životinja doprinose pojavi i širenju emergentnih bolesti (Kuzmin i sur., 2011.). Kao izazovi u njihovoj prevenciji i kontroli nameću se pravovremeno prepoznavanje uzročnika i njegovog podrijetla te kontrola lanca prijenosa. Istraživanje i poznavanje viroma (svi virusi utvrđeni u neke vrste) divljih životinja je jedan od temelja u rješavanju navedenih izazova (Wu i sur., 2016., Anderson i sur., 2003.).

Šišmiši su, kao divlje životinje i rezervoari emergentnih bolesti, u središtu više istraživanja koja su uglavnom usredotočena na infekcije od značaja za humanu i veterinarsku medicinu (Calisher i sur., 2006., Wu i sur., 2016.). U njih su pronađene različite skupine mikroba uključujući bakterije, gljivice, helminate, protozoe i viruse. No, za razliku od virusa, ostale skupine mikroba šišmiša su slabo proučene (Allocati i sur., 2016.).

Šišmiši su rezervoari virusnih patogena čovjeka poput lyssavirusa, koronavirusa (*Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS)-CoV i *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus* (MERS)-CoV), filovirusa (virus Ebole i Marburga) i paramyxovirusa (virus Hendra, Nipah i Menangle) (Calisher, 2015.). Uz iznimku lyssavirusa, šišmiši nisu pokazivali znakove niti podlijegali bolestima prouzročenim navedenim virusima (Baker i Zhou, 2015.). Zbog toga su stekli status „posebnog“ ili „jedinstvenog“ rezervoara zoonotskih virusa. Više je karakteristika šišmiša za koje se smatra da pogoduju tom statusu:

- duga koevolucija i koegzistencija šišmiša i virusa omogućila je njihovu uzajamnu prilagodbu što djelomično objašnjava izostanak znakova bolesti i značajnijeg mortaliteta (Luis i sur., 2015.).
- veliki broj vrsta šišmiša i globalna rasprostranjenost doprinijeli su bioraznolikosti patogena kojima su oni rezervoari

- šišmiši su jedne od najdruštvenijih životinja što povećava mogućnost prijenosa i održavanja virusa u populaciji. Grupiranje velikog broja gravidnih ženki prije poroda je specifična karakteristika šišmiša koja može doprinijeti kruženju virusa u porodiljnim kolonijama pa one predstavljaju mjesto povećanog rizika prijenosa virusa na druge vrste (Drexler i sur., 2011.). Između kolonija postoji razmjena jedinki što omogućuje neizravnu povezanost prostorno vrlo udaljenih kolonija.

- šišmiši nastanjuju i koriste raznolike ekološke niše među kojima i antropogene tvorevine i poljoprivredna područja što povećava mogućnost kontakta s ljudima i domaćim životinjama. Virusi se mogu prenijeti izravno sa šišmiša na čovjeka ili putem posrednika (Calisher i sur., 2006., Allocati i sur., 2016., Baker i sur., 2011.).

- dugovječnost – iako još uvijek nije potvrđeno, moguće je da kao dugoživući nosioci imaju više prilika prenijeti infekciju unutar vlastite populacije, ali i na druge vrste (Kuzmin i sur., 2011.)

- migracije šišmišima omogućuju dolazak na različite lokacije i u različite kolonije te povećavaju vjerojatnost kontakta s drugim vrstama životinja, a time i priliku za međuvrsni prijenos patogena (Calisher i sur., 2006., Wang i sur., 2011.). Klimatske promjene i slučajna premještanja šišmiša mogu također dovesti do promjena u rasprostranjenosti pojedinih vrsta pa je moguće očekivati i pojavu patogena i bolesti tamo gdje ih ranije nije bilo (Kuzmin i sur., 2011.).

- let – O'Shea i suradnici (2014.) su iznijeli pretpostavku da povećani metabolizam i povišena tjelesna temperatura u šišmiša tijekom leta služe kao evolucijski dodatak imunosnom sustavu, djeluju protuvirusno te doprinose raznolikosti virusa koji inficiraju šišmiše, a bez očitih znakova bolesti. No, kada ti virusi inficiraju druge sisavce, oni su za njih visoko patogeni jer mogu preživjeti njihov febrilni odgovor (O'Shea i sur., 2014.).

- hibernacija – istraživanja su ukazala na moguću inertnost imunosnog sustava prilikom hibernacije što bi moglo objasniti način održavanje virusa u populaciji šišmiša. Naime, šišmiši izloženi produljenim periodima niskih temperatura (8°C) nisu uspjeli stvoriti protutijela za virus japanskog encefalitisa unatoč prisutnosti virusa u različitim tkivima, ali su se ona javila unutar tjedan dana nakon što su šišmiši premješteni na 24°C (Baker i

sur., 2011.). Također se smatra da je tijekom hibernacije replikacija većine patogena sisavaca značajno smanjena zbog niže tjelesne temperature (O'Shea i sur., 2014.).

- eholokacija – iako još nije potvrđeno, pretpostavlja se da i eholociranje može dovesti do aerosolizacije virusa i omogućiti prijenos na druge jedinke (Calisher i sur., 2006.)

- specifičnosti imunosnog sustava – u interakciji šišmiša i virusa najvažniji je imunosni sustav. O imunosnom sustavu šišmiša se malo zna, ponajviše zato jer se dugo nisu smatrali važnim rezervoarima ili vektorima patogena. Isto tako njihov status zaštićene vrste, primjerice u Europi, je onemogućio ili znatno otežao opsežnija istraživanja kao i nedostatak specifičnih reagenasa poput protutijela za karakterizaciju populacija stanica (Baker i sur., 2011.). Kao i u drugih sisavaca, i u šišmiša imunosni sustav čine dvije povezane cjeline, urođena i stečena imunost. Stanice urođenog imunosnog sustava dosada utvrđene u šišmiša obuhvaćaju makrofage, neutrofile, bazofile i eozinofile. Interferonski odgovor, kao prva linija obrane od virusnih infekcija, stalno je aktivan u šišmiša pa se pretpostavlja da je odmah dostupan i da tako može ograničiti početno umnožavanje virusa (Schountz i sur., 2017.). Istraživanja stečene imunosti šišmiša su dokazala prisutnost humoralnog i staničnog odgovora (Baker i sur., 2011.), no ne zna se reagiraju li imunoglobulini (Ig) kao slični izotipovi drugih sisavaca, a između različitih vrsta šišmiša postoje razlike u broju imunoglobulinskih podrazreda što ukazuje na nužni oprez prilikom uopćavanja u ove vrste životinja (Baker i Zhou, 2015.). Nakon infekcije, kao i u drugih vrsta sisavaca, prvo se pojavljuje IgM, a zatim IgG. No, postoji razlika u količini sintetiziranih protutijela i trajanju humoralnog odgovora te je zaštitna uloga protutijela u šišmiša nedostatno istražena (Baker i sur., 2011.). Iako populacije T-limfocita u šišmiša još nisu okarakterizirane, analiza transkriptoma ukazuje da su receptori i koreceptori prisutni na T-limfocitima drugih vrsta prisutni i u šišmiša (Baker i Zhou, 2015.). Također, smatra se da šišmiši mogu ograničiti imunosni odgovor nepotpunim uklanjanjem patogena kako bi izbjegli imunopatologiju (oštećenja tkiva domaćina prouzročena imunosnim odgovorom) što je imunološka strategija tipična za asimptomatske rezervoare. Tolerancija na patogene nije univerzalna te infekcija nekim virusima (npr. virus bjesnoće, Tacaribe virus i adenovirusi), bakterijama ili gljivicama (npr. *Pseudogymnoascus destructans*) rezultira oboljenjem i uginućem šišmiša. Smatra se da je ključ opisane

tolerancije posljedica djelovanja mitohondrija. Naime, u šišmiša mitohondriji imaju zadatak minimalizirali oksidativni stres tijekom leta. Koristeći mehanizme prvotno razvijene za kontrolu metaboličkog stresa oni mogu kontrolirati patogenezu u zaraženim stanicama procesom autofagije i apoptoze te na taj način izbjeći imunopatološke posljedice pojačanog imunosnog odgovora. Ti mehanizmi su ograničeni na unutarstanične puteve pa su šišmiši osjetljivi na imunopatološke posljedice pokušaja uklanjanja izvanstaničnih infekcija (Brook i Dobson, 2015.). Imunologija šišmiša je nedovoljno istraženo znanstveno područje koje zahtjeva opsežna istraživanja.

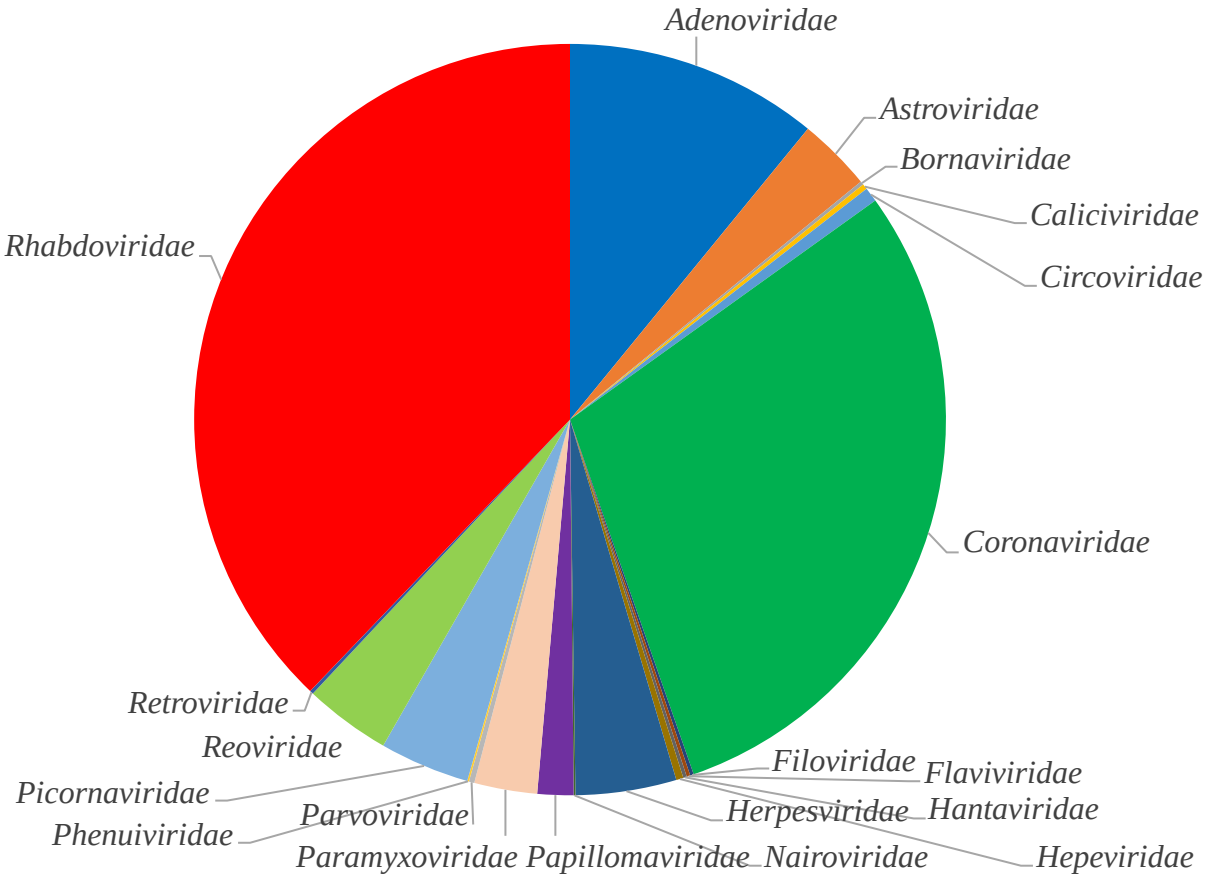
2.4 Virusi šišmiša

Molekularne tehnike postale su široko dostupne poput lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) i tehnologije sekvenciranja nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS) te su omogućile otkrivanje viroma različitih biljaka i životinja (Donaldson i sur., 2010., Levy i Myers, 2016., Alekseyev i sur., 2018.). Tehnologija sekvenciranja nove generacije omogućila je pretraživanje različitih uzoraka u kratkom vremenu (Kunin i sur., 2008., Calisher, 2015.), a bez potrebe za izdvajanjem virusa u laboratorijskim uvjetima. Tako dobivene informacije mogu biti izuzetno vrijedne i otkriti potencijalne patogene (Thomas i sur., 2012.). Međutim, genomski nukleotidni slijed (sekvenca) sam po sebi nije virus, pa uvijek treba težiti izdvajanju virusa kako bi se razjasnile njegove biološke karakteristike, primjerice tkivni tropizam te ima li vrsta u koje je utvrđen ulogu rezervoara ili je tek slučajni domaćin (Calisher, 2015., Li i sur., 2010.). Također, tehnologija NGS vjerojatno ne daje pravu informaciju o slabo zastupljenim virusima u uzorku (Li i sur., 2010.). Upravo zato, kako ne bih propustila utvrditi prisutnost lyssavirusa u ovom sam istraživanju koristila konvencionalni PCR. Dodatni izazov predstavlja raznolika primjena ove tehnologije (otkrivanje novih virusa, dijagnostika, ekološka istraživanja) i nepostojanje standarda kako u pripremi uzoraka tako i u obradi rezultata. Obzirom na ubikvitarnost virusa, razumijevanje uloge viroma u kompleksnom ekosustavu je posve nov izazov (Dutilh i sur., 2017.).

U šišmiša je dosada utvrđeno više od 200 virusa, pripadnika 28 virusnih porodica, od kojih je u Europi do sada utvrđeno njih 20: *Adenoviridae, Astroviridae, Bornaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Hantaviridae, Hepeviridae, Herpesviridae, Nairoviridae, Papillomaviridae, Paramyxoviridae, Parvoviridae,*

Phenuiviridae, Picornaviridae, Reoviridae, Retroviridae, Rhabdoviridae (Slika 3) (Allocati i sur., 2016., DBatVir). Pretraživanja prisutnosti drugih virusa, izuzev lyssavirusa, u Hrvatskoj dosad nije bilo.

Većina emergentnih virusa kao i onih utvrđenih u šišmiša su virusi s RNA genomom od kojih su neki važni patogeni ljudi i životinja (lyssavirusi, koronavirusi, filovirusi, henipavirusi). Ovi virusi osiguravaju svoj opstanak na razini populacije visokom stopom mutacija, kao posljedica nemogućnosti popravka pogrešaka nastalih uslijed replikacije genoma, što rezultira višim razinama antigene varijabilnosti uzrokujući valove epidemija. Iako su i virusi s DNA genomom utvrđeni u šišmiša (herpesvirusi, adenovirusi), manje je jasna njihova uloga kao uzročnika emergentnih bolesti (Drexler i sur., 2011.).



Slika 3. Zastupljenost virusnih porodica u šišmiša u Europi. Preuzeto: DBatVir (http://www.mgc.ac.cn/DBatVir/).

Obično su epidemije i emergentne bolesti u svijetu bile poticaj za istraživanje virusa u Europi gdje su među najzastupljenijim porodicama *Adenoviridae*, *Coronaviridae* i *Rhabdoviridae* (Slika 3).

Adenoviridae (AdV)

Porodica *Adenoviridae* obuhvaća pet rodova *At-*, *Avi-* , *Icht-* , *Mast-* i *Siadenovirus* koji imaju linearan, dvolančani DNA genom. Utvrđeni su u Njemačkoj, Mađarskoj i Španjolskoj u šišmiša iz roda *Hypsugo*, *Nyctalus*, *Myotis*, *Pipistrellus* i *Rhinolophus* u uzorcima gvana, fecesa, urina, oralnim i rektalnim obriscima i organima (mješavina organa i crijeva). Iako se infekcija AdV-om u ljudi povezuje s konjunktivitisom, gastroenteritisom i respiratornim bolestima te su oni utvrđeni i u moribundnih i uginulih šišmiša, nekoliko istraživanja je dokazalo prisutnost ovih virusa i u zdravih šišmiša. Neke genomske sekvence šišmišjih AdV-a pokazuju sličnost s onima psećeg podrijetla (DBatVir, Queen i sur., 2015.).

Coronaviridae (CoV)

Koronavirusi pripadaju redu *Nidovirales*, porodici *Coronaviridae*, potporodici *Coronavirinae*. Imaju pozitivan jednolančani RNA genom koji je jedan od najvećih među RNA virusima. Potporodica *Coronavirinae* obuhvaća četiri roda: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* i *Deltacoronavirus*. Šišmiši se smatraju idealnim domaćinima alpha- i betacoronavirusa i imaju važnu ulogu u njihovoj ekologiji i evoluciji (Calisher, 2015.). Istraživanja pokazuju da su šišmiši domaćini svih trenutno poznatih virusa ove porodice nađenih kod sisavaca (Woo i sur., 2009.).

Od studenog 2002. pa do srpnja 2003. godine svijet je bio suočen s prvom pandemijom novog milenija – SARS-om, koju je uzrokovao betakoronavirus. Smatra se da je epidemija započela u kineskoj provinciji Guangdong, a zahvaćene su 33 države na pet kontinenata. Naknadno je potvrđeno da su šišmiši primarni domaćini virusa koji se potom prenosi u posrednika – larvenog uvijača (lat. *Paguma larvata*, engl. *masked palm civet*) ili kunopsa (lat. *Nyctereutes procyonoides*) – i potom dalje u čovjeka. Obzirom da je moguć prijenos s čovjeka na čovjeka nastala je epidemija s preko 8000 zaraženih osoba i visokom stopom smrtnosti (oko 10%) (Calisher, 2015., Ge i sur., 2015., WHO, pristupljeno 02. studenog 2018.). Tijekom 2012. godine se pojavio novi virus, filogenetski blisko srodan virusu SARS-CoV, nazvan MERS-CoV (betakoronavirus). MERS-CoV se počeo širiti iz Saudijske Arabije i dosada je zaraženo preko

2000 osoba, a više od 800 ih je preminulo (WHO, pristupljeno 02. studenog 2018.). Deve i šišmiši su pretpostavljeni rezervoari, a moguće je da su deve posrednici između šišmiša i ljudi. Virus se također prenosi s čovjeka na čovjeka (Ge i sur., 2015.).

Iako su u europskih šišmiša nađene sekvence slične virusima MERS-CoV (Nizozemska, Rumunjska i Ukrajina) i SARS-CoV (Mađarska, Luksemburg, Italija), ne može se procijeniti njihov zoonotski potencijal jer za sada nisu uzgojeni u kulturi stanica. Virusi mogu biti slični ili srodni na razini sekvence nukleinskih kiselina, ali različita uloga proteina je ključna pri utvrđivanju raspona domaćina (Drexler i sur., 2010., Annan i sur., 2013., Kohl i Kurth, 2014.). Međutim, CoV sačinjavaju skupinu virusa s velikim potencijalom međuvrsnog prijenosa. Osim spomenutih betakoronavirusa, utvrđeni su i alfakoronavirusi u različitih vrsta šišmiša u nekoliko europskih država (Rizzo i sur., 2017., Gloza-Rausch i sur., 2008., Kemenesi i sur., 2014., August i sur., 2012., Reusken i sur., 2010.).

Rhabdoviridae

Rhabdoviridae je velika i raznolika virusna porodica čiji pripadnici inficiraju sisavce, ptice, gmazove, ribe, insekte i biljke (Walker i sur., 2018.). Rabdovirusi imaju ovojnicu koja okružuje helikalnu nukleokapsidu unutar koje je jednolančani RNA genom negativnog smisla. Ova porodica obuhvaća 18 rodova, od čega su u šišmiša ili artropoda koji se na njima hrane utvrđeni *Ledantevirus, Vesiculovirus* i *Lyssavirus* (Walker i sur., 2018.). Rod *Ledantevirus* dobio je ime po predstavniku roda Le Dantec virusu (LDV) koji je izoliran u Senegalu iz desetogodišnje djevojčice s akutnom febrilnom bolešću i znakovima hepatosplenomegalije. Zanimljivo je da je virusna RNA slična LDV-u utvrđena u šišmiša *Eptesicus isabellinus* u Španjolskoj (Walker i sur., 2018.). U europskih šišmiša su iz porodice *Rhabdoviridae* još zabilježeni rod *Lyssavirus* i neklasificirani rabdovirusi. Potonji su zabilježeni u Danskoj i Njemačkoj te Španjolskoj u obriscima usne šupljine šišmiša iz rodova *Eptesicus, Hypsugo, Miniopterus, Myotis, Plecotus* i *Rhinolophus*. Unutar porodice *Rhabdoviridae* rod *Lyssavirus* je najznačajniji s aspekta javnog zdravstva jer se unutar njega nalaze uzročnici bjesnoće koji su se i najviše istraživali (DBatVir, Kuzmin i Rupprecht, 2015.).

2.5 Bjesnoća

Bjesnoća je uglavnom smrtonosna zarazna bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS) uzrokovana pripadnicima roda *Lyssavirus*. Prijemljivi su svi sisavci (Kuzmin i Rupprecht, 2015.). Usprkos tome što je uglavnom preventabilna, ova zoonoza ima najvišu stopu smrtnosti od svih trenutno poznatih zaraznih bolesti (Hanlon i Childs, 2013.). I danas odnosi preko 60 000 ljudskih života godišnje, svakih 10 do 20 minuta netko umre od bjesnoće, a 40 do 50% žrtava su djeca mlađa od 15 godina (Fooks i sur., 2017.).

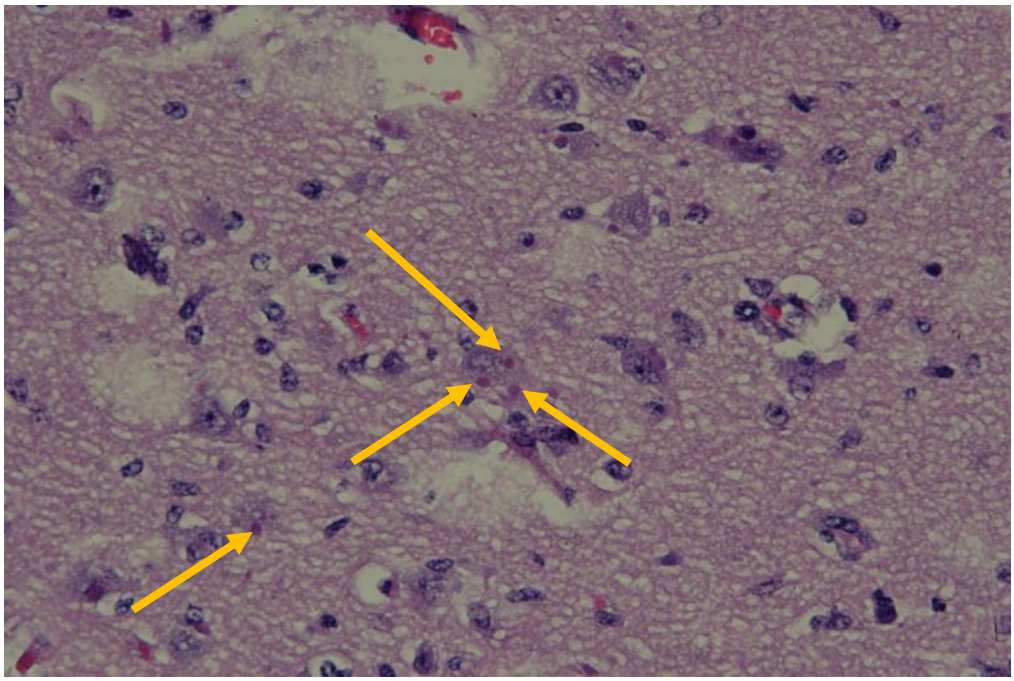
2.5.1 Povijest bjesnoće

U iznimno dugoj povijesti ove bolesti istaknuli su se brojni istraživači. Neki od njih su i starogrčki filozof Aristotel (4.st.pr.Kr.) koji je povezao bolest sa životinjama, ali je smatrao da se ne prenosi na ljude ugrizom. U starom Rimu Cordamus je nagađao da se „otrov“ nalazi u slini, a Celsus je opisao kliničku sliku u čovjeka i predložio izrezivanje tkiva, kauterizaciju rane i potapanje žrtve u bazen u svrhu sprječavanja bolesti. Renesansni znanstvenik Fracastoro (1478. – 1553.) je pretpostavio da klica (mikrob) uzrokuje bjesnoću (germinativna teorija bolesti) i to 300 godina prije Kocha i Pasteura te je također opisao klinički slučaj u čovjeka. Georg Gottfried Zinke (1771. – 1813.) je 1804. godine inokulacijom sline bijesnog psa u incizije na drugim životinjama uspio prenijeti bolest (Jackson, 2013., Lyles i sur., 2013.).

Louis Pasteur (1846. – 1908.) je svojim radom promijenio povijest ove bolesti. Prilagodio je „ulični“ ili tzv. divlji tip virusa na laboratorijskim životinjama i tako dobio laboratorijski soj koji je neurovirulentniji nego divlji virus, a inkubacijski period je kraći (fiksni soj). Pasteur je razvio prvo zaštitno cjepivo protiv bjesnoće koristeći isušene leđne moždine inficiranih kunića, iako se kasnije pokazalo da ono nije sigurno za korištenje jer može izazvati bolest. Primijenivši po prvi puta postekspozicijsku zaštitu (PEP) na devetogodišnjem Josephu Meisteru, 6. srpnja 1885., načinio je prekretnicu pretvorivši bjesnoću od isključivo smrtonosne u preventabilnu bolest (Jackson, 2013., Lyles i sur., 2013.).

Adelchi Negri (1875. – 1912.) je, iako nesvjestan pravog značenja svoga otkrića, uočio patognomonične ovalne ili okrugle citoplazmatske uklopine u neuronima bijesnih životinja, svojevremeno korištene u dijagnostičke svrhe i po njemu nazvane Negrijeva tjelešca (Slika 4). Negrijeva tjelešca se nalaze prilikom infekcije divljim virusom, ali gotovo nikada nakon infekcije fiksnim sojem (Rossiter i Jackson, 2013.). Unutar neurona može biti jedno ili više

tjelešaca, obično se nalaze u perikarionu, povremeno u dendritima i aksonima. Tek je pojavom elektronskog mikroskopa bilo moguće razlučiti da se radi o nakupinama virusnih komponenata (Jackson, 2013., Lyles i sur., 2013.).



Slika 4. Negrijeva tjelešca (strelice). Unutar jedne stanice vidi se više tjelešaca. Fotografija je objavljena u Šoštarić i sur., 2010. Originalna fotografija je ustupljena ljubaznošću dr.sc. Branka Šoštarića.

Paul Remlinger (1871. – 1964.) sa suradnicima dokazao je da je uzročnika bjesnoće moguće izdvojiti ultrafiltracijom te se njemu pripisuje otkriće virusa bjesnoće 1903. godine. Glodwasser i Kissling su 1958. godine tehnikom koju su razvili – neizravnim fluorescentnim bojenjem razmaza mozga – postavili temelje suvremene dijagnostike i istraživanja patogeneze bolesti (Jackson, 2013.).

U nastojanju da se proizvedu sigurna i učinkovita inaktivirana cjepiva 1960-ih se počinju koristiti stanične kulture (Lyles i sur., 2013.). Pojavom najsuvremenijih tehnika pristupilo se i kloniranju virusa bjesnoće što je omogućilo razvoj rekombinantih cjepiva namijenjenih divljim životinjama te je unaprijedilo istraživanja patogeneze (Jackson, 2013.).

Ubrzo nakon otkrića Amerika, biskup Petrus Martry-Anglerius u svom *De Rebus Oceanicis et de Orbi Novi Decades Octo* donosi jedan od prvih opisa prijenosa bjesnoće sa šišmiša vampira na španjolske mornare i vojnike (Lyles i sur., 2013.).

Antonio Carini, direktor Pasteurovog instituta u Sao Paulu, 1911. godine utvrdio je da bjesnoću biljojeda mogu prenositi šišmiši. Virus bjesnoće iz hematofagnog šišmiša (lat. *Desmodus rotundus*) prvi je izolirao Joseph Pawan 1931. godine, a povezao je i voćojedne šišmiše s paralitičkom bjesnoćom (Moratelli i Calisher, 2015.). Sjevernoamerički šišmiši, od kojih je većina insektivornih, bili su ignorirani kao mogući rezervoari bjesnoće do 1953. godine kada je pronađen bijesan šišmiš, što je potaknulo istraživanja diljem svijeta (Constantine, 2009.). Prvi slučaj bjesnoće šišmiša u Europi prijavljen je u Njemačkoj 1954. godine. U narednih 30 godina bolest je utvrđena u svega 14 šišmiša (Kuzmin i Rupprecht, 2015.). No, dvije ljudske smrti nakon ugriza šišmiša 1985. godine povećale su interes za istraživanje bjesnoće pa je do kraja 1989. pretraženo 4705 šišmiša od kojih je 379 (8%) bilo pozitivno. U Europi je od 1977. do 2018. zabilježeno 6,19% (n = 1245/20111) pozitivnih šišmiša (Rabies Bulletin, datum pristupanja 05. studenog 2018.). Otprilike 80% europskih slučajeva prijavljeno je u Danskoj, Njemačkoj i Nizozemskoj (Slika 6 i Slika 7), što je djelomično posljedica pojačane razine istraživanja u navedenim državama (McElhinney i sur., 2011.).

U Hrvatskoj su se prva istraživanja bjesnoće šišmiša počela provoditi 1968. godine za potrebe vojske. Kako bi se istražilo predstavljaju li špiljske vrste šišmiša izvor zoonoza na 15 lokacija uzduž jadranske obale prikupljeno je i eutanazirano 470 jedinki. Ispitani su na prisutnost *Histoplasme capsulatum*, arbovirusa i lyssavirusa, a od čega su bili pozitivni samo na arboviruse. Ispitivanje uzoraka na prisutnost virusa bjesnoće je tada obavljeno u Pragu (Heneberg i sur., 1968.). Hrvatski veterinarski institut (HVI) je 1986. godine započeo pretraživanje uginulih šišmiša na prisustvo virusa bjesnoće, ali je zbog Domovinskog rata ono prekinuto te je u tom periodu pretraženo oko 30 jedinki kasnog noćnjaka (lat. *Eptesicus serotinus*) (Pavlinić i sur., 2009.). Nakon toga, u Hrvatskoj je intenzitet nadzora bjesnoće bio visok i usredotočen na crvene lisice (lat. *Vulpes vulpes*), kao glavnog rezervoara genotipa 1, dok su šišmiši bili zanemareni. Ujedno, nedostatak prosvjećenosti javnosti o bjesnoći šišmiša doprinijeo je da pronađene uginule jedinke uglavnom nisu dostavljane na laboratorijsku pretragu. U razdoblju od 1986. do kraja 2018. godine pretraženo je 736 šišmiša koji su pripadali rodovima *Eptesicus, Hypsugo, Miniopterus, Myotis, Nyctalus, Pipistrellus, Plecotus* i *Rhinolophus*. Svi dosad pretraženi uzorci moždanoga tkiva su bili negativni na prisutnost lyssavirusa (Pavlinić i sur., 2009., Šimić i sur., 2018.).

2.5.2 Taksonomski pregled roda *Lyssavirus*

Uzročnici bjesnoće pripadaju redu *Mononegavirales*, porodici *Rhabdoviridae* i rodu *Lyssavirus*. Ime roda potječe iz grčke mitologije gdje je Lyssa bila boginja ludila i bijesa. Rod trenutno obuhvaća 16 vrsta lyssavirusa, dok još dvije čekaju klasifikaciju (Tablica 2). Geografsku rasprostranjenost vrsta roda *Lyssavirus* utvrđenih u šišmiša prikazuje Slika 5. Klasični virus bjesnoće (Rabies lyssavirus, RABV, genotip 1) je tipičan predstavnik roda (Walker i sur., 2018.).

Do 1950-ih virus bjesnoće je smatran jedinstvenim, međutim otkriće virusa *Lagos bat lyssavirus* i *Mokola lyssavirus* pokazalo je da je ovaj virusni rod mnogo kompleksniji te se uvodi pojam virusu bjesnoće srodni virusi (engl. *rabies-related viruses*, RRV) (Lyles i sur., 2013.).

Tablica 2. Taksonomski pregled vrsta unutar roda *Lyssavirus*. Prema Walker i sur., 2018. (pristupljeno 02. studenog 2018.) i Picard-Meyer i sur., 2018.

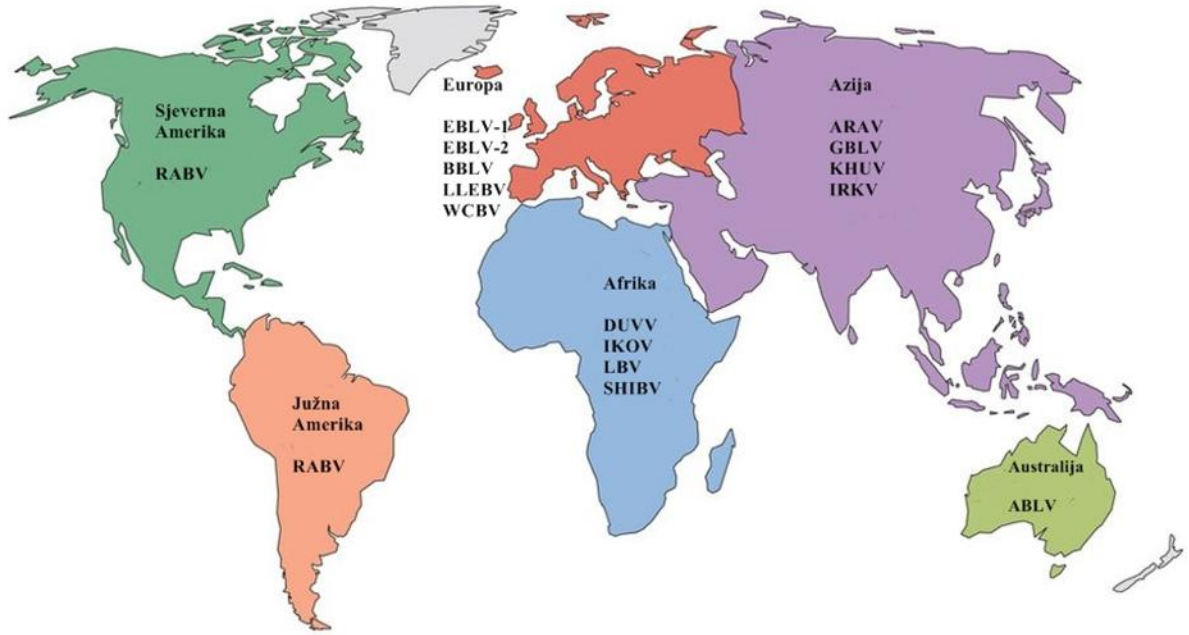
Lyssavirus – vrsta	**Kratica**	**Genotip**	**Primarni rezervoar**	**Filogrupa**	**Distribucija**
Aravan lyssavirus	ARAV		*Myotis blythii*	I	Kazahstan (jedan slučaj)
Australian bat lyssavirus	ABLV	7	Insektivorni šišmiši (*Pteropus* spp, *Saccolaimus flavicentris*)	I	Australija i moguće područje Jugoistočne Azije
Bokeloh bat lyssavirus	BBLV		*Myotis nattereri*, rezervoara treba potvrditi	I	Njemačka (2010.), Francuska (2012.)
Duvanhage lyssavirus	DUVV	4	*M. schribersii*, *Nycteris gambiensis*, *N. thebaica*	I	Afrika
European bat 1 lyssavirus	EBLV-1	5	*E. serotinus*	I	Europa
European bat 2 lyssavirus	EBLV-2	6	*M. dasycneme* i *M. daubentonii*	I	Europa
Gannawura bat lyssavirus	GBLV			I	
Ikoma lyssavirus	IKOV		Izdvojen iz afričke cibetke, ali šišmiši su mogući rezervoari	Trenutno neodređena	Tanzanija (jedan slučaj)
Irkut lyssavirus	IRKV		*Murina leucogaster*	I	Rusija (azijski dio)
Khujand lyssavirus	KHUV		*M. daubentonii*	I	Tadžikistan (jedan slučaj)

Tablica 2. (nastavak)

Lagos bat lyssavirus	LBV	2	Voćojedni šišmiši (*Eidolon helvum, Rousettus aegyptiacus, Epomophorus wahlbergi*)	II	Afrika
Lleida bat lyssavirus	LLEBV		Izoliran iz insektivornog šišmiša *M. schreibersii*	Trenutno neodređena	Španjolska (2012), Francuska
Mokola lyssavirus	MOKV	3	Nepoznat rezervoar, većina slučajeva utvrđena u pasa i mačaka	II	Afrika
Rabies lyssavirus	RABV	1	Zvijeri i američki šišmiši (insektivorni, vampiri i voćojedni šišmiši)	I	Širom svijeta, osim na Antartici i na nekim otocima. Zapadna Europa je iskorijenila bolest.
Shimoni bat lyssavirus	SHIBV		Šišmiš *Hipposideros commersoni*, rezervoara treba potvrditi	II	Kenija (jedan slučaj)
West Caucasian bat lyssavirus	WCBV		Insektivorni šišmiš *M. schreibersii*;serološki nalazi ukazuju da nekoliko vrsta roda *Miniopterus* u Keniji ima neutralizirajuća protutijela za WCBV ili antigenski sličan virus	Trenutno neodređena	Rusija (na granici s Gruzijom) (jedan slučaj 2002.)
Srodni, neklasificirani virusi					
Kothalaki bat lyssavirus	KBLV			Blisko srodan s virusima filogrupe I	Finska
Taiwan bat lyssavirus	TBLV				Tajvan

Na temelju genetičke udaljenosti i serološke križne reaktivnosti, 13 lyssavirusa je trenutno podijeljeno u dvije filogrupe, filogrupa I i II (Tablica 2) (Lyles i sur., 2013.). Vrste *West Caucasian bat lyssavirus*, *Ikoma lyssavirus* i *Lleida bat lyssavirus* ne mogu se svrstati u

postojeće filogrupe, ali kako nema ni dokazane križne neutralizacije između njih, nije ih moguće svrstati ni u zajedničku filogrupu III, pa postoji mogućnost da će u budućnosti postojati više filogrupa (Kuzmin i Rupprecht, 2015.). Podjela na filogrupe je bitna iz perspektive zaštite ljudi jer su jedino virusi filogrupe I učinkovito neutralizirani trenutno dostupnim cjepivima koja se unatoč tome koriste u zaštiti protiv svih filogrupa (Lyles i sur., 2013.).



Slika 5. Geografska rasprostranjenost vrsta roda *Lyssavirus* utvrđenih u šišmiša. Objašnjenje kratica je u Tablici 2. Preuzeto:https://www.nature.com/articles/nrmicro.2018.11/figures/3.

2.5.3 Epizootiologija bjesnoće

Glavni rezervoari bjesnoće su pripadnici reda zvijeri (lat. *Carnivora*) i reda šišmiši (lat. *Chiroptera*). Pas je transmisijski vektor u preko 99% humanih slučajeva koji se trenutno uglavnom javljaju u Africi i Aziji (Lyles i sur., 2013., Kuzmin i Rupprecht, 2015.).

Najučestaliji način izlaganja virusu bjesnoće i njegova prijenosa je putem ugriza. Vrsta ugriza ovisi o vektoru. Psi često nanose duboke i teške ugrizne rane pri čemu inokuliraju virus duboko u mišićno tkivo. Suprotno, šišmiši učinkovito prenose bjesnoću plitkim intradermalnim ugrizima koji su često neopaženi. Kontaminacija svježih otvorenih rana i sluznica infektivnim materijalom drugi su način izlaganja lyssavirusima. Kontaminacija intaktne kože slinom ne smatra se izlaganjem bolesti. Nakon izlaganja virusu oralnim putem bjesnoća se ne javlja uvijek,

a u nekim slučajevima se javlja imunosni odgovor. Ta spoznaja je uspješno iskorištena u oralnom cijepljenju divljih životinja uz primjenu atenuiranog ili rekombinantnog virusa bjesnoće (Hanlon i Childs, 2013.). Inhalacijsko ili intranazalno izlaganje je od manjeg značaja u prirodnom prijenosu bolesti, ali potreban je oprez u laboratorijima kako bi se izbjeglo stvaranje lyssavirusnog aerosola i posljedična infekcija (Johnson i sur., 2006.). Opisan je i jedan slučaj transplacentalnog prijenosa, ali novorođenčad majki koje su inficirane bjesnoćom preživljava ukoliko primi postekspozicijsku profilaksu. Zabilježeni su i slučajevi infekcije nakon mesarenja inficiranih leševa. Prijenos bjesnoće s čovjeka na čovjeka opisan je nakon transplantacije različitih organa i tkiva (rožnice, bubrega, jetra, arterijskog segmenta) (Hanlon i Childs, 2013.).

Inkubacijski period bjesnoće (vrijeme od infekcije virusom do razvoja kliničkih znakova) varira od pet dana do nekoliko godina, obično dva do tri mjeseca, ovisno o (i) količini i vrsti inokuliranog virusa, (ii) gustoći motornih živčanih završetaka na mjestu ugriza, (iii) blizini ulaznog mjesta virusa i SŽS, (iiii) težini (vrsti) ugriza te (iiiii) imunom statusu domaćina (Lyles i sur., 2013.). Inkubacijski period u šišmiša pod prirodnim okolnostima nije poznat, a iz iskustava rehabilitacijskih centara za divlje životinje za EBLV-2 on se kretao od sedam tjedana do devet mjeseci (Banyard i sur., 2013.). U eksperimentalno inficiranih jedinki inkubacija je varirala ovisno o načinu inokulacije, dozi i virusu. Reduciranjem inokulacijske doze produžio se inkubacijski period uz opsežniju replikaciju i distribuciju virusa u domaćinu (Banyard i sur., 2013.).

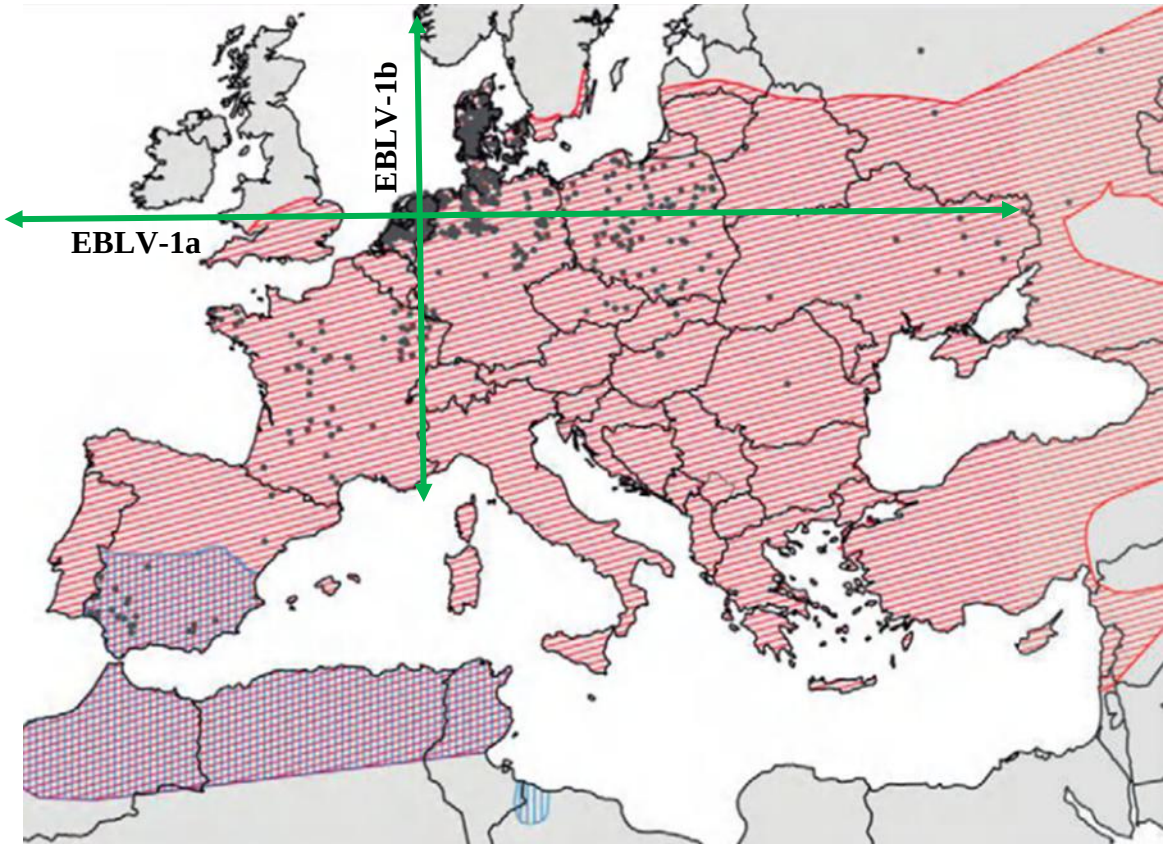
U šišmiša Sjeverne i Južne Amerike (Novi svijet) pojavljuju se samo varijante klasičnog virusa bjesnoće (RABV) dok su druge vrste lyssavirusa potpuno odsutne. Suprotno, u šišmiša u Europi, Aziji i Africi (Stari svijet) te Australiji nije zabilježen virus RABV, već genetički različiti virus RRV (Slika 5). Virus RABV je u Starom svijetu prisutan u kopnenih sisavaca, a nejasan je razlog opisanoj raspodjeli. Moguće je da RABV kruži među šišmišima Starog svijeta, ali zbog ograničenog praćenja još nije utvrđen ili su pak RABV i njegov domaćin izumrli na tim prostorima (Kuzmin i Rupprecht, 2015.).

Šišmiši su pretpostavljeni rezervoari i vektori 16 od 18 trenutno prepoznatih i predloženih lyssavirusa (14 od 16 priznatih vrsta od ICTV), ali su potvrđeni isključivi rezervoari sedam virusnih vrsta i to: LBV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, ABLV, IRKV i BBLV (Tablica 2). Na temelju jednog izolata ili dokazane nukleinske kiseline ARAV, KHUV, WCBV, SHIBV i

LLEBV ne bi trebalo donositi konačne zaključke o njihovim glavnim rezervoarima, ali kako su svi oni prvotno utvrđeni u šišmiša i kako filogenetske analize predlažu da svi lyssavirusi potječu od virusa šišmiša najvjerojatnije su i njihovi rezervoari šišmiši. Suprotno, zvijeri su rezervoari samo virusa RABV. Rezervoari virusa MOKV i IKOV su nepoznati i tek moraju biti utvrđeni (Tablica 2) (Kuzmin i Rupprecht, 2015.).

U Europi bjesnoću šišmiša uzrokuju pet vrsta lyssavirusa: EBLV-1, EBLV-2, BBLV, WCBV i LLEBV (Slika 5) (Kuzmin i Rupprecht, 2015.). Nedavno je u Finskoj pronađen i *Kotalahti bat lyssavirus* (KBLV) u Brandtovog šišmiša (lat. *Myotis brandtii*) (Nokireki i sur., 2018.). Većina trenutnih spoznaja o lyssavirusima insektivornih šišmiša u Europi temelji se na istraživanju virusa EBLV-1 koji je utvrđen u preko 97% slučajeva bjesnoće šišmiša (McElhinney i sur., 2011.).

Od 39 vrsta unutar roda noćnjaka (lat. *Eptesicus*), četiri su zabilježene u Europi (Dietz i Kiefer, 2016.), od kojih se EBLV-1 povezuje s vrstama *E. isabellinus* i kasni noćnjak (lat. *Eptesicus serotinus*), koji se smatra glavnim rezervoarom ovog virusa (Banyard i sur., 2013.). Većina porodiljnih kolonija kasnog noćnjaka je smještena u antropogenim tvorevinama (Dietz i Kiefer, 2016.) što je mogući razlog da se ova vrsta češće dostavlja na laboratorijsku pretragu na bjesnoću (Banyard i sur., 2013.).



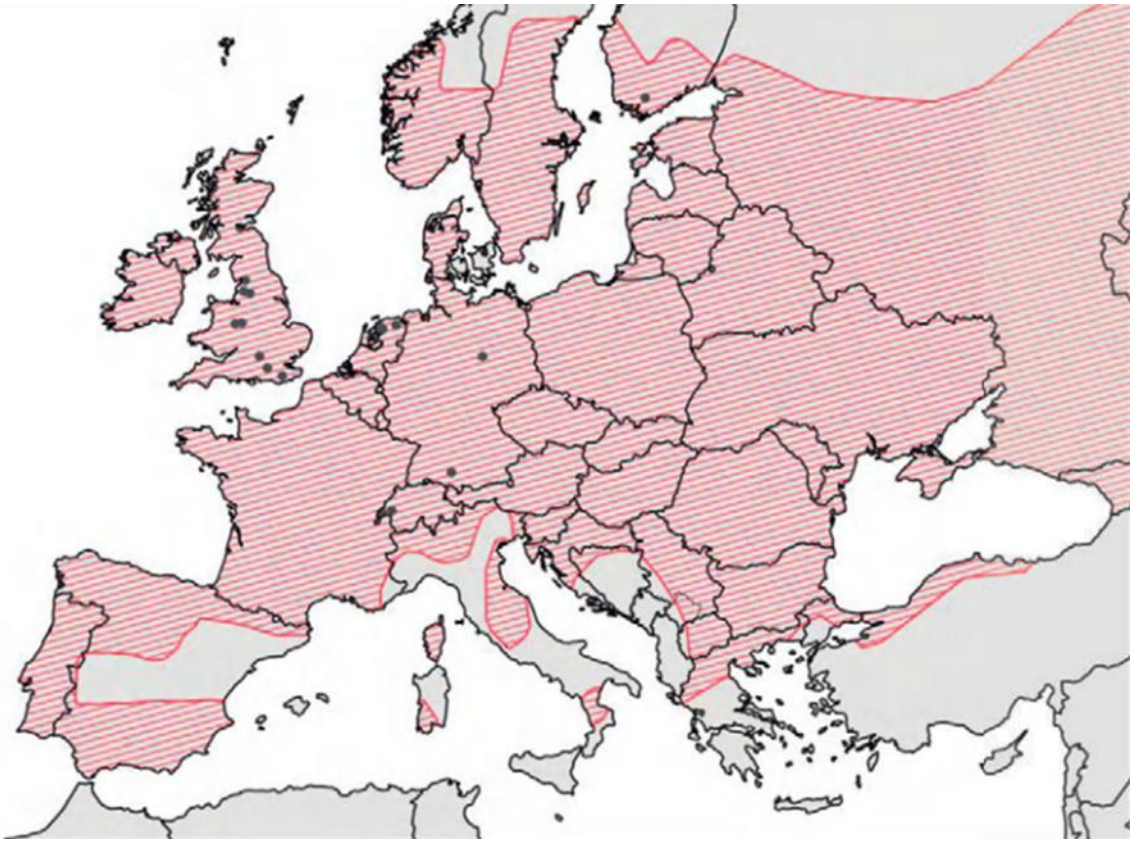
Slika 6. Rasprostranjenost noćnjaka i slučajeva bjesnoće. Kasni noćnjak (crveno) je najrasprostranjenija i najzastupljenija vrsta noćnjaka u Europi, dok *E. isabellinus* (plavo) obitava u sjevernoj Africi i na jugu Pirinejskog poluotoka. Prijavljeni slučajevi virusa EBLV-1 (točke) u Europi (1977. – 2010.) i geografsko grupiranje virusa EBLV-1a i 1b (strelice). Preuzeto iz Banyard i sur., 2013.

Smatra se da prevalencija virusa EBLV-1 korelira s brojnošću kasnog noćnjaka. U zemljama zapadne i srednje Europe, većina je slučajeva bjesnoće prijavljena u njihovim sjevernim dijelovima, gdje je zabilježena najveća gustoća populacije ove vrste (Slika 6). U europskoj populaciji noćnjaka dvije su genetičke linije, EBLV-1a i 1b. Genetička linija EBLV-1a ima zemljopisnu rasprostranjenost zapad-istok i utvrđena je u Nizozemskoj, Njemačkoj, Danskoj i Poljskoj. Genetička linija EBLV-1b ima rasprostranjenost sjever-jug te je utvrđena u Francuskoj, južnoj Njemačkoj, Nizozemskoj i genetički je heterogenija (Slika 6). Filogenijskom analizom je utvrđeno da virus EBLV-1 prisutan u *E. isabellinus* tvori neovisnu liniju, EBLV-1c. Koinfekcija kolonija noćnjaka ili infekcija jedinki s obje linije još nije utvrđena (Banyard i sur., 2013.).

Protutijela za virus EBLV-1 su utvrđena u kasnog noćnjaka u južnoj Engleskoj, iako virus nije izdvojen. Nepoznato je koliko se daleko virus EBLV-1 širi na istok jer su istraživanja u zemljama istočne Europe i središnje Azije, gdje je kasni noćnjak prisutan, ograničena. Kako postoje migracije između populacija *E. isabellinus* s obje strane Gibraltarskih vrata, ne može se isključiti prisutnost virusa EBLV-1 i u Africi (Banyard i sur., 2013.).

I u drugih vrsta šišmiša je utvrđen virus EBLV-1, i to u: ranog večernjaka (lat. *Nyctalus noctula*), malog šumskog šišmiša (lat. *Pipistrellus nathusii*), patuljastog šišmiša (lat. *P. pipistrellus*), velikog potkovnjaka (lat. *Rhinolophus ferrumequinum*), dvobojnog šišmiša (lat. *Vespertilio murinus*), močvarnog šišmiša (lat. *Myotis dasycneme*), dugokrilog pršnjaka (lat. *Miniopterus schreibersii*), resastog šišmiša (lat. *Myotis nattereri*), velikog šišmiša (lat. *Myotis myotis*) i sredozemnog slobodnorepca (lat. *Tadarida teniotis*). Trenutno se ne može sa sigurnošću utvrditi je li nalaz virusa EBLV-1 u tih vrsta posljedica prijenosa virusa s noćnjaka uslijed kohabitacije ili su i te vrste rezervoari (Banyard i sur., 2013.).

Jednako zapažanjima vezanim za kasnog noćnjaka i virus EBLV-1, dostupni podaci upućuju i na povezanost virusa EBLV-2 s vrstama roda *Myotis*. U rodu *Myotis* je više od 100 vrsta šišmiša svrstanih u tri filogeografske grupe (engl. *clades*) – sjevernoameričku, južnoameričku i Stari svijet. U Europi se javlja 14 pripadnika *Myotis* spp., a virus EBLV-2 je dosada utvrđen u riječnog (lat. *Myotis daubentonii*) i močvarnog šišmiša (lat. *Myotis dasycneme*) (Banyard i sur., 2013.).



Slika 7. Rasprostranjenost riječnog šišmiša (lat. *M. daubenotnii*) (crveno) i slučajeva infekcije virusom EBLV-2 (točke) u Europi (1977. – 2010.). Preuzeto iz Banyard i sur., 2013.

Virus EBLV-2 je utvrđen izuzetno rijetko u usporedbi s virusom EBLV-1 (Kuzmin i Rupprecht, 2015.). Prvi put je izoliran iz preminulog švicarskog biologa 1985. godine te su od tada do 2017. potvrđena samo 34 slučaja (McElhinney i sur., 2018.) i to u Nizozemskoj (4 slučaja), Škotskoj (3 slučaja), Engleskoj (12 slučajeva), Walesu (1 slučaj), Švicarskoj (4 slučaja), Norveškoj (1 slučaj), Njemačkoj (6 slučajeva) i Finskoj (3 slučaja). U Nizozemskoj je ovaj virus utvrđen u močvarnog šišmiša, dok je u svim drugim državama utvrđen i u riječnog šišmiša (Slika 7) (McElhinney i sur., 2018.). Nejasno je zašto se rasprostranjenost virusa EBLV-2 ne poklapa s prilično širokom rasprostranjenošću riječnog šišmiša (Kuzmin i Rupprecht, 2015.) (Slika 7). Kao moguće objašnjenje nameću se biološke karakteristike rezervoara koji ne koristi antropogene objekte, pa se rjeđe dostavlja na pretragu u usporedbi s noćnjacima. Drugo moguće objašnjenje je niska stopa prijenosa ovog virusa što potvrđuju i istraživanja (McElhinney i sur., 2018.).

Iako je infekcija lyssavirusima uglavnom smrtonosna zabilježeni su rijetki slučajevi preživljavanja nakon kliničkog očitovanja bolesti u životinja i ljudi. Također, zabilježen je i

izostanak produktivne infekcije uz stvaranje neutralizirajućih protutijela u naočigled zdravih životinja poput lisica, mungosa i hijena, ali i u ljudi (trapera) (Jackson i Fu, 2013., Jackson, 2013a, Kuzmin i Rupprecht, 2015.). U populaciji lisica je tako utvrđena vrlo niska seroprevalencija (<5%, ukoliko nema oralnog cijepljenja) što potvrđuje da većina kontakata s virusom RABV završava uginućem. Međutim, pretraživanje populacije klinički zdravih šišmiša diljem svijeta je ukazalo da se seroprevalencija kreće i do 70%, a ponekad se protutijela mogu utvrditi najmanje godinu dana nakon prvotno zabilježene serokonverzije. Seroprevalencija je ovisila o veličini i gustoći šišmišje kolonije (Kuzmin i Rupprecht, 2015.). Naime, bjesnoća je bolest čije je širenje uvjetovano gustoćom populacije domaćina. Bolest dovodi do smanjenja broja prijemljivih jedinki pa tako primjerice na inficiranom području ugiba 60 do 80% lisica te bolest ulazi u tihu fazu koja traje dvije do tri godine (EFSA, 2015.). Slično, istraživanja na šišmišima ukazuju da dolazi do fluktuacija u populaciji zbog mortaliteta uzrokovanog lyssavirusima odnosno infekcija se javlja u „valovima“ (engl. *„wave-like“ fashion*). Mortalitet smanjuje populaciju i prema tome i dokaze bolesti dok se populacija ne poveća što opet omogućuje prijenos lyssavirusa putem učestalih kontakata (Amengual i sur., 2007.).

Posebno je zanimljivo da je utvrđena nazočnost virusa u slini šišmiša (virusna RNA i izdvojen virus) bez znakova bolesti dok se u većine ostalih sisavaca virus u slini pojavljuje pred kraj inkubacije ili u kliničkom stadiju bolesti. Tako je RNA virusa EBLV-1 utvrđena u 13 obrisaka usne šupljine, ali u samo pet mozgova podrijetlom od 34 šišmiša od kojih su oba uzorka bila dostupna (Echevarría i sur., 2001.). Nadalje, RNA virusa EBLV-1 je utvrđena u jednjaku, grkljanu i ždrijelu te plućima velikog potkovnjaka, bez utvrđivanja virusa u mozgu te u tri od 27 taloga krvnih stanica (engl. *blood pellet*) naočigled zdravih velikih šišmiša (Serra-Cobo i sur., 2002.). Također je RNA virusa EBLV-1 utvrđena u tkivu naočigled zdravog europskog plodojednog šišmiša (lat. *Rousettus aegyptiacus*) u nizozemskom zoološkom vrtu, a pretpostavlja se da se inficirao od europskih šišmiša (Kuzmin i Rupprecht, 2015.).

Sve navedeno je dovelo do pretpostavki da šišmiši preživljavaju infekciju virusom EBLV-1, te mogu biti nosioci i izlučivati virus u slini bez infekcije SŽS, a sam virus u njih može uzrokovati subkliničku infekciju (Banyard i sur., 2013.).

Međutim, iako je napravljen ograničen broj istraživanja na manjem broju vrsta (Tablica 3) (Franka i sur., 2008., Freuling i sur., 2009., Johnson i sur., 2008., Fooks i sur., 2009.), zajedno

sa slučajevima zabilježenim u prirodi i rehabilitacijskim centrima, ne postoje dokazi koji bi potvrdili da je infekcija virusom EBLV nesmrtonosna ekstraneurološka bolest u šišmiša.

Tablica 3. Sažeti prikaz provedenih istraživanja virusa EBLV-1 i EBLV-2 te patogeneze u šišmiša. i.c. – inrakranijalno, i.m. – intramuskularno, i.n. – intranazalno, s.c. – subkutano, s.d. – subdermalno, i.d. – intradermalnim ogrebom, p.o. – peroralno, ES – kasni noćnjak, MD – riječni šišmiš, EF – veliki smeđi šišmiš (lat. *Eptesicus fuscus*). Prema Franka i sur., 2008., Freuling i sur., 2009., Johnson i sur., 2008., Fooks i sur., 2009.

Vrsta šišmiša	**Virus korišten za inokulaciju**	**Načini inokulacije**	**Načini inokulacije koji je rezultirao bjesnoćom(n pozitivnih od ukupno inokuliranih)**	**Prisutnost protutijela**	**Virus u slini**
ES	EBLV-1a	i.c. i.m. i.n. s.c.	i.c. (5/5) i.m. (1/7) s.c. (3/7)	ne	Da, nakon s.c.
MD	EBLV-2	i.c. i.n. i.m. s.d.	i.c. (5/5) s.d. (1/7)	ne	Da nakon s.d.
EF	EBLV-1a	i.n. p.o. i.d.		Da (i.d. i i.m.)	Da
EF	EBLV-1	i.c. i.m. p.o. i.n.	i.c. (4/6) i.m. (7/14)	Da (p.o. i i.n.)	Da

Nadalje, jedino istraživanje virusa EBLV-1 i njegovog rezervoara nije potvrdilo da su noćnjaci subklinički nosioci kao ni prisutnost virusa u oralnom obrisku ili žlijezdama

slinovnicama u odsustvu infekcije SŽS (Freuling i sur., 2009.). Također, istraživanja su ukazala da subkutana inokulacija vrlo vjerojatno oponaša način prijenosa bolesti među domaćinima jer je učinkovita u izazivanju mortaliteta i izlučivanja virusa u slini neposredno prije razvoja bolesti (Banyard i sur., 2013., Freuling i sur., 2009., Franka i sur., 2008.). Šišmiši koji prežive eksperimentalnu infekciju trebaju se smatrati kao slučajevi neuspjele infekcije (Banyard i sur., 2013.).

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdile okolnosti pod kojima se razvijaju neurološki znakovi bolesti, odnosno imunosni odgovor s uklanjanjem virusa prije nego uzrokuje kliničku bjesnoću (Banyard i sur., 2013., Baker i Zhou, 2015.). Iako istraživanja pokazuju da virus EBLV-1 pokazuje malo genomskih varijacija u usporedbi s virusom RABV (Marston i sur., 2007.), promjena samo jedne baze u genomu je dovoljna da se od patogenog dobije jako atenuirani uzročnik te da umjesto infekcije nastupi imunizacija (Wunner i Conzelmann, 2013.). Također, serokonverzija može biti posljedica izlaganja virusu putem aerosola, ponovljenih izlaganja niskim dozama virusa ili neuspjele infekcije (Johnson i sur., 2010.). Za nerođene i sisajuće šišmiše se pretpostavlja da ih štite majčina protutijela i to šest do 10 tjedana po rođenju. Istovremeno, dok ih još štiti pasivna imunost, mladunci su izloženi virusu, protiv kojega postupno stvaraju protutijela koja bi trebala pružati dugotrajnu zaštitu. Za mladunce koji ipak uginu od bjesnoće pretpostavlja se da su rođeni od neimune majke. Tako da iako virus imunizira većinu populacije, ipak ostaje dovoljno neimunih jedinki koje virusu omogućavaju opstanak unutar kolonije (Constantine, 2009.).

Virus EBLV-1 se rijetko prenosi na kopnene sisavce. Istraživanja ukazuju na njegovu evolucijsku stabilnost ($5x10^5$ supstitucija po mjestu po godini) s malo genomskih varijacija što može utjecati na prijenos virusa i njegovo širenje među rezervoarom, ali i ograničiti kapacitet prelaska vrsne barijere i patogenost (Banyard i sur., 2013.). Pet slučajeva infekcije virusom EBLV-1 je zabilježeno u ovaca u Danskoj (Tjørnehøj i sur., 2006.), jedan u kune bjelice u Njemačkoj (Müller i sur., 2004.) i dva slučaja u domaće mačke u Francuskoj (Dacheux i sur., 2009.). Ovako mali broj slučajeva može biti i posljedica ograničene prijemljivosti nekih kopnenih sisavaca za virus EBLV-1 (Banyard i sur., 2013.). Na temelju eksperimenata je zaključeno da je virus EBLV-2 manje virulentan u životinjskom modelu miša, ovce i lisice u usporedbi s virusom EBLV-1, a oba su manje virulentna nego virus RABV (Johnson i sur.,

2008.). Nisu zabilježeni slučajevi infekcije virusom EBLV-2 u drugih životinjskih vrsta (Kuzmin i Rupprecht, 2015.).

Iako većinu slučajeva bjesnoće u čovjeka uzrokuje virus RABV koji cirkulira među psima, i lyssavirusi europskih šišmiša mogu također uzrokovati bolest u ljudi te je zabilježeno pet smrtnih slučajeva. Virus EBLV-1 je uzrokovao jednu, virus EBLV-2 dvije smrti, a u druga dva slučaja uzročnik nije identificiran, ali kako je šišmiš nanio ozljede pretpostavlja se da se radi o jednom od ova dva virusa (Tablica 4) (Jackson, 2013a).

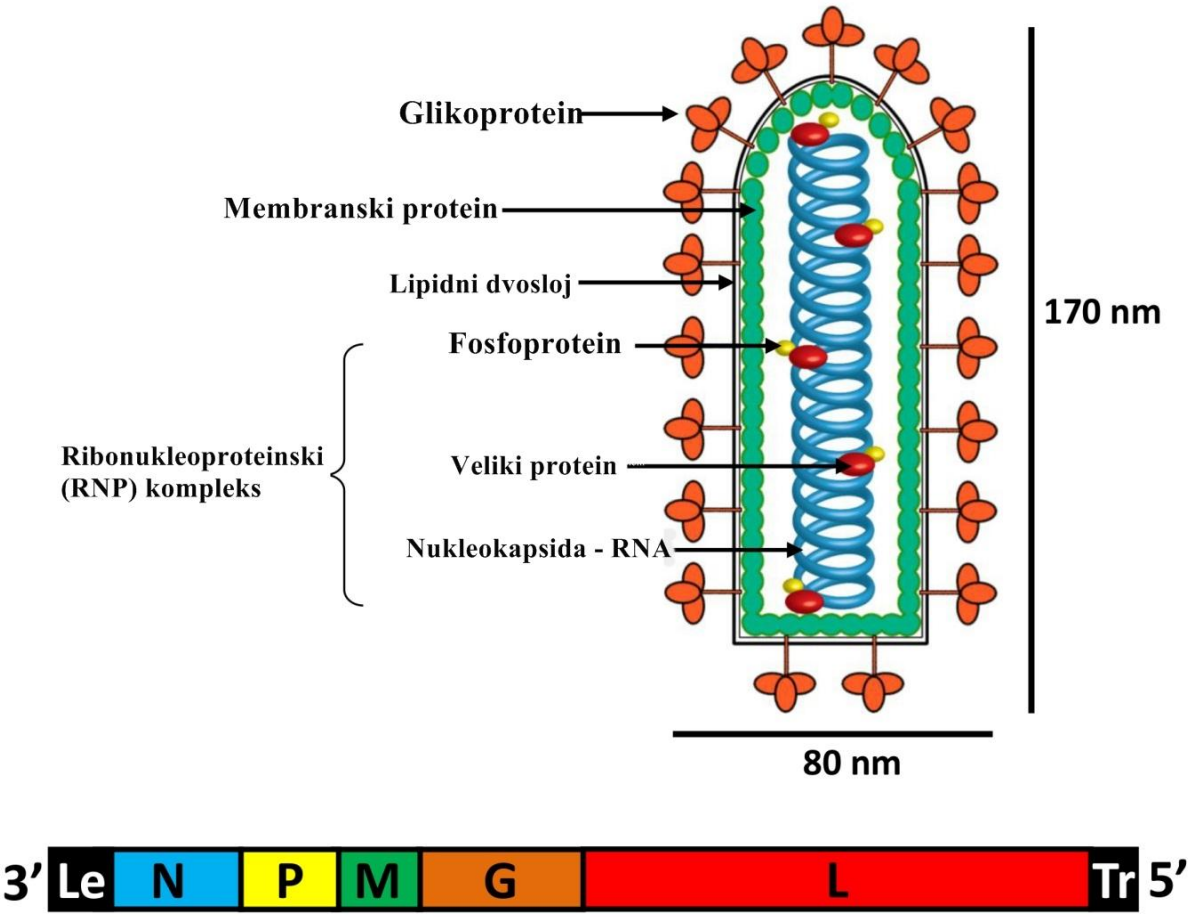
Tablica 4. Slučajevi bjesnoće šišmišjeg podrijetla kod ljudi u Europi. Prema Banyard i sur., 2013.

Godina	**Država**	**Virus**	**Šišmiš**
1977.	Ukrajina	Nije dostupan za karakterizaciju	Nije identificiran
1985.	Rusija	EBLV-1 (Yuli virus)	Nije identificiran
1985.	Finska	EBLV-2	Nije identificiran
2002.	Ukrajina	Nije dostupan za karakterizaciju	Nije identificiran
2002.	Škotska	EBLV-2	*M. daubentonii*

Mnoge europske vrste šišmiša su vrlo male pa je hiropterolozima (stručnjaci za šišmiše) teško rukovati s njima u rukavicama te ih uglavnom ne koriste i izlažu se riziku da budu ugriženi. K tome, neki hiropterolozi nemaju suradnju s istraživačima bjesnoće i nemaju odgovarajuće informacije o prevalenciji bolesti i prevenciji infekcije. Ugrizi šišmiša mogu biti mali i površinski te stoga zanemareni ili neprepoznati rezultirajući kriptičkom bjesnoćom (engl. *small vector hypotesis*) (Johnson i sur., 2006.). U dijelovima svijeta s niskom incidencijom bjesnoće (poput SAD, Kanade i Europe), bolest se često ne uvrsti na listu diferencijalnih dijagnoza akutnih neuroloških poremećaja, osobito ako u anamnezi nije naveden ugriz. U slučaju bjesnoće pogrešna dijagnoza se postavlja u 60,7% slučajeva, a tada u 70% slučajeva bjesnoće podrijetla šišmiša i 35% slučajeva one psećeg podrijetla nije naveden ugriz (Udow i sur., 2013.). Dakle, šišmiši u Europi predstavljaju malu, ali neporecivu prijetnju ljudskom zdravlju (Fooks i sur., 2009.).

2.5.4 Građa lyssavirusa

Lyssavirusi su oblika metka, dužine 100 do 300 nm i promjera od 60 do 100 nm. Virusna čestica se sastoji od dvije strukturne i funkcionalne jedinice: unutarnje nukleokapside i vanjske ovojnice (envelope) (Slika 8). Nukleokapsidu sačinjava ribonukleoproteinski (RNP) kompleks koji se sastoji od genomske RNA te proteina N, L i P (Slika 8). Genomska RNA je otprilike duga 12 kilobaza, nesegmentirana, linearna, negativnog smisla i jednolančana (Wunner i Conzelmann, 2013.). Genomska RNA nije infektivna jer joj nedostaje 5' kapa i 3' poli(A) rep. Otprilike 50 nukleotida na 3' i 5' kraju (tzv. *leader* (Le) i *trailer* (Tr) sekvence) (Slika 8) sadrži cis-djelujuće kontrolne elemente (engl. *cis-acting sequences*) koje imaju ulogu transkripcijskog i replikacijskog promotora i signala za inkapsidaciju genoma i antigenoma tijekom replikacije. Pet virusnih gena dolazi u strogo očuvanom redoslijedu (3' prema 5'): nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), membranski protein (M), glikoprotein (G) i RNA-ovisna RNA-polimeraza ili veliki protein (L) (Slika 8) (Lyles i sur., 2013.).



Slika 8. Građa viriona lyssavirusa. Glikoprotein izaziva stvaranje neutralizacijskih protutijela čija se prisutnost ispituje serološkim metodama, a gen za nukleoprotein se dokazuje lančanom reakcijom polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju ili imunofluorescencijskim testom. Preuzeto: https://ai2-s2-public.s3.amazonaws.com/figures/2017-08-08/31c3c42e041542c373641e9eef452e13264431db/3-Figure1-1.png.

Lipidna ovojnica (dvosloj) (Slika 8) potječe od domaćinove citoplazmatske membrane tijekom pupanja virusa iz stanice.

Pet virusnih gena kodira pet strukturnih proteina. Dva strukturna proteina, G i M, su povezana s lipidnom ovojnicom koja okružuje kompleks RNP (Slika 8).

Glikoprotein (protein G) (dug 5 –10 nm, promjera 3 nm) se translatira s G-mRNA koja kodira 524 aminokiseline uključujući i N-terminalni signalni peptid od 19 aminokiselina. Uloga signalnog peptida je usmjeravanje glikoproteina na put „grubi endoplazmatski retikulum – Golgijev aparat – plazmatska membrana“ prije nego bude uklonjen u Golgijevom aparatu.

Također, u Golgijevom aparatu glikoprotein je organiziran u trimere (tri monomera svaki po 65 kDa). Glikoprotein ima N-terminalnu ektodomenu koja se pruža kroz virusnu ovojnicu te je jedini vanjski virusni protein (Wunner i Conzelmann, 2013.) (Slika 8), transmembransku domenu i C-terminalnu domenu u citoplazmi. Između 300 i 400 ektodomena glikoproteina je odgovorno za prihvaćanje viriona za stanične receptore domaćina i njegov ulazak u stanicu, za fuziju virusne ovojnice s endosomalnom membranom induciranu niskim pH. Glikoprotein je ključan za indukciju humoralnog imunosnog odgovora, meta je virus neutralizacijskih protutijela i virus specifičnih citotoksičnih i pomoćničkih T-limfocita. Glavna je odrednica patogenosti, a zamjena samo jedne aminokiseline može drastično oslabiti virulenciju virusa bjesnoće (Xiang i Ertl, 2013.). C-terminalna domena u citoplazmi s proteinom M sudjeluje u završnom sklapanju viriona.

Membranski protein (protein M) je najmanji virusni protein građen od 202 aminokiseline (25 kDa) te se između 1200 do 1500 kopija ovog proteina veže za kompleks RNP. Membranski protein je smješten između nukleokapside i ovojnice (Slika 8), skraćuje nukleokapsidu interakcijama s proteinom N te daje krutost virusnoj strukturi (tzv. virusni kostur) i osigurava platformu za vezanje glikoproteina i ovojnice. Posreduje u vezanju nukleokapside za membranu domaćina gdje započinje proces pupanja (Wunner i Conzelmann, 2013.).

U kompleksu RNP je nukleoprotein najzastupljeniji (1325 ili 1800 kopija), a slijedi ga fosfoprotein (691 ili 950 kopija) i RNA-ovisna RNA-polimeraza (25 ili 72 kopije).

Nukleoprotein (protein N) RABV sadrži 450 aminokiselina (~57 kDa) i reagira s RNA te proteinima L i P (Slika 8). Iako je aminokiselinska sekvenca nukleoproteina najočuvanija među lyssavirusnim proteinima, unutar nje postoji i veliki stupanj raznolikosti između genotipova. Naime, aminokiselinska sekvenca mora biti dovoljno očuvana kako bi se zadržale ključne funkcije proteina nužne za interakciju s RNA. Istovremeno, razlika u amiokiselinskim sekvencama osigurava epitope specifične za genotip koji određuju antigenske veze između virusnih sojeva unutar i između genotipova (Wunner i Conzelmann, 2013.). Nukleoprotein virusa RABV funkcionira kao egzogeni superantigen što znači da može nespecifično aktivirati T- ili B-limfocite vezanjem za njihove receptore i rezultira poliklonalnom aktivacijom i otpuštanjem citokina (Banyard i sur., 2013.).

Fosfoprotein (protein P) RABV sadrži 297 aminokiselina (38 kDa) i najmanje je očuvan od pet proteina RABV. Ovaj protein stabilizira protein L i posreduje u njegovom pravilnom pozicioniranju na kalup protein N-RNA. Također, ima ulogu šaperona prilikom sinteze nukleoproteina formirajući N-P komplekse koji sprječavaju stvaranje nakupina nukleoproteina ili njegovo vezanje za staničnu RNA. Fosfoprotein može reagirati sa staničnim transportnim sustavom i olakšati unutarstanično kretanje sastavnica viriona. Također interferira s urođenim imunosnim odgovorom inhibirajući različite korake interferonskog odgovora stanice (Wunner i Conzelmann, 2013.).

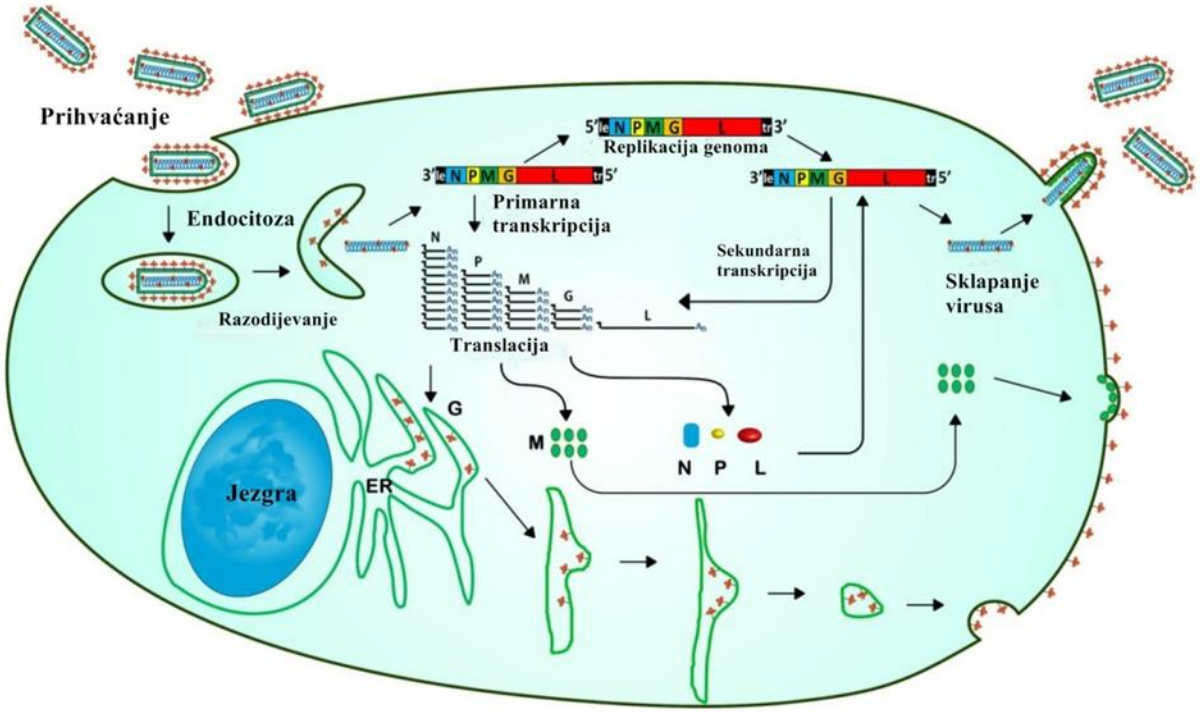
Protein L virusa RABV sadrži 2142 aminokiseline (244 kDa) i gen koji ga kodira zauzima 54% genoma virusa RABV (Slika 8). Protein L je katalitička komponenta polimeraznog kompleksa, a zajedno s nekatalitičkom komponentom, kofaktorom P, je važan za replikaciju i transkripciju virusnog genoma. Protein L ima šest očuvanih regija koje se označavaju CRI do CRVI, a RNA-ovisna RNA-polimeraza se nalazi u regiji CRIII (Lyles i sur., 2013.).

2.5.5 Patogeneza bjesnoće

Trenutno se smatra da se u određenoj mjeri virus RABV replicira u mišićnim vlaknima na mjestu inokulacije ugrizom. Mišićna vlakna su povezana sa živčanim vlaknima u neuromuskularnom spoju gdje se nalaze stanični receptori koji omogućuju virusu ulazak u senzorna i motorička vlakna perifernih živaca. Prihvaćanje za receptore je posredovano virusnim glikoproteinom. Nekoliko je vjerojatnih receptora za koje se virus prihvaća. Jedan od njih je nikotinski acetilkolinski receptor (nAChR) koji se nalazi u neuromuskularnom spoju. Kao druge dvije mogućnosti predloženi su receptori CD56 ili NCAM (engl. *neural cell adhesion molecule*) i *low-affinity p75 neurotrophin receptor* (engl.) ili $p75^{NTR}$ (Wunner i Conzelmann, 2013., Lyles i sur., 2013.).

Nakon što se vezao za receptor, virus je unesen u stanicu endocitozom. Unutar endocitoznih vezikula virus se prenosi retrogradnim aksonalnim transportom ovisno o mreži mikrotubula, koristeći dineine (Wunner i Conzelmann, 2013.). Endocitozne vezikule se stapaju s ranim endosomima čija unutrašnjost ima kiseli pH koji posreduje konformacijske promjene glikoproteina koje dovode u neposrednu blizinu virusnu ovojnicu i endosomalnu membranu te slijedi njihova fuzija. Kompleks RNP se otpušta u citoplazmu (raspakiravanje, engl. *uncoating*), gdje dolazi do transkripcije i replikacije (Banyrad i sur., 2013., Wunner i Conzelmann, 2013.).

Virusni protein M se odvaja s nukleokapside (Lyles i sur., 2013.), a genomska RNA služi kao kalup za primarnu transkripciju (transkripcija s roditeljskog kalupa) koju obavljaju proteini L i P. Transkripcija svakog gena ovisi o transkripciji prethodnog, a zastupljenost svakog proteina ovisi o njegovoj udaljenosti od 3' kraja genoma (atenuacija ili prigušivanje transkripcije). Pet gena genomske RNA se prepisuje u pet pozitivnih monocistronskih mRNA i pozitivan antigenom koji služi kao kalup za replikaciju genoma potomstva negativnog smisla. Translacija proteina N, P, M i L obavlja se na slobodnim ribosomima u citoplazmi, a proteina G na ribosomima vezanim za membranu endoplazmatskog retikuluma. Neki N-P kompleksi tvore intracitoplazmatske uklopine (Negrijeva tjelešca) (Slika 4), a neki inkapsidiraju genom i antigenom. Nakon što je genom potomstva inkapsidiran kompleksom N-P te je ugrađen L nastaje kompleks RNP potomstva za koji se veže protein M i kondenzira ga. Protein M zajedno s proteinom G usidrenim u staničnu membranu posreduje u sklapanju (engl. *assembly*) viriona. Novonastale virusne čestice pupaju (engl. *budding*) i otpuštaju se u sinaptičku pukotinu i nastavljaju putovati prema središnjem živčanom sustavu (Slika 9). Na ovaj način se izbjegava ili ograničava domaćinov urođeni i rani stečeni imunosni odgovor. Protutijela se ne stvaraju ili se stvaraju u kasnom kliničkom stadiju bolesti, kada se virus rasprostranjuje u periferne organe (Kuzmin i Rupprecht, 2015.). Uz to, protein P blokira interferonski signalni put u inficiranoj stanici. Virus RABV putuje perifernim živcima prema središnjem živčanom sustavu brzinom od 50 do 100 mm na dan (Warrell i Warrell, 2004.). Kad jednom stigne u SŽS, virus se vrlo brzo proširi po njemu, a iz produžene moždine se transportira u slinovnice i druga tkiva. Virioni se javljaju u slini obično tijekom kliničkog perioda bolesti, ali se mogu utvrditi i pred kraj inkubacijskog razdoblja. Tako se u pasa, mačaka i pitomih vretica (fereta) virus može utvrditi 10 dana prije očitovanja kliničkih znakova, a u šišmiša i drugih divljih životinja to razdoblje može biti i dulje. Promjena ponašanja (agresija, sklonost griženju) i otpuštanje viriona u slinu osigurava prijenos bjesnoće na drugu prijemljivu jedinku (Kuzmin i Rupprecht, 2015.). Rasprostranjivanje virusa iz središnjeg živčanog sustava u druga tkiva je sporo, javlja se tijekom kasnog stadija bolesti isključivo neuralnim putem i to pasivnom difuzijom te dovodi do infekcije neživčanih tkiva poput mišićnih vlakana, kože, dlačnih folikula, dijelova oka, srčanog mišića, pluća i abdominalnih organa (Rossiter i Jackson, 2013., Kuzmin i Rupprecht, 2015.).



Slika 9. Pojednostavljeni prikaz replikativnog ciklusa virusa bjesnoće u stanici. Prvi stadij uključuje vezanje i ulazak virusa u stanicu endocitozom (1). Slijedi raspakiravanje (2), transkripcija, replikacija i translacija (3) te sklapanje, pupanje i otpuštanje viriona koji mogu započeti novi ciklus. ER – endoplazamatski retikulum, G, M, N, P, L – virusni proteini. Preuzeto: https://www.intechopen.com/books/methylation-from-dna-rna-and-histones-to-diseases-and-treatment/messenger-rna-cap-methylation-in-vesicular-stomatitis-virus-a-prototype-of-non-segmented-negative-se.

2.5.6 Klinička slika bjesnoće

Klinička slika u inficiranih životinja i ljudi uglavnom je kratka i traje jedan do 10 dana. U prodromalnom stadiju su klinički znakovi nespecifični i uključuju vrućicu, slabost i ponekad znakove nalik gripi. Ljudi često osjećaju paresteziju (poremećaj u osjetima na površini tijela) i trnce na mjestu ugriza (WHO, 2013.). S napredovanjem bolesti i razvojem encefalitisa javljaju se neurološki simptomi.

Dva su glavna klinička oblika bjesnoće: agresivini (furiozni) i paralitički. Ljudi i životinje s furioznim oblikom bolesti su uznemireni i agresivni, a moguće je uočiti i proširene zjenice, izmijenjeno glasanje, besciljno lutanje i hiperaktivnost, slinjenje i mišićni spazam. U ljudi se često javljaju nesanica, razdražljivost, tjeskoba, halucinacije i delirij. Iako se smatraju

karakterističnim simptomima bjesnoće, hidrofobija, aerofobija, fotofobija i fonofobija se javljaju u do 50% oboljelih. U paralitičkom obliku bolesti od samoga početka izraženije su pareza i paraliza. S progresijom oštećenja SŽS-a, oboljeli postaju komatozni i umiru, obično uslijed zatajenja srca ili disanja (WHO, 2013., Jackson, 2013a).

Klinički period u eksperimentalno inficiranih šišmiša je iznosio jedan do osam dana. Klinički znakovi u šišmiša su rijetko zabilježeni i temelje se na opažanjima u životinja iz rehabilitacijskih centara ili nakon eksperimentalnih infekcija. Znakovi bolesti uključuju nesposobnost letenja, smanjen unos hrane i vode, gubitak tjelesne težine, slabost, preosjetljivost na zvukove visoke frekvencije, vokalizaciju, uzbuđenost, sklonost griženju i agresivnost. Moguća je i potpuno drukčija netipična klinička slika (Banyard i sur., 2013.).

2.5.7 Patohistološke promjene

Makroskopske lezije inficiranog SŽS-a uglavnom izostaju, a ako su prisutne uključuju hiperemiju i blagi edem mozga, kongestiju leptomeninga i parenhima s petehijama (Rossiter i Jackson, 2013.).

Mikroskopske lezije u inficiranom SŽS-u su uglavnom vrlo blage i uključuju mikroglijozu ili neuronofagiju (nakupljanje mikroglije (rezidentni makrofazi) koji fagocitiraju degenerirane i umiruće neurone) i perivaskularnu infiltraciju limfocita, makrofaga i plazma stanica, dok su moždane ovojnice rijetko zahvaćene. U citoplazmi inficiranih neurona mogu se uočiti Negrijeva tjelešca (Slika 4) (Rossiter i Jackson, 2013.).

2.5.8 Dijagnostika bjesnoće

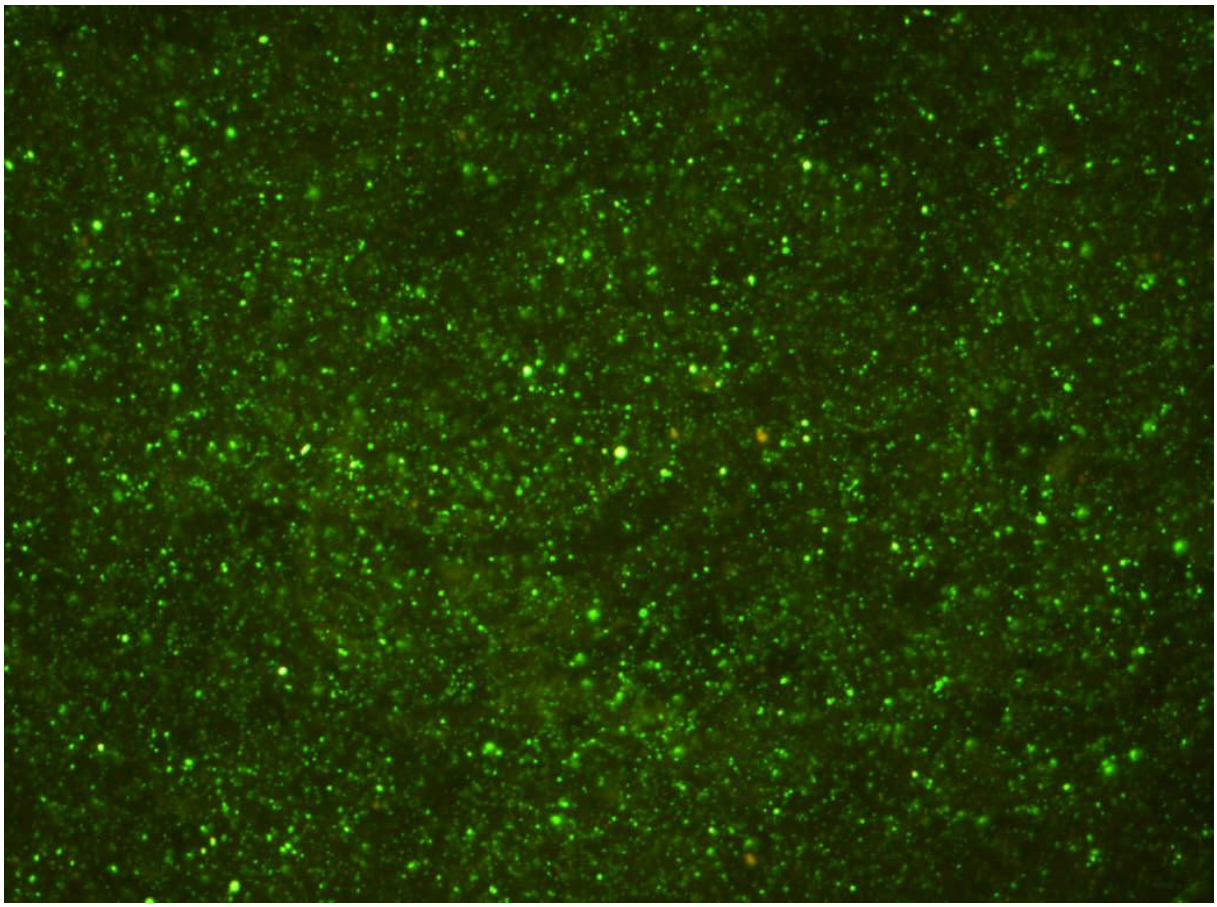
Kliničkim pregledom moguće je tek postaviti sumnju na bjesnoću jer znakovi bolesti nisu specifični. Pouzdana i konačna dijagnoza se postavlja laboratorijskim testovima. Kako su lyssavirusi neurotropni patogeni, moždano tkivo je jedino prikladno za pouzdano utvrđivanje prisutnosti virusa u ljudi i životinja pa se konačna dijagnoza može postaviti samo nakon smrti. Biološke tekućine (slina, suze, cerebrospinalna tekućina) i tkiva (biopsati kože i dlačnih folikula s potiljka) se mogu koristiti za zaživotnu dijagnostiku u ljudi, dok se u životinja ona ne primjenjuje (WHO, 2013.). Budući da je opisan prijenos bjesnoće transplantacijom organa, svi donori s encefalitisom trebali bi također biti testirani (Banyard i sur., 2013.).

Moždano tkivo se prikuplja kroz zatiljni otvor (lat. *foramen occipitale*) ili retroorbitalnim putem. Moždana struktura izbora je talamus koji je pozitivan u svim slučajevima, a preporučljivo je napraviti skupni uzorak od više dijelova mozga (OIE, 2018.).

Uzorci bi trebali biti dostavljeni u laboratorij brzo uz poštivanje hladnog lanca transporta. Ukoliko tijekom transporta nije moguće održati hladni lanac može se primijeniti formalin ili smjesa 50% glicerola u puferiranoj otopini fosfatnih soli (engl. *phosphat buffer saline*, PBS). Formalin inaktivira virus pa izolacija virusa više neće biti moguća, a morat će se primijeniti modificirane i manje osjetljive metode. Smjesa glicerola i PBS-a neće inaktivirati virus pa se mogu izvesti svi testovi, štitit će uzorak od putrefakcije, ali ne i od temperature pa je moguć pad titra virusa. Također, za transport uzoraka na daljnju molekularnu karakterizaciju mogu se koristiti i papiri koji čuvaju virusnu RNA, pa se uzorak može transportirati pri okolišnoj temperaturi bez potrebe za biosigurnosnim mjerama (OIE, 2018.).

Imunokemijska identifikacija virusnog antigena obuhvaća imunofluorescencijski test (engl. *flourescent antibody test*, FAT), imunoperoksidazni test, enzimski imunotest (engl. *Enzyme -Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) i izravni brzi imunohistokemijski test (engl. *Direct rapid immunohistochemistry test*, dRIT). Zlatni standard u dijagnostici bjesnoće je FAT, koji preporučuju WHO i OIE (Slika). Test je specifičan, osjetljiv i jeftin, ali zahtjeva uporabu fluorescentnog mikroskopa i stručno osoblje (OIE, 2018.).

Dostupne su i različite molekularne metode poput lančane reakcije polimerazom (PCR) uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-qPCR). Korisne su za potvrdu dijagnoze i kao prvi korak u tipizaciji virusa, a od svibnja 2018. godine su preporučene metode prema OIE (OIE, 2018.).



Slika 10. Pozitivan imunofluorescencijski test (FAT). Zelene fluorescentne točke odgovaraju virusu bjesnoće u mozgu zaražene ovce. Fotografija je objavljena u Šoštarić i sur., 2010. Originalna fotografija ustupljena ljubaznošću dr.sc. Branka Šoštarić.

Sposobnost umnožavanja virusa bjesnoće utvrđuje se inokulacijom tkivne suspenzije na stanične kulture (engl. *rabies tissue culture inoculation test*, RTCIT) ili u laboratorijske životinje (miševe) (engl. *mouse inoculation test*, MIT). Ovi testovi se koriste ukoliko je rezultat metode FAT i PCR dvojben. Prednost se daje uzgoju virusa na staničnim kulturama. Obično se rade tri uzastopne pasaže kako bi se potvrdio negativan rezultat. Stanične linije koje se uobičajeno koriste su stanice mišjeg neuroblastoma i bubrega hrčka (engl. *Baby hamster kidney*, BHK-21). U testu MIT se koristi tri do deset miševa starih dva dana ili tri do četiri tjedna koji se inokuliraju intracerebralno pročišćenim supernatantom homogeniziranog mozga. Miševi se promatraju svakodnevno tijekom 28 dana (OIE, 2018.). U Laboratoriju za bjesnoću i opću virologiju HVI-a primjenjuje se test RTCIT.

Histološka identifikacija intracitoplazmatskih Negrijevih tjelešaca (Slika 4) se više ne primjenjuje zbog niske osjetljivosti (OIE, 2018.).

Serološke metode se rijetko koriste u epidemiološkim istraživanjima zbog kasne serokonverzije i visokog mortaliteta. Primjenjuju se za utvrđivanje humoralnog odgovora nakon cijepljenja domaćih životinja, a prije međunarodnih putovanja ili u populacijama divljih životinja poput lisica nakon oralne imunizacije ili šišmiša. Neutralizacijska protutijela se smatraju ključnim sastavnicama stečenog imunosnog odgovora protiv virusa bjesnoće pa su virus neutralizacijski testovi (VNT) metoda izbora (engl. *Fluorescent Antibody Virus Neutralisation Test*, FAVN i *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test*, RFFIT). Dostupan je i neizravan ELISA test (OIE, 2018.).

Kako su europske vrste šišmiša zaštićene te nije dozvoljeno njihovo ubijanje, moždano tkivo je dostupno samo od uginulih jedinki pa se prisutnost virusa nastoji utvrditi u obriscima usne šupljine metodama RT-PCR i RTCIT. Za utvrđivanje prisutnosti protutijela koriste se testovi FAVN i RFFIT.

2.5.9 Prevencija bjesnoće

U sprječavanju bjesnoće u ljudi primjenjuje se preekspozicijska i postekspozicijska profilaksa.

Preekspozicijska profilaksa (PreP) se primjenjuje u visokorizičnih skupina, poput hiropterologa, veterinara, lovaca, speleologa i laboratorijskog osoblja, kako bi se potaknulo stvaranje protutijela prije doticaja s lyssavirusima. Imunizacijski protokol uključuje tri doze inaktiviranog cjepiva i to 0., 7. i 28. dan, a serološka procjena imunizacije (RFFIT-om, FAVN-om) radi se jedan do tri tjedna nakon zadnje doze cjepiva i provjerava se svakih šest mjeseci u slučaju laboratorijskog osoblja. Ponovljena preekspozicijska profilaksa se daje kada titar padne ispod 0,5 internacionalnih jedinica po mililitru (IU/ml) seruma. Ukoliko nema serološkog praćenja, ponovljeno cijepljenje se provodi nakon jedne godine i zatim za jednu do tri godine (WHO, 2013., OIE, 2018.).

Postekspozicijska profilaksa (PEP) se primjenjuje u ljudi koje je ugrizla bijesna životinja ili ukoliko nije moguće utvrditi status životinje obzirom na bjesnoću. Uz obradu rane, postekspozicijska profilaksa obuhvaća i korištenje inaktiviranog cjepiva protiv bjesnoće i

humanog antirabičnog imunoglobulina (engl. *human rabies immunoglobulin*, HRIG) koji se injektira u okolinu ugrizne rane kako bi spriječio umnožavanje virusa dok se ne stvore protutijela (WHO, 2013.). Savjetodavno povjerenstvo za primjenu imunizacije (engl. *Advisory Committee on Immunization Practices*) i WHO preporučuju da se u ljudi razmotri postekspozicijska profilaksa kada se ugriz šišmiša ne može isključiti (zbog opasnosti od kriptičke bjesnoće) i kada šišmiš nije dostupan za testiranje na bjesnoću (Kuzmin i Rupprecht, 2015.).

U Hrvatskoj je zakonski obvezno cijepljenje pasa protiv bjesnoće jednom godišnje, a za mačke i ferete postoji preporuka. Druge domaće životinje cijepe se ovisno o epidemiološkoj situaciji (Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti).

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Popis kemikalija

- Otopina za čuvanje nukleinskih kiselina *DNA/RNA Shield* (Zymo Research, Irvine, Kalifornija)
- Medij za staničnu kulturu *Dulbecco's modified Eagle's medium – high glucose* (Sigma – Aldrich, St. Louis, Missouri)
- Goveđi serum *Fetal Bovine Serum* (Gibco, US origin, Paisley, UK)
- Otopina antibiotika i antimikotika *Antibiotic Antimycotic Solution (100x), Stabilized* (Sigma – Aldrich, St. Louis, Missouri)
- Komplet reagenasa za izolaciju virusnih nukleinskih kiselina *iPrep PureLink Virus Kit* (Invotrogen, Carlsbad, Kalifornija)
- Komplet reagenasa za konvencionalni PCR *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija)
- Agaroza *UltraPure Agarose* (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija)
- Pufer za otapanje agaroze *AccuGENE TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer (50x)* (Lonza, Verviers, Belgija)
- Interkalirajuća boja za označavanje nukleinskih kiselina *Gel Star Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, Rockland, Maine)
- Pufer za nanošenje uzorka *Blue Juice Gel Loading Buffer (10x)* (Invitrogen, Vilnius, Litva)
- Komplet reagenasa za reakciju PCR u stvarnom vremenu *Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Enzim DNaza *Recombinant DNase I (RNase free)* (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan)
- Inhibitor RNaza *RiboGuard RNase Inhibitor* (Epicentre Illumina, Madison, Wisconsin)
- Etilendiamintetraoctena kiselina *0,5 M EDTA, AccuGENE* (Lonza, Basel, Švicarska)
- Magnetske kuglice *AgenCourt RNA clean XP* (Beckman Coulter, Beverly, Massachusetts)
- Alkohol *Ethanol absolute puriss. p.a.* (Honeywell, Seelze, Njemačka)

- Komplet reagenasa za sintezu komplementarne DNA *cDNA Synthesis System* (Roche, Mannheim, Njemačka)
- Nasumične početnice *Random primer* (50 µg/mL) (Promega, Madison, Wisconsin)
- Početnice *Oligo(dT)$_{15}$ primer* (50 µg/mL) (Promega, Madison, Wisconsin)
- Komplet reagenasa za pročišćavanje nukleinskih kiselina *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Komplet reagenasa za određivanje koncentracije DNA *Qubit dsDNA HS Assay Kits*
- Elucijski pufer *EB 10 mM Tris-Cl*, pH 8,5 (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Komplet reagenasa *Nextera XT DNA Library Prep Kit* (Illumina, San Diego, Kalifornija)
- Natrijev hidroksid *Sodium Hydroxide 1.0N Solution* (Sigma-Aldrich, St.Louise, Missouri)
- Komplet reagenasa za sekvenciranje *MiSeq reagent Nano kit v.3* (Illumina, San Diego, Kalifornija)
- Tripsin *Trypsin-EDTA Solution* (Sigma – Aldrich, St. Loiuse, Missouri)
- Aceton *Aceton pro analysi* (GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska)
- Tripansko modrilo *Trypan Blue* (Sigma – Aldrich, St. Louise, Missouri)
- Obilježena monoklonska protutijela *FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin* (FUJIREBIO Diagnostics, Seguin, Teksas)
- Kontrola bibilioteke *Phix control kit v.3* (Illumina, San Diego, Kalifornija)
- Puferirana otopina fosfatnih soli *Phosphat buffer saline* (PBS, priprema se u Laboratoriju za sterilizaciju HVI-a)
- WHO standard *Rabies Immunoglobulin* (WHO International Laboratory for Biological Standards, Copenhagen, Danska)

3.2 Popis pribora i aparature

- ručne mreže za hvatanje šišmiša (engl. *hand nets*)
- mreže za hvatanje šišmiša (engl. *mist nets*)
- sterilni štapić za obriske (*ClassiqSwabs*, Copan, Murrieta, Kalifornija)
- epruvete (*Safe-Lock Tube 2,00 ml*, Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- epruvete u nizu (*PCR Tube strip 0,2 ml*, Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- igle (*26 G, BD Microlance 3*, Becton, Dicinson and Co Ltd., Drogheda, Irska)
- filter papiri (*Mini Trans – Blot Filter paper*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija)

- drvena lopatica (*AYRE wood spatula*, Deltalab, Barcelona, Španjolska)
- laboratorijska žlica (*Laboratory spatulas*, Deltalab, Barcelona, Španjolska)
- epruvete (*EUROTUBO 50 ml conical tubes*, Deltalab, Barcelona, Španjolska)
- automatska tresilica (*Corning LSE*, Corning, New York)
- mikrocentrifuga (*MIKRO 200* Hettich, Tuttlingen, Njemačka)
- 0,22 µm filtri (*Millex - GP* Merck Millipore Ltd, Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Irska)
- uređaj za izolaciju nukleinskih kiselina (*iPrep Purification Instrument*, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija)
- uređaj za konvencionalni PCR (*Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler*, Foster City, Kalifornija)
- uređaj za kvantitativni PCR (*Rotor-Gene Q*, Qiagen)
- uređaj za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina (*Qubit Fluorometer*, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija)
- ploča (*Eppendorf*, Hamburg, Njemačka)
- uređaj za konvencionalni PCR (*T Professional basic Thermocycler gradient*, Biometra, Gottingen, Njemačka)
- plastična posuda (*Loading reservoar*, Qiagen, Hilden, Njemačka)
- magnetni stalak (*Ambion RNA*, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija)
- stalak za hlađenje (*Isofreeze Rack with temperature indicator*, Deltalab, Barcelona, Španjolska)
- ploča (*96 deep well plate*, Deltalab, Barcelona, Španjolska)
- termoblok (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts)
- uređaj za sekvenciranje nove generacije (*Miseq Illumina*, San Diego, Kalifornija)
- termostat
- pipete
- Neubauerova komorica (Assistent, Sondheim/Rhön, Njemačka)
- boce za staničnu kulturu (*Nunc EasYFlask 25 cm*^{2} i *75 cm*^{2}, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Danska)

- mikrotitracijska ploča s 96 jažica (*Nunclon Delta Surface*, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Danska)

  imunofluorescencijski mikroskop (*Olympus BX 51*, Tokijo, Japan).

3.3 Biološki uzorci

Ovaj doktorski rad je izrađen u sklopu Uspostavnog istraživačkog projekta „Aktivni nadzor bjesnoće u šišmiša – bitan faktor za procjenu buduće prijetnje“ (BatsRabTrack) sufinanciranog od HRZZ-a.

Prikupljanje uzoraka od šišmiša odobreno je Rješenjem Ministarstva zaštite okoliša i energetike (Klasa UP/I-612-07/16-48/163 i UP/I-612-07/15-48/132). Rješenjem je dozvoljeno namjerno uznemiravanje i sakupljanje uzoraka iz dviju porodica šišmiša, *Rhinolophidae* (zecousnjaci) (1.) i *Vespertilionidae* (glatkonosci) (2. – 7.), i to sljedeće vrste (Slika 11):

1. *Rhinolophus ferrumequinum* (lat.) (RF) – veliki potkovnjak, engl. *Greater Horseshoe bat*
2. *Eptesicus serotinus* (lat.) (ES) – kasni noćnjak, engl. *Serotine bat*
3. *Miniopterus schreibersii* (lat.) (MS) – dugokrili pršnjak, engl. *Schreibers's Bent-winged bat*
4. *Myotis blythii* (lat.) (MB) – oštrouhi šišmiš, engl. *Lesser mouse-eared bat*
5. *Myotis emarginatus* (lat.) (ME) – riđi šišmiš, engl. *Geoffroy's bat*
6. *Myotis myotis* (lat.) (MM) – veliki šišmiš, engl. *Great Mouse-eared bat*
7. *Myots nattereri* (lat.) (MN) – resasti šišmiš, engl. *Natterer's bat*.

Veliki potkovnjak (lat. *Rhinolophus ferrumequinum)* (izvor: Toyran K, Yorulmaz T, Gözütok S (2017) Mammal fauna of Ihlara Valley (Aksaray, Turkey))

Kasni noćnjak (lat. *Eptesicus serotinus*) (izvor: IUCN, autor: Kamiel Spolestra)

Dugokrili pršnjak (lat. *Miniopterus schreibersi*) (autor: Steve Bourne)

Oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis blythii*) (izvor: IUCN, autor: Vilda - Rollin Verlinde)

Slika 11. Vrste šišmiša uključene u ovo istraživanje

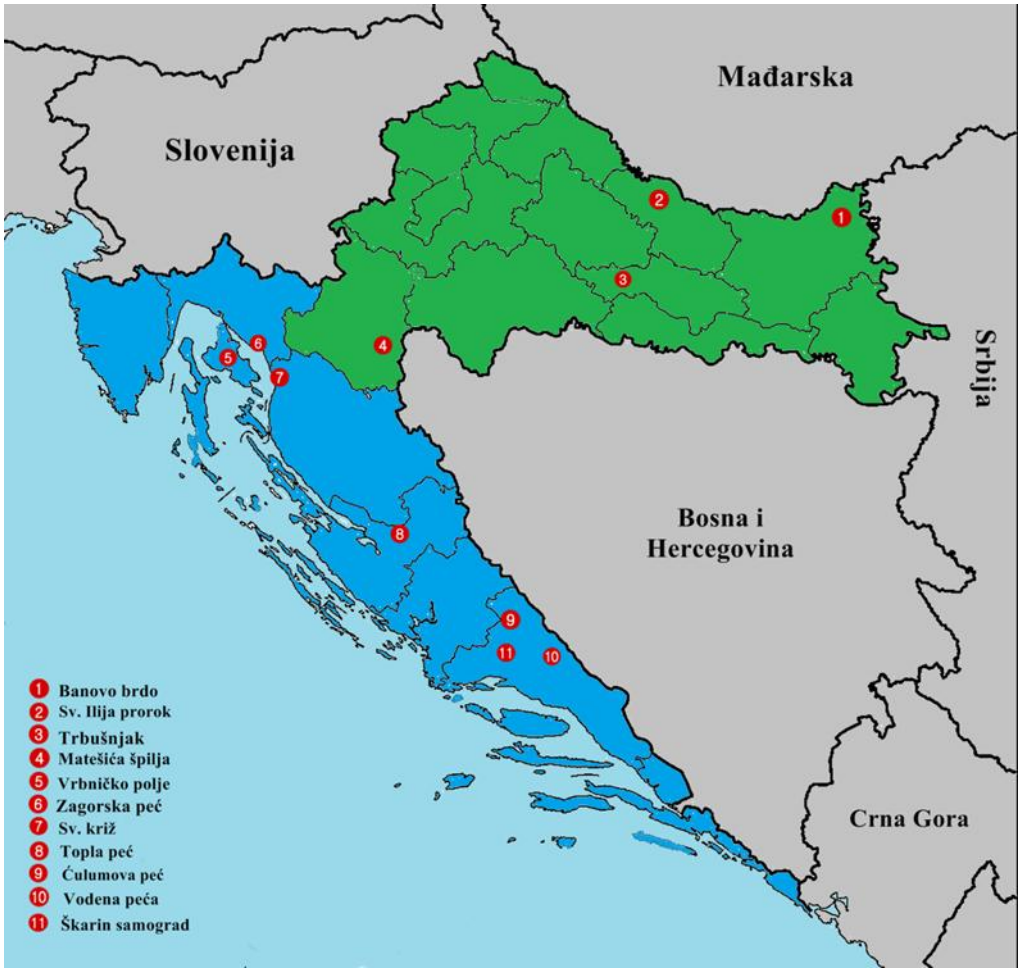
Riđi šišmiš (lat. *Myotis emarginatus*)

Veliki šišmiš (lat. *Myotis myotis*)

Resasti šišmiš (lat. *Myotis nattereri*) (autor: Primož Presetnik)

Slika 11. (nastavak).

Uzorke sam prikupila na 11 lokacija (tunel Vrbničko polje, ugljenokop Banovo brdo, crkve: Sveti Križ i Sveti Ilija prorok, špilje i pećine: Trbušnjak, Topla peć na Krupi, Zagorska peć, Škarin samograd, Matešića špilja, Ćulumova peć i Vodena peća) u devet županija (Šibensko-kninska, Primorsko-goranska, Ličko-senjska, Zadarska, Splitsko-dalmatinska, Karlovačka, Požeško-slavonska, Osječko-baranjska, Virovitičko-podravska) (Slika 12).



Slika 12. Prikaz lokacija uzorkovanja tijekom 2016. i 2017. godine.

Uzorkovanje sam provodila tijekom proljeća 2016. te tijekom proljeća i jeseni 2017. godine. U slučaju kada sam na nekoj lokaciji uzorkovala tijekom dvije uzastopne noći, radi izbjegavanja uzimanja uzoraka od istih jedinki označavala sam ih stočnom kredom po letnicama. Uhvaćeno je ukupno 455 šišmiša.

Hiropterolozi su za hvatanje šišmiša koristili ručne mreže (engl. *hand nets*) i mreže za hvatanje (engl. *mist nets*). Na temelju morfoloških karakteristika odredili su za svaku jedinku pripadnost vrsti, dob (adulti, subadulti), spol te su izmjerili tjelesnu težinu i dužinu podlaktice. Na temelju morfoloških kriterija za 14 jedinki nije bilo moguće odrediti radi li se o velikom ili oštrouhom šišmišu pa su te jedinke označene kao *Myotis myotis/blythii* (MM/B). Sve jedinke u proljetnom ulovu su bili iz kategorije adulti, a u jesen je uhvaćeno 10 subadultnih jedinki (4 MS i 6 RF).

Nijedna jedinka obuhvaćena ovim istraživanjem nije pokazivala kliničke znakove bolesti (neobičan stav, iscjetke iz tjelesnih otvora, iznimno ozlijeđena i oštećena krila, mršavost, iznurenost, neuredno krzno, nesposobnost letenja, perzistentna agresija). Tijekom uzorkovanja nijedan šišmiš nije uginuo, a po završenoj obradi svakoj jedinki je ponuđena vodena otopina šećera nakon čega su svi uspješno pušteni na mjestu hvatanja.

3.4 Postupak uzorkovanja

Od svakog šišmiša nastojala sam prikupiti suhe obriske sluznice usne šupljine (Slika 13) i krv (Slika 14) te feces. Ispod kolonije prikupila sam gvano ukoliko je bio dostupan.

3.4.1 Obrisak sluznice usne šupljine (obrisak)

Ranijim istraživanjima nije dokazana razlika u mogućnosti utvrđivanja lyssavirusne RNA između mokrih i suhih obrisaka (Brookes i sur., 2005., Megali i sur., 2010.) pa sam u ovom istraživanju prikupljala suhe obriske sluznice usne šupljine. Obrisak usne šupljine prikupila sam umetanjem sterilnog štapića za obriske u usnu šupljinu šišmiša pritom lagano okrećući štapić po sluznici (Slika 13).

Obriske sam prikupila u duplikatu. Jedan štapić obriska sam pohranila u epruvetu koja je sadržavala 500 µL otopine za čuvanje nukleinskih kiselina, a bio je namijenjen za dokazivanje virusnih genoma molekularnim metodama. Drugi obrisak sam pohranila u epruvetu s 500 µL transportne podloge (medij za staničnu kulturu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 1% antibiotika – antimikotika), a bio je namijenjen izdvajanju lyssavirusa na staničnoj kulturi ukoliko se molekularnim metodama dokaže prisutnost njihova genoma. Kliještima sam prerezala aluminijski štapić kako bih mogla zatvoriti epruvetu. Ukupno sam prikupila obriske od 455 šišmiša, a zastupljene su bile sve navedene lokacije (Tablica 5).

Slika 13. Uzimanje obriska sluznice usne šupljine velikog šišmiša uhvaćenog u špilji Trbušnjak.

3.4.2 Krv

Kapi krvi, koje su se oblikovale nakon probadanja uropatagijalne vene iglom, prikupila sam filter papirima (Slika 14). Jedan filter papir može apsorbirati do 20 µL krvi. Filter papire sam spremala u odgovarajuće označene epruvete. Od svakog šišmiša sam nastojala prikupiti najmanje dva i najviše četiri papira. Ukupno sam prikupila krv od 392 jedinke, a zastupljene su bile sve navedene lokacije (Tablica 5). Krv sam pretraživala serološkom metodom na prisutnost specifičnih neutralizacijskih protutijela za virus EBLV-1.

Slika 14. Uzorkovanje krvi. Pridržavajući filter papir pincetom sakupljene su kapi krvi koje su se oblikovale nakon probadanja uropatagijalne vene. Fotografija je snimljena ispred Matešića pećine.

Tablica 5. Broj šišmiša i uzoraka po vrstama, spolu i lokaciji. M - muški, Ž – ženski, MS – dugokrili pršnjak (lat. *Miniopterus schreibersii*), MN – resasti šišmiš (lat. *Myotis nattereri*), MM – veliki šišmiš (lat. *Myotis myotis*), RF – veliki potkovnjak (lat. *Rhinolophus ferrumequinum*), ME – riđi šišmiš (lat. *Myotis emarginatus*), ES – kasni noćnjak (lat. *Eptesicus serotinus*), MB – oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis blythii*), MM/B – veliki/oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis myotis/blythii*).

Vrsta	**Broj ulovljenih jedinki**	**Spol**		**Broj uzoraka**		**Lokacije**
		M	**Ž**	**Obrisak**	**Krv**	
RF	90	48	42	90	86	Matešića špilja, Sv. Križ, Banovo brdo, Trbušnjak, tunel Vrbničko polje, Škarin samograd, Ćulumova peć,Vodena peća
ES	1	1		1	1	Matešića špilja
MS	255	135	120	255	221	Škarin samograd, Trbušnjak, Zagorska peć, Matešića špilja, Banovo brdo, tunel Vrbničko polje, Topla peć, Ćulumova peć
MB	27	24	3	27	17	tunel Vrbničko polje, Topla peć, Škarin samograd, Ćulumova peć
MM/B	14	3	11	14	7	Škarin samograd, Topla peć

Tablica 5. (nastavak)

ME	10	/	10	10	1	Sv. Križ
MM	56	2	54	56	56	Trbušnjak, Banovo brdo, Sv. Ilija prorok
MN	1		1	1	1	Škarin samograd

3.4.3 Feces

Ukoliko je šišmiš u trenutku prikupljanja uzoraka defecirao, feces sam prikupila drvenom lopaticom i spremala u epruvete s 500 µL otopine za čuvanje nukleinskih kiselina. Feces sam prikupila na šest lokacija (Trbušnjak (1MM i 1 MS), Matešića špilja (1 RF, 1 ES i 1MS), crkva Sv. Križ (7 RF), Škarin samograd (2 MS), Banovo brdo (2 MS) i tunel Vrbničko polje (2 skupna uzorka fecesa više vrsta)). Feces sam pretraživala molekularnom metodom u cilju utvrđivanja virusnih genoma (Slika 15).

3.4.4 Gvano

Gvano sam uzorkovala laboratorijskom žlicom i pohranila u epruvetu. Prikupila sam ga na pet lokacija (Škarin samograd, Zagorska peć, Trbušnjak, crkve Sv. Križ i Sv. Ilije proroka). Gvano sam pretraživala molekularnom metodom u cilju utvrđivanja virusnih genoma (Slika 15).

Tijekom uzorkovanja uzorke sam spremala u transportni hladnjak (+4°C). Po dolasku u laboratorij gvano i obriske sluznice usne šupljine u transportnom mediju sam odmah zamrznula pri -20°C, a uzorke u otopini za čuvanje nukleinskih kiselina sam držala na sobnoj temperaturi do obrade. Epruvete s filter papirima sam otvorila kako bi se kroz četiri do pet dana papiri osušili na sobnoj temperaturi, a zatim sam ih pohranila pri -20°C do obrade.

3.5 Priprema uzoraka

3.5.1 Priprema obrisaka sluznice usne šupljine za lančanu reakciju polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) za dokazivanje genoma lyssavirusa i lančanu reakciju polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju u stvarnom vremenu (RT-qPCR) za dokazivanje gena za beta-aktin

Sadržaj epruvete miješala sam pomoću automatske tresilice 1 minutu kako bi se uzorak obriska homogenizirao. Zatim su uzorci centrifugirani pri 14 000 okretaja 1 minutu kako bi se uklonile stanice i nečistoće. Dobiveni nadtalog sam prenijela u epruvete u količini od 250 µL te

je načinjena automatska izolacija virusnih nukleinskih kiselina. Izolirane nukleinske kiseline sam pohranila pri -20°C do pretraživanja RT-PCR i RT-qPCR.

3.5.2 Priprema uzoraka za tehnologiju sekvenciranja nove generacije (NGS)

Zbog visokih troškova uzorci namijenjeni pretraživanju NGS-om su pripremljeni kao skupni uzorci i to obzirom na vrstu uzorka i lokaciju uzorkovanja. Iznimno, uzorci od jedinog primjerka kasnog noćnjaka obrađeni su pojedinačno jer je zanimljiv kao rezervoar bjesnoće.

3.5.2.1 Obrisak usne šupljine

Sadržaj svake epruvete miješala sam pomoću automatske tresilice 1 minutu kako bi se uzorak obriska homogenizirao. Napravila sam skupne uzorke tako što sam pipetom prenijela 250 µL uzorka od svake jedinke u epruvetu te sam ponovno promiješala uzorke. Zatim su uzorci centrifugirani pri 14 000 okretaja 1 minutu kako bi se uklonile stanice i nečistoće. Dobiveni nadtalog sam filtrirala.

3.5.2.2 Feces

Feces u otopini za čuvanje nukleinskih kiselina sam miješala pomoću automatske tresilice 1 minutu kako bi se uzorak homogenizirao. Napravila sam skupne uzorke fecesa tako da sam pipetom prenijela 250 µL uzorka od svake jedinke u epruvetu. Te skupne uzorke sam ponovno miješala pomoću tresilice. Zatim su uzorci centrifugirani pri 14 000 okretaja 1 minutu kako bi se uklonile krute čestice. Dobiveni nadtalog sam filtrirala.

3.5.2.3 Gvano

Koristeći laboratorijsku žlicu, prebacila sam približno 1 g gvana u sterilnu epruvetu (bez DNaza i RNaza) za centrifugiranje i dodala odgovarajući volumen puferirane otopine fosfatnih soli (PBS) kako bih u konačnici dobila 10%-nu suspenziju. Potom sam sadržaj epruvete miješala pomoću automatske tresilice 1 minutu kako bi se uzorak jednolično suspendirao. Zatim je uzorak centrifugiran pri 14 000 okretaja 1 minutu radi uklanjanja krutih čestica. Dobiveni nadtalog sam filtrirala.

Svi uzorci namijenjeni pretraživanju NGS-om nakon filtriranja, a prije automatske izolacije nukleinskih kiselina bili su podvrgnuti tretmanu DNazom. Pripremila sam reakcijsku smjesu koja se sastojala od 200 µL filtrata, 25 µL 10x pufera za DNazu I i 100 µL rekombinantne DNaze I (*Recombinant DNase I (RNase free*). Smjesa je inkubirana 60 minuta pri

37°C, nakon čega je djelovanje DNaze I zaustavljeno inkubacijom pri 80°C tijekom 10 minuta. DNaza I je rekombinantna endonukleaza koja razgrađuje (hidrolizira fosfodiestersku vezu) jedno- i dvolančane DNA te hibride DNA-RNA.

Centrifugiranje, filtriranje i tretman DNazom se rade kako bi se uklonio domaćinov genom koji je velik te bi mogao „preplaviti“ genom mikrobne zajednice (Thomas i sur., 2012.).

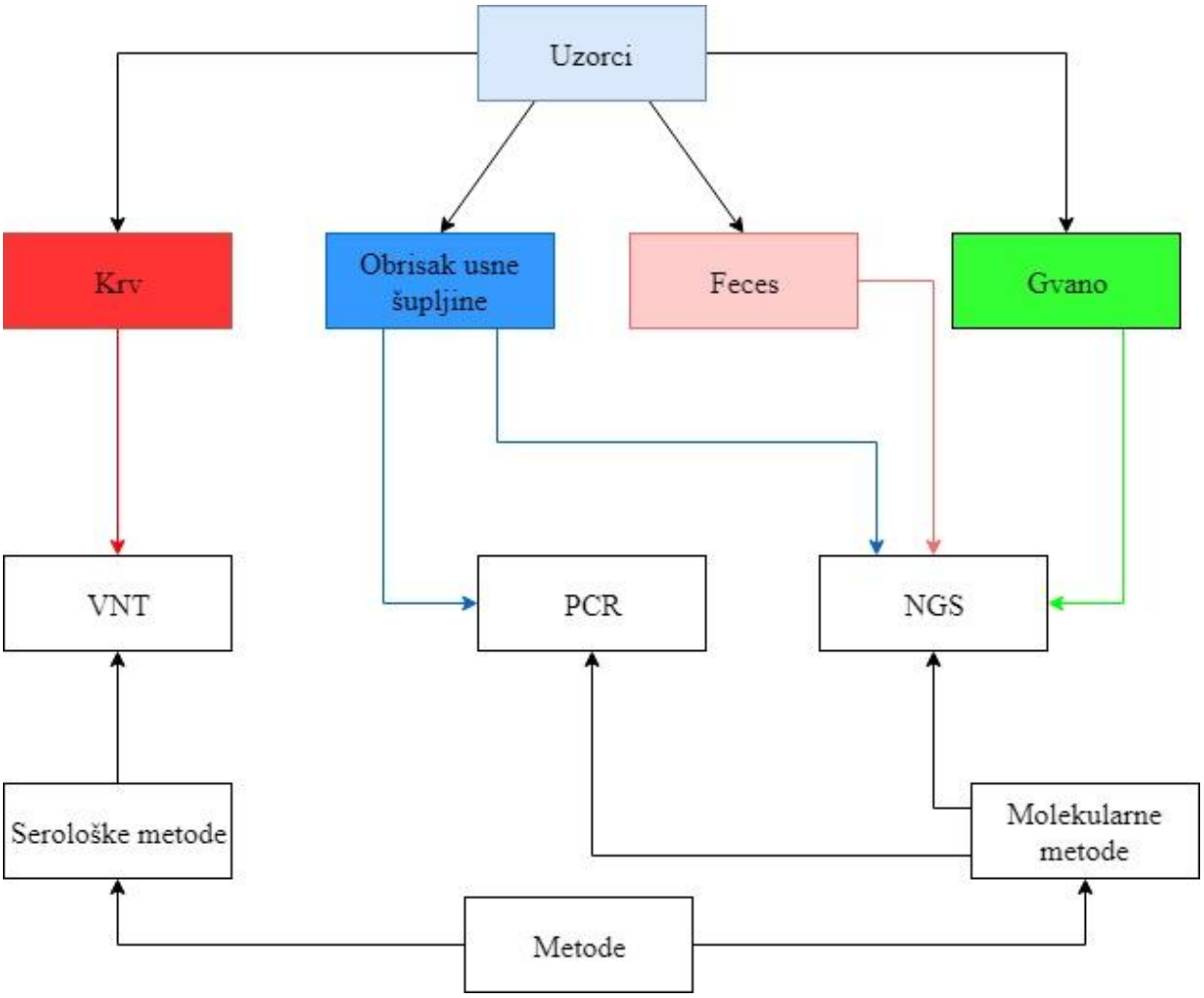
3.5.3 Priprema uzoraka za virus neutralizacijski test (VNT)

3.5.3.1 Krv

Za VNT sam koristila samo filter papire koji su bili potpuno natopljeni krvlju. O broju valjanih papira ovisi količina medija (otopina sastavljena od DMEM, 10% FBS i 1% antibiotika – antimikotika) koja se dodaje za izdvajanje seruma kako bi se postigla poznata razrjeđenja. Tako se za jedan papir dodaje 65 µL, za dva papira 130 µL, za tri papira 195 µL i za četiri papira 260 µL medija. Medij treba pokriti sve papire te slijedi inkubacija tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim centrifugiranje na 2 000 okretaja 2 minute (Rotina 420 Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Kako bih dobila najveću moguću količinu seruma papire sam pritiskivala nastavkom za pipetu (1 000 µL) o dno epruvete, a tako dobiveni serum prebacila sam u novu epruvetu (Safe-Lock Tube 2,00 ml, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) i zamrznula pri -20°C do obrade.

3.6 Metode

U ovom sam istraživanju koristila RT-PCR, qRT-PCR, tehnologiju NGS i virus-neutralizacijski test.



Slika 15. Sažeti prikaz uzorkovanja i metoda korištenih u ovom istraživanju.

3.6.1 Molekularne metode

3.6.1.1 Izdvajanje virusnih nukleinskih kiselina

Prethodno pripremljene obriske sluznice usne šupljine, feces i gvano upotrijebila sam kao početni materijal za automatsko izdvajanje virusnih nukleinskih kiselina.

Virusne nukleinske kiseline izdvojila sam automatiziranim sustavom *iPrep Purification Instrument* koristeći komplet reagenasa *iPrep PureLink Virus Kit*. Uređaj omogućava automatsko pročišćavanje nukleinskih kiselina po principu tehnologije magnetskih kuglica. Komplet reagenasa *iPrep PureLink Virus Kit* se sastoji od kaseta od kojih svaka ima 10 jažica ispunjenih reagensima. Virusna čestica se razgrađuje lizirajućim puferom, a proteini proteinazom K. Lizat se zatim pomiješa s magnetskim kuglicama za koje se vežu nukleinske kiseline nakon

čega slijedi odvajanje kuglica od lizata. Potom se kuglice ispiru radi uklanjanja nečistoća te se naposljetku RNA i DNA razrjeđuju u elucijskom puferu. Po završetku, nukleinske kiseline sam pohranila na -20°C do testiranja molekularnim metodama.

3.6.1.2 Lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) u jednom koraku za dokazivanje genoma lyssavirusa

Metodom RT-PCR u jednom koraku (engl. *One-Step RT-PCR*) dokazivala sam dijelove gena N uz primjenu specifičnih početnica JW6 (pozicija u genomu 660 – 641, nukleotidni slijed CAR TTV GCR CAC ATY TTR TG) i JW12F (pozicija u genomu 55 – 73, nukleotidni slijed ATG TAA CAC CYC TAC AAT G) (Heaton i sur., 1997.) koristeći komplet reagenasa *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase*. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µL sadržavala je: 12,5 µL mješavine nukleotida 2x Rxn Mix, 7,5 µL vode, 1 µL početnice JW6, 1µL početnice JW12F, 1µL mješavine enzima SSIII i 2 µL RNA. Reakcija je provedena u uređaju za PCR *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler*. Reverznu transkripciju (20 minuta pri 50°C) slijedila je inaktivacija reverzne transkriptaze i aktivacija polimeraze (2 minute pri 94°C) te reakcija umnožavanja s 35 temperaturnih ciklusa (40 sekundi pri 94°C, 40 sekundi pri 48°C i 55 sekundi pri 68°C) i završnim korakom od 5 minuta pri 68°C. Ovaj protokol se primjenjuje u Laboratoriju za bjesnoću i opću virologiju i prilikom sudjelovanja u međulaboratorijskom testiranju koje organizira Europski referentni laboratorij za bjesnoću te može utvrditi prisutnost genoma svih genotipova lyssavirusa.

3.6.1.3 Elektroforeza u gelu

Za prikaz umnoženog proizvoda reakcije RT-PCR (amplikona) pripremila sam 1,5% agarozni gel. U Erlenmeyerovu tikvicu sam dodala 1,5 g agaroze i 100 mL prethodno razrijeđenog TAE pufera. Agaroza je rastaljena zagrijavanjem do vrenja u mikrovalnoj pećnici, nakon čega je ohlađena pod mlazom vode na otprilike 50°C. U nosač za gel dodala sam 1µL interkalirajuće boje (*Gel Star Nucleic Acid Gel Stain*) i ohlađenu agarozu, sve sam promiješala i umetnula češljić za oblikovanje jažica. Nosač s gelom sam pokrila aluminijskom folijom i ostavila na sobnoj temperaturi da polimerizira tijekom najmanje 30 minuta.

Nakon što se gel polimerizirao, 9 µL amplikona sam pomiješala s 1 µL pufera za nanošenje uzorka (*Blue Juice Gel Loading Buffer*) na parafilmu i prenijela pipetom u jažice gela. Elektroforeza na gelu je izvedena tijekom 30 do 45 minuta, pri naponu od 90V i jakosti struje

120 mA. Rezultate sam očitala u transiluminatoru. Reakciju sam smatrala uspješnom ukoliko je pozitivna kontrola veličinom odgovarala 606 baznih parova (bp) te ukoliko u negativnoj kontroli nije bilo amplikona.

3.6.1.4 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-qPCR) u jednom koraku za dokazivanje gena za beta-aktin

Kako bi se utvrdila prisutnost domaćinova materijala (stanica usne šupljine) na štapiću obriska, a s ciljem izbjegavanja lažno negativnih rezultata, metodom RT-qPCR (engl. *One-Step RT-qPCR*) dokazivala sam dijelove kontrolnog gena beta-aktina uz primjenu specifičnih početnica ACT-1005-F (nukleotidni slijed 5'-CAGCACAATGAAGATCAAGATCATTC-3'), ACT-1135-R (nukleotidni slijed 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3') i sonde (probe) ACT-1081-HEX (nukleotidni slijed HEX-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAGATG- BHQ1) (Toussaint i sur., 2007.) koristeći komplet reagenasa *Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Kit*. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µL sadržavala je: 12,5 µL *2x Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Master Mix*, 3,25 µL vode, 2 µL mješavine početnica BA HEX mix (ACT-1005-F, ACT-1135-R i ACT-1081-HEX), 0,25 µL *Rotor-Gene RT Mix* i 5 µL RNA. Reakcija je provedena u uređaju za kvantitativni PCR *Rotor-Gene Q*. Reverznu transkripciju (15 minuta pri 50°C) slijedila je inaktivacija reverzne transkriptaze i aktivacija polimeraze (5 minuta pri 95°C) te reakcija umnožavanja s 40 temperaturnih ciklusa (15 sekundi pri 95°C, 15 sekundi pri 60°C).

3.6.1.5 Sekvenciranja nove generacije (NGS)

NGS uključuje četiri osnovna koraka, a to su priprema biblioteke, stvaranje klastera, sekvenciranje i analiza podataka.

1. Priprema biblioteke

Nakon izdvajanja nukleinskih kiselina (v. 3.6.1.1.), prvi korak je priprema biblioteke koja obuhvaća:

1.1. Zaštitu RNA kompletom reagenasa *RiboGuard RNase Inhibitor* koji štiti RNA od učestalih RNaza (RNaze A, B i C) vezanjem rekombinantnog inhibitora RNaze.

Priredila sam reakcijsku smjesu od 3 µL reakcijskog pufera A, 0,5 µL enzima *Riboguard* RNaze i 1 µL *Terminator 5'-Phosphate- Dependent Exonulease* (po uzorku). Smjesu sam

prenijela pipetom u epruvete (*PCR Tube strip 0,2 ml*, Eppendorf), a zatim sam u svaku dodala 30 µL RNA. Reakcija se odvijala pri 30°C tijekom 60 minuta (*T Professional basic Thermocycler gradient*). Po završetku, epruvete sam centrifugirala i dodala sam 1 µL razrijeđenog (0,1 M) EDTA. Zatim sam pipetom uzorke prenijela iz epruveta u ploču (Eppendorf).

1.2. Pročišćavanje RNA:

Magnetske kuglice (*AgenCourt RNA clean XP*) sam ulila u plastičnu posudu (*Loading reservoar*) i višekanalnom pipetom sam dodala 54 µL kuglica po jažici te promiješala. Uslijedila je inkubacija kroz 15 do 20 minuta tijekom koje se RNA veže za magnetske kuglice i odvaja se od nečistoća. Po isteku inkubacije ploču sam stavila na magnetni stalak, a kad se smjesa razbistrila višekanalnom pipetom sam uklonila supernatant ne dirajući smeđi prsten kuglica i za njih vezane RNA. Zatim sam svježe priređeni 70%-tni etanol ulila u posudu (*Loading reservoar*) i višekanalnom pipetom dodala 200 µL po jažici, uklonila ga nakon 30 sekundi te sam pustila ploču da se osuši. Ploču sam uklonila s magnetnog stalka, dodala sam 25 µL vode slobodne od RNaza, promiješala te vratila ploču na magnetni stalak. Krajnji rezultat ovog postupka je pročišćena RNA.

1.3. Sinteza prvog lanca dvolančane komplementarne DNA (ds cDNA)

Kako bih sintetizirala ds cDNA iz ukupne RNA ili mRNA koristila sam komplet reagenasa *cDNA Synthesis System*. Uzela sam novu mikrotitarsku ploču (Eppendorf) i u svaku jažicu prenijela 8 µL pročišćene RNA, a zatim dodala 2,5 µL nasumičnih početnica (1,5 µL *Random primer* (50 µg/mL) i 1 µL početnica *Oligo(dT)15 primer* (50 µg/mL)). Reakcija se odvijala pri 70°C tijekom 10 minuta (*T Professional basic Thermocycler gradient*), nakon čega sam uzorke stavila na stalak za hlađenje.

Pripremila sam smjesu koja se sastojala od 4 µL pufera za reverznu transkriptazu (5x *RT-buffer AMV*), 2 µL ditiotreitola, 1 µL reverzne transkriptaze (*Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse Transcriptase*), 0,5 µL inhibitora RNaza (*Protector RNase inhibitor*) i 2 µL mješavine deoksinukleotida (*dNTP -Mix*, 10 mM svaki) te sam dodala 9,5 µL smjese po jažici ploče s RNA i početnicama. Reakcija se odvijala pri 25°C 10 minuta, a zatim pri 42°C kroz 60 minuta (*T Professional basic Thermocycler gradient*). Uzorke sam stavila na stalak za hlađenje kako bih

zaustavila reakciju, a rezultat je hibrid cDNA-mRNA koji služi kao supstrat za sintezu drugog lanca.

1.4. Sinteza drugog lanca cDNA

Smjesa za sintezu drugog lanca sadržavala je 15 µL pufera (2*nd strand synthesis buffer*, 5x *conc*.), 0,75 µL mješavine deoksinukleotida (*dNTP-Mix*, 10 mM svaki), 3,25 µL mješavine enzima (2*nd Strand Enzyme Blend*, sadrži DNA polimerazu I, *E. coli* ligazu i RNaze H) i 36 µL vode. Reakcija se odvija pri 16°C 2 sata (*T Professional basic Thermocycler gradient*). Tijekom reakcije RNaza H zarezuje RNA tvoreći tako niz RNA (3'-OH) početnica za DNA polimerazu I. Egzonukleazna aktivnost (5' – 3') DNA polimeraze I uklanja početnice u smjeru sinteze koje su zamijenjene novim nukleotidima polimeraznom aktivnošću. *E. coli* ligaza spaja jazove kako bi se upotpunili lanci ds cDNA. Posljednji korak u sintezi cDNA je osigurati tupe krajeve cDNA što se postiže dodavanjem 10 µL T4 DNA polimeraze, a reakcija se odvijala pri 16°C tijekom 5 minuta (*T Professional basic Thermocycler gradient*). Za zaustavljanje reakcije dodala sam 0,8 µL razrijeđenog (0,2 M) EDTA.

1.5. Pročišćavanje i mjerenje koncentracije ds cDNA

Dobivenu ds cDNA sam pročistila kompletom za pročišćavanje PCR amplikona (*QIAquick PCR Purification Kit*) kako bih uklonila početnice, nukleotide, mineralna ulja, soli i druge nečistoće, i to na slijedeći način:

Dodala sam 5 volumena pufera PB na 1 volumen ds cDNA i promiješala. Stavila sam kolonu (*QIAquick column*) u epruvetu (*2 ml collection tube*), dodala uzorak i centrifugirala (13 000 okretaja 1 minutu). Odbacila sam filtrat i vratila kolonu u epruvetu i dodala 750 µL pufera PE i centrifugirala (13 000 okretaja 1 minutu) te ponovno odbacila filtrat i vratila kolonu u epruvetu i centrifugirala (13 000 okretaja 1 minutu). Kolonu sam stavila u epruvetu (1,5 ml *microcentrifuge tube*) i dodala sam 50 µL pufera EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) i centrifugirala (13 000 okretaja 1 minutu).

Tako pročišćenoj cDNA odredila sam koncentraciju uređajem za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina (*Qubit Fluorometer*) i kompletom reagenasa *Qubit dsDNA HS Assay Kits* (koji sadrži reagens *Qubit dsDNA HS Reagent (Component A),* pufer *Qubit dsDNA HS Buffer (Component B),* standarde *Qubit dsDNA HS Standard #1 (Component C)* i *Qubit*

dsDNA HS Standard #2 (Component D)), i to na sljedeći način: pripremila sam odgovarajući broj epruveta (0,5 mL) za standarde, uzorke i Qubit radnu otopinu tako što sam razrijedila reagens *Qubit dsDNA HS Reagent* 1:200 u puferu *Qubit dsDNA HS Buffer*. Ukupni volumen u svakoj epruveti mora biti 200 µL. U epruvete sa standardima dodala sam 190 µL, a u epruvete s uzorcima 195 µL Qubit radne otopine. U odgovarajuće označene epruvete za standarde sam dodala po 10 µL odgovarajućeg standarda i promiješala. Jednako, u epruvete za uzorke dodala sam po 5 µL uzorka i promiješala. Uslijedila je inkubacija 2 minute, nakon koje sam prema uputi na ekranu očitala vrijednosti za standarde, a potom za svaki uzorak. Dobivene vrijednosti izražene su u ng/mL.

Zatim sam razrijedila cDNA (puferom EB, 10 mM Tris-Cl, pH 8,5) na koncentraciju 0,2 ng/µL te sam prenijela 5 µL u novu ploču (Eppendorf).

1.6. Tagmentacijska enzimatska reakcija (tagmentacija)

Tagmentacija omogućava istovremenu fragmentaciju i označavanje cDNA s adapterima, a koristila sam komplete reagenasa *Nextera XT DNA Library Prep Kit* (24 uzorka) i *Nextera XT Index Kit*. Uzorak mora biti pocijepan na kratke fragmente (100 do 150 bp).

Komplet reagenasa *Nextera XT DNA Library Prep Kit* sastoji se od dvije kutije. U kutiji 1 nalaze se reagensi *Amplicon Tagment Mix, 24 rnx (ATM), Tagment DNA Buffer (TD), Nextera PCR Master Mix (NPM), Resuspension Buffer (RSB), Library Normalization Additives 1 (LNA1), Library Normalization Wash 1 (LNW1)* i *Hybridization Buffer (HT1)*. U kutiji 2 nalaze se reagensi *Neutralize Tagment Buffer (NT), Library Normalization Beads 1 (LNB1)* i *Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)*.

1.6.1. Tagmentacija DNA

Na 5 µL DNA po jažici dodala sam 5 µL ATM (transpozonski kompleks - fragmentira cDNA i dodaje adapter) te 10 µL TD (pufer za ATM). Smjesu sam promiješala, ploče pokrila ljepljivom folijom i centrifugirala 280 x g 1 minutu. Reakcija tagmentacije se odvijala pri 55°C 5 minuta, a zatim se temperatura spustila na 10°C (*T Professional basic Thermocycler gradient*). Kad je temperatura dostigla tu vrijednost dodala sam 5 µL NT kako bih inaktivirala transpozonski kompleks. Smjesu sam promiješala, ploču pokrila ljepljivom folijom te centrifugirala, a zatim inkubirala pri sobnoj temperaturi 5 minuta.

1.6.2. Umnožavanje biblioteke (engl. *Amplify Libraries*)

Tagmentiranoj DNA iz prethodnog koraka dodala sam 15 µL NPM (polimeraza) u svaku jažicu, 5 µL od svake početnice (indeksirani adapteri – kratki dvolančani segmenti sintetske DNA), promiješala, pokrila folijom i centrifugirala. Adapteri su sintetizirani tako da imaju jedan "ljepljivi" i jedan "tupi" kraj koji se veže na tupi kraj DNA. Reakcija se odvijala pri 72°C 3 minute, zatim pri 95°C 30 sekundi, a nakon toga je uslijedilo 12 ciklusa pri 95°C 10 sekundi, 55°C 30 sekundi i 72°C 30 sekundi te 72°C 5 minuta, a zatim 10°C (*T Professional basic Thermocycler gradient*). Ploča je označena kao NTA (engl. *Nextera XT Tagment Amplicon Plate*).

1.7. Pročišćavanje biblioteka (engl. *Clean Up Libraries*)

Prije sljedećeg koraka izvadila sam magnetske kuglice (*Agencourt AMPure XP*) na sobnu temperaturu i priredila 80%-tni etanol, a ploču NTA centrifugirala.

Uzela sam novu ploču (*96 deep well plate*) koju sam označila CAA (engl. *Clean Amplified Plate*) te sam u nju prebacila 50 µL PCR amplikona iz ploče NTA. Magnetske kuglice sam homogenizirala te sam dodala 90 µL po jažici ploče CAA. Smjesu sam promiješala na tresilici (2 minute) te je uslijedila inkubacija 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim sam ploču stavila na magnetni stalak tijekom 2 minute i pažljivo sam uklonila i odbacila supernatant te dodala 200 µL 80%-tnog etanol koji sam nakon 30 sekundi odbacila. Postupak sam ponovila još jednom nakon čega sam ostavila ploču da se osuši te sam je uklonila s magnetnog stalka. Zatim sam dodala 52,5 µL pufera za ispiranje (EB 10 mM Tris-Cl, pH 8,5), smjesu sam promiješala na tresilici (2 minute) i inkubirala 2 minute pri sobnoj temperaturi nakon čega sam ploču vratila na magnetni stalak tijekom 2 minute.

1.8. Normalizacija biblioteka (engl. *Normalize Libraries*)

Normalizacija biblioteka je postupak kojim se osigurava ravnomjerna zastupljenost pojedinih biblioteka.

Prije nastavka otopila sam i promiješala otopinu LNA1 (pohranjen pri -20°C), a LNB1 i LNW1 (pohranjeni pri 4°C) sam stavila na sobnu temperaturu. U ploča koju sam označila CAN (engl. *Clean Amplified NTA Plate*) prenijela sam 50 µL supernatanta iz ploče CAA. U

novooznačenu ploču (*96 deep well plate*) LNP (engl. *Library Normalization Plate*) iz ploče CAN prebacila sam 20 µL supernatanta.

U epruvetu sam dodala (po uzorku) 44 µL LNA1, 8 µL LNB1 i promiješala okrećući epruvetu. Tu sam mješavinu izlila u plastičnu posudu (*Loading reservoar*), a zatim sam višekanalnom pipetom dodala 45 µL te mješavine po jažici ploče LNP. Ploču sam pokrila folijom i stavila na tresilicu tijekom 30 minuta.

Za to vrijeme sam pripremila LNS1 i 0,1 N natrijev hidroksid.

Po isteku 30 minuta ploču LNP stavila sam na magnetni stalak tijekom 2 minute nakon čega sam odbacila supernatant i isprala s 45 µL LNW1 po jažici te ploču stavila na tresilicu (5 minuta), zatim na magnetni stalak i odbacila supernatant. Korak sam ponovila još jednom. Dodala sam 30 µL 0,1N NaOH po jažici te je uslijedilo miješanje tijekom 5 minuta. Ploču LNP sam stavila na magnetni stalak tijekom 2 minute te sam prenijela 30 µL supernatanta u novooznačenu ploču – SGP (engl. *Storage Plate*), u koju sam prethodno dodala 30 µL LNS1, nakon čega slijedi centrifugiranje (1 000 x g 1 minutu).

1.9. Priprema skupnog uzorka biblioteka (engl. *Pool Libraries*)

Kasetu s reagensima za sekvenciranje (*MiSeq reagent Nano kit v.3*) i HT1 stavila sam u posudu s vodom radi otapanja, a ploču SGP sam centrifugirala.

Po 5 µL svake biblioteke sam prenijela u epruvetu označenu PAL (engl. *Pooled Amplicon Library*) i promiješala.

U epruvetu koju sam označila DAL (engl. *Diluted Amplicon Library*) dodala sam 576 µL HT1, 24 µL PAL biblioteke i promiješala, a zatim sam izbacila 6 µL smjese i dodala 6 µL 12,5 pM kontrolne biblioteke (*Phix control kit v.3*). Nakon miješanja epruvetu sam stavila u termoblok pri 96°C 2 minute, promiješala okretanjem i ohladila u ledenoj kupelji 5 minuta. Tako pripremljenu smjesu dodala sam u odgovarajuće označenu jažicu na kaseti.

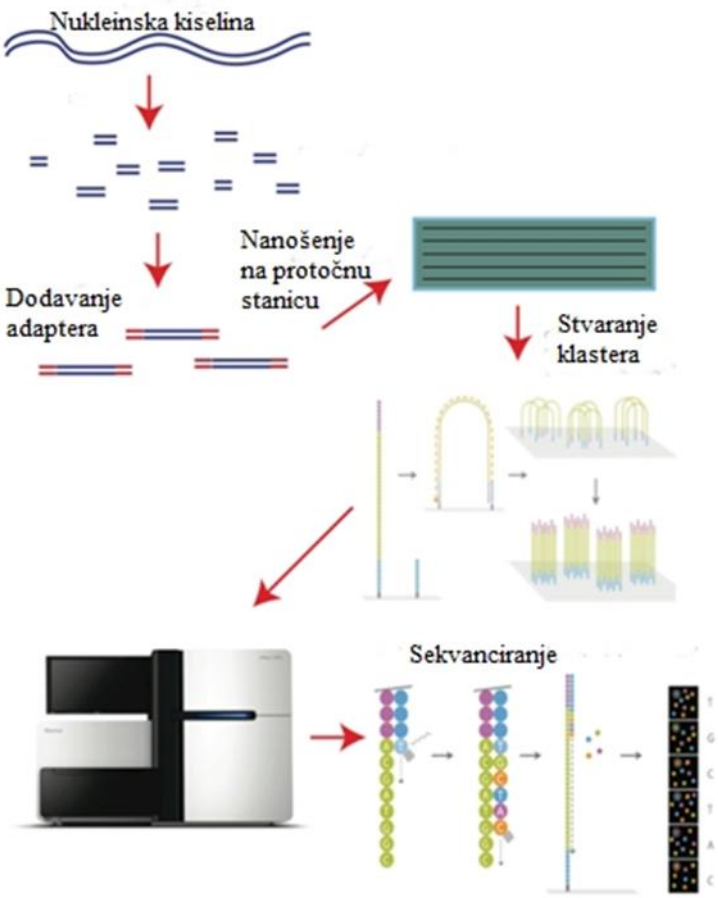
Za sekvenciranje sam koristila platformu Miseq Illumina na kojoj se odvijaju sljedeća dva koraka: stvaranje klastera i sekvenciranje.

2. Stvaranje klastera

U ovom koraku odvija se *in vitro* kloniranje kako bi se umnožile pojedine molekule DNA jer metoda nije dovoljno osjetljiva da bi sekvencirala jednu molekulu odnosno potrebno je umnožiti fragmente kako bi signal bio dovoljno jak da se može točno zabilježiti. Da bi sekvenciranje bilo uspješno fragmenti trebaju biti prostorno grupirani u DNA kolonije ili klastere koje se sastoje od mnogobrojnih kopija određenog fragmenta. Kako bi se izbjegla preferencijalna amplifikacija određenih fragmenata postoji nekoliko različitih procesa umnažanja koji koriste PCR za stvaranje velikog broja DNA klastera. Jedan od njih je i „most“ (engl. *bridge*) PCR. Biblioteka se nanosi na protočnu stanicu (engl. *flow cell*) koja na svojoj površini ima početnice s 5' i 3' krajevima (engl. „*forward*“ i „*reverse*“) koje su komplementarne adapterima koji su dodani na krajeve fragmenata. Fragmenti DNA su dvolančani pa se denaturiraju u jednolančane što omogućuje njihovu hibridizaciju s početnicama na protočnoj stanici. Nakon hibridizacije dodatkom nukleotida i enzima slobodni krajevi jednolančane DNA se prihvaćaju na površinu protočne stanice komplementarnim početnicama i stvaraju mostove. Enzim tvori drugi lanac mosta pa kad dođe do denaturacije dva jednolančana fragmenta DNA su pričvršćena na stanicu u blizini. Ponavljanje ovog procesa vodi klonalnom klasteriranju identičnih lanaca. Kopije ostaju lokalno i tvore klastere (nakupine; otprilike milijun, jednakih molekula DNA) (engl. *cluster generation*) (Slika 16).

3. Sekvenciranje

Princip sekvenciranja metodom nove generacije koristeći platformu Illumina je da DNA polimeraza katalizira ugradnju modificiranih deoksiribonukleotid trifosfata (dNTP). Svaka od četiri baze ima različit fluorofor i terminator (3-O-azidmetilnu grupu). Terminator zaustavlja daljnju polimerizaciju pa polimeraza može dodati svakom rastućem lancu DNA samo jednu bazu što osigurava da lanci budu jednake veličine. Neugrađeni nukleotidi se ispiru, kamera snima protočnu stanicu, nakon čega reagens TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) uklanja fluorofor i terminator, obnavlja 3'-OH skupinu i ciklus se može ponoviti. Reakcija sekvenciranja se provodi istovremeno na veoma velikom broju (milijunima) različitih kalupa na protočnoj stanici (Slika 16).



Slika 16. Sažeti prikaz principa sekvenciranja nove generacije. Preuzeto s https://bitesizebio.com/13546/sequencing-by-synthesis-explaining-the-illumina-sequencing-technology/.

4. Analiza podataka

Dobiveni podaci su obrađeni u suradnji s Institutom za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani.

Po završetku sekvenciranja podatci su u formatu datoteke FASTQ. Datoteka FASTQ za svaki par očitanja je podvrgnuta sklapanju kontigova *de novo* koristeći program CAP3 uz kriterij od najmanje 90% preklapanja identiteta i najmanju dužinu preklapanja od 40 nukleotida (nt). Kontigovi čija je dužina iznosila manje od 100 nt nisu dalje analizirani.

Daljnji korak u analizi bila je usporedba dobivenih kontiga s referentnim izolatima u NCBI banci gena (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), za što je korišteno sučelje *Diamond* BLASTx (Buchfink i sur., 2015.) i sljedeće postavke: neredundantna proteinska baza podataka (blastx),

prag E vrijednosti 10^{-4} i ograničenje na virusne sekvence (*Viruses (taxid 10239)*). Rezultati pretraživanja *Diamond* BLASTx su korišteni za taksonomsku klasifikaciju očitanja i kontiga u MEGAN *Communitiy Edition* (verzija 6.11.7).

Rezultati taksonomske klasifikacije su dalje obrađeni i vizualizirani koristeći *Bash* i *Python* biblioteke *NumPy*, *SciPy*, *Matplotlib*, *scikit-learn* i *pandas*.

Odabrane referentne sekvence su preuzete s NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) za daljnje sklapanje koristeći SPAdes 3.12.0 (Bankevich i sur., 2012.) i kasnije u filogenetskoj analizi.

Dobivene virusne sekvence su potvrđene mapiranjem očitanja s preuzetim referentnim genomima. Sravnjivanje, metoda susjednog sparivanja (engl. *neighbour-joining*, NJ) i metoda najveće izglednosti (engl. *maximum likelihood*, ML) napravljeni su pomoću programskog paketa MEGAX (Kumar i sur., 2018.). Pouzdanost filogenetskih povezanosti je procijenjena neparametrijskom metodom samoučitavanja (engl. *bootstrap*) u 1000 ponavljanja za NJ i 500 za ML.

Vizualizacija i početna obrada filogenetskih stabala napravljena je u programskom paketu MEGAX (Kumar i sur., 2018.), a završna obrada koristeći program za uređivanje fotografija PhotoScape dostupan na internet stranici http://www.photoscape.org/ps/main/index.php.

3.6.2 Serološke metode

S ciljem utvrđivanja prisutnosti specifičnih protutijela za virus EBLV-1 u uzorcima krvi šišmiša koristila sam virus neutralizacijski test.

Za serološko testiranje umnožen je referentni virus i određen je njegov radni titar. Stanična kultura koju sam koristila redovito je testirana (kao dio kontrole kvalitete) na prisutnost virusa bjesnoće i mikoplazmi. Reagensi (goveđi serum, medij za staničnu kulturu) su testirani i na prisutnost specifičnih protutijela za virus bjesnoće.

3.6.2.1 Umnažanje referentnog soja virusa EBLV-1

Liofilizirani virus EBLV-1 nabavljen je iz Europskog referentnog laboratorija za bjesnoću, ANSES, Francuska.

Umnažanje referentnog soja virusa napravila sam na sljedeći način:

1. liofiliziranom virusu dodala sam 1 mL medija za staničnu kulturu DMEM i promiješala ga koristeći tresilicu
2. iz boce za staničnu kulturu (*Nunc EasYFlask 25 cm*^{2}) u kojoj se nalazi jednodnevna stanična linija *Baby hamster kidney-21* (BHK-21) odlila sam postojeći medij (dalje u tekstu medij; DMEM, 10% FBS i 1% antibiotik-antimikotik) i dodala sam 0,5 mL priređene virusne suspenzije.
3. nakon jednosatne inkubacije u termostatu pri 35°C dodala sam svježi medij
4. uslijedila je trodnevna inkubacija pri 35°C nakon čega sam boce zamrznula (-20°C) pa odmrznula
5. sadržaj boce sam prelila u epruvete (*EUROTUBO 50 ml conical tubes*) i centrifugirala pri 3 000 okretaja 10 minuta
6. s 1 mL nadtaloga inficirala sam jednodnevne BHK-21 u boci za staničnu kulturu (*Nunc EasYFlask 75 cm*^{2})
7. ponovila sam postupke opisane pod točkama 3. – 6.
8. nakon posljednjeg umnažanja ponovila sam korak 4. i 5., a dobiveni nadtalog sam razdijelila (po 500 µL) u epruvete
9. epruvete sam pohranila u tekući dušik.

3.6.2.2 Određivanje titra referentnog soja EBLV-1

Titar virusa odredila sam tjedan dana nakon pohranjivanja epruveta u tekući dušik pripremajući deseterostruka razrjeđenja virusa. Testirala sam virus iz triju nasumično odabranih epruveta, a za svaku epruvetu sam koristila zasebnu mikrotitracijsku ploču s 96 jažica (*Nunclon Delta Surface*).

3.6.2.3 Priprema stanične linije BHK-21

Pripremila sam staničnu liniju BHK-21 u mikrotitracijskim pločama s 96 jažica 24 sata prije izvođenja titracije virusa EBLV-1, na slijedeći način:

1. iz boce za staničnu kulturu (*Nunc EasYFlask 75 cm*^{2}) odbacila sam postojeći medij
2. stanice sam isprala s 3 mL tripsina koji sam odmah odbacila
3. ponovno sam dodala 3 mL tripsina i pričekala da se stanice odignu od stjenke boce
4. dodala sam 7 mL medija kako bih neutralizirala djelovanje tripsina. Rabila sam stanice stare dva do četiri dana.

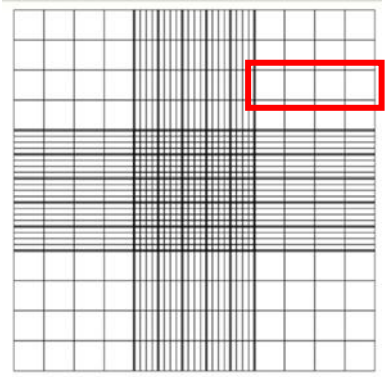
5. u svaku jažicu na mikrotitracijskoj ploči dodala sam po 200 µL stanične suspenzije BHK-21 prosječnog broja stanica 1,1 x 10^5/ mL. Broj živih stanica u mL odredila sam koristeći Neubauerovu komoricu, a mrtve stanice sam isključila dodavanjem tripanskog modrila.

Stanice sam brojala u četiri mala kvadrata (Slika 17), a ukupni broj sam izračunala prema formuli:

$$\frac{n}{4} \cdot 1{,}6 \cdot 2 = n \cdot 10^5/\mathrm{mL}$$

$$\frac{n \cdot 10^5/\mathrm{mL}}{1 \cdot 10^5/\mathrm{mL}}$$

gdje je *n* broj stanica.



Slika 17. Neubauerova komorica. Označena su polja u kojima sam brojila stanice (crveni pravokutnik).

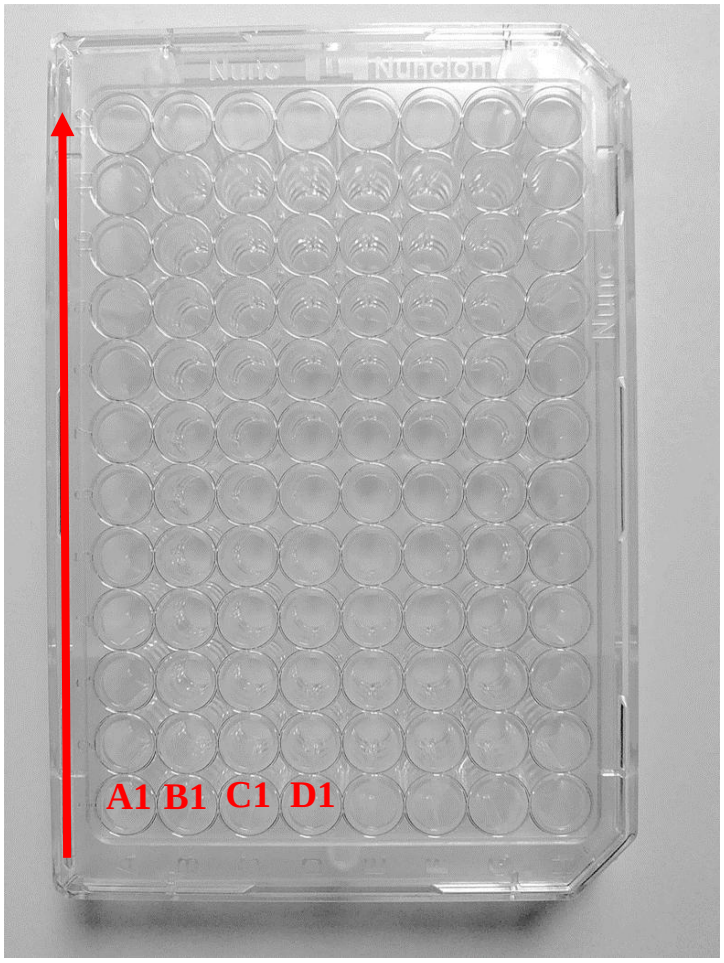
6. Ploče sa stanicama odložila sam u termostat pri 37°C, 95% vlage i 5% CO_2.

3.6.2.4 Titracija

Na dan titracije:

1. u mikrotitracijsku ploču sam dodala višekanalnom automatskom pipetom 270 µL DMEM po jažici
2. suspenziju virusa EBLV-1 iz tekućeg dušika sam otopila u hladnoj vodi
3. u red A1 do D1 dodala sam 30 µL virusne suspenzije (Slika 18)
4. najmanje osam puta višekanalnom automatskom pipetom sam promiješala virus u redu 1 te sam prenijela 30 µL u red 2, potom sam promiješala uzorke u redu 2 i prenijela 30 µL u red 3, nakon miješanja u redu 3 prenijela sam 30 µL u red 4 i tako redom do reda 12 iz

kojeg sam nakon miješanja odbacila 30 µL. Za svaki red koristila sam nove sterilne nastavke za pipetu.



Slika 18. Pločica za titraciju virusa. Strelica označava smjer titracije virusa, a A1 do D1 označava jažice u koje se dodaje nerazrijeđeni virus.

5. po dovršenom razrjeđivanju, prenijela sam 150 µL virusa u mikrotitracijsku ploču sa staničnom linijom BHK-21 (pripremljenu dan ranije) iz koje sam prethodno odbacila medij okretanjem ploče i to tako da sam red 1 prenijela u red 1, red 2 u red 2 i tako redom do kraja

6. nakon jednosatne inkubacije odbacila sam virus i medij i dodala sam 200 µL svježeg medija

7. ploče sam ponovno pohranila u termostat na trodnevnu inkubaciju pri 35°C uz 95% vlage i 5% CO_2.

3.6.2.5 Postupak bojenja virusa EBLV-1 i očitavanja rezultata

Po isteku trodnevne inkubacije

1. izvadila sam ploče iz termostata i okretanjem odbacila medij te sam isprala svaku jažicu s 250 µL PBS koji sam odmah odbacila
2. dodala sam 250 µL 80%-tnog acetona po jažici koji sam odmah uklonila okretanjem ploča
3. ponovno sam dodala 250 µL 80%-tnog acetona u svaku jažicu i ostavila tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi
4. aceton sam odbacila okretanjem ploče te sam ploče osušila u komori za sterilan rad pri sobnoj temperaturi
5. u svaku jažicu dodala sam 50 µL prethodno razrijeđenih obilježenih monoklonskih protutijela (1:50) (*FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin*)
6. ploče sam stavila u termostat pri 37˚C tijekom 30 minuta
7. protutijela sam odbacila okretanjem ploče te sam svaku jažicu isprala dva puta s 250 µL otopina fosfatnih soli PBS. Višak tekućine sam uklonila tapkanjem ploče o upijajući papir.
8. imunofluorescencijskim mikroskopom (100x) sam promatrala stanični sloj u svakoj jažici. Pozitivnom reakcijom smatrala sam jasno vidljivu zelenu fluorescenciju u inficiranim stanicama. Ako je u jažici i jedna stanica fluorescirala, jažicu sam smatrala pozitivnom.
9. titar virusa sam odredila koristeći formuli prema Spearman-Kerberu. Za vrijednost titra uzela sam srednju vrijednost dobivenu pojedinačnim testiranjem triju epruveta.

3.6.2.6 Određivanje radnog razrjeđenja virusa EBLV-1

Napravila sam titraciju virusa EBLV-1 te je u skladu s rezultatima validacije odlučeno da će se test raditi sa 70 puta razrijeđenim virusom (radno razrjeđenje virusa).

Staničnu liniju BHK-21 pripremila sam 24 sata prije izvođenja titracije, kako je opisano ranije (v. 3.6.2.3.).

1. na dan titracije u mikrotitracijsku ploču sam dodala 150 µL medij za staničnu kulturu DMEM u svaku jažicu

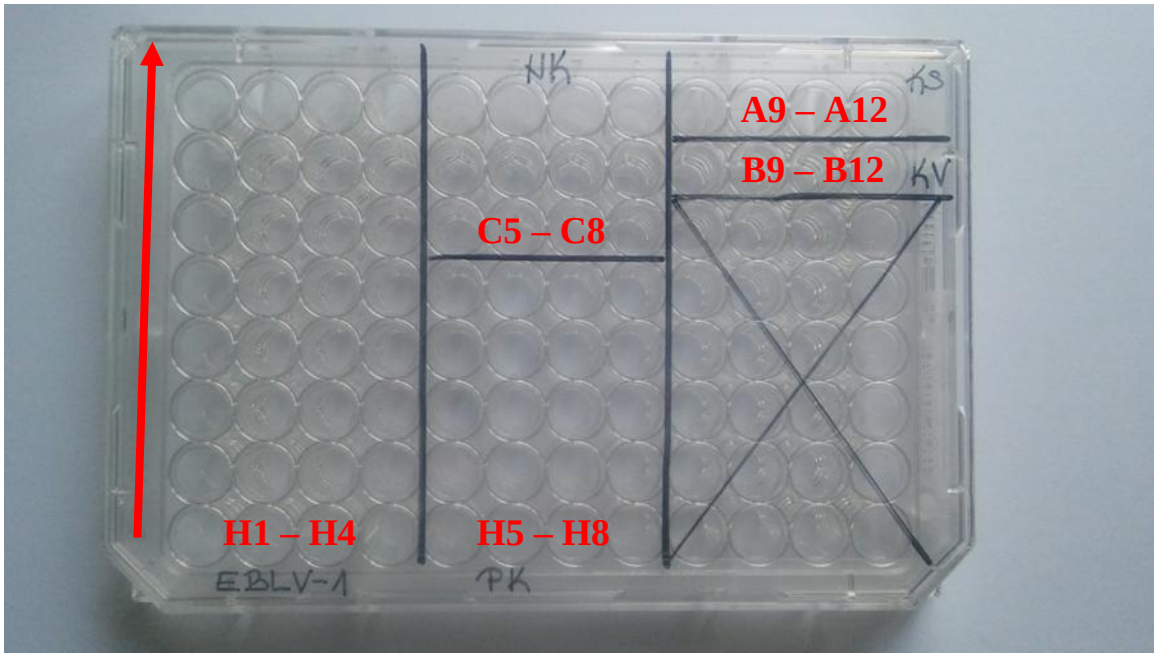
2. u red A1 do D1 dodala sam 50 µL virusa po jažici
3. promiješala sam višekanalnom automatskom pipetom i prenijela 50 µL u slijedeći red i tako do zadnjeg reda iz kojega sam nakon miješanja izbacila 50 µL
4. iz mikrotitracijske ploče sa stanicama sam odbacila medij i prenijela iz mikrotitracijske ploče u kojoj sam razrjeđivala virus 150 µL virusa EBLV-1 po jažici u odgovarajući red
5. ploče sam inkubirala u termostatu jedan sat pri 35°C, 95% vlage i 5% CO2
6. okretanjem ploče odbacila sam virus i dodala sam 100 µL medija
7. ploče sam inkubirala u termostatu dva dana pri 35°C, 95% vlage i 5% CO2.

Nakon dva dana:

8. obojala sam ploče monoklonskim protutijelima i očitala rezultate kako je opisano ranije (v. 3.6.2.5).

3.6.2.7 Virus neutralizacijski test (mFAVN)

Dan prije izvođenja testa pripremila sam stanice BHK-21 kako je opisano u 3.6.2.3. Na dan testa izvadila sam uzorke da se odmrznu pri sobnoj temperaturi. Kod svakog izvođenja testa napravila sam jednu kontrolnu ploču i ploče s uzorcima. Na kontrolnoj ploči napravila sam kontrolnu (povratnu) titraciju virusa, razrjeđenje WHO standarda (Slika 18, PK) i jednog sigurno negativnog uzorka (FBS) koji je služio kao negativna kontrola (NK). WHO standard sam uključila kao pozitivan uzorak, ali kako je moguće da on ne neutralizira virus u najnižem pripremljenom razrjeđenju (1:3) nisam ga rabila kao pozitivnu kontrolu. Pozitivan uzorak šišmišjeg seruma nije bio dostupan, a trenutno ni ne postoji međunarodno prihvaćen standard. Također na kontrolnoj ploči nalazi se kontrola stanica (A9 - A12) i kontrola EBLV-1 (B9 - B12) (Slika 19).



Slika 19. Organizacija kontrolne ploče u virus neutralizacijskom testu. EBLV-1 predstavlja povratnu titraciju virusa, PK – WHO standard, NK - negativna kontrola, KS - kontrola stanica, KV - kontrola virusa. Prekriženo područje nije korišteno. Strelica označava smjer razrjeđenja.

Povratnu titraciju virusa sam pripremila tako što sam dodala 150 µL medija za staničnu kulturu DMEM višekanalnom automatskom pipetom u jažice predviđene za povratnu titraciju virusa EBLV-1 (H1 – H4 do A1 – A4). Pripravila sam radno razrjeđenje virusa EBLV-1 (1:70) u mediju. Na kontrolnoj ploči u red H1 – H4 dodala sam 50 µL razrijeđenog virusa EBLV-1 kojeg sam promiješala i prenosila po 50 µL do reda A1 – A4 iz kojeg sam, nakon miješanja, odbacila 50 µL. Nakon svakog prenošenja virusa u novi red koristila sam nove sterilne nastavke za pipetu (Slika 19).

Na ostatak kontrolne ploče dodala sam višekanalnom automatskom pipetom po 100 µL medija za staničnu kulturu DMEM. U red H5 – H8 dodala sam 50 µL WHO standarda (*Rabies Immunoglobulin*) kojeg sam promiješala i prenosila po 50 µL do reda D5 – D8, iz kojeg sam nakon miješanja odbacila 50 µL. U red C5 – C8 sam dodala 50 µL negativne kontrole i razrijedila je na jednak način kako je opisano za WHO standard (Slika 19).

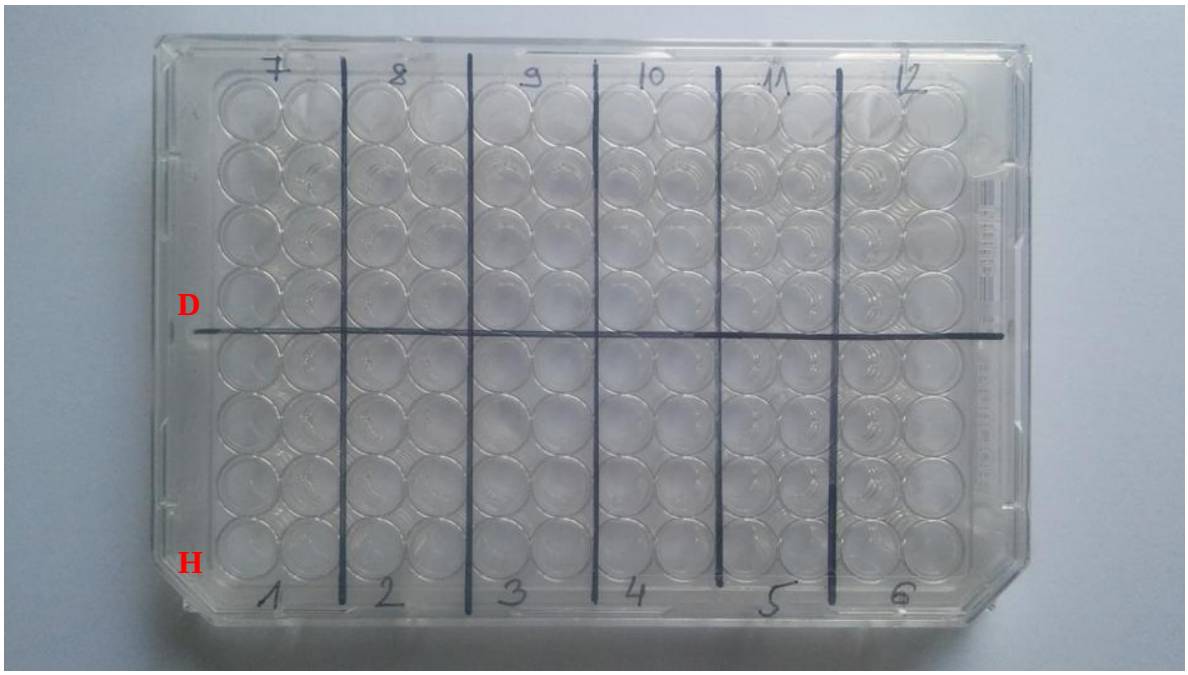
Višekanalnom automatskom pipetom dodala sam 100 µL medija za staničnu kulturu DMEM u jažice namijenjene uzorcima. U red H i D mikrotitracijske ploče dodala sam 50 µL uzorka po jažici, a pojedini uzorak je bio ispitivan u duplikatu. Najmanje osam puta sam

višekanalnom automatskom pipetom promiješala uzorke u redu H te prenijela 50 µL u red G, potom sam uzorke promiješala u redu G i prenijela 50 µL u red F, nakon miješanja u redu F prenijela sam 50 µL u red E iz kojeg sam nakon miješanja odbacila 50 µL zajedno s nastavcima. Na jednak način sam razrijedila uzorke koje sam dodala u redu D (Slika 20).

Po 50 µL razrijeđenog virusa EBLV-1 je dodano u svaku jažicu ploča s uzorcima, a na kontrolnoj ploči samo u jažice s WHO standardom, negativnom kontrolom i kontrolom virusa. Jedino u red A9 do A12 (kontrola stanica, KS) nije dodan virus. Uslijedila je inkubacija u trajanju od jednog sata pri 35˚C, 5% CO_2 i 95% vlage.

Nakon inkubacije izbacila sam medij iz ploče sa stanicama te prenijela razrjeđenja virusa (povratna titracija), WHO standarda, negativne kontrole, kontrole virusa i uzoraka. U red predviđen za kontrolu stanica dodala sam 150 µL medija. Ploče sam inkubirala 90 minuta, nakon čega sam odbacila sadržaj jažica okretanjem ploče te u svaku jažicu dodala 200 µL medija.

Mikrotitracijske ploče sam inkubirala dva dana pri 35˚C, 5% CO_2 i 95% vlage i potom pristupila postupku bojenja i očitavanju rezultata koji su opisani ranije (v. 3.6.2.5). Kao granica pozitivnosti postavljen je titar ≥1:27 (Serra-Cobo i sur., 2002.). Rezultati su očitani po principu „sve ili ništa“, tj. ako je i jedna stanica fluorescirala, jažicu sam smatrala negativnom (specifična protutijela nisu neutralizirala virus).

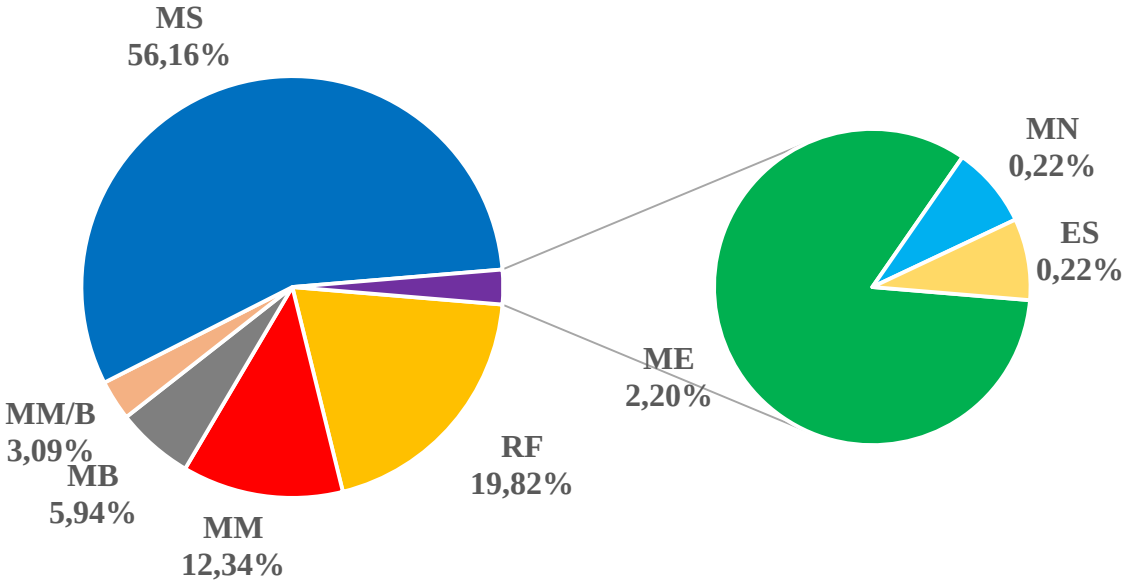


Slika 20. Organizacija ploče s uzorcima; brojevi 1 do 12 oznake su uzoraka; D i H označavaju redove u koje se dodaju uzorci.

4 REZULTATI

4.1 Uzorkovanje

Tijekom istraživanja ukupno su uhvaćena 455 šišmiša, pripadnici sedam vrsta (Slika 21): dugokrili pršnjak (lat. *Miniopterus schreibersii*, MS) (n = 255), veliki potkovnjak (lat. *Rhinolophus ferrumequinum*, RF) (n = 90), veliki šišmiš (lat. *Myotis myotis*, MM) (n = 56), oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis blythii*, MB) (n= 27), MM/B (n = 14), riđi šišmiš (lat. *Myotis emarginatus*, ME) (n = 10), resasti šišmiš (lat. *Myotis nattereri*, MN) (n = 1) i kasni noćnjak (lat. *Eptesicus serotinus*, ES) (n = 1).



Slika 21. Učestalost pojedinih vrsta šišmiša zastupljenih u ovom istraživanju. MS -dugokrili pršnjak (lat. *Miniopterus schreibersii*), RF - veliki potkovnjak (lat. *Rhinolophus ferrumequinum*), MM - veliki šišmiš (lat. *Myotis myotis*), MB - oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis blythii*), MM/B – veliki/oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis myotis/blythii*), ME - riđi šišmiš (lat. *Myotis emarginatus*), MN - resasti šišmiš (lat. *Myotis nattereri*), ES - kasni noćnjak (lat. *Eptesicus serotinus*). U ovom istraživanju su ukupno uhvaćena 455 šišmiša.

Jedna jedinka je pobjegla prije negoli joj je određena vrsta i spol. Među uhvaćenim šišmišima ženke su bile zastupljenije (n = 241, 53,1%) u odnosu na mužjake (n = 213, 46,9%). Većina hvatanja odrađena je tijekom proljeća (n = 277, 61%) kada je uhvaćeno i više ženki (n = 194, 70%), dok je u jesen uhvaćeno više mužjaka (Tablica 6).

Tablica 6. Raspodjela šišmiša prema sezoni i godini uzorkovanja te spolu.

Spol	**Proljeće 2016.**	**Proljeće 2017.**	**Jesen 2017.**
Mužjaci	56	27	130
Ženke	120	74	47
Neutvrđen			1
Ukupno	176	101	178

Obzirom na lokaciju najveći broj hvatanja proveden je na mediteranskim lokacijama (n = 7) gdje je prikupljeno ukupno 260 uzoraka, a na kontinentalnima (n = 4) 195. Većina uzoraka (44,62%) prikupljena je u špiljama Trbušnjak (n = 111) i Škarin samograd (n = 92) (Tablica 7). Izuzev dvije lokacije (crkva Sv Ilije proroka i Zagorska peć) na svim ostalima pronađene su kolonije sastavljene od više vrsta šišmiša (miješane kolonije) (Tablica 7).

Tablica 7. Raspodjela šišmiša prema vrsti, lokaciji i spolu s naznačenim brojem jedinki prema vrsti i lokaciji. MS -dugokrili pršnjak (lat. *Miniopterus schreibersii*), RF - veliki potkovnjak (lat. *Rhinolophus ferrumequinum*), MM - veliki šišmiš (lat. *Myotis myotis*), MB - oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis blythii*), MM/B – veliki/oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis myotis/blythii*), ME - riđi šišmiš (lat. *Myotis emarginatus*), MN - resasti šišmiš (lat. *Myotis nattereri*), ES - kasni noćnjak (lat. *Eptesicus serotinus*).

	Lokacija	**Vrsta**	**M**	**Ž**	**Ukupno po vrsti**	**Ukupno po lokaciji**
Kontinentalna Hrvatska	crkva Svetog Ilije proroka	MM	/	9	9	9

Tablica 7. (nastavak)

	Matešića špilja	ES	1	/	1	45
		MS	2	2	4	
		RF	31	9	40	
	špilja Trbušnjak	MS	29	36	65	111
		MM	2	43	45	
		RF	/	1	1	
	ugljenokop Banovo brdo	MS	7	19	26	30
		MM	/	2	2	
		RF	1	1	2	
Mediteranska Hrvatska	crkva Sveti Križ	RF	/	19	19	29
		ME	/	10	10	
	špilja Škarin samograd	MS	44	29	73	92
		MM/B	1	10	11	
		MB	1	/	1	
		MN	/	1	1	
		RF	3	3	6	
	Ćulumova peć	MS	10	9	19	38
		MB	4	1	5	
		MM/B	1	1	2	
		RF	9	3	12	
	Vodena peća	MS	14	1	15	21
		MB	4	1	5	
		RF	1	/	1	
	tunel Vrbničko polje	MS	4	4	8	19
		MB	1	/	1	
		RF	3	6	9	
		neodređena	/	/	/	
	špilja Topla peć	MS	24	10	34	50

Tablica 7. (nastavak)

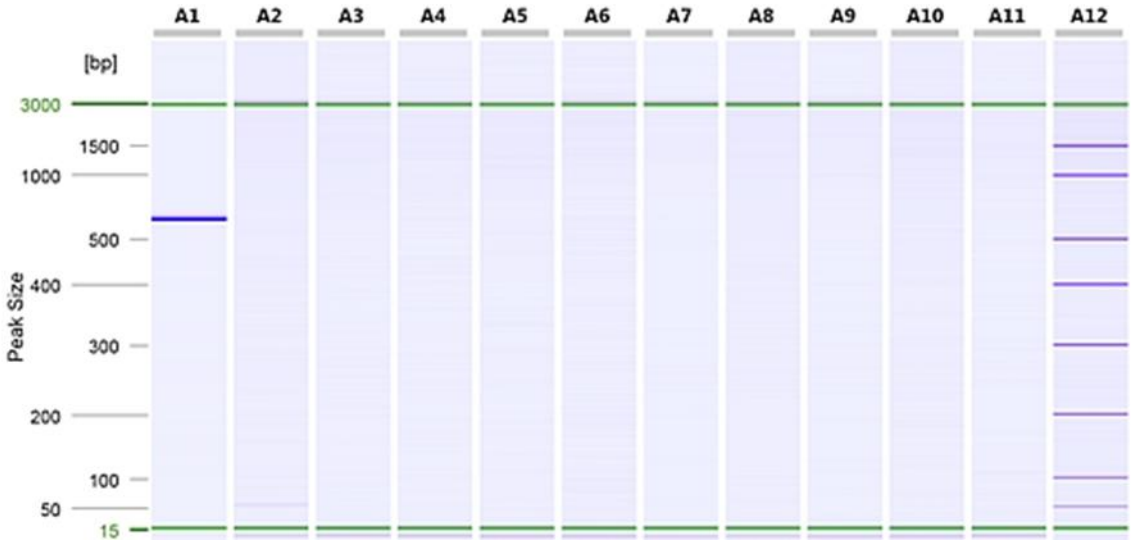
		MM/B	1	/	1	
		MB	14	1	15	
	špilja Zagorska peć	MS	1	10	11	11
Ukupno			213	241		455

4.2 Rezultati molekularnih metoda

4.2.1 Rezultati dokazivanja odsječka gena za nukleoprotein virusa EBLV-1

Prikupila sam 455, a obradila sam 453 obriska usne šupljine, dok je u dvije epruvete otopina za čuvanje nukleinskih kiselina kristalizirala pa te uzorke nisam bila u mogućnosti obraditi.

Postupkom lančane reakcije polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju, provela sam postupak umnožavanja odsječka (606 bp) gena za nukleoprotein lyssavirusa u uzorcima obrisaka usne šupljine. Svi uzorci su polučili negativan rezultat (Slika 22), odnosno virus nije utvrđen ni u jednom uzorku. Postupkom lančane reakcije polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju u stvarnom vremenu utvrdila sam prisutnost gena za beta-aktin u svim uzorcima kako bih isključila lažno negativan rezultat pretrage na prisutnost lyssavirusa.



Slika 22. Rezultati umnožavanja gena za nukleoprotein lyssavirusa reakcijom RT-PCR. A1 pozitivna kontrola, A2 negativna kontrola, A3 – A11 uzorci, A12 DNA marker.

4.2.2 Rezultati sekvenciranja metodom NGS

Metodom NGS je obrađeno ukupno 28 skupnih obrisaka usne šupljine, pet uzorka gvana i deset uzorka fecesa (pet pojedinačnih i pet skupnih) (Tablica 8) s ciljem razotkrivanja viroma šišmiša. Obrisci usne šupljine su uzorkovani na svim lokacijama, a gvano na tri mediteranske i dvije kontinentalne lokacije. Feces je uspješno uzorkovan na tri mediteranske i tri kontinentalne lokacije (Tablica 8). Na preostalim lokacijama gvano i feces nisu bili dostupni.

Tablica 8. Sažeti pregled uzoraka, lokacija, vrsta uzoraka i šišmiša pretraženih metodom NGS s istaknutim brojem ukupnih očitanja (nukleotidni slijedovi) i brojem virusnih očitanja. MS -dugokrili pršnjak (lat. *Miniopterus schreibersii*), RF - veliki potkovnjak (lat. *Rhinolophus ferrumequinum*), MM - veliki šišmiš (lat. *Myotis myotis*), MB - oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis blythii*), ME - riđi šišmiš (lat. *Myotis emarginatus*), ES - kasni noćnjak (lat. *Eptesicus serotinus*).

Oznaka uzorka	**Vrsta uzorka**	**Lokacija**	**Vrsta šišmiša**	**Ukupan broj očitanja**	**Broj virusnih očitanja (%)**
1/1	obrisak	Škarin samograd	17 MS	148414	272 (0,18)
1/2	obrisak	Škarin samograd	11 MM	164 768	484 (0,29)
1/3	obrisak	Matešića špilja	18 RF	183 852	308 (0,17)
1/4	obrisak	Matešića špilja	15 RF	147 554	296 (0,20)
1/5	obrisak	Trbušnjak	15 MS, 15 MM	168 416	470 (0,28)
1/6	obrisak	Trbušnjak	15 MM, 15 MS	214 144	484 (0,23)
1/7	obrisak	Zagorska peć	11 MS	178 080	334 (0,19)
1/8	obrisak	Sv. Križ	19 RF	139 586	250 (0,18)
1/9	obrisak	Sv. Križ	10 ME	137 330	448 (0,33)
1/14	gvano	Škarin samograd	/	95 486	2 412 (2,53)
1/15	gvano	Sv.Križ	/	66 412	3 410 (5,13)

Tablica 8. (nastavak)

1/17	gvano	Zagorska peć	/	146616	4896 (3,34)
1/12	feces	Matešića špilja	1 RF	204830	348 (0,17)
1/13	feces	Trbušnjak	1 MS, 1 MM	157 556	1 124 (0,71)
1/16	feces	Sv Križ	7 RF	128594	49408 (38,42)
2/3	feces	Matešića špilja	1 MS	480 412	568 (0,12)
2/4	feces	Banovo brdo	2 MS	54 332	938 (1,73)
2/5	gvano	Sv. Ilija prorok	/	528 380	966 (0,18)
2/6	gvano	Trbušnjak	/	221 642	848 (0,38)
2/7	obrisak	Matešića špilja	MS	185 032	280 (0,15)
2/8	obrisak	Matešića špilja	RF	409 226	502 (0,12)
2/9	obrisak	Matešića špilja	1 ES	359 210	340 (0,09)
2/10	obrisak	Banovo brdo	MS	345 554	406 (0,12)
2/11	obrisak	Banovo brdo	RF	485 698	502 (0,10)
3/3	obrisak	Sv. Ilija prorok	MM	512 712	320 (0,06)
3/4	obrisak	Trbušnjak	RF	142 344	222 (0,16)
3/5	obrisak	Trbušnjak	MM	363 694	466 (0,128)
3/6	obrisak	Trbušnjak	MS	261 908	244 (0,09)
3/7	feces	Matešića špilja	1 ES	133 184	398 (0,30)
4/6	obrisak	Vrbničko polje	RF	22 024	126 (0,57)
4/8	obrisak	Topla peć	MB	19 166	42 (0,22)
4/9	obrisak	Topla peć	MS	99 570	262 (0,26)
4/10	obrisak	Škarin samograd	MS	56 042	208 (0,37)
4/11	obrisak	Škarin samograd	RF	64 410	200 (0,31)
4/12	obrisak	Ćulumova peć	RF	67 010	1 588 (2,37)
4/13	obrisak	Ćulumova peć	MS	13 690	96 (0,70)
4/14	obrisak	Ćulumova peć	MB	112 358	280 (0,25)
4/15	obrisak	Vodena peća	MB	108 178	300 (0,28)
4/16	obrisak	Vodena peća	MS	47 690	228 (0,48)

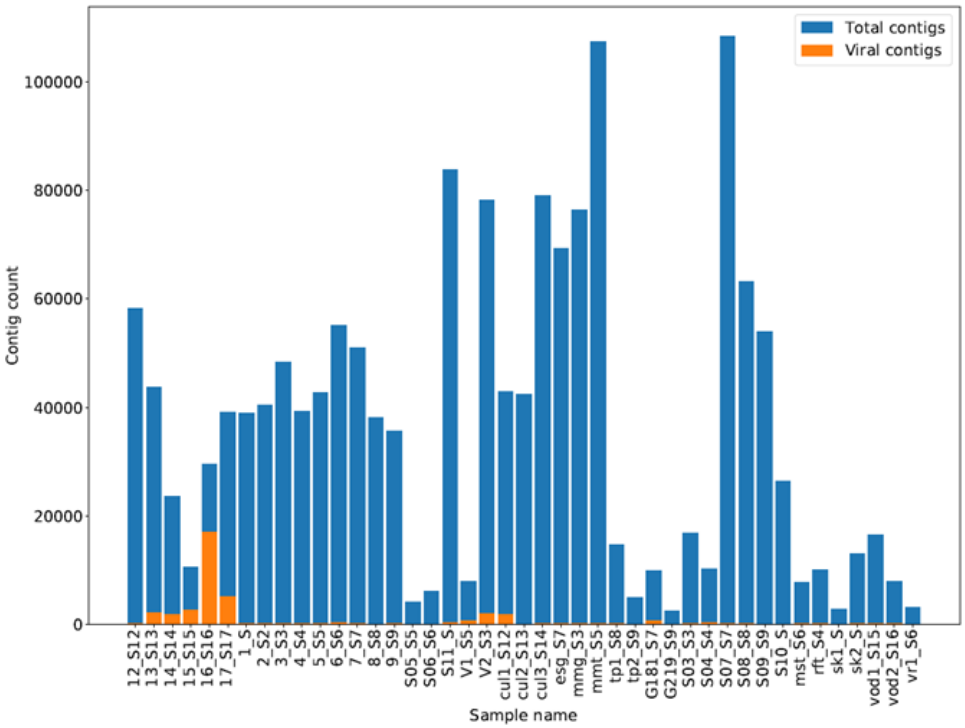
Tablica 8. (nastavak)

5/181	feces	Škarin samograd	MS	22 772	52 (0,23)
5/219	feces	Škarin samograd	MS	34 438	46 (0,13)
5/V1	feces	Vrbničko polje	MS, RF	71 742	496 (0,69)
5/V2	feces	Vrbničko polje	MS, RF	32 040	136 (0,42)
Ukupno				**7 536 096**	**76004 (1)**

Od ukupno 7 536 096 očitanja (engl. *reads*), prosječne duljine 150 bp, 1,00% (n = 76 004) pokazuje sličnost s poznatim virusima (Tablica 8).

Očitane sekvence su sklopljena u preklapajuće odsječke DNA (kontigove) što je podiglo specifičnost, no kako dužina očitanja nije uniformna nisu sva uspješno sastavljena u kontigove pa je to umanjilo osjetljivost.

U većini uzoraka je utvrđen manji udio virusnih kontigova (Slika 23), ukupno 39 527.



Slika 23. Grafički prikaz zastupljenosti virusnih kontigova (narančasto) u pojedinim uzorcima.

Na mediteranskim lokacijama je utvrđeno više virusnih sekvenci (n = 29 747) u usporedbi s kontinentalnim (n = 9 780). Obzirom na pojedinačnu lokaciju najviše je virusnih sekvenci utvrđeno na lokaciji Sv. Križ (n = 19 992), Zagorska peć (n = 5 330) i Trbušnjak (n = 4 977). U velikog potkovnjaka je utvrđen najveći broj virusnih sekvenci (n = 19 060), a slijede dugokrili pršnjak (n = 1 634), veliki šišmiš (n = 955), kasni noćnjak (n = 452), oštrouhi (n = 380) i riđi šišmiš (n = 256). U šišmiša kojem nije određena vrsta također je utvrđen veliki broj sekvenci (n = 14 681).

Među virusnim sekvencama prevladavaju virusi s jednolančanom (ss)RNA pozitivnog smisla (n = 18 672), slijede oni s dvolančanim (ds)DNA (n = 11 747) i ssDNA genomima (n = 3 240).

Prevladavaju sekvence koji odgovaraju virusima eukariota (n = 26 522) u odnosu na prokariote (n = 9 349) od koji su većina bakteriofagi (99,88%, n = 9 338). Među virusima eukariota najbrojniji su oni životinja (n = 24 903), zatim protista (n = 1 152), biljaka (n = 199) i gljiva (n = 6). Među virusima životinja najviše je onih koji inficiraju beskralježnjake (n = 21 603), a slijede virusi kralježnjaka (n = 3 300). Dio dobivenih virusnih kontigova (9,25%, n = 3 656) zasad se ne može klasificirati obzirom na domaćina.

Obzirom na tip uzorka najviše je sekvenci utvrđeno u pojedinačnim uzorcima fecesa (n = 19 951) gdje su najzastupljeniji virusi beskralježnjaka (83,18%, n = 16 595), zatim u gvanu (n = 14 377) gdje prevladavaju bakteriofazi (37,76%, n = 5 429), a najmanje u obriscima usne šupljine (n = 5 199) gdje je utvrđeno najviše kontigova koji se podudaraju s virusima kralježnjaka (39,91%, n = 2 075).

Taksonomska jedinica u koju su klasificirani kontigovi su virusne porodice što je omogućilo uvid u virusnu raznolikost. Sve virusne sekvence mogu se svrstati u 63 virusne porodice (Tablica 10) različitih tipova genoma: 23 (+)ssRNA, 22 dsDNA, 7 ssDNA, 5 dsRNA, 4 (-) ssRNA, 1 *reverse- transcribing* (RT) dsDNA i 1 RT-RNA. Više je različitih virusnih porodica na kontinentalnim lokacijama (n = 57) u odnosu na mediteranske (n = 46). Čak 50 porodica pronađeno je na kontinentalnoj lokaciji Trbušnjak, dok je od mediteranskih lokacija najviše virusnih porodica utvrđeno u Škarinom samogradu (n = 32) (Tablica 9 i Tablica 10). Najzastupljenije porodice su *Iflaviridae* (44,64%, n = 17 645), slijedi *Siphoviridae* (9,6%, n = 3 791) i *Podoviridae* (7,4%, n = 2 906). Na razini porodice 14,23% kontigova (n = 5 628) nije bilo

moguće klasificirati odnosno svrstali su se kao nepoznato ili neklasificirano. U fecesu je utvrđeno 30, u obrisku 39, a u gvanu 56 virusnih porodica (Tablica 10). U velikog potkovnjaka (n = 36) je utvrđeno najviše virusnih porodica, a slijede dugokrili pršnjak (n = 30), veliki šišmiš (n = 24), kasni noćnjak (n = 19), riđi (n = 18) te oštrouhi šišmiš (n = 14).

Tablica 9. Broj virusnih porodica utvrđenih u šišmiša metodom NGS po lokacijama.

	Lokacija	**Broj virusnih porodica**
Mediteranske lokacije	Zagorska peć	24
	Topla peć	12
	Škarin samograd	32
	Vrbničko polje	15
	Vodena peća	14
	Ćulumova peć	16
	Sv. Križ	29
Kontinentalne lokacije	Matešića špilja	37
	Trbušnjak	50
	Sv. Ilija prorok	35
	Banovo brdo	28

Tablica 10. Virusne porodice. Sve virusne porodice utvrđene u ovom istraživanju, njihov domaćin, tip uzorka (obrisak - O, gvano – G, feces - F), tip genoma ((+)ssRNA – jednolančana RNA pozitivnog smisla, (-)ssRNA – jednolančana RNA negativnog smisla, dsRNA – dvolančana RNA, ssDNA – jednolančana DNA, dsDNA – dvolančana DNA, RT-DNA – revezno transkribirajuća DNA, RT-RNA – reverzno transkribirajuća RNA) i lokacija na kojoj su pronađene (kontinentalna - K, mediteranska - M).

Redni broj	**Virusna porodica**	**Domaćin**	**Tip genoma**	**Tip uzorka**	**Lokacija**
1.	*Tymoviridae*	Biljke	(+)ssRNA	G	K
2.	*Caulimoviridae*	Biljke	RT-DNA	O, G, F	K, M
3.	*Nanoviridae*	Biljke	ssDNA	G	M
4.	*Virgaviridae*	Biljke	(+)ssRNA	G	K
5.	*Partitiviridae*	Biljke	dsRNA	G, F	K, M
6.	*Luteoviridae*	Biljke	(+)ssRNA	G, F	K
7.	*Solemoviridae*	Biljke	(+)ssRNA	G, F	K
8.	*Bromoviridae*	Biljke	(+)ssRNA	G	K
9.	*Tombusviridae*	Biljke	(+)ssRNA	G	K
10.	*Secoviridae*	Biljke	(+)ssRNA	G	K, M
11.	*Potyviridae*	Biljke	(+)ssRNA	O	K, M
12.	*Betaflexviridae*	Biljke	(+)ssRNA	O, G	K
13.	*Rhabdoviridae*	Biljke	(-)ssRNA	G	K
14.	*Phycodnaviridae*	Alge	dsDNA	O, G, F	K, M
15.	*Siphoviridae*	bakterije, arhebakterije	dsDNA	O, G, F	K, M
16.	*Ackermannviridae*	Bakterije	dsDNA	O, G, F	K, M
17.	*Myoviridae*	bakterije, arheje	dsDNA	O, G, F	K, M
18.	*Spiraviridae*	Arheje	ssDNA	G	K
19.	*Inoviridae*	Bakterije	ssDNA	O, G, F	K, M
20.	*Bicaudaviridae*	Arheje	dsDNA	F	K
21.	*Microviridae*	Bakterije	ssDNA	O, G, F	K, M

Tablica 10. (nastavak)

22.	*Leviviridae*	Bakterije	(+)ssRNA	O, G	K
23.	*Podoviridae*	Bakterije	dsDNA	O, G, F	K, M
24.	*Peribunyaviridae*	Člankonošci	(-)ssRNA	G	K, M
25.	*Iridoviridae*	Beskralješnjaci	dsDNA	O, G, F	K, M
26.	*Baculoviridae*	Člankonošci	dsDNA	O, G, F	K, M
27.	*Ascoviridae*	Insekti	dsDNA	O, G, F	K, M
28.	*Parvoviridae*	insekti i kralježnjaci	ssDNA	O, G, F	K, M
29.	*Nodaviridae*	Insekti	(+)ssRNA	O, G	K, M
30.	*Phenuiviridae*	Insekti	(-)ssRNA	G	K
31.	*Dicistroviridae*	Beskralješnjaci	(+)ssRNA	O, G	K, M
32.	*Metaviridae*	Beskralješnjaci	(+)ssRNA	O, G, F	K, M
33.	*Nudiviridae*	Insekti	dsDNA	O, G, F	K, M
34.	*Totiviridae*	Insekti	dsRNA	G, F	K, M
35.	*Iflaviridae*	Insekti	(+)ssRNA	G, F	K, M
36.	*Polycipiviridae*	Insekti	(+)ssRNA	G	K, M
37.	*Permutotetraviridae*	Insekti	(+)ssRNA	G, F	K, M
38.	*Polydnaviridae*	insekti (ose)	dsDNA	O, G	K, M
39.	*Alphatetraviridae*	insekti (leptiri, moljci)	(+)ssRNA	O, G	K, M
40.	*Marseilleviridae*	Ameba	dsDNA	O, F	K, M
41.	*Mimiviridae*	Ameba	dsDNA	O, G, F	K, M
42.	*Pithoviridae*	Ameba	dsDNA	O, G, F	K, M
43.	*Hepeviridae*	sisavci i ptice	(+)ssRNA	O, G	K, M
44.	*Circoviridae*	sisavci i ptice	ssDNA	G	K, M
45.	*Adenoviridae*	Kralježnjaci	dsDNA	O, F	K, M
46.	*Herpesviridae*	Kralježnjaci	dsDNA		K, M
47.	*Flaviviridae*	kralježnjaci; vektori: komarci i krpelji	(+)ssRNA	O, G, F	K, M

Tablica 10. (nastavak)

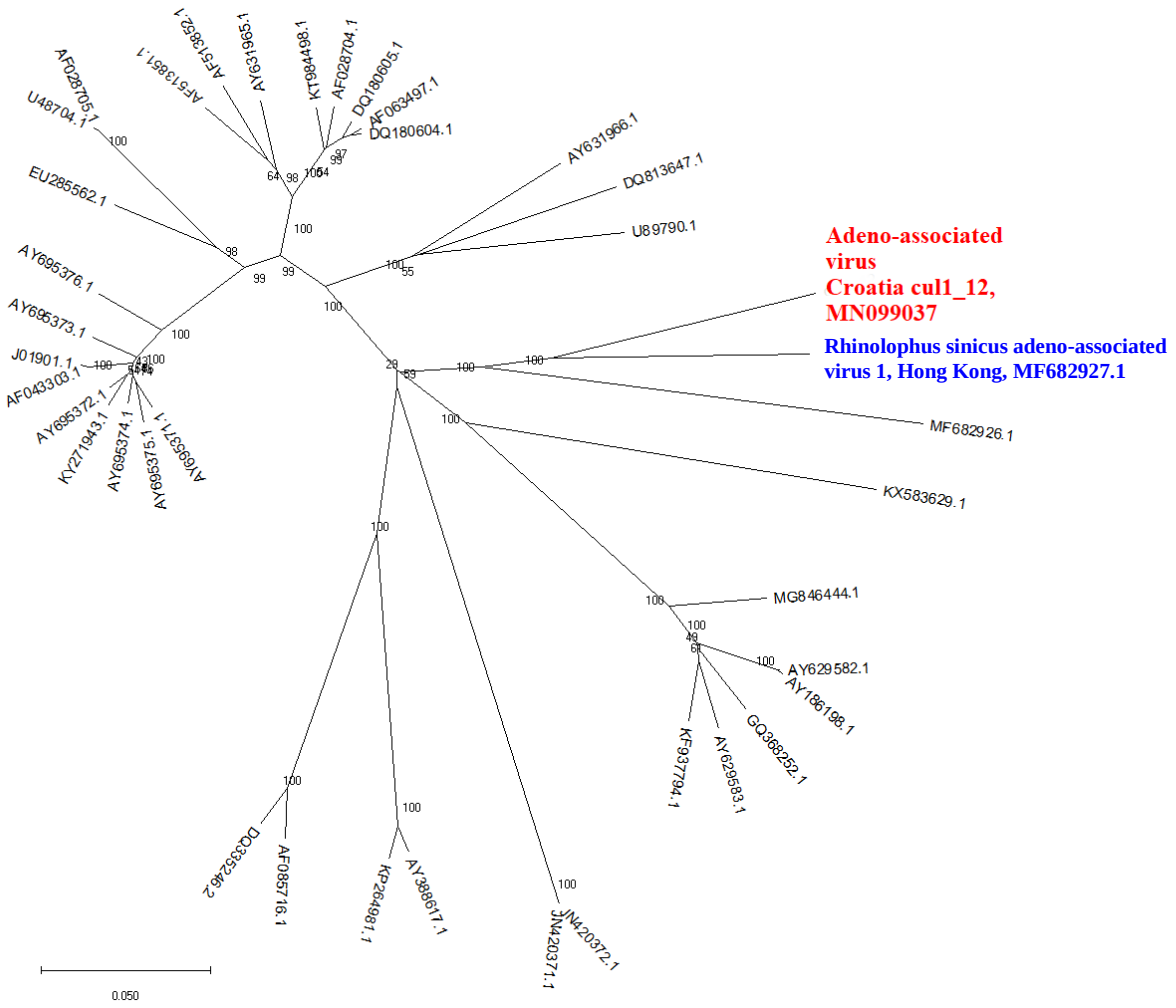
48.	*Bornaviridae*	sisavci i ptice	(-)ssRNA	O	M
49.	*Caliciviridae*	Kralježnjaci	(+)ssRNA	G	K
50.	*Coronaviridae*	Kralježnjaci	(+)ssRNA	O, G	K, M
51.	*Astroviridae*	Kralježnjaci	(+)ssRNA	O, G	K, M
52.	*Retroviridae*	Kralježnjaci	RT-RNA	O, G, F	K, M
53.	*Polyomaviridae*	sisavci i ptice	dsDNA	G	M
54.	*Asfarviridae*	sisavci, vektori: krpelji	dsDNA	O	M
55.	*Picornaviridae*	Kralježnjaci	(+)ssRNA	G	K, M
56.	*Genomoviridae*	sisavci, ptice i gljive	ssDNA	O, G	K, M
57.	*Picobirnaviridae*	nejasno: sisavci ili bakterije	dsRNA	G	K
58.	*Reoviridae*	kralježnjaci, beskralježnjaci, biljke i gljive	dsRNA	O, G, F	K
59.	*Poxviridae*	kralježnjaci, člankonošci	dsDNA	O, G, F	K, M
60.	*Autolykiviridae*	Bakterije	dsDNA	G	M
61.	*Alloherpesviridae*	Ribe	dsDNA	O, G	K
62.	*Malacoherepsviridae*	Mekušci	dsDNA	O	K, M
63.	*Birnaviridae*	Insekti	dsRNA	G	K

Analizom podataka rekonstruirano je, djelomično ili u cijelosti, nekoliko virusnih genoma:

1. Adeno-associated virus (AAV)

U obrisku sluznice usne šupljine velikog potkovnjaka iz Ćulumove peći (mediteranska lokacija) pronađen je cijeli genom adeno-associated virusa (AAV) (Adeno-associated virus Croatia cul1_12, pristupni broj MN099037) (Prilog C) iz porodice *Parvoviridae*, potporodice *Parvovirinae*, roda *Dependoparvovirus*. Genomska sekvenca je duga 4 561 nt i posjeduje dva

otvorena okvira čitanja (engl. *open reading frames*, ORF), oba na istom lancu DNA, koji vjerojatno kodiraju za replikazu (Rep, 5'- terminalna regija) i kapsidni protein (Cap, 3'-terminalna regija) omeđen obrnutim terminalnim ponavljanjima (engl. *inverted terminal repeat*, ITR) dugim 38 bp na 5' i 3' kraju. Filogenijsko svrstavanje, nukleotidna i aminokiselinska sličnost su procijenje uklapanjem cijelog genoma (RefSeq) te sekvenci Cap i Rep (Non-redundant protein dataset) u NCBI. Proteini hrvatskog izolata dependoparvovirusa imaju 80 do 85% aminokiselinske (ak) i 75 do 79% nukleotidne (nt) sličnosti s proteinima Rep i Cap virusa pronađenog u šišmiša *Rhinolophus sinicus* adeno-associated virus 1 strain Rs-BtAAV1_82A_TLC01_HKG_2011 (pristupni broj MF682927.1) u Hong Kongu (Slika 24).

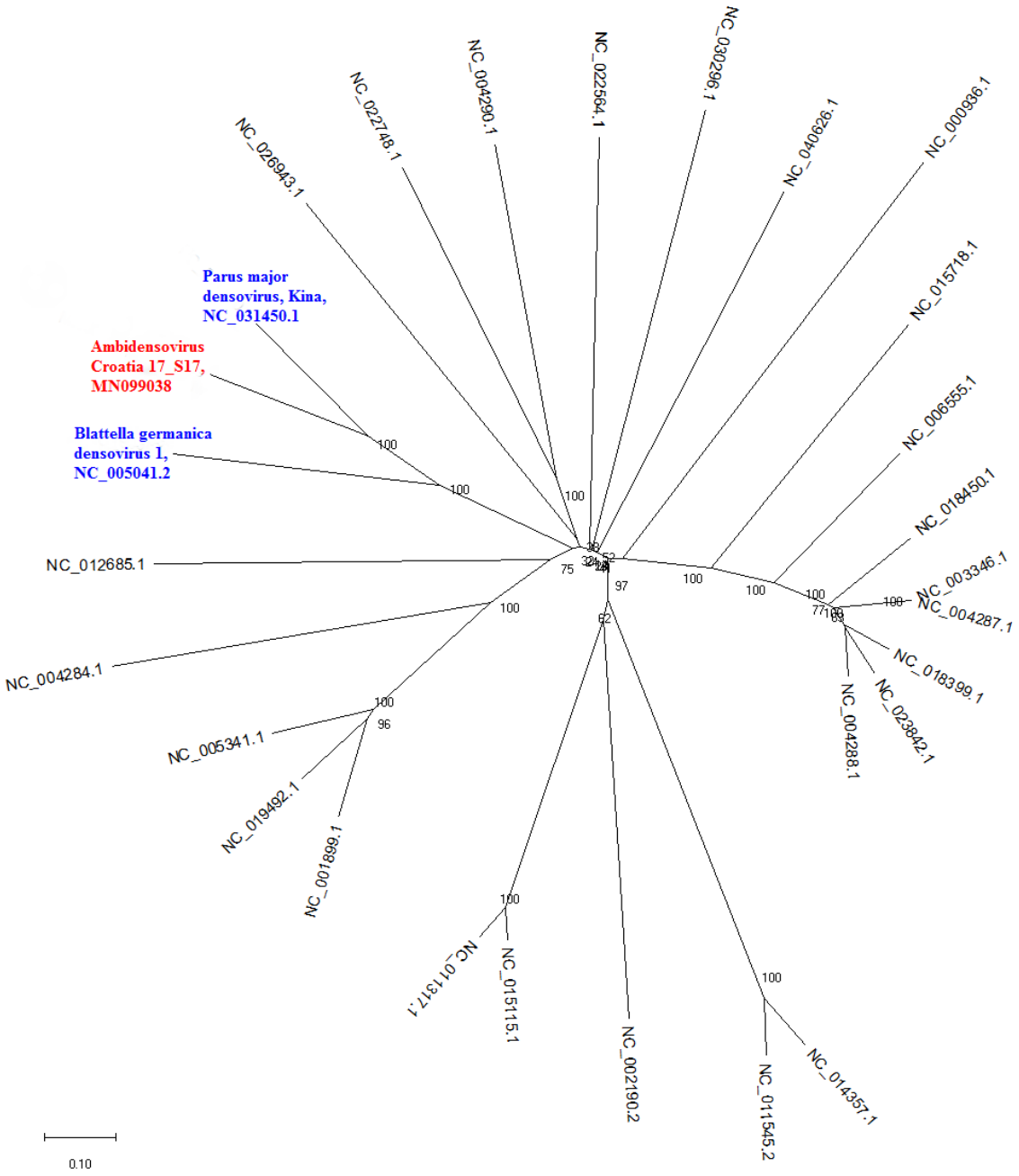


Slika 24. Filogenetska povezanost hrvatskog izolata adeno-asocciated virus (crveno) dokazanog u velikog potkovnjaka s referentnim izolatima (najsrodniji izolat je označen plavo) na osnovi nukleotidnih slijedova. Prikazano filogenetsko stablo je formirano koristeći metodu susjednog sparivanja (engl. n*eighbour-joining*) uz model p-udaljenost. Kvaliteta svrstavanja pojedinih taksona dobivena je metodom samoučitavanja (engl. *bootstrap*) s 1 000 ponavljanja, s vrijednostima naznačenim uz čvorišta. Skala označava evolucijsku udaljenost. Objašnjenje korištenih sekvenci nalazi se u Prilogu B.

2. Ambidensovirus

U uzorku gvana ispod kolonije dugokrilog pršnjaka u Zagorskoj peći (mediteranska lokacija) pronađen je i sastavljen *de novo* cijeli genom ambidensovirusa (Ambidensovirus Croatia 17_S17, pristupni broj MN099038) (Slika 25, Prilog C) koji je najsličniji nukleotidnim sekvencama densovirusa i denso-like virusa u banci gena. Genom je dug 6 110 nt, posjeduje 3'- i 5'- terminalne palindromske sekvence i pet ORF-ova koji kodiraju za tri nestrukturna proteina

(NS1, NS2 i NS3) 5' terminalne regije pozitivnog DNA lanca i dva strukturna proteina (VP1 i VP4) 5' terminalne regije negativnog lanca. Cijeli genom hrvatskog izolata virusa ima najveću podudarnost s NCBI RefSeq cijelim genomima densovirusa utvrđenog u velike sjenice (70,6% nt) (*Parus major* densovirus PmDNV-JL, pristupni broj NC_031450.1) i densovirusa utvrđenog u žohara (64,2%) (*Blattella germanica* densovirus 1, pristupni broj NC_005041). To je utvrđeno korištenjem programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT; v1.2, Muhire i sur., 2014.). Proteinska sekvenca NS1 hrvatskog izolata pokazuje 60,15% ak sličnosti s proteinom NS1 densovirusa pronađenog u žohara (*Blatella germanica* densovirus 1, pristupni broj NP_874381), 75% s NS2 *Blattella germanica* densovirus-like virus (pristupni broj AFC75859.1) i 45% s proteinom NS3 *Parus major* densovirus PmDNV-JL (pristupni broj YP_009310052.1). Genom ima 51% i 64% ak sličnosti s VP1 i VP4 *Blattella germanica* densovirus-like virus (pristupni brojevi AFC75861.1 i AFC75860.1).



Slika 25. Filogenetska povezanost cijelog genoma hrvatskog izolata ambidensovirusa (crveno) dokazanog u uzorku gvana ispod kolonije dugokrilog pršnjaka s referentnim izolatima (najsrodniji su označeni plavo) na osnovi nukleotidnih slijedova. Prikazano filogenetsko stablo je formirano koristeći metodu susjednog sparivanja (engl. n*eighbour-joining*) uz model p-udaljenost. Kvaliteta svrstavanja pojedinih taksona dobivena je metodom samoučitavanja (engl. *bootstrap*) s 1 000 ponavljanja, s vrijednostima naznačenim uz čvorišta. Skala označava evolucijsku udaljenost. Objašnjenje korištenih sekvenci nalazi se u Prilogu B.

3. Iflavirus

U uzorku gvana ispod miješane kolonije riđeg šišmiša i velikog potkovnjaka i uzorku fecesa velikog potkovnjaka s lokacije Sv. Križ (mediteranska lokacija) generirane su dvije sekvence iflavirusa (od 4211 nt i 1964 nt) iz 1158 očitanja s najvećom pokrivenošću 93 (pristupni brojevi MG963177 i MG963178) (Prilog C). Sekvence iflavirusa pokazuju 74 i 78% sličnosti na razini nukleotida sa *Spodoptera exigua iflavirusom 2* utvrđenim u Španjolskoj (pistupni broj KJ186788) i Koreji (pristupni broj JN870848). Te dvije sekvence predstavljaju 65% cijelog genoma iflavirusa i kodiraju za poliprotein iflavirusa.

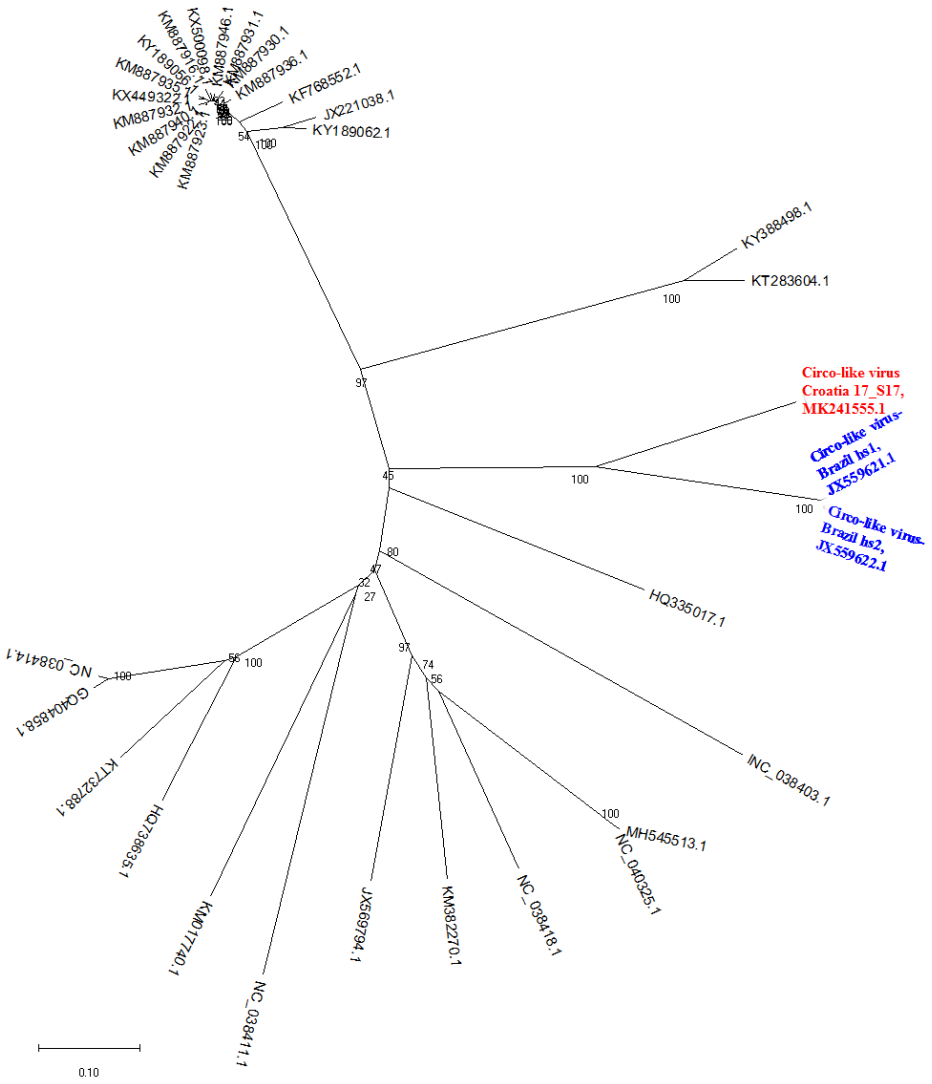
4. Circovirus šišmiša

U uzorku gvana ispod kolonije dugokrilog pršnjaka iz Zagorske peći (mediteranska lokacija) pronađen je cijeli genom circo-like virusa (pristupni broj MK241555.1, Circo-like virus Croatia 17_S17) (Prilog C). Identificirana su četiri ORF-a u genomu koji su na istom lancu.

Filogenetska analiza, temeljena na sekvenci proteina Rep, pokazuje da se Circo-like virus-Croatia 17_S17 grupira s ljudskim CRESS-DNA virusima (circo-like virusi) iz Brazila prije nego s circovirusima šišmiša (Slika 26).

Nukleotidna identičnost između Circo-like virus-Croatia 17_S17 i sekvenci Circo-like virus Brasil hs1 i hs2 (pristupni broj JX559622, NC_023888) je 60,65 do 60,98%.

Circo-like virus-Croatia 17_S17 ima tri RCR motiva: RCR motiv I [FTEFN], RCR motiv II [VHVQG] i RCR motiv III [YCKK] te Walker A GPPGTGKS, Walker B IIDDF i motiv C ITSN. Circo-like virus-Croatia 17_S17 ima nonanukleotidni motiv TAATACTAT koji je jednak onom u cyclovirusa. Otvoreni okviri čitanja utvrđeni su korištenjem programa ORFfinder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/).



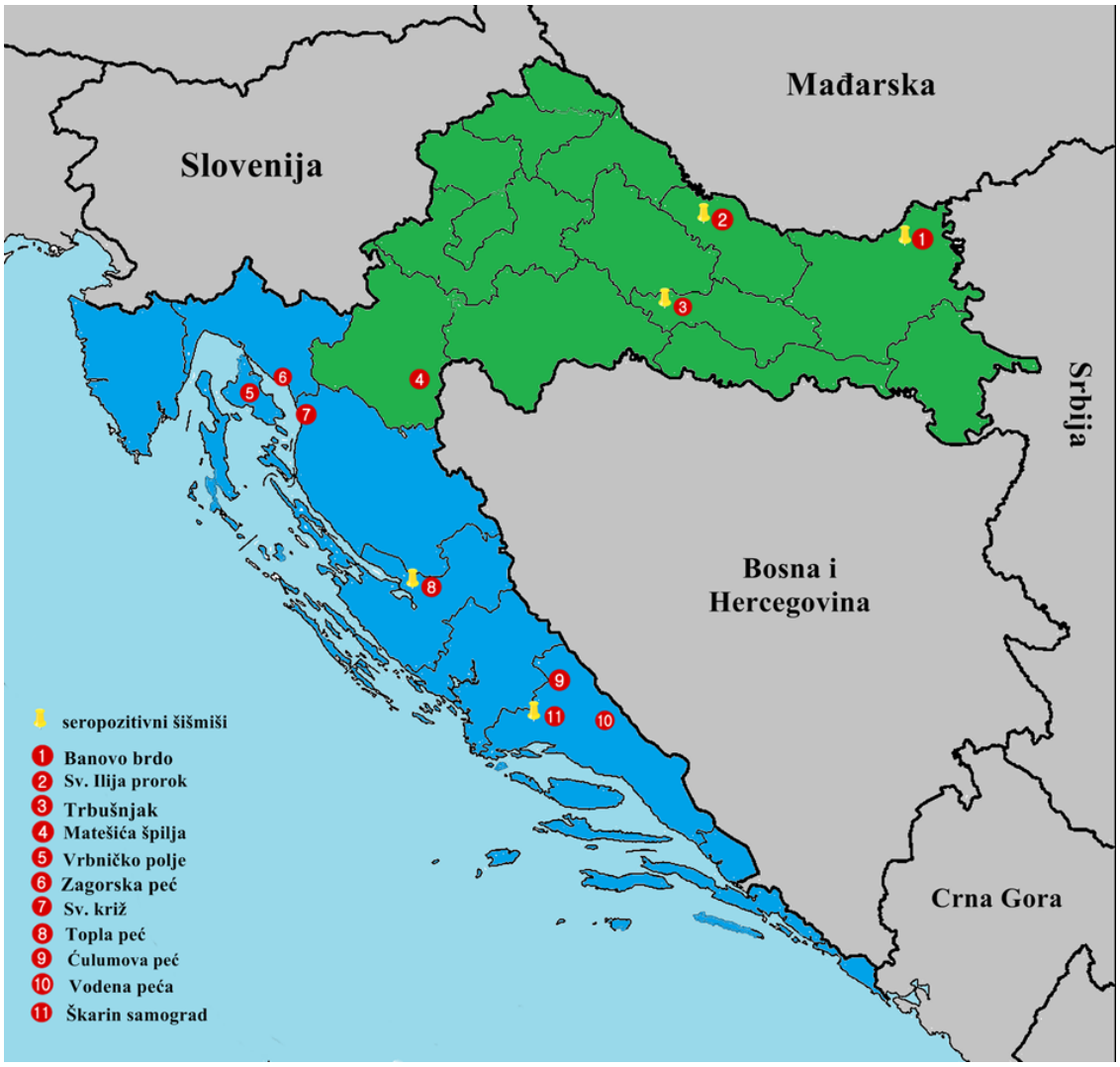
Slika 26. Filogenetska povezanost hrvatskog izolata circo-like virusa (crveno) dokazanog u gvanu ispod kolonije dugokrilog pršnjaka s referentnim izolatima (najsrodniji su označeni plavo) na osnovi nukleotidnih slijedova. Prikazano filogenetsko stablo je formirano na osnovi nukleotidnih slijedova gena Rep koristeći metodu susjednog sparivanja (engl. *neighbour-joining*) uz model p-udaljenost. Kvaliteta svrstavanja pojedinih taksona, dobivena je metodom samoučitavanja (engl. *bootstrap*) s 1 000 ponavljanja, s vrijednostima naznačenim uz čvorišta. Skala označava evolucijsku udaljenost. Objašnjenje korištenih sekvenci u Prilogu B

4.3 Rezultati seroloških metoda

4.3.1 Rezultati dokazivanja protutijela za EBLV-1 virus neutralizacijskim testom (mFAVN)

Krv sam prikupila od ukupno 392 šišmiša (86,15%, 392/455), dok od 63 jedinke (13,85%) nisam zbog nastanka hematoma ili nepojavljivanja kapi krvi na mjestu uboda. Kako su za virus neutalizacijski test potrebna najmanje dva papira potpuno natopljena krvlju, uzorka u dovoljnoj količini za test sam imala od ukupno 363 jedinke. U slučaju da od pojedinog šišmiša nisam uspjela prikupiti najmanje dva papira, istog nisam pretraživala virus neutralizacijskim testom. Od 363 uzorka za njih 7 nije bilo moguće očitati rezultat testa zbog citotoksičnosti (u jažici nije bilo stanica po završetku testa), dok za njih 6 rezultati nisu dobiveni zbog kvara termostata tijekom dvodnevne inkubacije. Od 350 uzoraka za koje je dobiven nedvosmislen rezultat (pozitivno ili negativno), od čega je 139 prikupljeno na kontinentalnim lokacijama, a 211 na mediteranskim, njih 330 je imalo titar protutijela <1:27 (Serra-Cobo i sur., 2002.).

Prisutnost neutralizirajućih protutijela u titru ≥1:27 sam utvrdila u 20 šišmiša (2016. godine n = 11 i 2017. godine n = 9) što ukazuje na serološku prevalenciju (seroprevalenciju) od 5,71% (20/350). Dokaz prisutnosti protutijela neizravno ukazuje na kruženje virusa EBLV-1 u populacijama hrvatskih šišmiša.



Slika 27. Lokacije na kojima su pronađeni seropozitivni šišmiši (žuta oznaka).

Protutijela su utvrđena u velikog šišmiša (n = 13), dugokrilog pršnjaka (n = 5), oštrouhog šišmiša (n = 1) i *Myotis myotis/blythii* (n = 1) (Tablica 11).

Protutijela za virus EBLV-1 utvrđena su na pet lokacija. Većina seropozitivnih jedinki (n = 15) potječe s kontinentalnih lokacija: špilja Trbušnjak (n = 13, od toga je 10 jedinki u 2016. i tri 2017. godini), ugljenokop Banovo brdo (n = 1) i crkva Sv. Ilije proroka (n = 1). Seropozitivne jedinki utvrđene su i na dvije mediteranske lokacije (špilje Škarin samograd (n = 1) i Topla peć (n = 4)) (Slika 27).

Među seropozitivnim jedinkama prevladavale su ženke (n = 16) nasuprot mužjacima (n = 4). Većina seropozitivnih jedinki (n = 16) je ulovljena u proljeće (1 mužjak i 15 ženki), a manji broj (3 mužjaka i 1 ženka) u jesen (Tablica 11).

Tablica 11. Zbirni prikaz serološki pretraženih jedinki virus neutralizacijskim testom na prisutnost protutijela za EBLV-1, po vrstama i spolu. M – mužjaci, Ž – ženke, poz – pozitivno, MS – dugokrili pršnjak (lat. *Miniopterus schreibersii*), MM – veliki šišmiš (lat. *Myotis myotis*), RF – veliki potkovnjak (lat. *Rhinolophus ferrumequinum*), ME – riđi šišmiš (lat. *Myotis emarginatus*), ES – kasni noćnjak (lat. *Eptesicus serotinus*), MB – oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis blythii*), MM/B – veliki/oštrouhi šišmiš (lat. *Myotis myotis/blythii*).

Vrsta	**Prikupljeni uzorci**			**Obrađeni uzorci**			**Rezultati**				
	Ukupno	**M**	**Ž**	**Ukupno**	**M**	**Ž**	**Ukupno**	**M**		**Ž**	
								Ukupno	**Poz**	**Ukupno**	**Poz**
ES	1	1		1	1		1	1			
MS	222	109	113	210	100	110	200	96	2	104	3
MB	17	15	2	16	14	2	16	14	1	2	
ME	1		1								
MM	56	2	54	53	2	51	52	2	1	50	12
MM/B	7	2	5	3	1	2	2			2	1
MN	1		1	1		1	1			1	
RF	86	45	41	78	40	38	77	39		38	
Neutvrđena	1			1			1				
Ukupno	392	174	217	363	158	204	350	152	4	197	16

5 RASPRAVA

Cilj ove disertacije bio je po prvi puta istražiti prisutnost virusa u populaciji šišmiša u Hrvatskoj. Po prvi put sam utvrdila prisutnost specifičnih protutijela za lyssaviruse te sam pretražila virom šišmiša primjenjujući tehnologiju sekvenciranja nove generacije. Dokazana prisutnost lyssavirusa ukazuje na važnost šišmiša sa stanovišta javnog zdravstva i omogućuje kreiranje smjernica u slučaju kontakta čovjeka i šišmiša temeljenih na stvarnim podacima. S druge strane, istraživanje i praćenje viroma šišmiša je važno jer je on već ranije prepoznat kao izvor mnogih virusnih zoonoza od kojih su neke odgovorne i za epidemije velikih razmjera u ljudi. Nadalje, praćenje viroma je važno i sa stanovišta zdravlja šišmiša kao ugrožene vrste koja uvelike doprinosi uklanjanju poljoprivrednih štetnika i koja je svojevrsni bioindikator zbivanja u okolišu.

Trenutno su u Hrvatskoj prisutne 34 vrste šišmiša no podatci o njihovoj zastupljenosti i rasprostranjenosti su nepotpuni (Pavlinić i sur., 2010.). Uzimajući u obzir rezultate drugih istraživanja (Serra-Cobo i sur., 2002., Schatz i sur., 2014., Picard-Meyer i sur., 2011.), tehničke kapacitete te činjenicu da nema otprije dostupnih podataka o dokazu bjesnoće u šišmiša u Hrvatskoj (Pavlinić i sur., 2009., Heneberg i sur., 1968.) u istraživanje je uključen manji broj vrsta (sedam). Na temelju ranijih istraživanja naglasak je bilo potrebno staviti na vrste koje se smatraju rezervoarima lyssavirusa (kasnog noćnjaka i riječnog šišmiša), koji su trenutno jedini zoonotski virusi u Europi (Banyard i sur., 2013.). Međutim, iako su poznate hibernacijske i porodiljine kolonije kasnog noćnjaka (Pavlinić i sur., 2011., MZOIP, 2014.), uhvaćena je samo jedna jedinka ove vrste jer nisu formirali kolonije kako se očekivalo što ukazuje na nepredvidljiv ishod istraživanja prilikom rada na divljim vrstama u njihovom staništu. S druge strane, riječni šišmiš nije bio uključen zbog bioloških karakteristika ove šumske vrste koja kao skloništе koristi šupljine na stablima i pukotine mostova te ih mijenja svakih dva do pet dana (Tvrtković, 2017.). Kako nisu poznata sva staništa šišmiša, a uzimajući u obzir ograničen vremenski period u kojem je uzorkovanje bilo dozvoljeno kao i ograničena financijska sredstva, uz pomoć hiropterologa, odabrane su vrste za koje su poznate pristupačne lokacije porodiljnih kolonija i mjesta rojenja. Zbog meni nepoznatih čimbenika na nekim lokacijama nisu pronađene očekivane vrste, dok na nekima uopće nije bilo šišmiša što je još jednom potvrdilo nepredvidljivost rada s divljim vrstama.

Negativan nalaz obrisaka usne šupljine na prisutnost specifičnih dijelova genoma lyssavirusa upućuje na zaključak da se virus nije izlučivao u trenutku uzorkovanja ili je broj kopija genoma bio ispod granica detekcije korištenih molekularnih metoda (Banyard i sur., 2013.). Ovakav nalaz je u skladu sa sličnim istraživanjima u više europskih država (primjerice Švedska, Francuska, Srbija, Slovenija) (Picard-Meyer i sur., 2011., Hammarin i sur., 2016., Vranješ i sur., 2010., Hostnik i sur., 2009.) i rezultatima eksperimentalnih inokulacija šišmiša kojima je utvrđeno da se virus intermitentno izlučuje u slini (Banyard i sur., 2013.), a što može objasniti odsutnost genoma u obrisku i u ovom istraživanju. Ranija istraživanja ukazuju da se vjerojatnost utvrđivanja genoma lyssavirusa povećava s brojem pretraženih uzoraka i s većom zastupljenošću rezervoara. Tako je primjerice u Njemačkoj tijekom 20 godina pretraženo 4277 obrisaka usne šupljine, a virus EBLV-1 je ustanovljen u njih sedam od čega je većina pripadala kasnim noćnjacima (5/7) (Schatz i sur., 2014.). U istraživanju provedenom u Švicarskoj od 237 uzorkovanih šišmiša, od čega su većina bili riječni šišmiši (n = 148), u jednog je utvrđen virus EBLV-2 (Megali i sur., 2010.). Međutim, uzimajući u obzir patogenezu bjesnoće moždano tkivo je najprikladnije za pouzdano utvrđivanje prisutnosti lyssavirusa u neke jedinke (WHO, 2013.). No, u šišmiša su zabilježeni slučajevi gdje se virus ili njegov genom nisu mogli utvrditi u SŽS-u, ali jesu u ekstraneuralnim organima i tkivima (Serra-Cobo i sur., 2002.). Kako su šišmiši strogo zaštićena vrsta, tkiva i organi nisu bili dostupni što je vjerojatno dodatno doprinijelo neutvrđivanju lyssavirusnog genoma i naglašava važnost pasivnog nadzora (pretraživanje uginulih jedinki), a što potvrđuju i iskustva iz drugih zemalja (Megali i sur., 2010., Schatz i sur., 2014a).

Obzirom na objektivna ograničenja u ovom istraživanju (financijska sredstva, trajanje uzorkovanja, nepoznavanje rasprostranjenosti šišmiša) zaključila bih da su rezultati u skladu s očekivanjima pri čemu su upravo manji broj pretraženih šišmiša ukupno te rezervoara pojedinačno najizgledniji razlog neutvrđivanja genoma lyssavirusa.

Dok je obrisak sluznice usne šupljine lako dostupan uzorak, prikupljanje krvi je mnogo zahtjevnije (zbog male tjelesne mase šišmiša, male količine krvi te torpora), ali je veća vjerojatnost neizravnog dokazivanja prisutnosti virusa (Brookes i sur., 2005., Picard-Meyer i sur., 2011., Hammarin i sur., 2016.).

U ovom istraživanju sam utvrdila nisku seroprevalenciju specifičnih protutijela od 5,71% i time sam po prvi put neizravno dokazala kruženje lyssavirusa u populaciji šišmiša u Hrvatskoj i tako proširila spoznaje o epidemiologiji bjesnoće. Iako je zbog nestandardiziranosti seroloških metoda teško uspoređivati rezultate različitih istraživanja, slična seroprevalencija je zabilježena u više europskih zemalja poput Njemačke (Schatz i sur., 2014.), Francuske (Picard-Meyer i sur., 2011.), Švicarske (Megali i sur., 2010.), Škotske (Brooks i sur., 2005.) i Švedske (Hammarin i sur., 2016.).

Nestandardiziranost seroloških metoda otežava usporedbu rezultata, a posljedica je uporabe različitih virus neutralizacijskih testova i razrjeđenja seruma, postavljanja različite granice pozitivnosti i odabira različitog testnog virusa (Megali i sur., 2010., Schatz i sur., 2014., Picard-Meyer i sur., 2011., Brookes i sur., 2005.). U ovom istraživanju sam koristila test mFAVN, početno razrjeđenje seruma 1:9 s granicom pozitivnosti ≥1:27. Postavljanjem ovako visoke granice pozitivnosti izbjegla sam lažno pozitivne rezultate, ali postoji i mogućnost da sam previdjela neke slabo pozitivni uzorke (Brookes i sur., 2005.). Iako su specifična protutijela utvrđena u više europskih vrsta šišmiša, zbog križne reaktivnosti između pripadnika jedne filogrupe, seropozitivnost nije moguće u potpunosti povezati sa specifičnim lyssavirusom (Hammarin i sur., 2016.). U nekim istraživanjima se kao testni virus koristio samo virus EBLV-1 (Serra-Cobo i sur., 2002., Picard-Meyer i sur., 2011., Schatz i sur., 2014.) ili EBLV-2 (Brookes i sur., 2005.), a u drugima dio uzoraka je ispitan s virusom EBLV-1 odnosno EBLV-2 ili RABV (*challenge virus standars*, CVS) kako bi se potvrdila specifičnost protutijela (Serra-Cobo i sur., 2002, Megali i sur., 2010.) jer je homologni imuni odgovor ipak jači nego heterologni (Moore i sur., 2005.). Dok se odabir virusa EBLV-1 kao testnog virusa čini ispravnim kad se ispituju serumi kasnog noćnjaka, teško je odabrati odgovarajući testni virus kada su u pitanju druge vrste (Schatz i sur., 2014.). U ovom istraživanju sam koristila kao testni virus EBLV-1 jer zbog male količine uzorka nisam bila u mogućnosti ponoviti test s virusom EBLV-2, RABV ili predstavnicima trenutno neodređenih filogrupa (poput virusa LLEBV) pa stoga postoji mogućnost da sam propustila utvrditi serokonverziju u nekih jedinki, posebice u dugokrilog pršnjaka koji se povezuje s virusima WCBV i LLEBV (Botvinkin i sur., 2003., Aréchiga Ceballos i sur., 2013.). S virusom LLEBV nisam radila iz biosigurnosnih razloga obzirom da je riječ o pripadniku trenutno neodređenih filogrupa za kojeg se smatra da dostupna cjepiva ne pružaju učinkovitu zaštitu (Banyard i sur., 2013.). Sve navedene razlike između istraživanja

naglašavaju potrebu za standardizacijom metoda. U budućnosti bi svakako trebalo provesti i serološka pretraživanja koristeći različite testne viruse.

Najviši postotak seropozitivnih šišmiša utvrđen je u špilji Trbušnjak koja je dom najveće miješane porodiljne kolonije šišmiša u Hrvatskoj (https://www.pszupanija.hr/arhiva-novosti/60-ured-upana/novosti/313-pakraka-pilja-trbunjak-najvea-kolonija-imia-u-nas.html) što dodatno potvrđuje da je bjesnoća bolest uvjetovana gustoćom populacije (EFSA, 2015.). Ujedno u ovoj špilji je uzorkovan najveći broj šišmiša pa je i to vjerojatno doprinijelo činjenici da je upravo ovdje utvrđeno najviše seropozitivnih jedinki. Zbog zakonskih ograničenja nisam smjela prstenovati šišmiše što bi omogućilo sustavnije i organiziranije uzorkovanje kao i bolje razumijevanje epidemiologije bjesnoće. Naime, zbog neoznačavanja nisam u mogućnosti odgovoriti na pitanje jesu li uzorkovane iste jedinke i je li u seropozitivnih šišmiša došlo do rasta ili pada titra protutijela, kao ni na pitanje o kretanju šišmiša između kolonija. To bi bilo posebno zanimljivo u kontekstu opažanja u španjolskim kolonijama gdje se razina seroprevalencije tijekom devetogodšinjeg razdoblja povećala s 3% jedne godine na 59% sljedeće godine da bi se spustila na 10% do kraja istraživanja (Serra Cobo i sur., 2002.).

Obzirom na spol među seropozitivnima su prevladavale ženke, a veći broj seropozitivnih jedinki sam utvrdila u proljeće (n = 16) u odnosu na jesen (n = 4) pri čemu je i veći broj šišmiša uhvaćen u proljeće (n = 277) u usporedbi s jeseni (n = 178). Uz to, proljeće je obilježeno fiziološkim specifičnostima u životnom ciklusu šišmiša pa i ta činjenica može igrati ulogu u utvrđenom nalazu. Naime, u proljeće dolazi do formiranja kolonija pa se miješaju jedinke iz različitih kolonija različitog zdravstvenog i imunosnog statusa te se povećava mogućnost za širenje virusa. Također, u tom periodu ženke su gravidne pa i to može utjecati na imunosni odgovor i sposobnost utvrđivanja protutijela (Racey, 2015., Brookes i sur., 2005.), ali da bi se u potpunosti razjasnio taj problem potrebna su dodatna istraživanja i dugoročno praćenje pojedinih kolonija.

Većina seropozitivnih jedinki je pripadala vrsti veliki šišmiš, za razliku od nekih drugih istraživanja (Picard-Meyer i sur., 2011., Schatz i sur., 2014.) u kojima je većina protutijela utvrđena u kasnog noćnjaka. Nedovoljna zastupljenost kasnog noćnjaka u ovom istraživanju može objasniti ovu razliku. No, virus neutralizacijska protutijela u 25% ispitanih velikih šišmiša ukazuje da je ova vrsta bila u dodiru s lyssavirusima filogrupe I i da može biti uključena u

njihovo rasprostranjivanje u Hrvatskoj, slično kao i u Španjolskoj (Serra-Cobo i sur., 2002.). Dodatno, ovaj nalaz treba promatrati u kontekstu da su u pripadnika roda Myotis utvrđeni različiti lyssavirusi (Tablica 2) što bi moglo ukazivati da ovaj rod igra ključnu ulogu u epidemiologiji lyssavirusa (Banyard i sur., 2013.).

Nakon velikog šišmiša, najveći postotak seropozitivnih su bili dugokrili pršnjaci. Dugokrili pršnjak tvori najveće zimske i porodiljne kolonije u Hrvatskoj (Pavlinić i sur., 2010.), a ujedno je i najzastupljenija vrsta u ovom istraživanju. Zabilježen je na čak devet (od 11) lokacija te na četiri od pet lokacija sa seropozitivnim šišmišima. Obzirom da ova vrsta sezonski migrira (Hutson i sur., 2008.) mogla bi biti ključna za širenje bjesnoće osim u Hrvatskoj i u susjednim zemljama. Tome u prilog govori i činjenica da je dugokrili pršnjak koji je označen u Sloveniji uhvaćen u Trbušnjaku (udaljenost 190 km) (Presetnik, 2009.), iako do sada u toj susjednoj zemlji nisu utvrđena ni protutijela ni virus u šišmiša (Hostnik i sur., 2009., Presetnik i sur., 2010.).

Usprkos navedenim nedostacima dobiveni rezultati pokazuju svu svrsishodnost ovakvih istraživanja i predstavljaju temelj za buduća, pri čemu je potrebno uključiti preostale vrste, s posebnim naglaskom na intenzivnije uzorkovanje rezervoara, i cijeli teritorij Hrvatske. Iako je rizik prijenosa bjesnoće sa šišmiša na ljude u Hrvatskoj nizak, ovo istraživanje je potvrdilo da su lyssavirusi prisutni i da je potreban povećan oprez prilikom izlaganja šišmišima. Posebice to vrijedi za osobe koje profesionalno dolaze u kontakt sa šišmišima (hiropterolozi, speleolozi) koje bi se trebale podvrgnuti preekspozicijskoj profilaksi.

Osim bjesnoće, šišmiši imaju važnu ulogu kao izvor emergentnih i reemergentnih virusnih bolesti ljudi i životinja (Calisher i sur., 2006.) pa kako bih istražila prisutnost drugih potencijalno zoonotskih virusa i dobila uvid u virom šišmiša pretražila sam obriske usne šupljine, feces i gvano tehnologijom sekvenciranja nove generacije. Rezultati pokazuju da 1% (76 004/7 536 096) od ukupnog broja očitanja pokazuje sličnost s virusima što je u skladu s nekim sličnim istraživanjima (oko 2% (He i sur., 2013), 1,2% (Wu i sur., 2016.)). Ukoliko se ovo istraživanje usporedi s istraživanjima provedenim u Mijanmaru (n = 24) (He i sur., 2013.) i Francuskoj Gvajani (n = 51) (Salmier i sur., 2017.) otkriven je veći broj virusnih porodica (n = 63, Tablica 9) koje inficiraju kralježnjake, beskralježnjake (insekte), biljke, alge, gljive, bakterije i arheje. Iako je prisutna virusna populacija heterogena, nisam pronašla potencijalno zoonotske patogene.

Najveći udio virusnih sekvenci (kontigova) (60,22%) se klasificirao kao virusi beskralježnjaka što je najvjerojatnije posljedica vrste uzorka (feces, gvano, obrisak usne šupljine) i prehrane šišmiša. Druga najzastupljenija skupina su bakteriofagi (26,03%). U usporedbi s istraživanjem koje su proveli Li i suradnici u Kaliforniji i Teksasu (Li i sur., 2010.) u ovom je istraživanju utvrđen visok udio sekvenci faga. I dok u spomenutom istraživanju prevladavaju porodice *Siphoviridae* i *Microviridae* (Li i sur., 2010.), u ovom su najzastupljenije porodice *Siphoviridae* (40,6%) i *Podoviridae* (31,12%), dok je porodica *Microviridae* zastupljena tek s 2,62%. U ovom, kao i u istraživanjima provedenim u Americi (Li i sur., 2010., Donaldson i sur., 2010.) i Kini (Wu i sur., 2016., Ge i sur., 2012.), utvrđeno je manje od 10% virusa kralježnjaka (9,19%) nasuprot 45% u istraživanju He i suradnika (He i sur., 2013). Uočena razlika najvjerojatnije je posljedica vrste uzorka (feces i obrisci usne šupljine nasuprot organa). Od virusa koji inficiraju kralježnjake utvrdila sam sljedeće virusne porodice *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviriae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Hepeviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae* (*Parvovirinae*), *Picornaviridae* i *Retroviridae* čime je ovo istraživanje potvrdilo neka ranija koja su također utvrdila navedene porodice (Li i sur., 2010., Ge i sur., 2011., Ge i sur., 2012., He i sur., 2013.). Uzimajući u obzir da se neki virusi ne izlučuju oralnim i fekalnim putem, a neki se izlučuju intermitentno, feces i obrisci ne daju potpuni uvid u virom (He i sur., 2013), ali su u ovom istraživanju bili jedini dostupni uzorci. Obzirom na vrstu uzorka u fecesu je najmanja (pripadnici 30 virusnih porodica), a u gvanu najveća virusna raznolikost (pripadnici 56 virusnih porodica), a u svim vrstama uzoraka prevladavaju virusi beskralježnjaka. Najveći broj virusnih porodica je utvrđen u velikog potkovnjaka i dugokrilog pršnjaka što je vjerojatno posljedica najveće zastupljenosti ove dvije vrste u ovom istraživanju.

Veću virusnu raznolikost sam utvrdila u kontinentalnoj Hrvatskoj u usporedbi s mediteranskom regijom, a ovakav nalaz ponajprije je posljedica prisutnosti raznolikih virusnih porodica koje inficiraju biljke (*Betaflexviridae*, *Bromoviridae*, *Luteoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Solemoviridae*, *Tombusviridae*, *Tymoviridae*, *Virgaviridae*). Prisutnost navedenih porodica je posljedica prehrane šišmiša. Kako je i ranije spomenuto, sve europske pa tako i hrvatske vrste šišmiša su insektivorne pa otuda i virusi beskralježnjaka. Uzimajući u obzir da se mnogi beskralježnjaci (insekti) hrane biljkama razumljivo je i prisustvo biljnih virusa. Dodatno, kada se nalaz stavi u zemljopisni kontekst gdje je većina kontinentalnih lokacija uzorkovanja na prostoru Panonske nizine, koja je među poljoprivredno najznačajnijim prostorima Europe (Hrvatska

enciklopedija), to potvrđuje insekticidnu važnost šišmiša i potencijalnu bioindikatorsku ulogu u hrvatskom ekosustavu. Insekticidnu važnost šišmiša potvrđuje i utvrđivanje dijelova genoma virusa iz porodice *Iflaviridae*, čiji članovi inficiraju člankonošce (primarno insekte), a koja je najzastupljenija u mediteranskoj regiji i u istraživanju. Genom pripadnika ove porodice, koja obuhvaća viruse bez ovojnice s RNA genomom pozitivnog smisla, iflavirusa, je pronađen u gvanu i fecesu te je najsličniji iflavivirusu karadrine iz Španjolske i Koreje. Ovaj kukac nanosi štete na kulturnim biljkama uključujući šećernu repu, lucernu i povrće (Maceljski, 1999.).

Ovo istraživanje je također potvrdilo još jednu smjernicu, a koja se odnosi na metagenomsko otkrivanje eukariotskih jednolančanih DNA (ssDNA) virusa koji uključuju biljne patogene iz porodica *Geminiviridae* i *Nanoviridae* te životinjske viruse iz porodica *Anelloviridae*, *Parvoviridae* i *Circoviridae* (Rosario i sur., 2012.).

Tako sam utvrdila cijeli genom novog ambidensovirusa, pripadnika porodice *Parvoviridae*, potporodice *Densovirinae*, roda *Ambidensovirus* (Cotmore i sur., 2019.). Ambidensovirus utvrđen u ovom istraživanju je najsličniji onomu iz pluća velike sjenice i smeđeg žohara. Iako se donedavno smatralo da densovirusi inficiraju insekte i rakove, moguće je da imaju i širi raspon domaćina. Tako su Yang i suradnici pronašli densovirus u plućima velike sjenice, ali nisu bili u mogućnosti razjasniti inficira li virus pticu ili je samo unesen hranom (Yang i sur., 2016.), što je slučaj i u ovom istraživanju jer je virus pronađen u gvanu. No densovirus iz pluća velike sjenice bio je najsličniji *Blattella germanica* densovirus-like virusu koji je izoliran iz šišmiša (Yang i sur., 2016.), a koji je sličan virusu koji inficira smeđeg žohara (Ge i sur., 2012.) što najvjerojatnije ukazuje na alimentarno podrijetlo virusa.

Dokazala sam i adeno-associated virus (AAV), također pripadnika porodice *Parvoviridae*, potporodice *Parvovirinae*, roda *Dependoparvovirus* koji je do sada zabilježen u šišmiša u Kini, SAD-u i Mijanmaru (DBatVir), a prema mojim spoznajama ovo je prvi dokaz ovog virusa u Europi. Ovo je također prvi dokaz virusa AAV u obrisku sluznice usne šupljine šišmiša dok je u drugim istraživanjima zabilježen u fecesu (DBatVir). Iako je virus AAV za produktivnu infekciju obično potrebna koinfekcija s adenovirusima ili herpesvirusima (Berns i Parrish, 2013.) nijedan od ovih pomoćničkih virusa nije utvrđen u spomenutom obrisku. Nadalje, utvrđen je cijeli genom pripadnika porodice *Circoviridae* koja obuhvaća dva roda, *Circovirus* i *Cyclovirus*. Circovirusi su po prvi puta zabilježeni u gvanu šišmiša u Sjevernoj Americi (Li i

sur., 2010.), a nakon toga i u nekoliko istraživanja u Kini (He i sur., 2013., Ge i sur., 2011., Ge i sur., 2012.). Protein Rep u *Circoviridae*, *Cycloviridae*, *Geminiviridae* i *Nanoviridae*, prema kojem nose naziv kružni Rep-kodirajući ssDNA virusi (engl. *circular Rep-encoding ssDNA*, CRESS-DNA viruses), ima endonukleaznu i helikaznu domenu uključene u replikaciju (engl. *rolling-cycle replication*, RCR) (Rosario i sur., 2012., Rosario i sur., 2017.), a obje domene su utvrđene i u Circo-like virus-Croatia 17_S17. Međutim, zanimljivo je da je helikazna domena slična onoj u cycloviusa i circovirusa, ali ne i endonuklezna domena. Dok su RCR motivi II i III slični onima u circo-, gemini- , cyclo- i nanovirusa (Rosario i sur., 2012.), javlja se posve novi RCR I motiv. Naime, aminokiseline FT utvrđene kod ovog virusa prisutne su i u proteinima Rep circovirusa, cyclovirusa i nanovirusa, sljedeće dvije aminokiseline nisu ranije opisane (prisutne su aminokiseline EF), a posljednja N je kao u circo-, cyclo- i nanovirusa. Nonanukleotidni motiv koji označava mjesto početka replikacije (engl. *origin of replication*, ori) jednak je onome u cyclovirusa. Filogenetska analiza ukazuje da je Circo-like virus-Croatia 17_S17 najsrodniji s virusima iz fecesa ljudi u Brazilu (Castrignano i sur., 2013.). Iako neki circovirusi mogu uzrokovati bolest uz značajne ekonomske gubitke u veterinarskoj medicini, značaj ovih virusa za ljude nije poznat (Rosario i sur., 2017.). Također, kako je virus pronađen u gvanu nije moguće njegovo povezivanje s određenom vrstom i znakovima bolesti u šišmiša. U budućnosti treba nastojati izdvojiti te viruse na staničnoj kulturi kako bi se bolje razumio odnos ovih virusa i šišmiša.

U ovom istraživanju dio virusnih sekvenci (14,23%) se na razini porodice svrstao kao nepoznato ili neklasificirano. Udio tih sekvenci je manji u usporedbi sa sličnim istraživanjima (Li i sur., 2010., Victoria i sur., 2009.) što je vjerojatno posljedica rasta javno dostupnih baza referentnih genoma posljednjih godina, a u budućnosti je za očekivati da će se taj udio dodatno smanjiti (Garcia-Etxebarria i sur., 2014.). Kako ne postoje referentni genomi za sve viruse, ne može se isključiti mogućnost da se dio sekvenci svrstava netočno. Na to upućuju i nalazi dijelova virusa za koje se ne očekuje da inficiraju šišmiše uključujući *Bovine viral dhiarrea virus* (BVDV) (porodica *Flaviviridae*) i virus zaraznog ektima ovaca (orf) (porodica *Poxviridae*) te porodice *Alloherpesviridae* i *Malacoherpesviridae*.

6 ZAKLJUČCI

1. Po prvi puta je utvrđena prisutnost protutijela za lyssaviruse (seroprevalencija 5,71%) u šišmiša u Hrvatskoj. Utvrđena seroprevalencija je niska, što je u podudarnosti s polaznom hipotezom. Niska seroprevalencija ukazuje da šišmiši predstavljaju nizak rizik za ljude, međutim on nije zanemariv te bi sve osobe koje dolaze u kontakt sa šišmišima trebale biti cijepljene. Rezultati ovog istraživanja nedvojbeno ukazuju na potrebu daljnjeg praćenja kretanje seroprevalencije i označavanja šišmiša kako bi se dobio uvid javlja li se bolest u valovima i kako utječe na populaciju šišmiša.
2. Nije utvrđeno aktivno izlučivanje virusa bjesnoće u obriscima sluznice usne šupljine što je također u skladu s polaznom hipotezom. To ukazuje na važnost dobrog informiranja javnosti i veće suradnje hiropterologa i virologa kako bi se na pretragu dostavljao veći broj uginulih šišmiša i tako se povećala vjerojatnost utvrđivanja virusa.
3. Kako je ovdje obuhvaćena tek petina hrvatskih vrsta, od kojih glavni rezervoari bjesnoće, kasni noćnjak i riječni šišmiš, nisu dovoljno zastupljeni bit će potrebna daljnja istraživanja koja će obuhvatiti sve vrste s posebnim naglaskom na rezervoare. Također, bit će potrebno pretražiti i dosad nepretražene i nezastupljene lokacije kao što su primjerice Istra i krajnji jug te sjever Hrvatske.
4. Po prvi puta dobiven je uvid u virom hrvatskih šišmiša kojeg, u ovom istraživanju, čine 63 različite virusne porodice. Navedene porodice uključuju viruse bakterija i arheja, algi, biljaka, gljiva, beskralježnjaka i kralježnjaka. Utvrđeni su i cijeli ili gotovo cijeli genom adeno-associated virusa, ambidensovirusa, iflavirusa i circo-like virusa.
5. Iako trenutno nisu utvrđeni drugi značajni zoonotski patogeni, što je povoljno i sa stajališta šišmiša kao ugrožene vrste i sa stajališta javnog zdravstva, potrebna su opsežnija istraživanja i daljnja praćenja viroma u ove zaštićene, a za ekološki sustav važne vrste.
6. U budućnosti će svakako biti potrebna standardizacija i molekularnih i seroloških metoda kako bi se jednostavnije mogli uspoređivati rezultati različitih istraživanja.

7 POPIS LITERATURE

1. Alekseyev YO, Fazeli R, Yang S, Basran R, Maher T, Miller NS, Remick D (2018) A Next-Generation Sequencing Primer - How Does It Work and What Can It Do?. Academic pathology 5:1-11.
2. Allocati N, Petrucci AG, Di Giovanni P, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V (2016) Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. Cell Death Discovery 2: 1-8.
3. Altringham, JD (2011) Bats: From Evolution to Conservation (2. izdanje). Oxford, New York, Oxford University Press
4. Amengual B, Bourhy H, López-Roig M, Serra-Cobo J (2007) Temporal Dynamics of European Bat Lyssavirus Type 1 and Survival of Myotis myotis Bat sin Natural Colonies. PLoS ONE 2: 1-7.
5. Anderson NG, Gerin JL, Anderson NL (2003) Global Screening for Human Viral Pathogens. Emerging Infectious Diseases 9: 768-773.
6. Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Agbenyega O, Meyer B, Oppong S, Sarkodie JA, Kalko EKV, Lina PHC, Godlevska EV, Reusken C, Seebens A, Gloza-Rausch F, Vallo P, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF (2013) Human Betacoronavirus 2c EMC/2012–related Viruses in Bats, Ghana and Europe. Emerging Infectious Diseases 19: 456-460.
7. Antolović J, Frković A, Grubešić M, Holcer D, Vuković M, Flajšman E, Grgurev M, Hamidović D, Pavlinić I, Tvrtković N (2006): Crvena knjiga sisavaca Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb
8. Aréchiga Ceballos N, Vázquez Morón S, Berciano JM, Nicolás O, Aznar López C, Juste J, Rodríguez Nevado C, Aguilar Setién A, Echevarría JE (2013) Novel Lyssavirus in Bat, Spain. Emerging Infectious Diseases 19: 793–795.
9. August TA, Mathews F, Nunn MA (2012) Alphacoronavirus Detected in Bats in the United Kingdom. Vector-borne and zoonotic diseases 12: 530-533.
10. Baker ML, Schountz T, Wang L-F (2011) Antiviral Immune Responses of Bats: A Review. Zoonoses and Public Health 60: 1-13.

11. Baker ML, Zhou P (2015) Bat immunology. U: Wang L-F, Cowled C (ed.) Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. Hoboken, John Wiley & Sons, 327-348
12. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin V, Nikolenko S, Pham S, Prjibelski A, Pyshkin A, Sirotkin A, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology 5: 455-477.
13. Banyard AC, Hayman DTS; Freuling CM, Müller T, Fooks AR, Johnson N (2013) Bat Rabies. U: Jackson AC (ed.) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 215–267
14. Barbić Lj, Vilibić-Čavlek T, Stevanović V, Savić V, Klobučar A, Pem-Novosel I, Santini M, Pandak N, Hađina S, Tabain I, Kučinar J, Petrović G, Madić J (2015) Pristup "Jedno zdravlje" – primjer pojave, praćenja i nadzora emergentnih i re-emergentnih arbovirusa u Republici Hrvatskoj. Infektološki glasnik 35: 53–60.
15. Berns KI, Parrish CR (2013) Parvoviridae. U: Knipe DM, Howley PM (6. izdanje) Fields Virology, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1768-1791.
16. Botvinkin AD, Poleschuk EM, Kuzmin IV, Borisova TI, Gazaryan SV, Yager P, Rupprecht CE (2003) Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. Emerging Infectious Diseases 9: 1623-1625.
17. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium (2017) ICTV Virus Taxonomy: Circoviridae, Journal of General Virology 98:1997–1998.
18. Brook CE, Dobson AP (2015) Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. Trends in Microbiology 23: 172-180.
19. Brookes SM, Aegerter JN, Smith GC, Healy DM, Jolliffe TA, Swift SM, Mackie IJ, Stewart Pritchard J, Racey PA, Moore NP, Fooks AR (2005) European bat lyssavirus in Scottish bats. Emerging Infectious Diseases 11: 572–578.
20. Buchfink B, Xie C, Huson DH (2015) "Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND". Nature Methods 12: 59-60.
21. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T (2006) Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. Clinical microbiology reviews 19: 531–545.

22. Calisher CH (2015) Viruses in bats: a historic review. U: Wang L-F, Cowled C (ed.) Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. Hoboken, John Wiley & Sons, 23-45
23. Castrignano SB, Keico Nagasse-Sugahara T, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Brandão PE, Pires Curti S (2013) Two novel circo-like viruses detected in human feces: completegenome sequencing and electron microscopy analysis. Virus Research 178: 364-373.
24. Constantine DG (2009) Bat rabies and other lyssavirus infections. Geological Survey Circular 1329
25. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger A, Hughes J, Mietzsch M, Modha S, Ogliastro M, Pénzes JJ, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, ICTV Report Consortium (2019) ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae, Journal of General Virology (In Press).
26. DBatVir (The Database of Bat-associated Viruses) http://www.mgc.ac.cn/DBatVir/
27. Dacheux L, Larrous F, Mailles A, Boisseleau D, Delmas O, Biron C, Bouchier C, Capek I, Muller M, Ilari F, Lefranc T, Raffi F, Goudal M, Bourhy H (2009) European Bat Lyssavirus Transmission among Cats, Europe. Emerging infectious diseases 15: 280-284.
28. Dietz M, Kalko EKV (2006) Seasonal changes in daily torpor patterns of free-ranging female and male Daubenton's bats (Myotis daubentonii). Journal of Comparative Physiology B 176: 223–231.
29. Dietz C, Kiefer A (2016) Serotine Bat. U: Bats of Britain and Europe. London, Bloomsbury, 306-309
30. Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ, Frieman MB (2010) Metagenomic Analysis of the Viromes of Three North American Bat Species: Viral Diversity among Different Bat Species That Share a Common Habitat. Journal of Virology 84: 13004–13018.
31. Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, Seebens A, Niedrig M, Pfefferle S, Yordanov S, Zhelyazkov L, Hermanns U, Vallo P, Lukashev A, Müller MA, Deng H, Herrler G, Drosten C (2010) Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus in European Bats and Classification of Coronaviruses Based on Partial RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Sequences. Journal of Virology 84: 11336–11349.

32. Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Fumie Tateno A, Zerbinati RM, Gloza-Rausch F, Seebens A, Müller MA, Drosten C (2011) Amplification of Emerging Viruses in a Bat Colony. Emerging Infectious Diseases 17: 449-456.
33. Dutilh BE, Reyes A, Hall RJ, Whiteson KL (2017) Editorial: Virus Discovery by Metagenomics: The (Im)possibilities. Frontiers in Microbiology 8: 1-3.
34. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) (2015) Scientific opinion – Update on oral vaccination of foxes and raccoon dogs against rabies. EFSA Journal 13: 1-70.
35. Epstein JH, Field HE (2015) Anthropogenic epidemics: the ecology of bat-borne viruses and our role in their emergence. U: Wang L-F, Cowled C (ed.) Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. Hoboken, John Wiley & Sons, 249–279
36. Echevarría JE, Avellón A, Juste J, Vera M, Ibáñez C (2001) Screening of Active Lyssavirus Infection in Wild Bat Populations by Viral RNA Detection on Oropharyngeal Swabs. Journal of Clinical Microbiology 39: 3678–3683.
37. Fooks AR, Brookes SM, Johnson N, Mc Elhinney LM, Hutson AM (2003) European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. Epidemiology & Infection 131: 1029–1039.
38. Fooks AR, Johnson N, Müller T, Vos A, Mansfield K, Hicks D, Nunez A, Freuling C, Neubert L, Kaipf I, Denzinger A, Franka R, Rupprecht CE (2009) Detection of High Levels of European Bat Lyssavirus Type-1 Viral RNA in the Thyroid Gland of Experimentally-Infected Eptesicus fuscus Bats. Zoonoses Public Health 56: 270–277.
39. Fooks AR, Cliquet F, Finke S, Freuling C, Hemachudha T, Mani RS, Müller T, Nadin-Davis S, Picard-Meyer E, Wilde H, Banyard AC (2017) Rabies. Nature Reviews Disease Primers 3: 1-20.
40. Franka R, Johnson N, Müller T, Vos A, Neubert L, Freuling C, Rupprecht CE, Fooks AR (2008) Susceptibility of North American big brown bats (Eptesicus fuscus) to infection with European bat lyssavirus type. Journal of General Virology 89: 1998–2010.
41. Freuling C, Vos A, Johnson N, Kaipf I, Denzinger A, Neubert L, Mansfield K, Hicks D, Nuñez A, Tordo N, Rupprecht CE, Fooks AR, Müller T (2009) Experimental infection of serotine bats (Eptesicus serotinus) with European bat lyssavirus type 1a. Journal of General Virology 90: 2493–2502.

42. Garcia-Etxebarria K, Garcia-Garcerà M, Calafell F (2014) Consistency of metagenomic assignment programs in simulated and real data. BMC Bioinformatics 15: 2-10.
43. Ge X-Y, Hu B, Shi Z-L (2015) Bat coronaviruses. U: Wang L-F, Cowled C (ed.) Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. Hoboken, John Wiley & Sons, 127-155
44. Ge X, Li J, Peng C, Wu L, Yang X, Wu Y, Zhang Y, Shi Z (2011) Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. Journal of General Virology 92: 2646–2653.
45. Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, Shi Z (2012) Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. Journal of Virology 86: 4620-4630.
46. Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Göttsche M, Panning M, Drexler JF, Petersen N, Annan A, Grywna K, Müller M, Pfefferle S, Drosten C (2008) Detection and Prevalence Patterns of Group I Coronaviruses in Bats, Northern Germany. Emerging Infectious Diseases 14: 626-631.
47. Hamidović D (2017) Međunarodno važna podzemna skloništa za šišmiše u Hrvatskoj (poster). Konferencija: Međunarodni znanstveno-stručni skup "Georaznolikost, geobaština i geoturizam u krškim područjima" / International conference "Geodiversity, geoheritage and geoturism in karst areas, Perušić, Hrvatska, 18.-19. 2. 2017.
48. Hammarin L-A, Treiberg Berndtsson L, Falk K, Nedinge M, Olsson G, Lundkvist A (2016) Lyssavirus-reactive antibodies in Swedish bats. Infection Ecology and Epidemiology 6: 1-6.
49. Hanlon CA, Childs JE (2013) Epidemiology. U: Jackson AC (ed.) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 61–121
50. HAOP (Hrvatska agencija za okoliš i prirodu) http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/sismisi
51. Harris SL, Brookes SM, Jones G, Hutson AM, Racey PA, Aegerter J, Smith GC, McElhinney LM, Fooks AR (2006) European bat lyssaviruses: Distribution, prevalence and implications for conservation. Biological conservation 131: 193–210.

52. He B, Li Z, Yang F, Zheng J, Feng Y, Guo H, Li Y, Wang Y, Su N, Zhang F, Fan Q, Tu C (2013) Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses. PLoS ONE 8: 1-14.

53. Heaton PR, Johnstone P, Elhinney LMMC, Cowley ROY, Sullivan EO, Whitby JE (1997) Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. Journal of Clinical Microbiology 35: 2762–2766.

54. Heneberg Đ, Bakić J, Heneberg N, Nikolić B, Agoli B, Hronovsky V, Dusbabek F, Kolman J, Blažek K (1968) Ekološko – medicinska ispitivanja pećina dalmatinskog krša. Zbornik Vojnomedicinske akademije 1968: 43–46.

55. Hostnik P, Rihtarič D, Presetnik P, Podgorelec M, Pavlinič S, Toplak I (2009) Ugotavljanje lisavirusov pri netopirjih v Sloveniji. Determination of bat lyssavirus in Slovenia. Zdrav Vestn. 79: 265–71.

56. Hrvatska enciklopedija (mrežno izdanje) http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=46451

57. Hutson AM, Aulagnier S, Benda P, Karataş A, Palmeirim J, Paunović M (2008) Miniopterus schreibersii. The IUCN Red List of Threatened Species.

58. Jackson AC (2013) History of Rabies Research. U: Jackson AC (3. izdanje) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 1-15

59. Jackson AC (2013a) Human Disease. U: Jackson AC (3. izdanje) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 269-298

60. Jackson AC, Fu ZF (2013) Pathogenesis. U: Jackson AC (3. izdanje) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 299-349.

61. Jackson AC (2016) Human Rabies: a 2016 Update. Current Infectiuos Disease Report 18: 38.

62. Johnson N, Phillpotts R, Fooks AR (2006) Airborne transmission of lyssaviruses. Journal of Medical Microbiology 55: 785–790.

63. Johnson N, Vos A, Neubert L, Freuling C, Mansfield KL, KaipfI , Denzinger A, Hicks D, Núñez A, Franka R, Rupprecht CE, Müller T, Fooks AR (2008) Experimental study of European bat lyssavirus type-2 infection in Daubenton's bats (Myotis daubentonii). Journal of General Virology 89: 2662–2672.

64. Johnson N, Cunningham AF, Fooks AR (2010) The immune response to rabies virus infection and vaccination. Vaccine 28: 3896–3901.

65. Jones G, Jacobs DS , Kunz TH , Willig MR , Racey PA (2009) Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. Endangered species research 8: 93–115.

66. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P (2008). Global trends in emerging infectious diseases. Nature 451: 990–993.

67. Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Boldogh S, Estók P, Kurucz K, Kutas A, Földes F, Oldal M, Németh V, Martella V, Bányai K, Jakab F (2014) Molecular Survey of RNA Viruses in Hungarian Bats: Discovering Novel Astroviruses,Coronaviruses, and Caliciviruses. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 14: 846-855.

68. Kohl C, Kurth A (2014) European Bats as Carriers of Viruses with Zoonotic Potential. Viruses 6: 3110-3128.

69. Kunin V, Copeland A, Lapidus A, Mavromatis K, Hugenholtz P (2008) A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. Microbiology and molecular biology reviews 72: 557–578.

70. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular Biology and Evolution 35: 1547–1549.

71. Kuzmin IV, Bozick B, Guagliardo SA, Kunkel R, Shak JR, Tong S, Rupprecht CE (2011) Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited, Emerging Health Threats Journal 4: 1-17.

72. Kuzmin IV, Rupprecht CE (2015) Bat lyssaviruses. U: Wang L-F, Cowled C Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. Hoboken, John Wiley & Sons, 47-97

73. Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, Delwart E (2010) Bat Guano Virome: Predominance of Dietary Viruses from Insects and Plants plus Novel Mammalian Viruses. Journal of Virology 84: 6955–6965.

74. Luis AD, O'Shea TJ, Hayman DTS, Wood JLN, Cunningham AA, Gilbert AT, Mills JN, Webb CT (2015) Network analysis of host–virus communities in bats and rodents reveals determinants of cross-species transmission. Ecology Letters 18: 1153–1162.

75. Lyles DS, Kuzmin IV, Rupprecht CE (2013) Rhabdoviridae. U: Knipe DM, Howley PM (6. izdanje) Fields Virology Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 888-921.
76. Levy SE, Myers RM (2016) Advancements in Next-Generation Sequencing. The Annual Review of Genomics and Human Genetics 17: 95-115.
77. Maceljski M (1999) Poljoprivredna entomologija. Zrinski, Čakovec
78. Marston DA, McElhinney LM, Johnson N, Müller T, Conzelmann KK, Tordo N, Fooks AR (2007) Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G–L 39 non-translated region. Journal of General Virology 88: 1302–1314.
79. McElhinney LM, Marston DA, Leech S, Freuling CM, van der Poel WHM, Echevarria J, Vázquez-Moron S, Horton DL, Müller T, Fooks AR (2011) Molecular Epidemiology of Bat Lyssaviruses in Europe. Zoonoses and Public Health 60: 35-45.
80. McElhinney LM, Marston DA, Wise EL, Freuling CM, Bourhy H, Zanoni R, Moldal T, Kooi EA, Neubauer-Juric A, Nokireki T, Müller T, Fooks AR (2018) Molecular Epidemiology and Evolution of European Bat Lyssavirus. International Journal of Molecular Science 19: 1-16.
81. Megali A, Yannic G, Zahno ML, Brügger D, Bertoni G, Christe P, Zanoni R (2010) Surveillance for European bat lyssavirus in Swiss bats. Archives of Virology 155: 1655–1662.
82. Moore SM, Ricke TA, Davis RD, Briggs DJ (2005) The influence of homologous vs. heterologous challenge virus strains on the serological test results of rabies virus neutralizing assays. Biologicals 33: 269–276.
83. Moratelli R, Calisher CH (2015) Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 110: 1 – 22.
84. Mühldorfer K, Speck S, Kurth A, Lesnik R, Freuling C, Müller T, Kramer-Schadt S, Wibbelt G (2011) Diseases and Causes of Death in European Bats: Dynamics in Disease Susceptibility and Infection Rates. PLoS ONE 6: 1 – 12.
85. Müller T, Cox J, Peter W, Schäfer R, Johnson N, McElhinney LM, Geue JL, Tjørnehøj K, Fooks AR (2004) Spill-over of European Bat Lyssavirus Type 1 into a Stone Marten (Martes foina) in Germany. Journal of Veterinary Medicine 51: 49–54.

86. Müller T, Schröder R, Wysock P, Mettenleiter TC, Freuling CM (2015) Spatio-temporal Use of Oral Rabies Vaccines in Fox Rabies Elimination Programmes in Europe. PLOS Neglected Tropical Diseases 9: 1-16.

87. Muhire BM, Varsani A, Martin DP (2014) SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PLoS ONE 9: 1-8.

88. MZOIP (Ministarstvo zaštite okoliša i energetike) (2014) Sixth National Report on the Implementation of the Agreement: June 2010 – June 2014.

89. Nadin-Davis SA (2013) Molecular Epidemiology. U: Jackson AC (3. izdanje) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 123 – 177.

90. Nokireki T, Tammiranta N, Kokkonen UM, Kantala T, Gadd T (2018) Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. Transboundary and Emerging Diseases 65: 593-596.

91. OIE (2018) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018: Rabies (Infection with Rabies virus and other lyssaviruses) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.17_RABIES.pdf

92. O'Shea TJ, Cryan PM, Cunningham AA, Fooks AR, Hayman DTS , Luis AD, Peel AJ, Plowright RK, Wood JLN (2014) Bat Flight and Zoonotic Viruses. Emerging Infectious Diseases 20: 741-745.

93. Pavlinić I, Čač Ž, Lojkić I, Đaković M, Bedeković T, Lojkić M (2009) Šišmiši biološki rezervoari i potencijalni prijenosnici lyssavirusa. Veterinarska stanica 40: 297-304.

94. Pavlinić I, Đaković M, Tvrtković N (2010) The atlas of Croatian bats (Chiroptera) Part I. Natura Croatica 19: 295–337.

95. Pavlinić I, Đaković M, Tvrtković N (2011) The first records of maternity colonies of the serotine bat, Eptesicus serotinus in Croatia. Natura Croatica 20: 455-458.

96. Picard-Meyer E, Dubourg-Savage M-J, Arthur L, Barataud M, Be´cu D, Bracco S, Borel C, Larcher G, Meme-Lafond B, Moinet M, Robardet E, Wasniewski M, Cliquet F (2011) Active surveillance of bat rabies in France: A 5-year study (2004–2009). Veterinary Microbiology 151: 390–395.

97. Picard-Meyer E, Beven V, Hirchaud E, Guillaume C, Larcher G, Robardet E, Servat A, Blanchard Y (2018) Lleida Bat Lyssavirus isolation in Miniopterus schreibersii in France. Zoonozes and Public Health 66: 254-258.

98. Presetnik P (2009) Contribution to the knowledge of current migration of Miniopterus schreibersii (Kuhl, 1817) in NW of Panonian basin. http://www.ckff.si/javno/projekti/2009_Mis_Migration_NWPanonia_PPresetnik_poster.pdf.
99. Presetnik P, Podgorelec M, Hostnik P, Rihtarič D, Toplak I, Maurer Wernig J (2010) Sunny news from the sunny side of the Alps: Active surveillance for lyssaviruses in bats did not reveal the presence of eblv in Slovenia. Konferencija: 2nd Iternational Berlin Bat Meeting: Bat Biology and Infectious Diseases (poster)
100. Rabies Bulletin https://www.who-rabies-bulletin.org/
101. Racey (2015) The uniqueness of bats. U: Wang L-F, Cowled C (ed.) Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. Hoboken, John Wiley & Sons, 1 - 22
102. Reusken CBEM, Lina PHC, Pielaat A, de Vries A, Dam-Deisz C, Adema J, Drexler JF, Drosten C, Kooi EA (2010) Circulation of Group 2 Coronaviruses in a Bat Species Common to Urban Areas in Western Europe. Vector-borne and zoonotic diseases 10: 785-791.
103. Rizzo F, Edenborough KM, Toffoli R, Culasso P, Zoppi S, Dondo A, Robetto S, Rosati S, Lander A, Kurth A, Orusa R, Bertolotti L, Mandola ML (2017) Coronavirus and paramyxovirus in bats from Northwest Italy. BMC Veterinary Research 13: 1-11.
104. Rosario K, Duffy S, Breitbart M (2012) A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. Arch Virol 157: 1851–1871.
105. Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A (2017) Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. Archive of Virology 162: 1447–1463.
106. Rossiter JP, Jackson AC (2013) Pathology. U: Jackson AC (ed.) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 351-386
107. Rupprecht CE, Kuzmin IV (2015) Why we can prevent, control and possibly treat – but will not eradicate – rabies. Future Virology 10: 517-535.
108. Salmier A, Tirera S, de Thoisy B, Franc A, Darcissac E, Donato D, Bouchier C, Lacoste V, Lavergne A (2017) Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. PLoS ONE 12: 1-25.

109. Schatz J, Ohlendorf B, Busse P, Pelz G, Dolch D, Teubner J, Encarnação JA, Mühle R-U, Fischer M, Hoffmann B, Kwasnitschka L, Balkema-Buschmann A, Mettenleiter TC, Müller T, Freuling CM (2014) Twenty years of active bat rabies surveillance in Germany: a detailed analysis and future perspectives. Epidemiology & Infection 142: 1155–1166.

110. Schatz J, Freuling CM, Auer E, Goharriz H, Harbusch C, Johnson N, Kaipf I, Mettenleiter TC, Mühldorfer K, Mühle R-U, Ohlendorf B, Pott-Dörfer B, Prüger J, Sheikh Ali H, Stiefel D, Teubner J, Ulrich RG, Wibbelt G, Müller T (2014a) Enhanced Passive Bat Rabies Surveillance in Indigenous Bat Species from Germany - A Retrospective Study. PLoS Neglected Tropical Diseases 8: 1-9.

111. Schountz T, Baker ML, Butler J, Munster V (2017) Immunological Control of Viral Infections in Bats and the Emergence of Viruses Highly Pathogenic to Humans. Frontiers in Immunology 8: 1-9.

112. Serra-Cobo J, Amengual B, Abellán C, Bourhy H (2002) European Bat Lyssavirus Infection in Spanish Bat Populations. Emerging Infectious Diseases 8: 413-420.

113. Šimić I, Lojkić I, Krešić N, Cliquet F, Picard-Meyer E, Wasniewski M, Ćukušić A, Zrnčić V, Bedeković T (2018) Molecular and serological survey of lyssaviruses in Croatian bat populations. BMC Veterinary Research 14: 1-8.

114. Šoštarić B, Čač Ž, Lojkić I, Mihaljević Ž, Dežđek D, Novosel D (2010) Epizootija bjesnoće u ovaca - prikaz slučaja. Veterinarska stanica 41: 145-161.

115. Thomas T, Gilbert J, Meyer F (2012) Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. Microbial Informatics and Experimentation 2: 1-12.

116. Tjørnehøj K, Fooks AR, Agerholm JS, Rønsholt L (2006) Natural and Experimental Infection of Sheep with European Bat Lyssavirus Type-1 of Danish Bat Origin. Journal of Comparative Pathology 134: 190-201.

117. Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. (2007) Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. Journal of Virological Methods 140: 115–123.

118. Tvrtković N (2017) Bats of Croatia: short research history and identification key. Zagreb/Rijeka, Croatian Natural Historx Museum, 70–71.

119. Udow SJ, Marrie RA, Jackson AC (2013) Clinical Features of Dog- and Bat-Acquired Rabies in Humans. Clinical Infectious Diseases 57: 689-696.

120. Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, Naeem A, Zaidi S, Delwart E (2009) Metagenomic Analyses of Viruses in Stool Samples from Children with Acute Flaccid Paralysis. Journal of Virology 83: 4642–4651.

121. Vos A, Kaipf I, Denzinger A, Fooks AR, Johnson N, Müller T (2007) European bat lyssaviruses — an ecological enigma. Acta Chiropterologica 9: 283–296.

122. Vranješ N, Paunović M, Milićević V, Stankov S, Karapandža B, Ungurović U, Lalošević D (2010) Passive and active surveillance of lyssaviruses in bats in Serbia. Konferencija: 2nd International Berlin Bat Meeting: Bat Biology and Infectious Diseases.

123. Walker PJ, Blasdell KR, Calisher CH, Dietzgen RG, Kondo H, Kurath G, Longdon B, Stone DM, Tesh RB, Tordo N, Vasilakis N, Whitfield AE, ICTV Report Consortium (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae. Journal of General Virology 99: 447–448.

124. Wang L-F, Walker PJ, Poon LLM (2011) Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? Current Opinion in Virology 1: 649–657.

125. Warrell MJ, Warrell DA (2004) Rabies and other Lyssavirus diseases. The Lancet 363: 959–969.

126. WHO (2013) Expert Consultation on Rabies: second report. (WHO technical report series no. 982).

127. WHO https://www.who.int/ith/diseases/sars/en/

128. WHO https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/

129. Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen K-Y (2009) Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. Experimental Biology and Medicine 234: 1117-1127.

130. Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, Qian Z, Dong J, Sun L, Zhu Y, Du J, Yang F, Zhang S, JinQ (2016) Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. The ISME Journal 10: 609–620.

131. Wunner WH, Conzelmann KK (2013) Rabies Virus. U: Jackson AC (3. izdanje) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 17-60.

132. Xiang ZQ, Ertl HCJ (2013) Next Generation of Rabies Vaccines. U: Jackson AC (3. izdanje) Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Oxford, Elsevier Inc, 527-541.

133. Yang W-T, Shi S-H, Jiang Y-L, Zhao L, Chen H-L, Huang K-Y, Yang G-L, Wang C-F (2016) Genetic characterization of a densovirus isolated from great tit (Parus major) in China. Infection, Genetics and Evolution 41: 107–112.

134. Yuan L, Zhao X, Lin B, Rossiter SJ, He L, Zuo X , He G , Jones G , Geiser F, Zhang S (2011) Adaptive Evolution of Leptin in Heterothermic Bats. PLoS ONE 6: 1-9.

135. Queen K, Shi M, Anderson L J, Tong S (2015) Other bat-borne viruses. U: Wang L-F, Cowled C (ed.) Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. Hoboken, John Wiley & Sons, 217-247

8 ŽIVOTOPIS

Ivana Šimić, dr. vet. med., rođena je 11. svibnja 1987. u Zagrebu. Pohađala je Žensku opću gimnaziju Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti, a potom je 2006. godine upisala studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je diplomirala 2013. godine s težinskim prosjekom ocjena 4,718. Iste godine zaposlila se u Laboratoriju za bjesnoću i opću virologiju Hrvatskog veterinarskog instituta gdje radi i danas. Poslijediplomski doktorski studij iz prirodnih znanosti upisala je 2015. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Dobitnica je Dekanove nagrade za izvrstan uspjeh u III., IV. i V. godini studija (akademske godine 2008./2009., 2009./2010. i 2010./2011.), Dr Suzana Tkalčić One Health Award za komparativnu patologiju i medicinu u 2011. godini (22nd Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology), Rektorove nagrade 2011. godine te Stipendije Grada Zagreba u razdoblju od 2008. do 2012. godine.

U 2016. godini se educirala na području dijagnostike bjesnoće u Europskom referentnom laboratoriju za bjesnoću, Nancy, Francuska. U 2018. se educirala na području koncentriranja virusa iz vode metodom membranske koncentracije na Institutu za imunologiju i mikrobiologiju Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija. Sudjelovala je na međunarodnim konferencijama, godišnjim sastancima referentnih laboratorija za bjesnoću, bolest kvrgave kože i kugu malih preživača.

Kao autor ili koautor objavila je šest originalnih znanstvenih radova:

1. Krešić, Nina; Bedeković, Tomislav; Brnić, Dragan; **Šimić, Ivana**; Lojkić, Ivana; Turk, Nenad. Genetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in Croatia. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 58 (2018), 52-57.
2. **Šimić, Ivana**; Lojkić, Ivana; Krešić, Nina; Cliquet, Florence; Picard-Meyer, Evelyne; Wasniewski, Marine; Ćukušić, Anđela; Zrnčić, Vida; Bedeković, Tomislav. Molecular and serological survey of lyssaviruses in Croatian bat populations. BMC Veterinary Research 14 (2018), 1-8.
3. Bedeković, T.; **Šimić, I.**; Krešić, N.; Lojkić, I. Detection of lumpy skin disease virus in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination. Transboundary and Emerging Diseases 1-6 (2017), 1-14.

4. Bedeković, Tomislav; **Šimić, Ivana**; Krešić, Nina; Lojkić, Ivana; Mihaljević, Željko; Sučec, Ivica; Lohman Janković, Ivana; Hostnik, Peter. Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns. BMC Veterinary Research 12 (2016), 1-7.
5. Lojkić, Ivana; Biđin, Marina; Prpić, Jelena; **Šimić, Ivana**; Krešić, Nina; Bedeković, Tomislav. Faecal virome of red foxes from peri-urban areas. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 45 (2016), 10-15.
6. Lojkić, Ivana; Krešić, Nina; **Šimić, Ivana**; Bedeković, Tomislav. Detection and molecular characterisation of bovine corona and toroviruses from Croatian cattle. BMC Veterinary Research 11 (2015), 1-6.

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. Lojkić, Ivana; **Šimić, Ivana**; Krešić, Nina; Bedeković, Tomislav. Complete Genome Sequence of a Lumpy Skin Disease Virus Strain Isolated from the Skin of a Vaccinated Animal. Genome Announcements. 6 (2018), 22: e00482-18.
2. Krešić, Nina; **Šimić, Ivana**; Lojkić, Ivana; Bedeković, Tomislav. Canine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Transcriptome Composition Alterations: A Step towards Standardizing Therapeutic. Stem Cells International (2017), 1-12.

Ostali radovi u drugim časopisima:

1. Krešić, Nina; Bedeković, Tomislav; Lojkić, Ivana; **Šimić, Ivana**; Turk, Nenad. Infekcija goveđim respiratornim sincicijskim virusom. Veterinarska stanica 50 (2019), 75-80.
2. **Šimić, Ivana**; Lojkić, Ivana; Krešić, Nina; Bedeković, Tomislav. Kuga malih preživača - nova prijetnja stočarskoj proizvodnji?. Veterinarska stanica. 49 (2018), 469-475.
3. Bedeković, Tomislav; **Šimić, Ivana**; Lojkić, Ivana; Dežđek, Danko; Krešić, Nina; Sučec, Ivica; Lohman Janković, Ivana; Madić, Josip; Cvetnić, Željko. Infekcija virusom sindroma smeđeg zeca. Veterinarska stanica 45 (2014) 37-40.
4. **Šimić, Ivana**; Lojkić, Ivana, Krešić, Nina, Bedeković, Tomislav. Herpesvirusna infekcija pasa. Veterinarska stanica 6 (2014), 411-415.

5. **Ivana Šimić**; Krešić, Nina; Lojkić, Ivana; Bedeković, Tomislav. Bjesnoća u zvijeri i šišmiša u Republici Hrvatskoj. Veterinarska stanica 2 (2017).

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Brnić, Dragan; **Šimić, Ivana**; Krešić, Nina; Škoko, Ines; Lojkić, Ivana. Rotaviruses in Croatian Ecosystem: molecular epidemiology and zoonotic potential - Reco // Power of Viruses Book of Abstracts/Bielen, Ana; Ježić, Marin; Jurak, Igor; Škorić, Dijana; Tomaić, Vjekoslav (ur.). Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2018. 47-47.
2. Brnić, Dragan; **Šimić, Ivana**; Lojkić, Ivana; Krešić, Nina; Balić, Davor; Lolić, Marica; Knežević, Dražen; Hengl, Brigita. The emergence of porcine epidemic diarrhoea in Croatia: molecular and serological investigation. 11th International Congress for Veterinary Virology: Book of Abstracts. 2018. 61-61.
3. **Šimić, Ivana**; Lojkić, Ivana; Krešić, Nina; Bedeković, Tomislav; Cliquet, Florence; Wasniewski, Marine; Picard-Meyer, Evelyne; Ćukušić, Anđela; Zrnčić, Vida. Virome of Croatian bat populations. 11th International Congress for Veterinary Virology: Book od Abstracts. 2018. 46-46.
4. **Šimić, Ivana**; Krešić, Nina; Lojkić, Ivana; Bedeković, Tomislav. The first serological confirmation of bats rabies in Croatia //.
5. Brnić, Dragan; **Šimić, Ivana**; Krešić, Nina; Škoko, Ines; Lojkić, Ivana. Zoonotski potencijal rotavirusa // Veterinarski dani 2017 / Harapin, Ivica (ur.). 2017. 127-130.

PRILOG A

Popis kratica

BHK-21 - Baby hamster kidney-21, stanice bubrega hrčka

DD - Data Deficient, nedovoljno poznate vjerojatno ugrožene vrste

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium, medij za staničnu kulturu

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dNTP - deoksiribonukleotid

dRIT - Direct rapid immunohistochemistry test, izravni brzi imunohistokemijski test

ds – double – stranded, dvolančano

ELISA - Enzyme -Linked Immunosorbent Assay, enzimski imunotest

EN – Endangered, ugrožene vrste

ES - *Eptesicus serotinus,* kasni noćnjak

FAT - flourescent antibody test, imunofluorescencijski test za dokaz virusa bjesnoće

FAVN - Fluorescent Antibody Virus Neutralisation test, virus neutralizacijski imunofluorescentni test za dokaz protutijela za virus bjesnoće

FBS - fetal bovine serum, fetalni goveđi serum

HRIG - human rabies immunoglobulin

IU/ml - internacionalna jedinica po mililitru

M - muški spol

MB - *Myotis blythii*, oštrouhi šišmiš

ME - *Myotis emarginatus*, riđi šišmiš

MERS-CoV - *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*

MIT - mouse inoculation test, inokulacija tkivne suspenzije u mozak miša

MM - *Myotis myotis*, veliki šišmiš

MM/B – *Myotis myotis/blythii*, veliki/oštrouhi šišmiš

MN - *Myots nattereri*, resasti šišmiš

MS - *Miniopterus schreibersii*, dugokrili pršnjak

NGS - Next Generation Sequencing, sekvenciranje nove generacije

OIE - Office International des Epizooties

ORF – open reading frame, otvoreni okvir čitanja

PBS - phosphat buffer saline, puferirana otopina fosfatnih soli

PCR - Polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom

PEP – postekspozicijska profilaksa

PreP – preekspozicijska profilaksa

RF - *Rhinolophus ferrumequinum*, veliki potkovnjak

RFFIT - Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta

RNA – ribonukleinska kiselina

RT – reverzna transkripcija

RTCIT - rabies tissue culture inoculation test, test inokulacije tkivne suspenzije na staničnu kulturu

RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju

RT-qPCR - Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju u stvarnom vremenu

SARS-CoV - *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*

ss – single – stranded, jednolančano

SŽS - središnji živčani sustav

VNT - virus neutralizacijski test

VU – Vulnerable, rizične vrste

WHO –World Health Organization, Svjetska zdravstvena organizacija

Ž - ženski spol

PRILOG B

Pristupni brojevi sekvenci korištenih u filogenetskoj analizi.

Svi pristupni brojevi su preuzeti s poveznice: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=. Crveno su istaknuti hrvatski izolati, a plavo filogenijski najsrodniji.

Tablica se odnosi na pristupne brojeve sa Slike 23.

Virus	Pristupni broj	Zemlja	Domaćin
Adeno-associated virus	AY695371.1	SAD	čovjek
	AY695375.1	SAD	čovjek
	AY695374.1	SAD	čovjek
	AY695372.1	SAD	čovjek
	AY695373.1	SAD	čovjek
	AY695376.1	SAD	čovjek
	AY631965.1		majmun
	AY631966.1		majmun
	JN420371.1	SAD	kalifornijski morski lav
	AY388617.1		
	KX583629.1	Kina	mošusna patka
	KY271943.1	SAD	čovjek
	AF043303.1		
	J01901.1		
	EU285562.1	SAD	
	AF028705.1		
	AF028704.1		
	U48704.1		
	AF063497.1		

	KT984498.1	SAD	rezus makaki
	DQ180604.1		
	DQ180605.1	SAD	
	AF513851.1		rezus makaki
	AF513852.1		rezus makaki
	U89790.1		
	DQ813647.1	SAD	
	MF682927.1	**Hong Kong**	***Rhinolophus sinicus***
	MF682926.1	Kina	*Rhinolophus pusillus*
	DQ335246.2		
	AY186198.1		
	AY629583.1	SAD	
	GQ368252.1	Kina	pile
	MG846444.1	Brazil	kokoš
	AY629582.1		kokoš
	KF937794.1	Rusija	
	AF085716.1		
	KP264981.1	SAD	govedo
	JN420372.1	SAD	kalifornijski morski lav
	NC_014468.1	Kina	šišmiš *Myotis ricketii*
	MN099037	**Hrvatska**	**šišmiš *Rhinolophus ferrumequinum***

Tablica se odnosi na pristupne brojeve sa Slike 24.

Virus	**Pristupni broj**	**Zemlja podrijetla**	**Domaćin**
Ambidensovirus	NC_014357.1	Kina	kineski bijeli škamp (*Fenneropenaeus chinensis*)
	NC_011545.2	Indija	tigrasta kozica (*Penaeus*

			monodon)
	NC_002190.2		*Penaeus* sp.
	NC_015115.1	Brazil	komarac
	NC_011317.1		*Anopheles gambiae*
	NC_001899.1		*Diatraea saccharalis*
	NC_019492.1	Kanada	*Pseudoplusia includens*
	NC_005341.1		*Mythimna loreyi*
	NC_004284.1		*Junonia coenia*
	NC_012685.1	Francuska	obični komarac (*Culex pipiens*)
	NC_005041.2		**smeđi žohar (*Blattella germanica*)**
	MN099038	**Hrvatska**	**šišmiš *Miniopterus schreibersii***
	NC_031450.1	**Kina**	**velika sjenica (*Parus major*)**
	NC_026943.1	Australija	*Cherax quadricarinatus*
	NC_022748.1	Argentina	crveni mrav (*Solenopsis invicta*)
	NC_004290.1		zrikavac (*Acheta domesticus*)
	NC_022564.1	SAD	zrikavac (*Acheta domesticus*)
	NC_030296.1	Tajvan	*Diaphorina citri*
	NC_040626.1	Belgija	bumbar (*Bombus cryptarum*)
	NC_000936.1		žohar (*Periplaneta fuliginosa*)
	NC_015718.1	Kina	žuta kukuruzna sovica (*Helicoverpa armige*ra)
	NC_006555.1	Kina	*Dendrolimus punctatus*
	NC_018450.1	Kanada	*Papilio polyxenes*
	NC_003346.1		dudov svilac (*Bombyx mori*)
	NC_004287.1		dudov svilac (*Bombyx mori*)

	NC_018399.1	Kolumbija	*Sibine fusca*
	NC_023842.1	Kanada	monarh (*Danaus plexippus plexippus*)
	NC_004288.1		*Casphalia extranea*

Tablica se odnosi na pristupne brojeve sa Slike 25.

Virus	**Pristupni broj**	**Zemlja**	**Domaćin**
Circo-like virus	KM887936.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KM887946.1	Australija	krljuštogrli lori (*Trichoglossus chlorolepidotus*)
	KM887922.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KM887931.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KM887930.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KM887935.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KM887940.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KM887923.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KF768552.1	Nova Kaledonija	*Trichoglossus haematodus deplanchii*

	KM887916.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KM887932.1	Australija	zelenoleđi lori (*Trichoglossus haematodus*)
	KY189056.1	Australija	*Trichoglossus moluccanus*
	KX449322.1	Australija	*Glossopsitta concinna*
	KX500098.1		nasmijana kukabura (*Dacelo novaeguineae*)
	KY388498.1	Kina	pas
	KT283604.1	Njemačka	pas
	JX221038.1	Poljska	žako (*Psittacus erithacus*)
	MK241555.1	**Hrvatska**	**šišmiš (*Miniopterus schreibersii*)**
	JX559621.1	**Brazil**	**čovjek**
	JX559622.1	**Brazil**	**čovjek**
	NC_038411.1	SAD	konj
	NC_038403.1	Tonga	otočna leteća lisica (*Pteropus tonganus*)
	NC_040325.1	Kenija	mrav (*Crematogaster nigriceps*)
	NC_038414.1	Tunis	čovjek
	NC_038418.1	Šri Lanka	čovjek
	HQ335017.1	SAD	komarac
	HQ738635.1	Pakistan	koza
	KY189062.1	Australija	crvena rozela (*Platycercus eximius*)

	KT732788.1	Tonga	otočna leteća lisica (*Pteropus tonganus*)
	GQ404858.1	Tunis	čovjek
	KM017740.1	SAD	mačka
	MH545513.1	Kenija	*Crematogaster mimosae*
	JX569794.1	SAD	*palmetto bug*
	KM382270.1	Brazil	šišmišja kolonija (*Molossus molossus* i *Tadarida brasiliensis*)

PRILOG C

Struktura genoma Adeno-associated virus Croatia cul1_12 (pristupni broj MN099037)

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..4561
                     /organism="Adeno-associated virus Croatia cul1_12"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="unclassified Dependoparvovirus"
                     /isolation_source="Oral swabs"
                     /host="Rhinolophus ferrumequinum (Greater Horseshoe
Bat)"
                     /db_xref="taxon:10803"
                     /country="Croatia"
                     /collection_date="2017"
     misc_feature    join(1..57,4505..4561)
                     /note="Inverted terminal repeat region (ITR)"
     CDS             241..2148
                     /codon_start=1
                     /product="Replicase; Parvovirus non-structural protein
NS1"
/translation="MSFYEVIIRVPHDVEDQLPGVSDSFVDWIVRKEWELPDWSDMDITLIDQPQLTLAEKIQREFL
SEWQKITKEKETPHFVQLEKGEKFYHLHTLVSTEGMKSMVLGRYLNQIRQKLVSQIYRGVEPQIPDWMAVTKVKKEG
ANRIRDTQYIPAYLLPKTQSELQWAWTNLEEYKLATLNLEERKRLSEQYQTEFRRNQPASDSQISETDSGNPRWRGK
STARYMELVKWLVERGITSEKQWIQEDQESYLSFNSTGTARGQIKAALDNAGRIMSTTKSASDYLIGPHPPEDVKNN
RVYRIFELNGYDPKYAGSILVGWCRKEFGKRNTVWLFGPATTGKTNIAEAIAHAVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKM
IIWWEEGKMTAKVVESAKAILGGSMVRVDQKCKSSQQIEQTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLEDRMFKFEL
TRRLEPDFGKISKREIREFMNWAESNKVPVTHEFRVKKFAPIFKRHAPEGEESEGINNRKRFRSSSFEEESSERADV
ENFALRYVNKCSRHLNFVTMMFPCQICDRMNQSVDVCFTHGAKSCEICFPRSDPDGQVDCIEMGESEKAEKEEMPEN
RCNTCKMRNIFRPNCGLCAELALECIDDVNKEQ"
     CDS             2150..4324
                     /codon_start=1
                     /product="Capsid; Parvovirus coat protein VP1;
Parvovirus coat protein VP2"
/translation="MSRVVMSFVDHPPDWLKRVASGLTEFIDLEPGPPKPKPGYQDQQRGLVVPGYKYLGPFNGLDK
GEPVNKADEVAREHDLEYNKLLEQGDNPYLKYNHADKEFQEKLSDDTSWGGNLGKAVFQAKKRILEPFGLAEELGGE
KTAPGKKRPRPPELPPSAPHSDDEELIARPAVRARLEGQNGAANAGPAAAPAADMASTEVASGGGGPMGDNNQGSDG
VGSSSGNWHCDSIWMDGRVITKSTRTWSLPTYNNHLYKQINSNAEVKDEKYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
LINNHWGMRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFADTEYQLPYVLGNAHEGCLPPFPADVFMLPQY
GYLTLNDGNQVIPQSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYEFENVPFHSMFMHNQSLDRLMNPLVDQYLWYLSATNGLN
LHFRKSKKGAFASQYRNWMPGPNQRRQQWSKGAGNNNALTNLWEYKNKFHIMNRDSVLAPGLAQAAADGYFTADGQL
IFANATQQSDEASGGNPPSSMLITGESETRPTNPGANTKWGEMADNQQSTTAKPTMVIDNEAHIFPGMVWQDRDIYL
QGPIWAKIPETDGHFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPEAFTANKINSFITQYSTGQVTVEIEWELRKEH
SKRWNPEVQYTSNFDSTDSLQFTVNNDGLYIETRPIGTRFLSHNI"
BASE COUNT     1242 a     1165 c   1197 g    957 t

ORIGIN
1 gccccgagtc agccagccag ccagctttct gacccgggat agccccaccc actccgtgac
61 gaagttggtg acgtcacgtg ggaaaatgac gtagcgtggg aaagtgacgt aacgtgggaa
121 aatgaaaagg gcgcgaaaat gaaatctcgc gagacgagaa gatgacgtca atgggtgtga
181 atatataaga gagcacaccc agccgttagt cattccactc cagtcagcca gccagacaac
241 atgtcgttct acgaggtgat catccgagtg cctcacgacg tggaggatca gctcccggga
301 gtatccgact ccttcgtgga ctggatcgtg aggaaggaat gggagcttcc tgattggtca
361 gacatggaca ttacgctgat tgaccaacca cagctcacgc tggccgagaa gattcagcgg
421 gaatttctgt ccgagtggca gaaaatcacc aaggagaaag aaactccaca ctttgtgcag
```

481 ctcgagaaag gcgagaaatt ttaccatctg cacacgctgg tttccaccga aggcatgaag
541 tccatggtgc tgggaaggta cctgaaccag atccggcaga aattggtgag tcaaatttac
601 cgcggtgtgg aaccgcagat tcccgactgg atggcggtaa ccaaagttaa aaaggaggga
661 gccaatagaa ttcgagatac gcagtatatt cccgcctacc tgctgcccaa gacccaatca
721 gaacttcagt gggcttggac gaatctcgaa gagtataaat tggccacgct caacctcgag
781 gagcgtaaac gtctctcgga acagtaccag acagagttcc gcaggaacca gccagccagc
841 gactcgcaga tttcagagac agattctggt aatcctcggt ggaggggcaa atctaccgcg
901 agatatatgg agctggttaa atggttggtg gaacgaggta tcacctccga gaagcaatgg
961 atccaagagg atcaagagag ctatctcagc tttaactcga ccggcacggc cagaggtcag
1021 atcaaggccg cgttggacaa cgccggtcgg atcatgtcga ccaccaagag cgccagcgat
1081 tacctcatcg gaccacatcc gccagaggac gtgaaaaaca accgcgtgta ccgcatcttt
1141 gagctgaacg gctacgatcc caagtacgcg ggatcgatat tggtcgggtg gtgccggaaa
1201 gagtttggta aaaggaacac cgtgtggctc tttggaccgg ccacgaccgg taaaaccaac
1261 atcgccgagg ctatcgctca cgcggtgccg ttctacggct gcgtgaactg gaccaatgag
1321 aactttcctt tcaacgactg cgtggacaaa atgatcatct ggtgggagga gggtaagatg
1381 accgccaagg tggtcgagtc ggccaaggcc atcctcggag ggtcgatggt ccgcgtcgac
1441 caaaagtgca agtcgtcgca gcagattgag cagactccgg tcatcgtgac ttccaacacc
1501 aacatgtgcg cggtgattga cgggaactcg acgacctttg aacatcagca gccgttggag
1561 gacaggatgt tcaaatttga acttacgcgc cgtttggagc cggactttgg caagatctcc
1621 aaacgcgaga taagagagtt tatgaactgg gcagagtcca ataaagttcc ggtgactcat
1681 gagttccggg taaagaaatt cgcgccaatt ttcaaaagac acgccccgga aggggaggag
1741 tcagagggta taaataaccg caagcgcttc cgctcttcct catttgaaga ggagagttcg
1801 gagcgtgcgg acgtagagaa ctttgctctc aggtatgtca acaaatgttc tcgtcatttg
1861 aattttgtta caatgatgtt tccttgtcaa atttgcgaca gaatgaacca atctgtcgat
1921 gtctgtttta ctcacggggc aaaatcgtgt gaaatttgtt tccctagaag tgatccagac
1981 gggcaagttg attgtattga aatgggggag agtgagaagg cggaaaagga agaaatgcct
2041 gaaaatcgtt gtaacacttg taaaatgcgc aatattttcc gccctaattg tgggctatgt
2101 gctgagcttg ctctggaatg tattgacgat gtaaataaag aacagtaaaa tgagtcgagt
2161 agtcatgtcg tttgttgatc accctccaga ttggctgaag cgtgtggcga gtggcttgac
2221 tgagttcatc gacctcgaac ccggaccccc aaaacccaaa cccggctatc aggaccagca
2281 gcgcggtctc gtggtacccg gatacaaata cctcggtccc tttaacggtc tcgataaagg
2341 agaacccgtt aacaaggctg acgaggttgc tcgagagcac gacctcgagt acaacaagct
2401 acttgagcaa ggagataatc cttatctcaa gtacaaccac gccgataagg agtttcaaga
2461 gaaactctct gacgacactt cctggggcgg caacctcggg aaggcggttt ttcaagccaa
2521 gaagcgtatc ctcgagccct ttggcctagc cgaagagctc ggcggtgaaa agacggctcc
2581 tggaaaaaag cgtcccaggc ctccggaact tccaccttcg gctccgcatt cggacgacga
2641 agaactgatt gctcgaccgg cagtcagagc tcggctcgaa ggtcaaaacg gagcagcaaa
2701 cgcaggacca gcagcagcac cagccgcaga tatggcatct actgaagtgg cttcaggcgg
2761 tggcggccca atgggcgaca ataaccaagg ttccgatgga gtgggtagct cctccggaaa
2821 ttggcattgc gattccattt ggatggacgg cagagtcatc accaagtcta ccagaacctg
2881 gagcctgccc acctacaaca accacctcta caagcaaatc aactcaaatg ccgaagtcaa
2941 agacgaaaag tactttggat atagtactcc ctggggatac tttgatttca atcgattcca
3001 ctgccacttt tctcccagag actggcagcg actcatcaac aaccactggg gaatgcgacc
3061 caaaagactc aactttaagc tgttcaacat ccaggtcaag gaggtcacga cgaatgacgg
3121 aacgacaacg atcgccaata acctcacgtc gaccgtccag gtgtttgcag acacagagta
3181 ccagttgccg tacgtgctcg ggaatgcgca cgagggctgc ctcccgccgt tcccggcaga
3241 cgtgtttatg ctgccgcagt acggatactt gactctaaac gacggcaacc aggtcattcc
3301 tcagagctct ttttactgct tggagtactt tcccagtcag atgctgagaa ccggaaacaa
3361 ctttacgttc agctacgagt ttgagaacgt gcctttccac agcatgttta tgcataatca
3421 gtctctggac cgactgatga atcctttagt cgatcagtac ctgtggtacc tctcggctac
3481 caacggatta aatttacatt ttagaaaatc caagaaggga gcgtttgcca gtcaatacag
3541 aaactggatg cccggtccta accagcgacg tcagcagtgg agtaaaggag ctggaaacaa
3601 caacgccttg accaatctct gggaatacaa aaacaagttc cacatcatga acagagactc
3661 ggtactggct ccaggactcg cacaggctgc ggcggatgga tatttcacag ccgacggaca
3721 attaattttt gctaacgcta cacaacaatc ggacgaggct tccggtggaa atccaccgag
3781 cagcatgtta attaccggtg aatccgaaac tcgacccact aatcccggag caaacaccaa
3841 gtggggtgaa atggccgaca accaacagtc tacaacggca aagccgacca tggttatcga

```
3901 caacgaggct cacatctttc ccggcatggt ctggcaggat cgggacattt acctgcaagg
3961 gcccatctgg gccaagattc cagagacgga cggacacttt catccttctc cgctgatggg
4021 cggattcggt ctcaagaatc ctcctcctca gatactcatc aagaatacac ccgttccggc
4081 taatcctccg gaagcgttca ccgccaacaa gataaactcc ttcatcacgc agtactcgac
4141 cggacaagta acggtggaaa ttgaatggga gctcaggaag gagcacagca agcgctggaa
4201 cccagaggtg cagtacacgt ccaactttga ctctacagac agtctgcagt ttaccgttaa
4261 caacgacgga ctctacatcg agactcgacc aatcggaacc cgtttccttt cccacaatat
4321 ttaatttgaa tttaaataaa ccgcgtattc gtttcattgt atgctcgtgt cacgtgtggt
4381 tcttgctcgt tttttttggc gggctttttg aattttggcg ggcggatgta acgtcactcg
4441 ggtcaagggt cacgggcacg tcacatccct cacgggctgg caacgtgcca accctaaccc
4501 aaatacggaa agagtgggcg ttccccgggt cagaaagctg gctggctggc tgactcgggg
4561 c
```

Struktura genoma Ambidensovirus Croatia 17_S17 (pristupni broj MN099038)

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..6110
                     /organism="Ambidensovirus Croatia 17_S17"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="unclassified Ambidensovirus"
                     /host="Miniopterus schreibersii (Common bent-wing bat)"
                     /db_xref="taxon:10803"
                     /country="Croatia"
                     /collection_date="2017"
     misc_feature    join(482..569,606..693)
                     /note="5'-terminal palindrome"
     CDS             811..1581
                     /codon_start=1
                     /product="Non-structural protein (NS3)"
/translation="MDRVRVLPKWMTTFNPKSLRSLAMNAVQRVYKHDWHLVREIPKSLQEELLEAWLQCEESVPVS
DDDLEKVEAVVCRGWKGMRPWSPQVFVYIMMLPNELPCFAFEDNHVIFEYYLWKRQNCEMNLCVPCFISVSKEYKQY
SANYWLDKGWQFYKVKNHIRVKGDGLLYVLWDRSSWCDRCICEPLIYDIIDYEDCYYDYHYHKKRRCTRCYDSSSDS
DSDTDWQTRSLVGGRRTDPKMYEMMKQNKHFEWYCLFYF"
     CDS             1582..3168
                     /codon_start=1
                     /product="Non-structural protein (NS1)"
/translation="MNNDLYLWANPGASLGGTPGRMGESSWFLDPNVAGDAVGVDVQDEAAAIDQPLEQELQSMVDR
FVSRIEKENWEDSGYYVSDVYACESVSRAAGLAKKLAERARDFRRGFIGIALHGNHVHSIHSCAYSNKCCRCSFKDF
PEAKEDIRRLLRKPPPIETFKRSDWENITKYFCTKGRRATFFKINGVVQRLPLEITNISDIILSGQVEGRPYASLED
CNDPLDSNAERKRGIAPKGDGSTGSRKRRGVSNTGGPGGIRGVPGVILSIIERYAVCPLSEIVYTREYLENQIATKR
LDDRDVKNAIDCHAGIINTWTREDFVKFYTNPETVKIWSARSLDLVDLYYLSYEESQQVILQLLQYQCGDNYPQFVR
DLLNVVDMKIPKCNCFLIVSPPSAGKNFLIDAVKDYFLNVGQMQNPNKYNTFAYQDCHNRRLLIWNEPNYEPRETEN
LKMLFGGDNLSANVKCKPQANVKRTPVICMSNVTPRFANHDAFVDRVIKYYWNSAPFLKHVNKKPRPDAVMDLLYSI
NGE"
     CDS             1589..2371
                     /codon_start=1
                     /product="Non-structural protein (NS2)"
/translation="MTSTFGQILEQVWEALPDEWASHPGFWIRMLQEMPLELMFKTKLQQLINRWSRNYSQWSIGSF
PALKKKIGKTADITCQMFMPANQSQELLDWLKNWQKELEISEEDLSELLSMAITSTPSTAVHIQTNAAGAASKISRK
RKKTLDDFFESLHPSKRSSEAIGKISQSIFVRKGDEQRSLKSTVSYKDFLLKLQIYPTLSYQAKLKEDHTQAWRTAT
TRLTVTLNENEELHRKVMEVLEVAKDEVLATQEDQEESEGSLE"
     CDS             complement(3189..4991)
                     /codon_start=1
                     /product="Structural protein (VP4)"
/translation="MPRREKPLGPHPRDRPNWDRLNEGQRRYAVEQWMLARVRRGERFDPPGGEEYEIPNEQDVIDD
FDLNLLGTPGGQPEPEEAEDEIPNSEEDAAADNFLQAVRDRQEAGPSGMAGAGQQPMEGITGVKRALAPDSTGSPSK
```

VAKSGTSLPGTGGNLDGMTRGGANGDGSSAPTSILRPIGMHIDKQTHVYRKKWRFLTSANANVILSEAENSTLKIPK
RFAMTTGMASIPWEYLFFYMSPAEYNRMKNYPGTFAKHASIEIKAWNTRVAFQTGDTQTSNATLNQNKFVQIAKGFR
SIPHISSSNRRYNYSETEPMQPVSFKEQTSAQYREGLKTAMYGYDNNSTDFNKAPPADATGAEIYLQDYLTIYTIDA
RGTTSPPFLPGFPPFKNFIEEYDASAVINQSVLVMDYDFKYAPLMPQFASVPANLMQSTDNAVIPTGTEYEVSGVKI
TDSGQSAAPLNNFNLTRKYLQGPTPASTFFTEDQLYYKVPIEQGGVFEEIHTQSFGDSQMPSCNIGIRAVPKLTTHD
NTTQAESWLDAQGYFEVECVLVTESADPYAYIKDNCFSQNTKGQLQYFSTNNRPIAKTYDWPNEYGRMKVLPTVA"
     CDS   complement(4886..5797)
                     /codon_start=1
                     /product="Structural protein (VP1)"
/translation="MGEYIVLDGFNSGSSSASTSTETLFQQPTERTSLLNRSRVHPGYGASKLPLRPTGAAGAAGSQ
YDAIFQSQLGRAAATGNPLGLFKHRDAYYASVPFELRRLPLADRQKYIKPYNVPWNKETKTQFRQHWRLVNPRAGQK
RLQQQQQAAKQKEVEANRAQANLARGEPTWYGKALTLPLSKNLGPGNRISPATNTADVIAQGHDLHYQDAKKDSDVL
QADREAINQFTHEAIQGSDPVSRLHAAVGAVGLGIKHTVESLTGKVIYGELICQDAKNLLVLIPGTDQIGIALMKGN
GVMLLNSGC"
     misc_feature   join(5822..5947,5984..6109)
                     /note="3'-terminal palindrome"
BASE COUNT   1645 a   1261 c   1352 g   1852 t

ORIGIN
1 ttttgtccag cccttggatt tactagtctc cagtgtctac ggaattgagc ctttgtttcc
61 ttagtccagg gaacgttgta tggtttaata tatttctgtc tatctgctaa aggcaagcgt
121 cgaagttcaa atggaactga cgcgtaataa gcgtctctgt ctttaaataa tcctaatgga
181 ttaccggtag ctgcagctct ccctaattga ctctggaaga tagcgtcgta ctgcgaccct
241 gctgcacctg ctgctcctgt tggtcttagg ggtagtttcg acgctccgta ccctgggtga
301 actctgctcc ggttgaggag ggatgtccgt tcagttggtt gttgaaataa agtctctgta
361 gaggtactcg ctgaactact cccactgttg aatccgtcga ggacaatgta ctcgcccata
421 ctgacgcgct cggccttcct cccctccttt tattctcttt gtccgccatt taatctcctt
481 tactgggtgc ttgcccctaa gcccctggct tagcactaac gacgaccacg acgacgggtg
541 gggttatata ctcgctgacc ttgataacca tggtttaccg ataatagcaa attatcatgg
601 taaccggtta tcaaggtcag cgagtatata accccacccg tcgtcgtggt cgtcgttagt
661 gctaagccag gggcttaggg gcaagcaccc agtttgaaga gataataacc tcggtgagta
721 taaatactgt tactatgttg gattttatat tagttgttgt tagaaagtgc tagaggagtt
781 gctgattatt ctttctcttg gtaagtagat atggatcggg ttcgagttct gcctaagtgg
841 atgactacct ttaatcctaa atcgttgcgg tctctggcga tgaatgctgt tcagagggtc
901 tacaagcatg actggcatct tgttcgcgaa attccaaagt ctttgcagga ggagttacta
961 gaggcttggt tgcagtgtga agaaagtgtt ccagtgtctg atgatgattt agagaaagta
1021 gaggctgttg tttgtagggg ttggaaagga atgcgtccat ggtctccaca agtgtttgtg
1081 tatattatga tgttaccgaa tgaactgcct tgttttgctt ttgaggataa tcatgtaatt
1141 tttgagtatt atctttggaa acgacagaac tgtgaaatga acttatgtgt tccatgtttc
1201 atctctgtta gtaaagaata taaacaatat tctgctaatt actggttaga taagggatgg
1261 caattctata aagtgaaaaa tcacattcgt gtaaaaggag atgggttgtt gtatgttttg
1321 tgggatagat catcttggtg cgatcgatgc atttgtgaac ctttgattta tgatattatt
1381 gattatgagg actgttacta cgactatcat taccacaaga agaggcgttg cacgcggtgt
1441 tacgattcaa gcagtgactc tgattcggac acagactggc aaactcgttc tttggttggt
1501 ggtcggagaa cagatcctaa aatgtatgaa atgatgaaac aaaataaaca ctttgaatgg
1561 tattgtttgt tttatttcta gatgaataat gacctctacc tttgggcaaa tcctggagca
1621 agtttgggag gcactcccgg acgaatgggc gagtcatcct ggtttctgga tccgaatgtt
1681 gcaggagatg ccgttggagt tgatgttcaa gacgaagctg cagcaattga tcaaccgttg
1741 gagcaggaac tacagtcaat ggtcgatagg ttcgtttccc gcattgaaaa agaaaattgg
1801 gaagacagcg gatattacgt gtcagatgtt tatgcctgcg aatcagtctc aagagctgct
1861 ggactggcta aaaaattggc agaaagagct cgagatttca gaagaggatt tatcggaatt
1921 gctctccatg gcaatcacgt ccactccatc cacagctgtg catattcaaa caaatgctgc
1981 aggtgcagct tcaaagattt cccggaagcg aaagaagaca ttagacgact tcttcgaaag
2041 cctccaccca tcgaaacgtt caagcgaagc gattgggaaa atatcacaaa gtatttttgt
2101 acgaaagggc gacgagcaac gttctttaaa atcaacggtg tcgtacaaag acttcctctt
2161 gaaattacaa atatatccga cattatccta tcaggccaag ttgaaggaag accatacgca
2221 agcttggagg actgcaacga cccgcttgac agtaacgctg aacgaaaacg aggaattgca

2281 ccgaaaggtg atggaagtac tggaagtcgc aaaagacgag gtgttagcaa cacaggagga
2341 ccaggaggaa tcagaggggt ccctggagta attctcagca ttattgagag gtatgcagta
2401 tgtcccttat ctgaaattgt ttatactaga gagtatcttg aaaatcaaat tgctactaaa
2461 cgattagatg atagggatgt aaagaatgca attgattgtc atgcagggat tattaatacg
2521 tggactagag aggactttgt taaattttat actaatcctg aaactgtaaa gatttggtct
2581 gcacgtagcc ttgacttagt tgatttgtac tacttgtcat atgaggaatc tcagcaagtt
2641 attttgcaat tacttcagta tcagtgtgga gataactatc cacaatttgt tagagacttg
2701 ttaaatgttg ttgacatgaa aataccaaaa tgtaattgtt ttcttatagt gagccctccg
2761 agcgcaggaa agaacttctt aatagatgcc gtaaaagact attttcttaa tgtaggccag
2821 atgcaaaatc ccaacaagta taacaccttt gcatatcaag attgtcacaa cagaagactg
2881 cttatttgga atgagcctaa ctatgaaccg agggaaactg agaacttaaa gatgttgttt
2941 ggaggagata acttgtctgc taatgttaaa tgtaaaccac aagctaatgt taaaagaaca
3001 cctgttatat gtatgagtaa tgtaactcct agatttgcta atcatgatgc ttttgtagac
3061 agagttatta aatactattg gaattctgca ccttttctta aacatgtaaa taagaaacca
3121 agaccagatg ctgtaatgga tttgctttat tcaataaatg gtgaatgaac atggtataca
3181 tctttcattt atgcaacagt tggcaatacc ttcatccttc catactcatt aggccaatcg
3241 tatgtcttag ctataggacg attattagta ctgaaatatt gcaattgtcc cttcgtattc
3301 tgactaaagc aattgtcttt aatatatgca tatggatcag cagattcagt tacaagcaca
3361 cattcaactt caaagtatcc ctgagcatct aaccaagatt cagcttgagt agtgttgtca
3421 tgtgtagtaa gcttcggtac agctctaatg ccaatattgc aagaaggcat ttggctatcc
3481 ccaaaagatt gggtatgtat ttcttcgaac acacctccct gttcgattgg aactttataa
3541 taaagctgat cctcagtaaa aaatgtggaa gctggagtag gaccttgaag gtacttgcga
3601 gttaagttaa aattatttaa cggggcagca ctttgtcctg aatcagtaat cttaactcca
3661 cttacttcat actcggtacc agtaggaata acagcgttat ccgtactctg cattaaatta
3721 gcaggaacag atgcaaattg aggcatcaac ggtgcatact taaaatcgta atccataaca
3781 agaacacttt gattgattac ggcacttgca tcgtattctt cgataaagtt tttgaatggt
3841 ggaaatcctg gtaaaaaagg gggacttgta gttcccctcg catctatagt ataaatagtc
3901 aagtagtcct gcaaataaat ctccgcacct gtagcgtctg caggaggtgc tttattaaaa
3961 tcagtactgt tattatcata cccatacata gctgttttta aaccttctct gtattgggca
4021 gatgtttgtt ctttaaaact tactggttgc ataggttcag tctcactata attatatctc
4081 ctgttcgaag atgatatgtg aggaattgaa cgaaaacctt tagcaatttg aacaaactta
4141 ttttggttta aggttgcatt tgatgtttgg gtgtccccag tctgaaaggc taccctggta
4201 ttccatgctt taatttcaat agatgcatgt ttagcaaacg taccaggata gtttttcatt
4261 cggttatact ctgctggaga catataaaag aataaatact cccaaggaat actagccata
4321 ccagtagtca tagcaaatcg ttttggaatt tttaatgtac tattttcagc ctcagaaaga
4381 attacattag catttgcact agttaaaaaa cgccacttct tcctatacac atgagtttgt
4441 ttatcaatat gcattccaat tggtcttaat atacttgttg gagcactgga tccgtcgccg
4501 ttcgcaccac cacgcgtcat accatctaag ttgcctccag ttcctggcag ggatgttcca
4561 ctttttgcta ctttagatgg actgcctgta gagtcaggcg ctaatgctcg ttttacacca
4621 gttataccct ccattggttg ttgtcctgca cccgccattc cactaggtcc tgcttcttgt
4681 ctgtcacgta cagcttgtag aaagttgtca gcagcagcgt cctcctcact gtttggtatc
4741 tcgtcctcag cttcctctgg ctcaggttga cctcccgggg tacctaaaag attaagatca
4801 aagtcatcta ttacgtcctg ttcatttggt atttcatact cttcaccccc gggaggatca
4861 aacctttcgc cacgtcgtac tctagctaac atccactgtt caacagcata acgccgttgc
4921 ccttcattaa ggcgatccca atttggtctg tcccggggat gaggaccaag aggtttttcg
4981 cgtcttggca tattaactca ccgtatataa cttttcctgt caacgactcg acagtatgct
5041 tgattcccag cccgactgct cccactgccg cgtgtagccg agatacagga tctgaaccct
5101 ggattgcctc gtgtgtaaac tggttgattg cttctctgtc cgcctgcaac acgtcagaat
5161 ccttcttagc gtcctggtaa tgaaggtcgt gaccctgtgc aataacgtca gctgtgttgg
5221 tggcgggaga tattcgattt ccaggtccta gattcttcga aagcggcaaa gttagcgctt
5281 tcccgtacca agtaggttct cctctcgcta gattggcttg tgctctgttg gcctctacct
5341 ccttctgctt tgctgcttgt tgttgttgtt gaagacgttt ttgtccagcc cttggattta
5401 ctagcctcca gtgttgacga aactgagtct ttgtttcctt attccaagga acgttatacg
5461 gtttaatata tttctgtcta tctgctaaag gcaagcgtcg aagttcaaat ggaactgacg
5521 cataataagc gtctctgtgt ttaaataatc ctaatggatt accggtagct gcagctctcc
5581 ctaattgact ctggaagata gcgtcgtact gcgaccctgc tgcacctgct gctcctgttg
5641 gtcttagggg tagtttcgac gctccgtacc ctgggtgaac tctgctccgg ttgaggagtg

```
5701 atgtccgttc tgttggttgt tgaaataaag tctctgtaga ggtactcgct gaactactcc
5761 cactgttaaa tccgtcgagg acaatgtact cgcccatact gacgcgctcg gccttccccc
5821 actcctttta ttctctttgt ccgccattta atctccctta ctgggtgctt gcccctaagc
5881 ccctggctta gcactaacga cgaccacgac gacgggtggg gttatatact cgctgacctt
5941 gataaccatg gtttaccgat aatagcaaat tatcatggta accggttatc aaggtcagcg
6001 agtatataac cccacccgtc gtcgtggtcg tcgttagtgc taagccaggg gcttaggggc
6061 aagcacccag taaaggagat taaatggcgg acaaagagaa taaaaggagg
```

Struktura genoma Iflavirus sp. strain 15/G-Me polyprotein gene (pristupni broj MG963177)

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..4211
                     /organism="Iflavirus sp."
                     /mol_type="genomic RNA"
                     /strain="15/G-Me"
                     /isolation_source="bat guano"
                     /host="Myotis emarginatus"
                     /db_xref="taxon:1916690"
                     /country="Croatia"
                     /collection_date="May-2016"
     CDS             <1..>4211
                     /codon_start=1
                     /product="polyprotein"
                     /protein_id="AWA28233.1"
/translation="DRDGPEMEDTIVQNQQHNVDLAETTEPSTSHVANVEFGVLPWIYDERHTYPDLTERWVRFTDF
QWTTTQTAGSILYRFDLPFDAIIQTQNTPNALPWRQHAFFRSDMEVMLQINSQPAQSGYIVMGTMYNASELTGSSAR
ITDVAHVLQMPHTVLAAGASNSGILYIPWMRHYPVSPVLDSNWDYPMYYHTLFISVLAPLRTGADGPTTADCVLQVR
FPNLEFYGMRNTVEVVSPTILTATGWIRDLTQEGVEPNPGPLFGTALAILGGVSSAAKAVSSIASTVSGIASNIGSF
GSKAKNVVEGTESLLRKVYPKEDMDRPQDIREPVNMYLQQNTSLSLATGVNKVKLLQLQAENTVTHPPAFVPSDDQF
STRYITEVFGQIDLVQWSTTQARGSLLFSWPVTPLNGKIINPNIGDNARTVPTPMAAISSYYSGYHGNMLMRLTFAL
SKFHSGRVYIVYSPDQVPFSDDVGALYATLLDVQDQSQYTFVVPYQIPATFAPIYANPRGFTVEDVNSNGLVNIPNY
GYVSIFVENELRVMETASPTIDIVIELAGSTDFSLVLPCGSPLRNLPSITPTALEATGMEGPSVEAEVDQSDERTKV
VDASTPLRNTYPAWALNLNETYDIRDTVKRYIPWFDALVPAINPNTATVPLINISVYHSPLSSIDSASPIITPTWTS
LTTSTLESILGSSRMIACERVKFDMNTTISFRVPWTTNASVLSNGIDPTLRFNQLPAYCNGRVHVVLEMATTNFYYL
SWDVTLGTAGQRPLGYRPDLITTLHDAFRFSKSDFNYQLDFNVGPSGVSTLFNINMRVYRAMGDGGNFYIFQGFPTY
NTLFNPVLNLIGGSSSTAGTMGITQFQRKGPKIFSTPRSKVTRTGIVIRPDPVRDLTEDGDVESNPGPVSRPEAGPS
SDPPGGHQPDPESDYFTTEEQEEMGRAGMTRRLYNRVSSYLRTVRRMPRDTVDEFWRRYEEKKRIVVDLTDSVRTVS
EFVKNVEDSDMDKQKFERAFESIGKASDNFNNLYDAYTDNGEVSPAIATMENALKYSTFLVNIWQSQSIYQTLLNII
TMLSEMGVCRIAATRIIDYFRVTAMADNEDDAEELSKGWSSLVITSILAAFGLTTAVTKGTNIGGDLLKEAREYFRT
GFNVKKFLDCHFKCIMETVNWVKRRVFGGEEPPSTEGLATDLVVWMEKVHTLTEIYNFEHLLSDPKFAKRVLDLQDE
CGKFDIQFATSKRPAPAMYSVNKGRLQRAVDTLGKQGGLRRNRCTPFCVWLYGASGAGKSHISDEVLINIGDVLGVR
SNDPIYYRSLDVEYWNGYNQQKLIAIQDFAKIVTGENYRRHVSELSSLIEPYPVNPPFAELEDKKRIADAVAVLVTS
NHAFPNVQNIGMTVDSLFYRRRHALIHVRFK"

ORIGIN
1 gatagggatg gaccagagat ggaggatact atagttcaga atcagcaaca taatgtggat
61 ttagcagaaa caactgaacc atccacttca catgttgcta atgttgaatt tggtgtcctt
121 ccatggattt atgatgagcg tcacacatac cctgatttaa ctgagaggtg ggttcggttt
181 acggactttc aatggaccac tacccagact gctggttcta ttttgtacag atttgacctt
241 ccctttgatg caatcataca gacacagaat accccaaatg ccctaccttg gagacaacat
301 gctttcttta gaagcgatat ggaagttatg ttgcagatta attctcaacc tgcccagtct
361 ggatacatag ttatgggtac tatgtataat gcatcagaat taacaggctc cagtgctaga
421 ataacagatg tggcccatgt attacaaatg ccacacactg tacttgctgc tggtgcttct
481 aattctggta tattgtacat accctggatg cgacattacc ctgttagtcc agttttggat
541 tctaattggg attatcctat gtattaccat accctttta tttcagtcct tgccccttta
601 cgaactgggg cggatggacc caccactgca gattgtgtgc tgcaggtgcg tttccctaac
```

661 cttgaatttt atggtatgcg aaatactgtt gaggtagttt cgccaaccat ccttactgct
721 acaggatgga ttcgtgattt gacacaggag ggagtggaac ccaatcccgg acccttgttt
781 ggtacagcac ttgcaatttt aggtggcgtc tcttcggctg ctaaggctgt gtccagtata
841 gccagcacgg tttctgggat tgctagtaac attggtagct ttggatctaa ggctaagaat
901 gttgttgagg gaactgagtc tttgttgaga aaagtctacc ctaaagaaga tatggatagg
961 ccacaagata ttagggaacc agtgaacatg taccttcagc agaatacgag tctatcatta
1021 gctaccggcg tcaataaggt taaactcctt cagttgcagg ctgaaaatac ggtaacccac
1081 cctcctgctt ttgtcccatc agatgatcag ttttcaacta gatatattac tgaggtattt
1141 ggacagatag atctagtcca atggtcgaca acgcaggcgc gtgggtcgtt gctgttttcc
1201 tggcctgtta ccccactaaa tggtaaaatc attaacccta atataggaga taatgcccgt
1261 actgtaccaa ctccaatggc tgcaatttca tcctattatt ctggttatca tggcaatatg
1321 ttaatgcgtc tcacctttgc attatcaaag tttcattctg gtcgtgttta tattgtgtat
1381 tcacctgatc aagtaccttt ttccgatgat gttggtgcat tgtatgcaac cctccttgat
1441 gttcaagacc aaagtcaata tacttttgta gttccatatc agatccctgc cactttcgct
1501 ccaatttatg caaatccacg tggttttacg gtagaggatg ttaactcgaa tggactagtt
1561 aacatcccca actatggcta tgtttcgatt ttcgtagaga atgagctgcg agtcatggaa
1621 actgcgagcc caactattga tatagtaatt gagctcgcag gttctactga cttttcgtta
1681 gtattaccat gtggttcccc actacgcaat ttaccatcca ttactcccac tgcactagaa
1741 gctactggta tggaaggccc gagtgttgag gctgaagttg atcagagcga cgaacgtacg
1801 aaagttgtag atgcttcaac accattgcgg aatacgtatc cagcttgggc tcttaatctg
1861 aatgagacct atgacatccg cgatacagta aagaggtata ttccgtggtt tgatgcttta
1921 gtgcctgcta ttaacccaaa tacagctacc gttcctttaa ttaacatcag tgtgtatcat
1981 agccctttat cttcaataga ttctgcctcc ccaataatta caccaacttg gacgtctttg
2041 actacttcta cactagaaag tatcttgggg tcttcccgta tgatagcctg tgagcgtgta
2101 aagtttgata tgaacaccac catttcattt agagtaccat ggacaacgaa tgctagtgtg
2161 ctttctaatg gtatagatcc aactttgcgt tttaaccaac ttccagcgta ttgtaatggt
2221 cgtgttcatg tcgtacttga aatggcaaca actaattttt actacctctc ctgggatgtt
2281 acattgggta cggctggaca acgaccattg gggtatcgac cagatttaat tactacactt
2341 catgatgctt tccgatttag taagtctgat ttcaattatc aactagattt taacgtagga
2401 ccatctggcg tctcaacttt gtttaacatc aacatgcgag tatatagagc gatgggagat
2461 gggggtaatt tttacatttt ccaaggtttc cccacctata atacactgtt taatcctgta
2521 ttaaacctca ttggtggctc aagcagcact gctggcacca tgggtattac gcaatttcaa
2581 cgtaagggac ccaagatctt ttcaacacca aggtcgaaag ttacacgcac gggaatagtt
2641 attcgacctg acccagtacg agatttgaca gaagatggag atgtggagtc aaaccctggg
2701 cctgtcagca gaccggaagc aggaccttcg agtgatcccc ctggcggtca ccagcccgac
2761 ccagagtcgg attacttcac tacggaggaa caagaggaaa tgggtcgggc tggtatgacg
2821 aggagattat ataatagagt gtcttcctac ttaagaacgg tgcgtaggat gcccagggat
2881 accgttgacg agttttggcg aaggtatgag gaaaagaaga gaatagtggt tgatcttact
2941 gattcagtta gaaccgtgtc tgaatttgta aagaacgtgg aggactcgga catggataaa
3001 caaaagtttg agcgtgcttt tgagagtata ggtaaagctt cggataattt taacaatttg
3061 tatgacgcat atacggataa tggagaagtt tccccagcta tcgccacaat ggagaatgct
3121 ctgaagtatt ctacttttct agtaaacatc tggcaatcac agtcaattta ccagacatta
3181 ttaaacataa taaccatgct ctcagagatg ggtgtgtgta ggattgctgc tactagaatt
3241 atagattact ttagagttac ggctatggcg gataatgaag atgatgctga ggaattgtcg
3301 aagggctggt ccagcctggt tataacatcc atacttgcag cttttggcct aacaacagcg
3361 gttactaagg ggactaacat tggtggagac ctccttaaag aagctcgtga gtattttagg
3421 actggcttta atgtaaagaa gtttctggat tgtcatttca agtgtatcat ggaaacagta
3481 aactgggtca agcgtagagt attcggtggc gaagagcccc caagtacaga gggtttagcc
3541 actgaccttg ttgtctggat ggaaaaggta catacactta cagaaattta taattttgaa
3601 catcttttat cagatcccaa gtttgcaaaa cgtgtgttgg acttacagga cgagtgtggc
3661 aagtttgaca tacaatttgc aactagtaaa cgaccagcac cagctatgta tagtgtaaac
3721 aaaggccgat tacagcgagc tgtggataca ctgggtaagc agggaggttt aagacgtaat
3781 cgttgtacac ccttctgtgt ttggttgtat ggggctagtg gagcaggaaa gtcccatatt
3841 agtgatgagg ttttgattaa catcggcgat gttttggggg ttcgtagtaa tgatccaatc
3901 tactatagat ccctagatgt ggagtattgg aatggctata atcagcagaa gctgatcgct
3961 atccaagatt ttgcgaagat agttactgga gagaattatc gccgtcatgt tagtgagctt
4021 tcatcactaa tagaaccata cccagtgaat ccaccgtttg ctgagttgga agacaagaag

```
4081 cgtattgctg acgctgtcgc tgttttagtg acgtcaaatc atgcattccc aaatgtgcag
4141 aatattggta tgactgttga ctccctattt tataggcgta ggcatgccct tatacatgtt
4201 aggtttaagg a
```

Struktura genoma Iflavirus sp. strain 16/F-Rf polyprotein gene (pristupni broj MG963178)

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1964
                     /organism="Iflavirus sp."
                     /mol_type="genomic RNA"
                     /strain="16/F-Rf"
                     /isolation_source="bat guano"
                     /host="Rhinolophus ferrumequinum"
                     /db_xref="taxon:1916690"
                     /country="Croatia"
                     /collection_date="May-2016"
     CDS             <1..>1964
                     /codon_start=1
                     /product="polyprotein"
                     /protein_id="AWA28234.1"

/translation="IGLPAAKNILNYWCKEMESASLKSVSTWIKPVENEIKWGDTTIQPYYSTNVSYVNSGMEKMRT
ELLGFKMQNGSNPHKCGTLLMSNDVLCGLVVAAKTLTSESFAVSISREMLVEGLRVLGATPFDMKMKTTPLDVVGGV
PKMLPPEEGDFVLIGKAERGITYAGKTRLTPSIIHGELSEPFRSPAAQKLEATGACTGFDVVMNGCKRQFKKPVTIP
TEEVRQITKYLIERIVPSSKPVRXIDDKPVALETAIIGIPKSKFTAMKLNTAIGWPLMTKFPRGYKKKDIIKINEER
TAVEIHRYALEEYYLANEGRRRGVCANTVFMDFPKDELLKAGKATRLINGAPLHHTLDMKRYCGEFLESVVKLENKI
AVGVDVHSSDWVEVHAGYDDVVNEDYKNFGPGFHSQWLDVIADVIVAWVHTYKTKDPEYENVVRCLIRENQNATHIA
GDLIFQVMCGSASGVFATDRMNSLANLCYHCLCYLRKYKTLTGFWEHYLVVYGDDTRRAHTAYTYEEFSDCMRSIGI
TVELDKGGNTFLKREFKPYNYKGVNILLAPLPLPIVGDIVNWVKKPVFDQVGALTQSIDSYLSEMFHHGQDRFETAR
SQLQEIMRRFGRNPDFKDFNVIWTEKYGKSGYLPVGRYVDERGEILKHDVAT"

ORIGIN
1 attggacttc ctgctgccaa aaatatatta aattattggt gcaaggagat ggagtctgcc
61 tcacttaaat ccgtttccac ttggataaaa cctgttgaaa acgaaattaa gtggggtgat
121 accaccatcc aaccgtacta tagtacgaat gtctcgtatg tgaattcggg catggagaaa
181 atgcgtactg agttactagg atttaaaatg caaaatggaa gtaatccaca taagtgtggc
241 actctgctaa tgtcgaacga cgttttgtgc ggactagtgg tagcagcgaa gacgcttact
301 agcgaaagct ttgctgttag tattagtcgt gaaatgttag tagaaggcct acgtgtcctt
361 ggagctactc cttttgatat gaagatgaag accacaccac ttgatgtagt tggtggtgtg
421 ccaaagatgt tacctcctga agagggggac ttcgtattga ttggaaaagc tgaaaggggc
481 ataacttatg ctggtaagac gagacttacc ccatcgatca tccatgggga acttagtgaa
541 ccgtttagat ctccggccgc ccaaaaactt gaggccactg gagcatgtac aggatttgat
601 gtagtgatga atgggtgtaa acgtcagttc aagaaacccg ttactatacc tacggaggaa
661 gtacggcaaa ttactaaata cttgattgaa aggatagtac ctagtagtaa gccagtacgg
721 ytcattgatg acaagccagt tgcgttagaa actgcaatta tcggtattcc aaagtcaaag
781 tttaccgcaa tgaagttgaa cactgcaatt gggtggccat taatgaccaa gttcccacgt
841 ggatataaga agaaggacat catcaaaatt aacgaagaac ggactgctgt agagattcat
901 aggtatgctc tggaagagta ttatcttgct aatgaaggtc gtaggcgcgg cgtttgcgcg
961 aataccgtgt ttatggactt tccaaaagac gaattattga aagcaggaaa agctacacgt
1021 ttgattaatg gtgccccact acatcacact ctggacatga aacgttattg tggagagttt
1081 cttgagtcag tcgtaaaact tgaaaataag atcgccgtcg gtgttgatgt gcattcttcc
1141 gattgggtag aagtgcacgc tggatatgat gacgttgtca acgaagatta taagaatttt
1201 ggtcctggtt ttcatagcca gtggctagat gtaattgccg acgtcattgt agcctgggtg
1261 cacacctata agacgaaaga ccccgaatac gagaatgtag taaggtgtct tattcgagaa
1321 aatcaaaatg ccactcacat tgctggcgat cttatttttc aagttatgtg tggttctgca
1381 agtggtgtgt ttgccactga tagaatgaat agtttggcca acttgtgtta ccattgcctg
```

```
1441 tgttatttgc gaaaatataa gacactcaca ggtttttggg aacactattt ggtcgtatat
1501 ggcgatgata cacgtcgcgc tcatacagcg tacacttatg aagaatttag tgactgtatg
1561 cgctcgattg gtatcaccgt cgaattagat aagggtggaa acactttcct taagagagag
1621 tttaagccct ataattataa gggagttaac attttgttgg ctccattacc ccttcccatt
1681 gtgggagata ttgtcaattg ggtaaagaag ccggtctttg accaggtagg tgcgttaacg
1741 caatcgattg actcttatct ctctgaaatg ttccatcatg gacaggatcg ttttgaaacg
1801 gctcgatccc agctccagga aattatgaga aggtttggta ggaatccgga ctttaaagac
1861 ttcaatgtta tttggacaga aaagtatggt aagtctggtt atctacctgt tgggcgctac
1921 gtggatgaac gaggtgaaat cttgaagcat gacgtagcga catt
```

Struktura genoma Circo-like virus Croatia 17_S17 (pristupni broj MK241555)

```
FEATURES             Location/Qualifiers
  stem loop          1..26
                     /note="putative RCR initiation site; pseudopalindromic
                     sequence"
     CDS             59..517
                     /note="ORF1"
                     /codon_start=1
                     /product="hypothetical protein"
                     /protein_id="QBA86166.1"
/translation="MHSSIWDDIEDEEFFKLDDYDYWVDEASLIRSTVLTEAIKEIKGEKETVKWRLEDMNNIIKIR
EVSTVVRLFCHNTATRLRVNWSDRSWKGWAIEKRAWTLSRGTGAYTTRERSGGITDLQRHRKHVYFMKGEIWRMLDN
LEQLCKRHLKSM"
     CDS             702..1412
                     /note="ORF2"
                     /codon_start=1
                     /product="hypothetical protein"
                     /protein_id="QBA86167.1"
/translation="MKRNYHMRKYQRVKYQIPNVLNPDELVMTIKKNNVSVFDLSSVDRKTYPLLGIDDAEKGFYLN
LEANIAKFKSMEILSGKLKLYIMPIEVIPRTTEGTQPSYQKNGGIMGYQTQKTWVDAEGGEQTETQVAKPSGYASMW
NVSAETPGYGTRFITNKGSKVQKFTFKGSKKEWNVLKADPTGFTQSLPLPVGISPLNNKTVTIDITEITGPDWKDGT
KFYVFDSHTLLVKFKGRKV"
     CDS             1443..2315
                     /note="ORF3"
                     /codon_start=1
                     /product="putative Rep protein"
                     /protein_id="QBA86168.1"
/translation="MSLRFWCFTEFNEQRVNSYREWIEGRYNEGGITYIVCQKEQCPDTNRVHVQGYVVFENRKRIG
GVKTALGSTTVHVERRRGTHDEAASYCKKEESRCEEGIELGEFDDRGNQSKCLEEVKEKIKRGATELEIAEEHFGIW
CRYYQAFAKYRLLGSRQRDFKTTVRVYWGPPGTGKSRRATAECGGMAYRKPLGEWWDGYDGSSNVIIDDFYGWIRFD
ELLRCLDRYAHRVPVKGGFVNFAPELLIITSNAMPRCWYNVETIDDYRFAALTRRLDTVEHMVDNWEPIENEE"
     misc_feature    1461..1478
                     /note="Region: RCR motiff I (CFTEFN)"
     CDS             1477..2139
                     /note="ORF4"
                     /codon_start=1
                     /product="putative Rep1 protein"
                     /protein_id="QBA86169.1"
/translation="MNKGLTVTVNGSKEDTTREELPTSYVKKSNAQTPTEYMYKDMLSLRTEKELEELRQHWDQQLC
TLKEEEELMTKLLHTARKRKAVAKRGLSLVNSTIEETNQNVSKKLKRKSKEGQLNWKLPKNTSEYGADTTRPLPNTD
YWDLDSEISRPQFGYIGDHQVQANQEEQLQNVAEWLTENPWESGGMDTMDQAMSSLTTSTGGYDSTSYYDAWTGTPI
EYQ"
     misc_feature    1584..1598
                     /note="Region: RCR motiff II (VHVQG)"
     misc_feature    1707..1718
```

```
                     /note="Region: RCR motiff III (YCKK)"
     misc_feature    1947..1970
                     /note="Region: Walker motiff A (GPPGTGKS)"
     misc_feature    2058..2072
                     /note="Region: Walker motiff B (IIDDF)"
     misc_feature    2178..2189
                     /note="Region: Walker motiff C (ITSN)"

ORIGIN
1 cggcggggta atactattgc ccgccgattt tttttaggtt aagtttgctc acgctgtgat
61 gcatagttct atttgggatg acattgaaga cgaagagttt tttaaacttg atgattacga
121 ttattgggtg gatgaagcgt ctcttatcag gtcaacggtc cttacggaag ccatcaaaga
181 aatcaaagga gaaaaagaga cagtaaaatg gagacttgaa gacatgaaca acataataaa
241 aataagagaa gtatcaacag tcgtaaggct attctgtcac aacacagcaa caagattaag
301 agtcaattgg agcgatagat catggaaagg atgggccata gaaaaaagag cttggacttt
361 atcaagagga actggagcat atacaacaag agaaagaagc ggaggaataa cagatctaca
421 aagacacaga aaacacgtat acttcatgaa aggggagata tggcgtatgt tagacaacct
481 agaacaacta tgtaaaagac atctaaaaag catgtaacta tcgggattcc gggaagtaaa
541 taaaaactta taaaagaaaa acaaaagtgt cgtttcactt atgtccaaat gtctggaaga
601 tttacaactt acagacgaag aacaatcgga tacagacgat tcaatccata ctcaagaaga
661 cgattttata ctccttacag aagatactat agatacagaa gatgaagagg aactatcata
721 tgaggaaata tcagagggtg aaataccaaa taccaaacgt tttaaatccg gatgaattag
781 taatgacaat caaaaaaaac aatgtctcag tattcgactt aagcagtgtc gatagaaaaa
841 catatcctct actaggaatt gatgatgcag aaaaaggatt ttacttaaac ttagaagcaa
901 acatagcaaa atttaaatca atggaaatac tgtcaggaaa actaaaactc tatataatgc
961 caatcgaagt aataccaaga acaacagaag gaacacaacc ttcttaccaa aaaaatggag
1021 gaattatggg ataccaaaca cagaaaacat gggtagacgc agaaggagga gaacaaacag
1081 aaacacaagt agctaaacca tcaggctacg catcaatgtg gaacgtatca gcagaaacac
1141 caggatatgg aacaagattc ataacaaata aaggatcaaa agtacagaaa ttcacattta
1201 aaggatcaaa aaaagaatgg aacgtactaa aagcagaccc aacaggattc acacaatcat
1261 tacctctacc tgttggaata agtccattaa acaataaaac agtcacaata gatataacag
1321 aaataacagg tccagattgg aaagatggaa ctaaattcta cgtattcgac tctcacacac
1381 tattggtcaa atttaaagga agaaaagtct aaataaataa aaacaagtct ttaaaatcac
1441 tcatgtcctt acgtttttgg tgcttcacag aattcaatga acaaagggtt aacagttacc
1501 gtgaatggat cgaaggaaga tacaacgagg gaggaattac ctacatcgta tgtcaaaaag
1561 agcaatgccc agacaccaac agagtacatg tacaaggata tgttgtcttt gagaacagaa
1621 aaagaattgg aggagttaag acagcactgg gatcaacaac tgtgcacgtt gaaagaagaa
1681 gaggaactca tgacgaagct gcttcatact gcaagaaaga ggaaagccgt tgcgaagagg
1741 ggattgagct tggtgaattc gacgatagag gaaaccaatc aaaatgtctc gaagaagtta
1801 aagagaaaat caaaagaggg gcaactgaac tggaaattgc cgaagaacac ttcggaatat
1861 ggtgcagata ctaccaggcc tttgccaaat acagactatt gggatctcga cagcgagatt
1921 tcaagaccac agttcgggta tattggggac caccaggtac aggcaaatca agaagagcaa
1981 ctgcagaatg tggcggaatg gcttacagaa aacccctggg agagtggtgg gatggatacg
2041 atggatcaag caatgtcatc attgacgact tctacgggtg gatacgattc gacgagctat
2101 tacgatgctt ggacaggtac gcccatagag taccagtaaa gggtggattc gtaaactttg
2161 cacctgagct attaatcata acaagcaatg caatgcctag atgttggtat aacgtagaga
2221 caatcgatga ctacagattc gcggcattaa caagaaggtt agatacagta gaacatatgg
2281 tggacaactg ggagccaata gaaaatgaag aataagtgct cttcgggggt gcgtctggag
2341 ccgaagagca gcagaaataa aaatgattgg ttaaaacagt gttttggggc ttaataaggg
2401 aataaaatta atataaaagg agattttagg tgcgtccaca
```