

# Genotipizacija rotavirusa A iz divljih životinja s područja Republike Hrvatske

---

Čolić, Daniel

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:900539>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)




Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Daniel Čolić

**GENOTIPIZACIJA ROTAVIRUSA A IZ  
DIVLJIH ŽIVOTINJA S PODRUČJA  
REPUBLIKE HRVATSKE**

Diplomski rad



*Daniela Čolić*

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Odjelu za virologiju Hrvatskog veterinarskog instituta pod vodstvom dr. sc. Dragana Brnića, u okviru provedbe Uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-UIP-2017-05-8580 „Rotavirusi u ekosustavu Republike Hrvatske: molekularna epidemiologija i zoonotski potencijal“. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Veliko hvala mentoru dr. sc. Draganu Brniću na pruženoj prilici, stručnom vodstvu te podršci i ugodnoj komunikaciji tijekom cijelog procesa izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem Alenu Kovačeviću i ostalim djelatnicima Hrvatskog veterinarskog instituta koji su mi pomogli pri radu kada god je trebalo.

Zahvaljujem suvoditeljici doc. dr. sc. Silviji Černi na trudu i izdvojenom vremenu prilikom pregleda diplomskog rada.

Hvala kolegi Ljudevitu na savjetima prilikom obrade i interpretacije rezultata.

Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju i punoj podršci tijekom studiranja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## GENOTIPIZACIJA ROTAVIRUSA A IZ DIVLJIH ŽIVOTINJA S PODRUČJA REPUBLIKE HRVATSKE

Daniel Čolić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rotavirus A (RVA) je dvolančani RNA virus iz roda *Rotavirus*. Uzročnik je akutnog gastroenteritisa kod sisavaca i ptica i karakterizira ga visoka prevalencija, patogenost i genska raznolikost. Genom RVA sastoji se od 11 dvolančanih RNA segmenata. Sustav klasifikacije RVA temelji se na genotipizaciji segmenata VP7 (genotip G) i VP4 (genotip P). Važno svojstvo RVA je potencijal međuvrsnog prijenosa i zoonotski potencijal, koji je najčešće vezan za pojavu preslagivanja segmenata genoma. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti genotipove RVA koji cirkuliraju u populacijama crvenih lisica (*Vulpes vulpes*), europskih čagljeva (*Canis aureus moreoticus*), divljih svinja (*Sus scrofa*), galebova klaukavaca (*Larus michahellis*) i riječnih galebova (*Larus ridibundus*) s područja Republike Hrvatske. Metodom RT-PCR u stvarnom vremenu dokazana je prisutnost genoma RVA u 11% (58 od 523) obrađenih uzoraka. Sekvencije su utvrđene sekvenciranjem metodom po Sangeru, a genotipizacijom koja je uslijedila utvrđeno je ukupno sedam različitih genotipova G, pet genotipova P, tri genotipa E i jedan genotip I. Rezultati genotipizacije ukazuju na iznimnu raznolikost i heterogenost RVA kod divljih životinja s područja RH, a filogenetska analiza pokazuje potencijal međuvrsnog prijenosa i potkrepljuje važnost daljnjih istraživanja RVA kod divljih životinja.

(57 stranica, 13 slika, 9 tablica, 111 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: rotavirus A, genotipovi, molekularna filogenija, međuvrtni prijenos

Voditelj: dr. sc. Dragan Brnić, znanstveni suradnik

Suvoditelj: dr. sc. Silvija Černi, docent

Ocjenitelji: dr. sc. Silvija Černi, docent

dr. sc. Sofia Ana Blažević, docent

dr. sc. Rosa Karlič, docent

Rad prihvaćen: 04.02.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Master Thesis

# GENOTYPING OF *ROTAVIRUS A* FROM WILD ANIMALS IN CROATIA

Daniel Čolić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

*Rotavirus A* is a double-stranded RNA virus from the genus *Rotavirus*. It causes acute gastroenteritis in mammals and birds, and is characterized by high prevalence, pathogenicity and genetic diversity. The genome of RVA consists of 11 double-stranded RNA segments. The RVA classification system is based on the genotyping of segments VP7 (genotype G) and VP4 (genotype P). An important feature of RVA is the potential of interspecies transmission and zoonotic potential, which is most often associated with the occurrence of genetic reassortment. This study aimed to determine genotypes of RVAs circulating in populations of red foxes (*Vulpes vulpes*), European jackals (*Canis aureus moreoticus*), wild boars (*Sus scrofa*), yellow-legged gulls (*Larus michahellis*) and black-headed gulls (*Larus ridibundus*) in Croatia. The presence of RVA genome in 11% (58/523) of analyzed samples was proved by real-time RT-PCR. Sequences were obtained by Sanger sequencing, and subsequent genotyping detected seven different genotypes G, five genotypes P, three genotypes E and one genotype I. The results indicate exceptional diversity and heterogeneity of RVA from wild animals in Croatia, and phylogenetic analysis demonstrates the potential for interspecies transmission and supports the importance of further research on RVA in wildlife.

(57 pages, 13 figures, 9 tables, 111 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Rotavirus A*, genotype, molecular phylogenetics, interspecies transmission

Supervisor: Dr. Dragan Brnić, Res. Assoc.

Cosupervisor: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Dr. Rosa Karlić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 04/02/2021

## POPIS KRATICA

BIC – Bayesov informacijski kriterij (engl. *Bayesian information criterion*)

BLAST – mrežni alat za sravnjenje sekvenci (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*)

dsRNA – dvolančana RNA

FAM – fluorescentna boja 6-karboksifluorescein

HBGA – tkivni antigen krvnih grupa (engl. *histo-blood group antigen*)

MEGA-X - analiza molekularne evolucijske genetike X (engl. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X*)

MGB – molekula koja se veže za mali utor DNA (engl. *Minor Groove Binder*)

MID – domena koja stupa u interakcije s membranom (engl. *membrane interaction domain*)

PCR – lančana reakcija polimerazom

RVA – *Rotavirus A*

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom

SSCP – polimorfizam konformacije jednolančane DNA (engl. *single-strand conformation polymorphism*)

T92 – supstitucijski model *Tamura-3-parameter*, 1992

TN93 – supstitucijski model *Tamura-Nei*, 1993

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Otkriće rotavirusa i rana istraživanja.....	1
1.2. Struktura i genom rotavirusa .....	1
1.3. Klasifikacija rotavirusa.....	3
1.4. Replikacijski ciklus rotavirusa.....	4
1.5. Evolucija rotavirusa .....	6
1.6. Molekularna epidemiologija i genska raznolikost rotavirusa A.....	7
1.7. Međuvrtni prijenos i zoonotski potencijal rotavirusa A.....	9
1.7.1. Zoonoze.....	9
1.7.2. Zoonotski potencijal rotavirusa A .....	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	14
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Biološki materijali i uzorci .....	15
3.2. Korišteni reagensi .....	15
3.2.1. Priprema suspenzija fekalnih uzoraka.....	15
3.2.2. Izolacija i amplifikacija nukleinskih kiselina.....	15
3.2.3. Kapilarna elektroforeza .....	16
3.2.4. Pročišćavanje umnoženih produkata za sekvenciranje .....	16
3.2.5. Početnice .....	16
3.3. Uređaji, potrošni materijal i računalni programi .....	19
3.4. Metode .....	20
3.4.1. Priprema suspenzija fekalnih uzoraka.....	20
3.4.2. Izolacija nukleinskih kiselina iz uzoraka .....	20
3.4.3. Dokazivanje prisutnosti rotavirusnog genoma u uzorcima .....	21
3.4.4. Umnožavanje gena za proteine VP7, VP4 i NSP4.....	22
3.4.5. Kapilarna elektroforeza umnoženih produkata RT-PCR reakcije.....	24

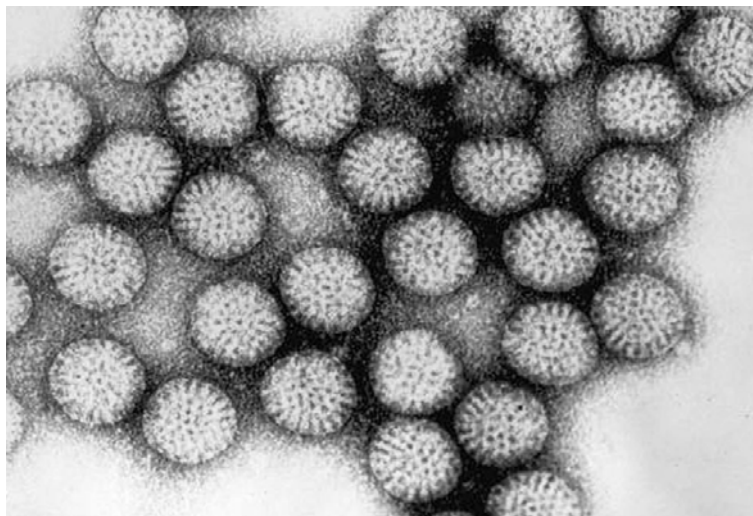


3.4.6. Elektroforeza na gelu umnoženih produkata s višestrukim signalima na elektroferogramu .....	24
3.4.7. Pročišćavanje umnoženih produkata .....	24
3.4.8. Bioinformatička analiza .....	25
4. REZULTATI.....	26
4.1. Prevalencija i genotipovi rotavirusa A u analiziranim uzorcima .....	26
4.2. Genotipizacija i filogenetska analiza segmenata VP7, VP4, NSP4 i VP6 .....	26
4.2.1. Segment VP7.....	26
4.2.2. Segment VP4.....	31
4.2.3. Segment NSP4.....	35
4.2.4. Segment VP6.....	36
5. RASPRAVA.....	38
6. ZAKLJUČCI.....	45
7. LITERATURA.....	46
8. ŽIVOTOPIS .....	56

# 1. UVOD

## 1.1. Otkriće rotavirusa i rana istraživanja

Rotavirusi su česti enterični patogeni ljudi, sisavaca i ptica. Prvi puta zabilježeni su sredinom dvadesetog stoljeća u tkivu crijeva miša i rektalnim brisevima majmuna u zatočeništvu (Adams i Kraft, 1963; Malherbe i Harwin, 1963), a prvi slučaj infekcije rotavirusima kod ljudi dokazan je pomoću elektronskog mikroskopa 1973. godine u Australiji, u uzorcima djece sa simptomima proljeva (Bishop i sur., 1973). Ubrzo je predložen naziv za ovu skupinu virusa, koji potječe od latinske riječi za kotač (lat. *rota*), budući da je slika viriona pod transmisijskim elektronskim mikroskopom nalik kotaču (Slika 1). Napretkom dijagnostičkih metoda, rotavirusi su dokazani kod brojnih vrsta sisavaca i ptica, te su prepoznati kao važan uzročnik akutnog gastroenteritisa, posebno kod mlađih dobnih kategorija. Također, uočeno je da rotavirusi ljudi i drugih životinjskih vrsta dijele zajednički antigen (protein VP6) karakterističan za pojedinu vrstu rotavirusa (Estes i Greenberg, 2013; Martella i sur., 2010).

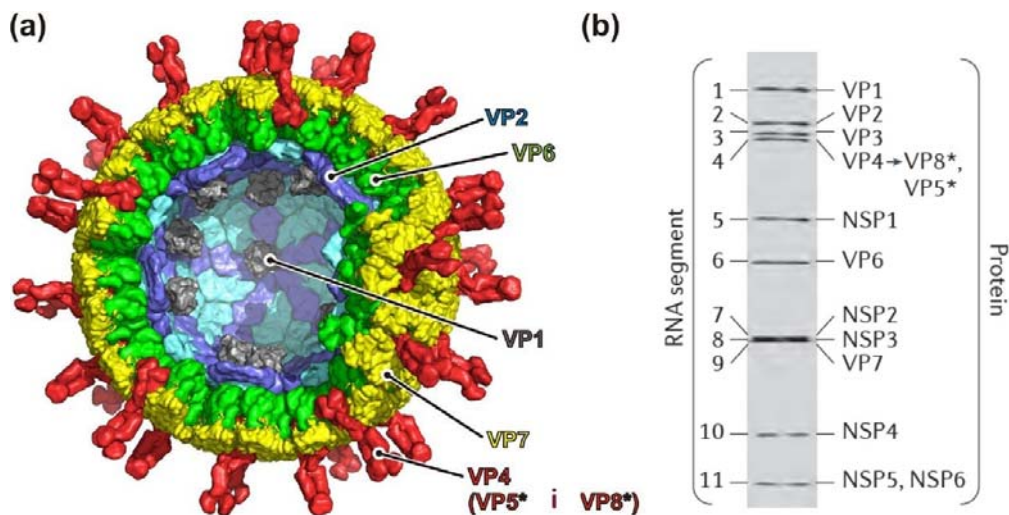


Slika 1. Rotavirusne čestice snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom. Vidljiv je oblik nalik kotaču. Preuzeto s [www.ecured.cu/Rotavirus](http://www.ecured.cu/Rotavirus).

## 1.2. Struktura i genom rotavirusa

Virusna čestica rotavirusa ikozaedarskog je oblika promjera 70-75 nm i ne sadrži lipidnu ovojnicu. Kapsida se sastoji od tri sloja: unutarnjeg, srednjeg i vanjskog (Slika 2a). Središnji dio virusne čestice sadrži genom, koji je obavijen unutarnjim slojem kapside sastavljenim od 60 dimera proteina VP2. Dimeri se grupiraju po pet u pentaradijalno simetrične dekamere s uskom porom u sredini, te 12 tako nastalih dekamera čini osnovni sloj

kapside. Duž osi pentaradijalne simetrije, unutarnji sloj kapside je u interakciji s enzimskim kompleksom za replikaciju, koji se sastoji od proteina VP1 (virusna RNA ovisna RNA polimeraza) i VP3 (metil- i gvanilil-transferaza) (McClain i sur., 2010). Srednji sloj kapside sastoji se od 260 trimera proteina VP6 (McClain i sur., 2010), a vanjski sloj čini 260 trimera proteina VP7 i 60 trimera proteina VP4 koji čine proteinske izdanke (engl. *spikes*). Vanjski sloj kapside važan je za interakcije s vanjskim dijelom membrane stanice domaćina, ali i za imunski sustav domaćina, koji proizvodi specifična antitijela. Protein VP7 sadrži glikozilirani N-kraj što ga čini glikoproteinom. Protein VP4 svojom hidrofobnom domenom VP5 stupa u interakcije sa srednjim slojem kapside i proteinom VP7, a vanjske strane se izdvaja globularna domena VP8 (Desselberger, 2014).



Slika 2. (a) Struktura virusne čestice rotavirusa A. Unutarnji sloj kapside čini protein VP2, srednji sloj protein VP6, a vanjski sloj proteini VP7 i VP4. Preuzeto iz Jenni i sur. (2019). (b) Elektroforetska mobilnost segmenata genoma RVA. Segment 1 koji kodira protein VP1 je najdulji, a najkraći je segment 11 koji kodira proteine NSP5 i NSP6. Preuzeto iz Crawford i sur., 2017.

Genom rotavirusa ukupne je veličine 18.5 kpb i sastoji se od 11 segmenata dsRNA duljine između 667 i 3302 pb (Slika 2b). Virusna RNA kodira šest strukturalnih (VP1-VP4, VP6 i VP7) i šest nestrukturalnih proteina (NSP1-NSP6), koji imaju ulogu u replikaciji genoma i utišavanju imunskog odgovora. Segmenti su monocistronski uz iznimku najmanjeg segmenta (segment 11), koji kodira proteine NSP5 i NSP6 (Estes i Greenberg, 2013). Svi segmenti imaju karakteristične konzervirane motive na krajevima, motiv GGC na 5' kraju i UGUGACC na 3' kraju (Tortorici, 2006). Motiv na 3' kraju služi virusnoj RNA polimerazi kao signal za prepoznavanje. Također, važno svojstvo segmenata je reverzna

komplementarnost 5' i 3' kraja, koja omogućuje tzv. interakcije dugog dometa (engl. *long range interactions*) (Li i sur., 2010; Tortorici, 2006).

### 1.3. Klasifikacija rotavirusa

Prema službenoj klasifikaciji, rotavirusi čine zaseban rod *Rotavirus* unutar porodice *Reoviridae* i potporodice *Sedoreovirinae* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Na temelju serološke reaktivnosti i razlike u slijedu nukleotida gena za protein VP6, razlikujemo 9 vrsta rotavirusa (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Vrste *Rotavirus A* (rotavirus A, RVA), *Rotavirus B*, i *Rotavirus C* važni su patogeni kod ljudi i drugih vrsta sisavaca. Za sisavce je još karakterističan *Rotavirus H*, a *Rotavirus D*, *Rotavirus F* i *Rotavirus H* inficiraju isključivo ptice (Dóró i sur., 2015). *Rotavirus I* je nedavno pronađen kod pasa u Mađarskoj (Mihalov-Kovács i sur., 2015), a *Rotavirus J* kod šišmiša u Srbiji (Bányai i sur., 2017). Od svih vrsta rotavirusa, ističe se RVA, za koji su karakteristične visoka prevalencija i patogenost kod ljudi, raznih vrsta sisavaca i ptica, kao i iznimna genska i antigenska raznolikost (Hacker i sur., 2012). Također, gotovo sav morbiditet i mortalitet uzrokovan rotavirusima pripisuje se upravo vrsti RVA (Patton, 2012).

Unutar vrste, 1989. godine uspostavljen je sustav binarne klasifikacije, slično kao kod virusa gripe (Matthijnsens i sur., 2008b). Sustav se temelji na proteinima VP7 i VP4, koji čine vanjski sloj kapside rotavirusa te su ciljana meta humoralnog imunskog sustava domaćina, tj. antitijela. Navedeno svojstvo je podloga seroloških testiranja koja su prvotno korištena, pa tako razlikujemo serotip G (odnosi se na protein VP7, naziv od engl. *Glycosilated*) i serotip P (odnosi se na protein VP4, naziv od engl. *Protease sensitive*) (Matthijnsens i sur., 2008b). Razvojem metoda molekularne dijagnostike, klasifikacija je danas u većoj mjeri zamijenjena i dopunjena genotipizacijom gena za proteine VP7 i VP4 pa govorimo o genotipovima G i P (Šimić i sur., 2019). O velikoj genskoj raznolikosti RVA govori podatak da je do danas poznato 36 genotipova G i 51 genotip P (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagénomics/virus-classification/rcwg>). Zbog činjenice da se serotipovi i genotipovi P ne podudaraju, odnosno da je broj genotipova znatno veći od broja serotipova, u nomenklaturi se broj uz oznaku genotipa P stavlja u uglate zagrade, npr. P[4] (Estes i Greenberg, 2013). U posljednje vrijeme sve se češće koristi sustav klasifikacije koji obuhvaća svih 11 segmenata genoma, pri čemu je za svaki genotip određena granična vrijednost sličnosti sekvencija (Tablica 1). Tako određeni genotipovi imaju konstelaciju Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x predstavlja arapski broj), što odgovara genomskim segmentima VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 (Matthijnsens

i sur., 2008b). Korištenje proširenog sustava klasifikacije omogućuje dodatne analize i saznanja o tome koji geni i kako utječu na raspon domaćina, replikaciju i virulenciju rotavirusa; te uvid u iznimno visoki stupanj genomske raznolikosti među RVA koji paralelno cirkuliraju u različitim vrstama (Desselberger, 2014). Također, uočeno je da postoje filogenetski povezane konstelacije svih 11 segmenata genoma, tzv. genogrupe, što upućuje na koevoluciju segmenata u svrhu postizanja što efikasnije replikacije (Patton, 2012).

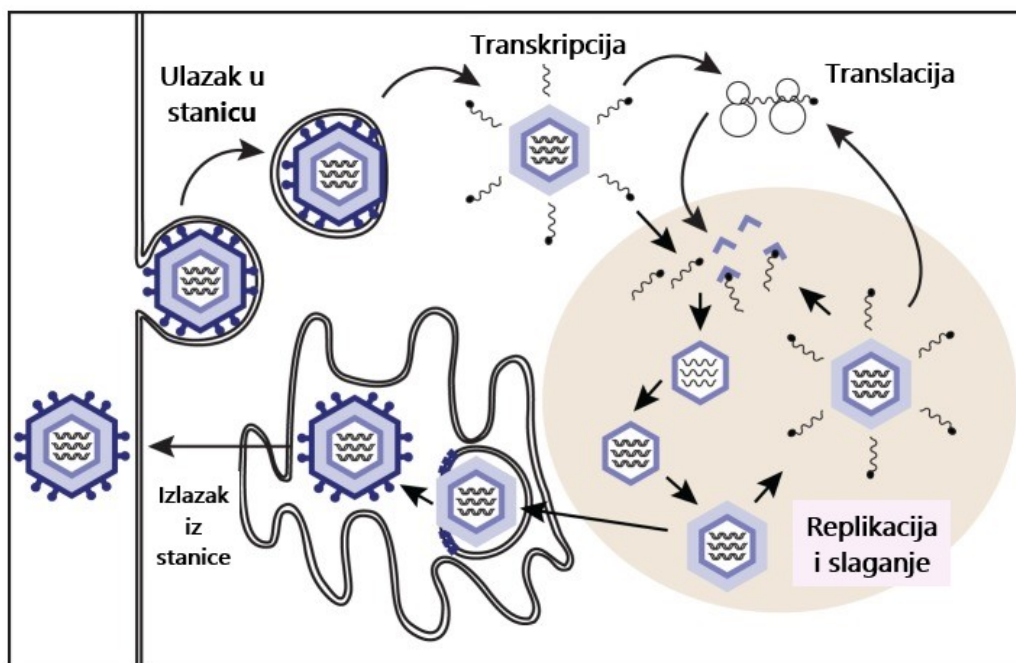
Tablica 1. Nazivlje i raznolikost genotipova RVA s graničnim vrijednostima nukleotidne sličnosti za svaki genotip. Podatci prema RCWG-u (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagénomics/virus-classification/rcwg>)

<b>Virusni protein</b>	<b>Naziv genotipa (funkcija, engl.)</b>	<b>Kratika</b>	<b>Broj pojedinih genotipova</b>	<b>Prag nukleotidne sličnosti (cutoff, %)</b>
VP7	<i>Glycosilated</i>	G	36	80
VP4	<i>Protease sensitive</i>	P	51	80
VP6	<i>Inner capsid</i>	I	20	85
VP1	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>	R	22	83
VP2	<i>Core protein</i>	C	20	84
VP3	<i>Methyltransferase</i>	M	20	81
NSP1	<i>Interferon antagonist</i>	A	31	79
NSP2	<i>NTPase</i>	N	22	85
NSP3	<i>Translation enhancer</i>	T	22	85
NSP4	<i>Enterotoxin</i>	E	27	85
NSP5	<i>Phosphoprotein</i>	H	22	91

#### **1.4. Replikacijski ciklus rotavirusa**

Rotavirusi uglavnom inficiraju zrele enterocite pri vrhu crijevne resice tankog crijeva. Početak replikacijskog ciklusa rotavirusa predstavlja proteolitičko cijepanje proteina VP4 (Crawford i sur., 2001), čime se oslobađa domena VP8, koja se zatim veže za površinske stanične receptore. Glavna molekula za adsorpciju većine rotavirusa na staničnu membranu je sijalična kiselina na terminalnoj ili subterminalnoj poziciji u receptoru (Dormitzer i sur.,2002; citirano u Desselberger, 2014), a kod nekih rotavirusa uočena je mogućnost vezanja za sijaličnu kiselinu na unutarnjim pozicijama te za tkivni antigen krvnih grupa (HBGA) (Hu i sur.,2012; Ramani i sur., 2013;citirano u Desselberger, 2014). Da bi rotavirusi ušli u stanicu,

moraju se vezati za koreceptor koji može pokrenuti signal za endocitozu. Koreceptori za koje se, pomoću domene VP5 i proteina VP7, vežu rotavirusi su integrini ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha x\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ) i protein Hsc70, i lokalizirani su u lipidnim splavima u membrani. Nakon unosa u stanicu endocitozom, a uslijed niske koncentracije  $Ca^{2+}$  iona u endosomu, dolazi do odvajanja vanjskog sloja kapside i oslobađanja dvoslojne čestice, koja je ujedno i transkripcijski aktivni oblik virusa, u citoplazmu (Desselberger, 2014). Enzimski kompleks za replikaciju (proteini VP1 i VP3) sintetizira mRNA koja izlazi iz virusne čestice kroz pore i ima ulogu u translaciji ili kao kalup za sintezu komplementarnog lanca. Za rotaviruse su karakteristične posebne strukture (inkluzije) koje se nazivaju viroplazme, unutar kojih se RNA pakira u nove virusne čestice s dvoslojnom kapsidom (Cheung i sur., 2010). Kod formiranja viroplazmi ključnu ulogu imaju proteini NSP2 i NSP5 (Fabbretti i sur., 1999). Posredstvom proteina NSP4, koji ima ulogu unutarstaničnog receptora, dolazi do sastavljanja vanjskog sloja kapside i pupanja u endoplazmatski retikulum (Slika 3), iz kojeg se lizom stanice ili vezikularnim transportom oslobađaju zreli virioni (Crawford i sur., 2017).



Slika 3. Shematski prikaz replikacijskog ciklusa rotavirusa. Virus ulazi u stanicu endocitozom, gubi se vanjski sloj kapside i oslobađa se dvoslojna čestica u citoplazmu, gdje se sintetizira (+) ssRNA. U posebnim strukturama viroplazmama slažu se nove dvoslojne čestice. Posredstvom proteina NSP4 dolazi do slaganja vanjskog sloja i ulaska u ER, iz kojeg se vezikularnim transportom ili lizom stanice oslobađaju novi virusi. Preuzeto iz Arnold i sur. (2013).

Virusi su po svojoj građi krajnje ekonomični biološki entiteti pa svi proteini i dijelovi genoma imaju izraženu funkciju. Osim prethodno istaknute važnosti proteina VP4 i VP7 u interakciji sa staničnim receptorima i koreceptorima, posebno se ističe višestruka uloga transmembranskog glikoproteina NSP4. Prvo, NSP4 se veže za protein VP6 i služi kao unutarstanični receptor za dvoslojnu česticu koja nastaje u viroplazmi (Taylor i sur., 1996). Drugo, kao transmembranski protein lokaliziran u membrani endoplazmatskog retikuluma, NSP4 omogućuje otpuštanje  $Ca^{2+}$  iona u citoplazmu, čime se stabilizira virion s troslojnom kapsidom (Hyser i sur., 2010). Treće, NSP4 formira strukturu kape na viroplazmi i kolokalizira s proteinom LC3 važnim za autofagiju. Uslijed povećanja količine unutarstaničnog kalcija, pokreće se signal za autofagiju (Berkova i sur., 2006). Četvrto, NSP4 mijenja permeabilnost stanične membrane i destabilizira međustanične veze (Newton i sur., 1997; Tian i sur., 1996). Peta funkcija je djelovanje NSP4 izlučenog izvan stanice kao enterotoksina. Djelovanje rotavirusnog enterotoksina uključuje promjene u membranskom transportu iona te unosu ugljikohidrata i vode u stanice, što doprinosi pojavi simptoma proljeva neovisno o mehaničkom oštećenju enterocita (Lorrot i Vasseur, 2007).

## 1.5. Evolucija rotavirusa

Rotavirusi su jedna od najnestabilnijih i najbrže mutirajućih skupina virusa (Malik i sur., 2020). Uzrok brze evolucije rotavirusa je kombinacija nekoliko mehanizama promjene na razini RNA te okolnosti zbog kojih ti mehanizmi mogu u značajnoj mjeri rezultirati nastankom virusa promijenjenog genoma i svojstava. Prvi mehanizam su točkaste mutacije koje nastaju uslijed grešaka prilikom replikacije i nedostatka mehanizma popravka pogrešaka (engl. *proofreading*) rotavirusne RNA polimeraze (protein VP1) (Desselberger, 2014; Estes i Greenberg, 2013). Sporadično nastalom mutacijom na važnom mjestu u genu ili nakupljanjem mutacija s vremenom može doći do nastanka nove linije virusa, što je dokazano u više navrata (Desselberger, 2014; De Grazia i sur., 2014).

Drugi važan način evolucije virusa je preslagivanje segmenata genoma (engl. *reassortment*). Kada dva srodna virusa segmentiranog genoma inficiraju istu stanicu domaćina, prilikom replikacije i slaganja novih virusnih čestica može doći do izmjene segmenata genoma. Tada nastaju kimerni virusi (u radu Savić (2017) koristi se termin *presložnice*) čiji je genom kombinacija dijelova genoma ishodišnih virusa (MacLachlan i Dubovi, 2017). Budući da uspostavljanje produktivnog replikacijskog ciklusa iziskuje brojne kompleksne prilagodbe virusa na stanicu domaćina, infekcija heterolognog domaćina za viruse je najčešće „slijepa ulica“. Međutim, pojava preslagivanja segmenata genoma

omogućuje nastanak kimernih varijanti virusa podrijetlom iz različitih domaćina, što povećava mogućnost da nastanu virusi koji se mogu rasprostranjivati u novom domaćinu (Luchs i Timenetsky, 2016). Ključno kod ovog procesa je da se koinfekcije događaju često, što je u slučaju RVA zadovoljeno, čemu doprinosi svojstvo da su infektivne jedinice rotavirusa često vezikule koje sadrže 5-15 virusnih čestica, a ne pojedinačni virusi (Santiana i sur., 2018). Stopa koinfekcije RVA u zemljama u razvoju iznosi ponegdje i više od 20% dok se u razvijenijim zemljama stopa koinfekcije kreće oko 5% (Iturriza-Gómara i sur., 2011; Patton, 2012; [www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/rota\\_info\\_surv\\_bulletin/en/](http://www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/rota_info_surv_bulletin/en/)).

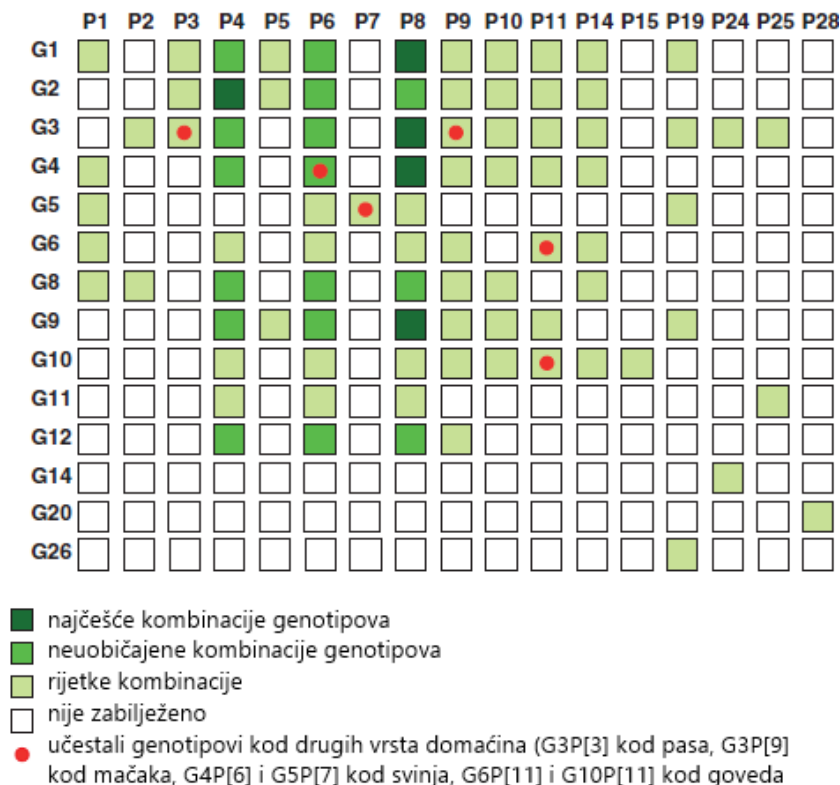
Osim točkastih mutacija i preslagivanja segmenata genoma, mogući mehanizam evolucije je i rekombinacija unutar genomskih segmenata. Iako ranije podcijenjena kao važan čimbenik brze evolucije RVA, recentno istraživanje pokazuje da se radi o potencijalno vrlo značajnoj pojavi (Hoxie i Dennehy, 2020). Naime, proteini VP7 i VP4 su pod jakim selekcijskom pritiskom za diversifikaciju, budući da njihova promjena omogućuje izbjegavanje imunosnog odgovora domaćina. U kontekstu visoke stope koinfekcije, nije neobično da se događaju i rekombinacije. Štoviše, pronađeni su primjeri rekombinacije u svim segmentima osim u segmentu 7, koji kodira protein NSP3. Iako u mnogim slučajevima rekombinacija ne olakšava, ili čak otežava replikaciju novonastalog virusa, mogućnost izbjegavanja odgovora imunosnog sustava potencijalno kompenzira stečene nedostatke (Hoxie i Dennehy, 2020).

## **1.6. Molekularna epidemiologija i genska raznolikost rotavirusa A**

Segmentirani genom, uz već opisanu brzu evoluciju, doprinosi velikoj raznolikosti RVA. Kod djece je na svjetskoj razini zabilježeno 14 genotipova G i 17 genotipova P te blizu 90 kombinacija G-P genotipova (Slika 4) (Dóro i sur., 2015). Međutim, nisu sve kombinacije genotipova jednake prevalencije i od jednakog značaja. Kod ljudi su najčešće i klinički najznačajnije kombinacije genotipova G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] i G12P[8] (Doro i sur., 2015; Santos i Hoshino, 2005). Genotipovi G9 i G12 pojavili su se kao emergentni genotipovi od 1990-ih, a u zadnjih nekoliko godina kao emergentna se nameće kombinacija genotipova G3P[8] sa segmentom VP7 podrijetlom od RVA kod konja (*equine-like*) (Brnić i sur., 2019; [www.eurorotnet.com/wp-content/uploads/2019/09/EuroRotaNet-report-Sept\\_2019\\_v1.pdf](http://www.eurorotnet.com/wp-content/uploads/2019/09/EuroRotaNet-report-Sept_2019_v1.pdf)). Pojava emergentnih genotipova potencijalno je epidemiološki vrlo značajna u kontekstu efikasnosti cjepiva koja su trenutno na tržištu, a koja su rađena na temelju virusa drugih genotipova (Caillère i sur., 2013; Luchs i Timenetsky, 2016; Matthijnsens i sur., 2010; Motayo i sur., 2019). U zemljama u razvoju sporadično se



pojavljaju i razni netipični genotipovi, primjerice G12P[6] u Aziji, G2P[6], G3P[6] i G1P[6] u subsaharskoj Africi, G1P[4] i G2P[8] na zapadnom Pacifiku i G9P[4] u obje Amerike (Patton, 2012; [www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/rota\\_info\\_surv\\_bulletin/en/](http://www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/rota_info_surv_bulletin/en/)). Uočena je ciklička izmjena dominantnih sojeva RVA, što se objašnjava hipotezom o izbjegavanju postizanja imuniteta, čime se omogućuje perzistiranje u ljudskoj populaciji (Esteban i sur., 2010). Također, vrši se sustavni nadzor cirkulirajućih genotipova sa svrhom detektiranja eventualne selekcije izazvane cjepivom (Luchs i Timenetsky, 2016).



Slika 4. Shematski prikaz kombinacija genotipova G i P zabilježenih kod ljudi u svijetu. Radi preglednosti, broj uz genotip P nije u uglatim zagradama. Prilagođeno prema Doro i sur. (2015).

Kod domaćih životinja prisutna je velika raznolikost genotipova RVA. Za goveda su karakteristični genotipovi G6, G8 i G10 u kombinaciji s P[5], P[11] i P[1], a kod konja genotipovi G3, G5, G10, G14 i P[12] (Ghosh i Kobayashi, 2014; Luchs i Timenetsky, 2016). Kod svinjskih RVA detektirano je čak 50-ak kombinacija genotipova (Šimić i sur., 2019). Karakterističnim svinjskim genotipovima smatraju se genotipovi G3, G4, G5, G9 i G11 u kombinaciji s P[5], P[6], P[7], P[13], P[23] i P[28] (Miyazaki i sur., 2011; Vlasova i sur., 2017). Općenito, genotip G3 ističe se svojom raširenošću kod različitih vrsta životinja (Tsugawa i Hoshino, 2008). Kod pasa taj genotip dolazi u kombinaciji s P[3] i P[5], a kod

mačaka u kombinaciji s genotipom P[9] (Dhama i sur., 2009; Tsugawa i Hoshino, 2008). RVA kod ptica pokazuje još veći stupanj raznolikosti nego kod sisavaca. U rezultatima malobrojnih istraživanja ističu se genotipovi G7, G23, G22, G6, G10 i P[37] (Luchs i Timenetsky, 2016).

Raznolikost RVA kod divljih životinja u svijetu je vrlo slabo istražena pa se ne može tvrditi da dokazani genotipovi predstavljaju dominante genotipove koji cirkuliraju u određenoj vrsti. Dokazane su RVA kombinacije genotipova G9P[23], G4P[23], G9P[13] i G4P[6] kod divljih svinja (*Sus scrofa*) te G3P[9] kod kunopsa (*Nyctereutes larvata*) i larvenog uvijača (*Paguma larvata*) u Japanu. Nadalje, dokazana je kombinacija genotipova G25P[6] kod voćojedog šišmiša (*Eidolon helvum*) u Keniji, G3P[3] kod šišmiša malog potkovnjaka (*Rhinolophus hipposideros*) u Kini, G8P[14] kod vikunje (*Vicugna vicugna*) u Argentini, te G1P[7] kod velikog pande (*Ailuropoda melanoleuca*) u Kini. Kod miševa je dokazan genotip G6P[16], a kod zečeva G3P[14]. U Sloveniji je kod srna (*Capreolus capreolus*) dokazan RVA G6P[15] (Ghosh i Kobayashi, 2014; Jamnikar-Ciglenceki i sur., 2016; Luchs i Timenetsky, 2016). U Republici Hrvatskoj sustavno pretraživanje RVA kod divljih životinja započelo je u lovnoj sezoni 2018./2019., te su dokazani genotipovi G3, G6, G9 i P[13] kod divljih svinja; G1, G3, G5, G6, G8, G9, G15 te P[13], P[14] i P[23] kod crvenih lisica (*Vulpes vulpes*); G3, G6 i P[14] kod europskih čagljeva (*Canis aureus moreoticus*); i genotip G6 kod običnog jelena i srna (*Cervus elaphus*) (Krešić i sur., 2019).

## **1.7. Međuvrsni prijenos i zoonotski potencijal rotavirusa A**

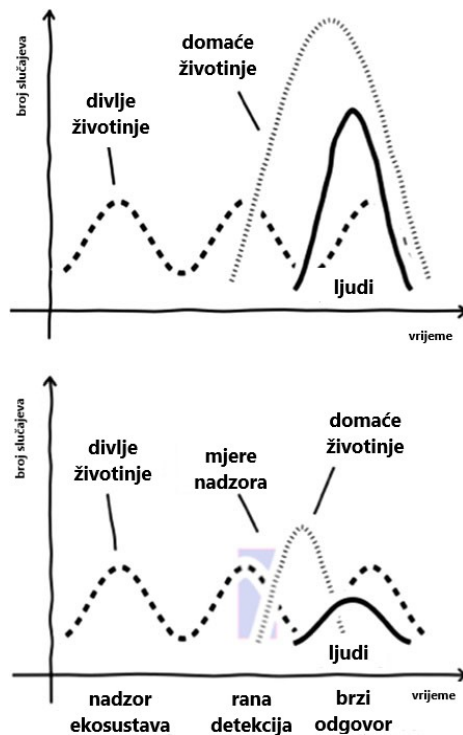
### **1.7.1. Zoonoze**

Zoonotske bolesti ili zoonoze su bolesti uzrokovane patogenima koji se prenose izravno ili neizravno između životinja i ljudi ([www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html](http://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html)). Budući da su ljudi često u vrlo bliskom kontaktu sa životinjama, bilo da se radi o divljim, domaćim životinjama ili kućnim ljubimcima, nije neobično što su zoonoze vrlo raširene i učestale. Štoviše, procjenjuje se da 60% zaraznih bolesti ljudi pripada zoonozama ([www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html](http://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html)). Tome uvelike doprinose različiti antropogeni čimbenici: genetički i biološki čimbenici, kao što su adaptacije i koevolucija mikroba i domaćina, zatim okolišni i klimatski čimbenici te populacijski čimbenici, na primjer blizina i gustoća ljudskih i životinjskih populacija. Također, veliki utjecaj imaju i društvene okolnosti, primjerice povećana stopa putovanja, ratni sukobi i nejednakost, siromaštvo, gospodarenje

tlom itd. Svi navedeni čimbenici kumulativno stvaraju gotovo idealne uvjete za pojavu emergentnih zaraznih bolesti (Gebreyes i sur., 2014). Utjecaj zoonoza na zdravlje ljudi posebno je aktualan u posljednje vrijeme uslijed pojave nekoliko virusnih bolesti zoonotskog karaktera, koje su pokazivale pandemijski potencijal, a neke od njih je karakterizirala i visoka smrtnost (Cross i sur., 2019). Recentni primjer navedenog je virus SARS-CoV-2, uzročnik bolesti COVID-19. Virus je prvi put detektiran u gradu Wuhanu u Kini krajem 2019. godine te se u svega nekoliko mjeseci proširio u najmanje 211 država (Yang i sur., 2020).

Vrlo je važan podatak da čak oko 75% emergentnih zaraznih bolesti potječe od divljih životinja (Jones i sur., 2008). U kontekstu virusa i virusnih bolesti, dolazi do stalnog „prelijevanja“ s izvornih domaćina na ljude i druge životinje, što je dobrim dijelom uzrokovano ljudskom djelatnošću, napose urbanizacijom i poljoprivredom (Cui i sur., 2019). Usprkos tome, biološka i epidemiološka istraživanja se fokusiraju prije svega na ljude i domaće životinje pa je znanje o bolestima divljih životinja često vrlo skromno i nedostatno, što onemogućuje predviđanje mogućih kriznih žarišta i pravovremenu reakciju s ciljem sprječavanja pojave novih epidemija u budućnosti (Preston i sur., 2013).

Sve veće razumijevanje kompleksnog međudjelovanja zdravlja ljudi i životinja te očuvanja okoliša dovelo je do formiranja koncepta „Jednog zdravlja“. „Jedno zdravlje“ podrazumijeva koordiniranu suradnju i multidisciplinarni pristup u rješavanju sadašnjih i potencijalnih zdravstvenih rizika koji su rezultat interakcije ljudi, životinja i okoliša (Mackenzie i Jeggo, 2019). U praksi, radi se o stavljanju većeg težišta na donedavno zanemarena pitanja zdravlja životinja te dobrobit i očuvanje okoliša. Imperativ je kontrola i znanje o zdravlju divljih životinja koje žive vrlo blizu ljudi (primjerice primati u tropskim krajevima, divlje svinje, lisice) i životinja koje su potencijalni prijenosnici emergentnih bolesti na veće udaljenosti (ptice i šišmiši) (Preston i sur., 2013). Sustavnim nadzorom i pravovremenom reakcijom, posljedice emergentnih zaraznih bolesti na zdravlje ljudi i domaćih životinja mogu se značajno smanjiti (Slika 5). Dobar primjer rezultata interdisciplinarnih istraživanja je istraživanje epidemije Nipah virusa u Bangladešu. Zahvaljujući koordiniranom radu znanstvenika različitih profesija, prvo je uočeno da se radi o uzročniku bolesti zoonotskog karaktera, zatim je utvrđeno da su svinje, s kojih je bolest prešla na ljude, zarazili voćojedi šišmiši, a na kraju je uočeno i da je rizični faktor za lokalno stanovništvo pijenje biljnog soka datulje, budući da su zaraženi šišmiši kontaminirali posude u kojima se sok prikupljao (Preston i sur., 2013).



Slika 5. Shematski prikaz epidemijskih krivulja u ovisnosti o adekvatnom nadzoru i reakciji. Gornja krivulja prikazuje situaciju u kojoj nema sustavnog praćenja zdravlja divljih životinja. Donja krivulja prikazuje razvoj epidemije ukoliko je nadzorom ekosustava i detekcijom bolesti kod divljih životinja omogućena pravovremena reakcija. Vidljivo je da je broj slučajeva (a posljedično i žrtava) kod ljudi i domaćih životinja puno manji u scenariju koji uključuje mjere nadzora. Prilagođeno prema Preston i sur. (2013).

### 1.7.2. Zoonotski potencijal rotavirusa A

Velika genska raznolikost i rasprostranjenost RVA kod ljudi, domaćih i divljih životinja, kao i činjenica da su pojedini genotipovi RVA utvrđeni kod ljudi ujedno i karakteristični genotipovi RVA kod drugih vrsta sisavaca ukazuju na potencijalnu važnost istraživanja zoonotskog potencijala RVA. Osim binarne klasifikacije i analize genotipova G i P, sekvenciranje cijelog genoma i uspostavljanje sustava klasifikacije koji uključuje svih 11 segmenata genoma ključni su za uvid i analizu evolucijskih i genetičkih odnosa različitih RVA (Martella i sur., 2010). Kao što je ranije spomenuto, analizom genotipova svih segmenata genoma utvrđeno je postojanje nekoliko istaknutih genotipskih konstelacija ili genogrupa RVA (Nakagomi i Nakagomi, 1989). Kod ljudi su prisutne dvije učestale i jedna rjeđa genogrupa: Wa-like ili genogrupa 1, DS-1-like ili genogrupa 2 i AU-1-like ili genogrupa 3. Karakteristične genotipske konstelacije triju navedenih genogrupa su redom: Gx-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 te G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 (Matthijnsens i Van Ranst, 2012). Usporedbom s konstelacijama

RVA kod drugih vrsta sisavaca, vidljivo je da svaka genogrupa dijeli genotipove s RVA tipičnima za određenu vrstu (Tablica 2), pa tako genogrupa Wa-like dijeli genotipove sa svinjskim, genogrupa DS-1-like s goveđim, a genogrupa AU-1-like s karakterističnim mačijmi psećim RVA (Matthijnsens i sur., 2008a; Nakagomi i sur., 1990). Na tom tragu formulirana je hipoteza o evolucijskoj povezanosti navedenih konstelacija, odnosno životinjskom podrijetlu triju genogrupa RVA kod ljudi (Matthijnsens i sur., 2008a). Međutim, valja naglasiti da konkretan razmjor evolucijske srodnosti navedenih konstelacija nije do kraja utvrđen, a također postoje i RVA kod svih vrsta koji ne pripadaju nijednoj od tri navedene genogrupe (Theuns, 2015).

Tablica 2. Genotipske konstelacije rotavirusa A (RVA) podrijetlom iz različitih domaćina. Ružičasto su označeni genotipovi zajednički za RVA kod svinja i ljudi, plavo genotipovi karakteristični za RVA kod goveda i ljudi, a zeleno genotipovi karakteristični za RVA kod ljudi i mačaka. Genotipovi I5, A8 i T6 karakteristični su za RVA kod svinja, odnosno goveda. Prilagođeno prema Theuns (2015).

Vrsta	Genotipska konstelacija	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
	<i>Wa-like</i>	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	G1
čovjek	<i>DS-1-like</i>	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	<i>AU-1-like</i>	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
svinja	svinjski RVA	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
govedo	goveđi RVA	G6	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
mačka	mačji RVA	G3	P[9]	I3	R3	C2	M3	A3	N1	T3	E3	H3

Međuvrni prijenos RVA kod sisavaca predmet je brojnih istraživanja već 40-ak godina. Već su prva istraživanja ukazala na antigensku srodnost RVA kod različitih vrsta, a također je dokazana mogućnost uspostavljanja produktivne infekcije pojedinih RVA u više različitih domaćina (Dhama i sur., 2009). Primjerice, pokazano je da se svinje mogu zaraziti RVA podrijetlom iz ljudi (Bridger i sur., 1975) te da se zečevi mogu zaraziti RVA karakterističnim za goveda, i obrnuto (Castrucci i sur., 1984). Također je zabilježen prijenos RVA podrijetlom od sisavaca na ptice (Wani, 2003) i prijenos RVA podrijetlom od ptica na sisavce (Mori i sur., 2001).

Midgley i sur. (2012) na temelju analize 36000 genotipiziranih izolata ljudi procjenjuju da se otprilike 2% RVA detektiranih kod ljudi ubraja u kategoriju potencijalno zoonotskih ili RVA s presloženim segmentima genoma. Premda uglavnom nisu od velikog

epidemiološkog značaja, kod ljudi se sporadično detektiraju RVA podrijetlom od drugih vrsta sisavaca (Malik i sur., 2020). Rezultati RNA-RNA hibridizacija i filogenetskih analiza upućuju na zaključak da je cijeli niz manje uobičajenih genotipova RVA, dokazanih kod ljudi u raznim dijelovima svijeta, podrijetlom od svinja, koje su potencijalno glavni rezervoar emergentnih genotipova RVA kod ljudi i drugih sisavaca (Martella i sur., 2010). RVA varijante genotipa G5, dokazane u nekoliko navrata kod djece u Južnoj Americi, nastale su preslagivanjem između RVA svinjske i Wa-like genotipske konstelacije (Alfieri i sur., 1996). U Europi latentno cirkulira genotip P[6], također svinjskog podrijetla (Martella i sur., 2006, 2008). Zabilježeno je i nekoliko slučajeva infekcija kod ljudi varijantama virusa koje sadrže genotipove karakteristične za goveda. Smatra se da su neuobičajene kombinacije genotipova G8P[6] i G8P[8] uočene u Africi, ali i u Republici Hrvatskoj 2006. godine, rezultat višestrukog preslagivanja između RVA kod ljudi i goveda (Delogu i sur., 2013; Matthijnsens i sur., 2006). Također, RVA G10P[11], vrlo srodan goveđim RVA, čest je patogen ljudi u Indiji (Ward, 2008).

Od ostalih vrsta, analizom je utvrđeno da su izolati Ro1845 i HCR32 kod ljudi, genotipova G3P[3], blisko srodni psećim i mačjim RVA, stoga se vjerojatno radi o još jednom primjeru izravnog prijenosa (Tsugawa i Hoshino, 2008). Genotipovi G9 i G12, spomenuti ranije kao svojedobno emergentni genotipovi, vjerojatno su također životinjskog podrijetla, što je važno iz epidemiološke perspektive jer implicira da emergentni genotip može značajno utjecati na prevalenciju lokalnih genotipova (Dóro i sur., 2014).

Zanimljivo je da su se saznanja o međuvrskom prijenosu i preslagivanju segmenata genoma RVA odrazila i na proizvodnju i ispitivanje učinkovitosti rotavirusnih cjepiva. Činjenica da je ljudski RVA kombinacije genotipova G1P[8] patogen za svinje koristi se u studijama učinkovitosti potencijalnih rotavirusnih cjepiva za ljude (Cook, 2004). Nadalje, pentavalentno oralno cjepivo RotaTeq™ temelji se na *in vitro* dobivenim varijantama RVA nastalim preslagivanjem segmenata genoma između goveđih i humanih RVA uslijed koinfekcije stanične kulture. Varijante RVA sadržane u cjepivu posjeduju genomsku okosnicu podrijetlom od goveđeg RVA i VP4 ili VP7 segment podrijetlom iz RVA najzastupljenijih kod ljudi (Chandran i Santosham, 2008). Iako ne sadrži genotip G8, istraživanja u Africi pokazala su da cjepivo pruža određenu zaštitu od goveđih RVA tog genotipa, što se dijelom može objasniti genomskom okosnicom RVA u cjepivu, koja je goveđeg podrijetla (Heylen i sur., 2015).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanja rotavirusa A (RVA) kod divljih životinja u svijetu uvelike su podzastupljena, premda su u kontekstu koncepta „Jednog zdravlja“ i dokaza o međuvrskom prijenosu RVA takva istraživanja potencijalno vrlo važna. U Republici Hrvatskoj tijekom 2018. i 2019. izvršena su prva uzorkovanja i analize genotipova RVA kod nekoliko vrsta divljih životinja čije populacije obitavaju na području RH, a također su analizirani RVA kod domaćih životinja i djece. Prvi rezultati poslužili su kao preliminarna studija pri odabiru vrsta kojima će se baviti ovo istraživanje. Zbog dostatne prevalencije i naznaka veće raznolikosti RVA koji cirkuliraju u populacijama, izabrane su divlje svinje (*Sus scrofa*), crvene lisice (*Vulpes vulpes*) i europski čagljevi (*Canis aureus moreoticus*). Također, za sve tri navedene vrste poznato je da dolaze u blizinu ljudskih staništa i životinjskih farmi, što ih čini relevantnima za ovu vrstu istraživanja. Osim navedenog, izabrani su riječni galebovi (*Larus ridibundus*) i galebovi klaukavci (*Larus michahellis*), dvije vrste galebova koje borave na odlagalištu otpada Jakuševac-Prudinec, a koje su, osim zbog blizine ljudskoj populaciji, zanimljive i zbog toga što do danas ne postoje nikakve informacije o RVA kod galebova. U skladu s navedenim, ciljevi ovog istraživanja su:

- na temelju sekvenciranja metodom po Sangeru i genotipizacije gena VP7, VP4 i NSP4 odrediti genotipove RVA koji cirkuliraju kod divljih svinja, crvenih lisica, europskih čagljeva, riječnih galebova i galebova klaukavaca s područja Republike Hrvatske.
- filogenetskom analizom sekvencija gena VP7, VP4 i NSP4 utvrditi filogenetsku povezanost RVA iz divljih životinja s RVA prethodno dokazanim kod ljudi i domaćih životinja s područja Republike Hrvatske.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Biološki materijali i uzorci

Pojedinačni uzorci fecesa i crijeva (po jedno od navedenog za svaku uzorkovanu jedinku) crvenih lisica, europskih čagljeva i divljih svinja prikupljeni su tijekom 2019. i u prvom tromjesečju 2020. godine prilikom redovnog odstrjela na području Republike Hrvatske. Kloakalni brisevi galebova klaukavaca i riječnih galebova prikupljeni su tijekom prstenovanja na odlagalištu otpada Jakuševac-Prudinec.

Prikupljeno je, i u okviru ovog rada analizirano, 178 uzoraka crvenih lisica, 34 uzorka europskih čagljeva, 177 uzoraka divljih svinja te 134 uzorka galebova, od čega 31 uzorak galebova klaukavaca i 103 uzorka riječnih galebova. Svi uzorci su do analize bili pohranjeni pri -20 °C.

#### 3.2. Korišteni reagensi

##### 3.2.1. Priprema suspenzija fekalnih uzoraka

- Medium 199 (Sigma-Aldrich, SAD)

##### 3.2.2. Izolacija i amplifikacija nukleinskih kiselina

U izolaciji i amplifikaciji nukleinskih kiselina koristio sam komercijalno dostupne komplete reagenasa (Tablica 3) i unutarnju pozitivnu kontrolu *VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA*.

Tablica 3. Kompleti reagenasa s navedenim sastojcima i namjenom za svaki pojedini komplet

<b>Postupak/metoda</b>	<b>Naziv kompleta</b>	<b>Reagensi u kompletu</b>	<b>Proizvođač</b>
izolacija RNA	<i>MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit</i>	otopina za liziranje, magnetske kuglice, proteinaza K, otopine za ispiranje (1) i (2), otopina za vezanje ( <i>core binding</i> )	Applied Biosystems, SAD
RT-PCR u stvarnom vremenu	<i>VetMAX™ Plus One-Step RT-PCR Kit</i>	2x pufer za RT-PCR, enzim reverzna transkriptaza, Xeno™ RNA kontrola, voda bez nukleaza	Applied Biosystems, SAD
RT-PCR u stvarnom vremenu	<i>VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control - VIC™ Assay</i>	smjesa proba <i>Xeno™ VIC™ Primer Probe Mix</i>	Applied Biosystems, SAD
RT-PCR	<i>SuperScript™ III One-Step RT-PCR System</i>	enzim SuperScript® III RT/Platinum® Taq, 2x	Applied Biosystems,



<i>with</i> <i>Platinum™ Taq DNA</i> <i>Polymerase</i>	reakcijska smjesa (0,4 mM svakog dNTP, 3,2 mM MgSO4)	SAD
--	--	-----

\*RT-PCR = lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom

Za ugniježdene PCR-reakcije koristio sam reakcijsku smjesu *GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix* (Promega, SAD) i *GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix* (Promega, SAD).

### 3.2.3. Kapilarna elektroforeza

- *QIAxcel DNA Screening Kit* (Qiagen, Njemačka)
- marker molekulske mase DNA (engl. *Size marker*, 100-2500 pb) (Qiagen, Njemačka)
- marker za sravnjenje (engl. *Alignment marker*, 15-3000 pb) (Qiagen, Njemačka)
- pufer za razrjeđivanje DNA (Qiagen, Njemačka)
- mineralno ulje (Qiagen, Njemačka)

### 3.2.4. Pročišćavanje umnoženih produkata za sekvenciranje

- reagens za pročišćavanje PCR produkta *ExoSAP-IT™* (ThermoFisher Scientific, SAD)
- agarozna *SeaKem LE Agarose* (Lonza, SAD)
- interkalirajuća boja *Midori Green Advance DNA Stain* (Nippon Genetics, Njemačka)
- pufer za elektroforezu *AccuGENE™ 10X TAE Buffer* (Lonza, SAD)
- molekularni DNA marker *Quick-Load Purple 50 bp DNA ladder* (New England Biolabs, SAD)
- boja za nanošenje *Gel Loading Dye, purple 6x* (New England Biolabs, SAD)
- komplet reagenasa za pročišćavanje DNA *Monarch DNA Gel Extraction Kit* (New England Biolabs, SAD)

### 3.2.5. Početnice

Početnice i probe koje sam koristio za amplifikaciju gena za proteine VP7, VP4, VP6, NSP4 i VP2 navedene su u Tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Nukleotidni sljedovi početnica i probe za RT-PCR u stvarnom vremenu za gen VP2

<b>Naziv početnice</b>	<b>Slijed nukleotida (5'→ 3')</b>	<b>Izvor</b>
VP2-F1	TCTGCAGACAGTTGAACCTATTAA	Gutiérrez-Aguirre i sur., 2008
VP2-F2	CAGACACGGTTGAACCCATTAA	Gutiérrez-Aguirre i sur., 2008
VP2-F3	TCGGCTGATACAGTAGAACCTATAAAAT	Gutiérrez-Aguirre i sur., 2008
VP2-F4	TGTCAGCTGATACAGTAGAACCTATAAAATG	Gutiérrez-Aguirre i sur., 2008
VP2-F5	TCAGCTGACACAGTAGAACCTATAAAATG	Gutiérrez-Aguirre i sur., 2008
VP2-R1	GTTGGCGTTTACAGTTCGTTTCAT	Gutiérrez-Aguirre i sur., 2008
VP2-R2	GTTGGCGTCTACAATTCGTTTCAT	Gutiérrez-Aguirre i sur., 2008
VP2-proba	FAM–ATGCGCATRTRTCAAHGCAA–MGB*	Gutiérrez-Aguirre i sur., 2008

\*FAM = 6-karboksifluorescein, MGB = *Minor Groove Binder*

Tablica 5. Nukleotidni sljedovi početnica za RT-PCR za gene VP7, VP4, VP6 i NSP4

Naziv početnice	Slijed nukleotida (5'→3')	Duljina produkta	Izvor
<b>VP7</b>			
VP7-F	ATGTATGGTATTGAATATAACCAC		Iturriza-Gomara i sur., 2009
VP7-R	AACTTGCCACCATTTTTTCC	881 pb	Iturriza-Gomara i sur., 2009
VP7-RINT*	ANAYNGANCCWGTYYGGCCA	293 pb	EurorotaNET, 2009
VP7-Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG		Gouvea i sur., 1990
VP7-End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1000 pb	Gouvea i sur., 1990
VP7-Up**	GCTCCTTTTAATGTATGGTA		Abe i sur., 2009
VP7-Down**	GATCTYGATCTYTTGGACAT	920 pb	Abe i sur., 2009
<b>VP4</b>			
VP4_1-17F	GGCTATAAAAATGGCTTCGC		Gentsch i sur., 1992
VP4R_Deg	TCYCTRTRTATTGCATYTCYTTCC	700 pb	Theuns i sur., 2014
VP4-Head	GGCTATAAAAATGGCTTCGCTCATTTA		Abe i sur., 2009
VP4-1094R2	AATGCTTGTGARTCRTCCCARAATC	1101 pb	Abe i sur., 2009
VP4-887R*	TCWGACCATTTATAWCCYARCCCWCC	894 pb	Abe i sur., 2009
Seg4-s	TCTAARACATCATTNTGGAARGA		Schumann i sur., 2009
Seg4-As	GCTTGTGAATCRTCCCARAATC	312 pb	Schumann i sur., 2009
<b>VP6</b>			
Rotvp6-F	GAACACTCGGAACGACCTTA		Ursu, 2009
Rotvp6-R	CCACGTATTCAAGCCATCAG	353 pb	Ursu, 2009
<b>NSP4</b>			
NSP4-F	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAG		Ciarlet i sur., 2000
NSP4-R	GGTCACACTAAGACCATTCC	743 pb	Ciarlet i sur., 2000

\*polu-ugniježđeni (engl. *semi nested*) PCR, \*\*ugniježđeni (engl. *nested*) PCR

### 3.3. Uređaji, potrošni materijal i računalni programi

Uređaji koje sam koristio u obradi uzoraka navedeni su u Tablici 6. U radu sam koristio sljedeći potrošni materijal: epruvete (Capp, Danska), epruvete za uređaj *Rotor-Gene Q* (Qiagen, Njemačka), pločice za PCR (Capp, Danska), prijanjajuće zaštitne folije za PCR (Thermofisher Scientific, SAD), nastavci za pipete (Capp, Danska), potrošna plastika za uređaj *KingFisher Flex* (Thermofisher Scientific, SAD), plastične eze (Thermofisher Scientific, SAD).

Tablica 6. Nazivi i proizvođači uređaja korištenih u obradi uzoraka

Uređaj	Proizvođač
uređaj za izolaciju nukleinskih kiselina <i>KingFisher Flex</i>	Thermofisher Scientific, SAD
automatska tresilica <i>Corning LSE</i>	Corning, SAD
mikrocentrifuga <i>MIKRO 200</i>	Hettich, Njemačka
uređaj za PCR u stvarnom vremenu <i>Rotor-Gene Q</i>	Qiagen, Njemačka
uređaj za konvencionalni PCR <i>Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler</i>	Applied Biosystems, SAD
uređaj za konvencionalni PCR <i>T Professional basic Thermocycler gradient</i>	Biometra, Njemačka
pipete (10, 100 i 1000 $\mu$ L)	Sartorius, Njemačka
multikanalna elektronska pipeta (50-1200 $\mu$ L)	Sartorius, Njemačka
uređaj za kapilarnu elektroforezu <i>QIAxcel Advanced</i>	Qiagen, Njemačka
uređaj za agaroznu elektroforezu na gelu	Bio-Rad, SAD

Računalni programi i alati za analizu sekvencija i filogenetsku analizu:

- Sequencher 5.4.6 (Gene Codes, SAD)
- mrežni alat BLAST (Altschul i sur., 1990)
- računalni program MEGA-X (Kumar i sur., 2018)
- BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999)
- R (R Core Team, 2019), paketi *ggplot2* (Wickham, 2016) i *formattable* (Ren i Russell, 2016)
- Inkscape (<http://www.inkscape.org>)

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Priprema suspenzija fekalnih uzoraka

Uzorke sam izvadio iz ledenice i pričekao da se odmrznu. Kloakalne briseve i briseve lumena crijeva odlomio sam u plastičnu epruvetu od 2 mL i dodao 1 mL staničnog medija. Od uzoraka fecesa, komadić veličine zrna graška dodao sam plastičnom ezom u epruvetu od 2 ml i dodao 1,5 mL staničnog medija. Sadržaj epruveta homogenizirao sam na tresilici 20-ak sekundi. Suspenzije su centrifugirane na 18000 x g 3 minute. S vrha sam uzeo 200 µL supernatanta i nanio u pločicu s dubokim jažicama radi izolacije nukleinskih kiselina. Ostatak suspenzije pohranio sam pri -80 °C.

#### 3.4.2. Izolacija nukleinskih kiselina iz uzoraka

Za izolaciju nukleinskih kiselina koristio sam komplet *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit* (Tablica 3), koji za izolaciju i pročišćavanje nukleinskih kiselina koristi tehnologiju magnetskih kuglica. U plastičnu epruvetu od 50 mL dodao sam za svaki uzorak po 450 µL pufera za liziranje i 2 µL kontrolne (Xeno) RNA, i promiješao okretanjem epruvete 10 puta. U pločicu koja sadrži 200 µL suspenzije uzoraka dodao sam 452 µL sadržaja epruvete u svaku jažicu. Pločicu sam pokrio zaštitnom folijom i inkubirao na tresilici pri sobnoj temperaturi 5 minuta. U epruvetu od 5 mL dodao sam 20 µL prethodno resuspendiranih magnetskih kuglica i 10 µL proteinaze K po uzorku. U novu pločicu dodao sam po 30 µL smjese kuglica i proteinaze K, te po 500 µL lizata. Uzorke sam kratko promiješao na tresilici i dodao po 350 µL otopine za vezanje. Prema uputama proizvođača, u uređaj *KingFisher Flex* postavio sam pločicu s uzorcima, dvije pločice s puferima za

ispiranje, zaštitni češalj za magnet te pločicu s puferom za eluciju. Postupak sam proveo prema protokolu proizvođača. Po završetku reakcije, pločicu s eluatima pokrio sam zaštitnom folijom i pohranio pri -80 °C.

### 3.4.3. Dokazivanje prisutnosti rotavirusnog genoma u uzorcima

#### 3.4.3.1. Uzorci podrijetlom od sisavaca

Prisutnost rotavirusne RNA utvrdio sam detekcijom segmenta VP2 metodom lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu (RT-PCR u stvarnom vremenu) na uređaju *Rotor-Gene Q*. Koristio sam komplet *VetMAX™-Plus One-Step RT-PCR Kit* (Tablica 3), početnice i probu navedene u Tablici 4 te mješavinu početnica i probe za kontrolnu RNA *Xeno™ Internal Positive Control - VIC™ Assay*. U prvom koraku pripremio sam denuracijsku smjesu (2,1µL vode, 0,9 µL otopine VP2 početnica (10µM)) i nanio na pločicu za PCR. U pločicu sam dodao prethodno izoliranu RNA (osim uzoraka dodane su pozitivna i negativna kontrola) i stavio inkubirati 5 min pri 95 °C u uređaju za PCR. Denaturacija je nužna budući da RVA sadrži dvolančani RNA genom pa je razdvajanje lanaca preduvjet za vezanje početnica. U epruvete za RT-PCR u stvarnom vremenu na uređaju *Rotor-Gene Q* dodao sam reakcijsku smjesu za RT-PCR (6,25 µL 2x pufera za RT-PCR, 0,5 µL Xeno RNA, 0,25 µL VP2-probe, 0,5 µL enzima *ArrayScript™ UP*) i po 5 µL denaturirane RNA i denuracijske smjese (2,1µL vode, 0,9 µL otopine VP2 početnica (10µM) i 3 µL RNA) i pokrenuo uređaj *Rotor-Gene Q* uz odgovarajući temperaturni protokol (Tablica 7).

Tablica 7. Temperaturni protokol korišten za RT-PCR reakciju u stvarnom vremenu. Protokol se sastoji od reverzne transkripcije, inaktivacije reverzne transkriptaze i denaturacije, te 45 ciklusa umnožavanja komplementarne DNA. Nakon svakog ciklusa slijedi očitavanje fluorescencije svjetlosti valne duljine 520 nm za fluorescentnu boju FAM i 554 nm za fluorescentnu boju VIC™.

<b>Reverzna transkripcija (RT)</b>	<b>Inaktivacija denaturacija</b>	<b>RT /</b>	<b>Umnožavanje DNA - 45 ciklusa</b>
48 °C	95 °C	95 °C	55 °C
10 min	10 min	15 s	45 s

Po završetku reakcije uslijedilo je očitavanje i interpretacija rezultata. Ručno sam odredio graničnu vrijednost (engl. threshold) fluorescencije koja dokazuje prisutnost segmenta VP2 rotavirusnog genoma u uzorku. Osim vrijednosti valne duljine za pobuđivanje fluorescentne boje FAM sadržane u VP2-probi, očitane su fluorescencije svjetlosti za fluorescentnu boju VIC™, koja ukazuje na umnožavanje unutarnje pozitivne kontrole. RNA izolate pozitivnih uzoraka koristio sam u daljnjoj analizi. Rezultati za unutarnju pozitivnu kontrolu služe kao kontrola metode, a negativni rezultat upućuje na mogućnost inhibicije reakcije. Takve uzorke ponovno sam podvrgnuo ovoj metodi, ali razrijeđene 10 ili 100 puta.

#### 3.4.3.2. Uzorci podrijetlom od ptica

Prisutnost genoma RVA u uzorcima galebova detektirao sam lančanom reakcijom polimerazom s reverznom transkripcijom (RT-PCR) koristeći početnice za segment 6, koji sadrži gen VP6 (Tablica 5). Pripremio sam denaturacijsku smjesu (2,25 μL vode i 0,75 μL Rotvp6-F početnica ( $c_{fin}$  600nM) po uzorku). Pipetom sam dodao po 3 μL smjese u plastične epruvete za PCR u nizu i po 2 μL izolata RNA te pozitivnu i negativnu kontrola, i stavio na inkubaciju pri 95°C 5 minuta. Za reakciju reverzne transkripcije i umnožavanja koristio sam komplet *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase*. Pripremio sam reakcijsku smjesu ukupnog volumena 25 μL (12,5 μL 2x Master mix-a, 1 μL enzima reverzne transkriptaze, 1,5 μL Rotvp6-R početnica ( $c_{fin}$  600 nM) po uzorku) i dodao u epruvete s denaturiranom RNA. Uzorke sam stavio u uređaj za PCR, uz odabir odgovarajućeg temperaturnog protokola (Tablica 8).

#### 3.4.4. Umnožavanje gena za proteine VP7, VP4 i NSP4

Uzorci u kojima je detektiran genom RVA podvrgnuti su daljnjoj obradi u svrhu genotipizacije postupkom umnožavanja sekvencija gena za proteine VP7, VP4 i NSP4 metodom RT-PCR. S obzirom na činjenicu da početnice nisu dizajnirane specifično na temelju sekvencija RVA iz životinjskih vrsta čiji su uzorci analizirani u ovom radu (zbog nedostatka istih u bazi GenBank), koristio sam nekoliko kombinacija početnica za VP7 i VP4 (Tablica 5). Svrha ovakvog pristupa je bila umnožavanje ciljanih sekvencija iz što većeg broja pozitivnih uzoraka. Nadalje, budući da je početna količina ciljane RNA u nekim uzorcima izvjesno bila vrlo niska, koristio sam i ugniježdenu i polu-ugniježdenu varijantu RT-PCR metode, koje povećavaju osjetljivost i specifičnost. Za segment VP7 najprije sam koristio kombinaciju početnica VP7-F/VP7-R, a neuspjele reakcije ponovio sam pomoću neke od ostalih kombinacija. Za segment VP4 najprije sam koristio kombinaciju početnica VP4\_1-

17F/ VP4R\_Deg, a neuspjele reakcije ponovio sam pomoću neke od preostalih kombinacija (Tablica 5).

Pripremio sam denaturacijsku smjesu (5,5  $\mu$ L vode i 1,5  $\mu$ L otopine *forward* početnice (c<sub>fin</sub>600 nM) po uzorku) i dodao u plastične epruvete za PCR u nizu. Dodao sam po 3  $\mu$ L uzorka u svaku epruvetu, te pozitivnu i negativnu kontrola. Epruvete sam stavio inkubirati pri 95°C 5 minuta. Za reakciju reverzne transkripcije i umnažanja koristio sam komplet *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase*. Pripremio sam reakcijsku smjesu (12,5 $\mu$ L 2x Master mix-a, 1,0  $\mu$ L enzima reverzne transkriptaze, 1,5  $\mu$ L Rotvp6-R početnica (c<sub>fin</sub>600 nM) po uzorku) i dodao u epruvete s denaturiranom RNA, što čini ukupni volumen 25  $\mu$ L. Stavio sam uzorke u uređaj za PCR uz odabir odgovarajućeg temperaturnog protokola za svaku kombinaciju početnica (Tablica 8).

Ukoliko se radi o ugniježđenoj ili polu-ugniježđenoj varijanti metode RT-PCR, za drugu reakciju koristio sam smjesu *GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix*. Pripremio sam reakcijsku smjesu (12,5 $\mu$ L Master Mix, po1,0  $\mu$ L otopine *forward* i *reverse* početnica (c<sub>fin</sub> 400 nM), 8,5 $\mu$ L vode) i nanio u epruvete u nizu, te dodao 2 $\mu$ L DNA iz prve reakcije tako da je ukupni volumen 25 $\mu$ L.

Tablica 8. Temperaturni protokoli za navedene kombinacije početnica. Broj ciklusa (denaturacija - vezanje početnica - elongacija) je 40. U reakcijama koje uključuju reverznu transkripciju, taj korak se izvodi pri 45°C 30 min.

Kombinacija početnica	RT	Početna denaturacija	Denaturacija	Vežanje početnica	Elongacija	Završna elongacija
VP7-F/ VP7-R	DA	94°C 2'	94 °C 15"	52°C 30"	68°C 1'	68°C 5'
VP7-F/ VP7-Rint	/	94°C 2'	95 °C 30"	50°C 30"	72°C 1'	72°C 5'
VP7-Beg9/ VP7-End9	DA	94°C 2'	94°C 15"	42°C 30"	68°C 90"	68°C 5'
VP7-Up/ VP7-Down	/	94°C 2'	95°C 30"	50°C 1'	72°C 1'	72°C 5'
VP4_1-17F/ VP4R_Deg	DA	94°C 2'	94°C 30"	45°C 30"	68°C 3'	68°C 10'
VP4-Head/ VP4-1094R2	DA	94°C 2'	94°C 30"	53°C 1'	68°C 90"	68°C 5'
VP4-Head/ VP4-887R	/	94°C 2'	95°C 30"	58°C 1'	72°C 1'	72°C 5'
Seg4-s/ Seg4-As	DA	94°C 2'	94°C 15"	56°C 1'	68°C 1'	68°C 5'
NSP4-F/ NSP4-R	DA	94°C 2'	94°C 15"	48°C 30"	68°C 1'	68°C 5'
Rotvp6-F/Rotvp6-R	DA	94°C 2'	94°C 15"	56°C 30"	68°C 1'	68°C 5'



### 3.4.5. Kapilarna elektroforeza umnoženih produkata RT-PCR reakcije

Umnožene produkte RT-PCR reakcije vizualizirao sam kapilarnom elektroforezom na uređaju *QIAxcel advanced*. U reakcijama je korišten marker molekulske mase DNA raspona 100-2500 pb i marker za sravnjenje raspona 15-3000 pb te *QIAxcel DNA Screening Kit*. Uložak kita, markere i uzorke stavio sam u uređaj na odgovarajuće pozicije. Ukoliko nije bilo dovoljno uzoraka za jednu reakciju (N=12), prazna mjesta sam popunio epruvetama s vodom ili puferom za razrjeđivanje. Odabrao sam metodu AM420 i pokrenuo elektroforezu. Rezultati su prikazani elektroferogramom, koji uređaj prilagođava prema markeru što omogućuje očitavanje veličine umnoženog produkta kod pozitivnih uzoraka, kao i relativne količine, koja je u korelaciji s jačinom signala.

### 3.4.6. Elektroforeza na gelu umnoženih produkata s višestrukim signalima na elektroferogramu

U slučajevima kada je rezultat kapilarne elektroforeze za pojedini uzorak uključivao dva ili više signala na elektroferogramu, ponovio sam RT-PCR reakciju (s reakcijskom smjesom *GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix* umjesto bezbojne), a umnoženi produkt sam vizualizirao i pročistio iz agaroznog gela nakon elektroforeze. To je redovito bio slučaj kod polu-ugniježđene RT-PCR reakcije s početnicama VP7-F i VP7-RINT, gdje su na gelu bili vidljivi PCR produkti obje reakcije. Za elektroforezu na gelu pripremio sam 1,5% agarozni gel. U tikvicu dodao 1,5 g agaroze i 98,5 mL TAE pufera. Agarozu sam rastalio zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici i ohladio pod mlazom vode na oko 60°C. U kalup sam dodao 2 µL interkalirajuće boje *Midori Green Advance DNA Stain*, izlio agarozu i sve zajedno promiješao nastavkom za pipete te umetnuo češalj za jažice. Skrutnuti gel uronio sam u kadicu s TAE puferom. Na parafilmu sam promiješao 5 µL uzorka i 1 µL pufera za nanošenje i dodao u jažice U jednu jažicu dodao sam marker DNA *Quick-Load® Purple 50 bp DNA Ladder*. Pokrenuo sam elektroforezu pri 80V u trajanju 30 minuta. Nakon provedene elektroforeze, gel sam stavio na transiluminator. Skalpelom sam izrezao tanki dio gela koji sadrži produkt od interesa.

### 3.4.7. Pročišćavanje umnoženih produkata

Produkte iz elektroforeze na gelu pročistio sam pomoću kompleta reagensa *Monarch DNA Gel Extraction Kit* prema uputama proizvođača. RT-PCR reakcijske smjese s jednim signalom na elektroferogramu pročistio sam koristeći reagens za pročišćavanje *ExoSAP-IT™*. U epruvete za PCR dodao sam po 10 µL uzorka i 1 µL reagensa. Epruvete sam stavio u uređaj za PCR uz odgovarajući temperaturni protokol (reakcija: 37°C 15 min; inaktivacija: 80°C 15

min). Pročišćeni produkti poslani su uz odgovarajuće početnice na sekvenciranje metodom po Sangeru u oba smjera (*Macrogen Europe*, Nizozemska).

#### 3.4.8. Bioinformatička analiza

Rezultate sekvenciranja uredio sam pomoću računalnog programa Sequencher 5.4.6. Uklonio sam dijelove loše kvalitete (nečitkog elektroferograma) te sravnjenjem sekvencija u oba smjera sastavio konsenzusne sekvencije. Referentne sekvencije iz baze GenBank pretražio sam mrežnim alatom BLAST te sam za utvrđivanje genotipa i u filogenetskoj analizi koristio sekvencije s najvećom nukleotidnom sličnošću i najmanjim E-vrijednostima. Također sam dodao referentne sekvencije s područja RH preliminarno prikazane u Brnić i sur. (2020) i Krešić i sur. (2019). Budući da se radi o preliminarnim rezultatima u okviru projekta „Rotavirusi u ekosustavu Republike Hrvatske: molekularna epidemiologija i zoonotski potencijal“, te sekvencije nemaju dodijeljene pristupne brojeve i u trenutku pisanja rada nisu bile dostupne u bazi GenBank. U svrhu genotipizacije koristio sam i mrežni alat u sklopu baze podataka ViPR (<https://www.viprbrc.org/brc/rvaGenotyper>). Višestruko sravnjenje sekvencija iz ovog istraživanja i referentnih sekvencija radio sam u programu MEGA-X pomoću alata ClustalX uz zadane parametre. Na temelju Bayesovog informacijskog kriterija (BIC) odabrao sam najbolji supstitucijski model za svaki segment. Filogenetska stabla izradio sam u programu MEGA-X metodom najveće vjerojatnosti (engl. *Maximum Likelihood*) uz odabrani optimalni supstitucijski model i provedenih 1000 pseudoreplikacija (engl. *bootstrap*) u svrhu određivanja pouzdanosti rezultata. Stabla sam po potrebi dodatno uredio u programu Inkscape. Pri označavanju sekvencija koristio sam standardni propisani sustav nomenklature za rotaviruse (Matthijnssens i sur., 2011). Specifično za uzorke s područja Republike Hrvatske, uz oznaku uzorka dodana je u obliku dvoslovne ili troslovne kratice oznaka županije u kojoj je uzorak uzorkovan ,npr. DS302-OB je oznaka uzorka divlje svinje s područja Osječko-baranjske županije. Analizu genske udaljenosti i grafički prikaz u svrhu određivanja granične vrijednosti genske udaljenosti između potencijalnih linija unutar pojedinog genotipa izradio sam u programskom jeziku R, prema ranije opisanoj metodologiji (Badaracco i sur., 2013; Matthijnssens i sur., 2008a) uz manju izmjenu, koja se odnosi se na određivanje granične vrijednosti prema kriteriju minimiziranja pogrešnog svrstavanja. Statističku analiza razlike proporcija u dvjema populacijama proveo sam pomoću z-testa u programskom jeziku R, uz graničnu p-vrijednost 0,05. Matrice nukleotidnih sličnosti sekvencija iz pojedinog sravnjenja izrađene su u programu BioEdit 7.2.5.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Prevalencija i genotipovi rotavirusa A u analiziranim uzorcima

Od ukupno 523 analizirana uzorka u ovom istraživanju, metodama RT-PCR u stvarnom vremenu za segment VP2 kod sisavaca i RT-PCR za segment VP6 kod ptica dokazana je prisutnost genoma RVA u 58 uzoraka. Udio pozitivnih uzoraka jako varira ovisno o vrsti. Najveći udio pozitivnih uzoraka uočen je kod europskih čagljeva (20,6%), a najmanji kod galebova (0,7%, samo jedan pozitivni uzorak) (Tablica 9). Umnožavanje dijela gena i sekvenciranje uspješno je provedeno za segment VP7 (genotip G) iz 27 uzoraka, za segment VP4 (genotip P) iz 21 uzorka te za segment NSP4 (genotip E) iz 8 uzoraka. Iz uzorka riječnog galeba također je sekvenciran dio gena za protein VP6 (genotip I) umnožen prilikom dokazivanja prisutnosti genoma RVA u uzorku. Podatci po vrstama navedeni su u Tablici 9.

Tablica 9. Prevalencija rotavirusa A (RVA) u analiziranim uzorcima i broj uspješno određenih genotipova G, P i E za svaku vrstu.

Vrsta	Broj uzoraka	RVA poz. (%)	G	P	E
divlja svinja	177	19 (10,7%)	11	9	6
crvena lisica	178	31 (17,4%)	13	8	2
europski čagalj	34	7 (20,6%)	2	3	/
galeb klaukavac i riječni galeb	134	1 (0,7%)	1	1	/

### 4.2. Genotipizacija i filogenetska analiza segmenata VP7, VP4, NSP4 i VP6

#### 4.2.1. Segment VP7

Genotipizacija primjenom kriterija nukleotidne sličnosti veće od 80% za segment VP7 (Tablica 1) pokazala je da kod divljih životinja s područja Republike Hrvatske cirkuliraju RVA različitih genotipova G. U 28 uspješno genotipiziranih sekvencija dokazano je sedam različitih genotipova G: G1, G2, G3, G5, G9, G10 i G34. Različiti genotipovi dokazani su također unutar pojedine vrste; pa su tako kod lisica dokazana četiri, kod divljih svinja dva i kod čagljeva dva različita genotipa G.

Genotip G3 dokazan je u ukupno devet uzoraka. Divlje svinje DS229, DS231, DS295, DS241 i DS244 tvore u filogenetskom stablu klaster unutar linije u koju su grupirani RVA domaćih i divljih svinja. RVA iz uzoraka DS302 i DS306 nalaze se unutar iste linije, ali u

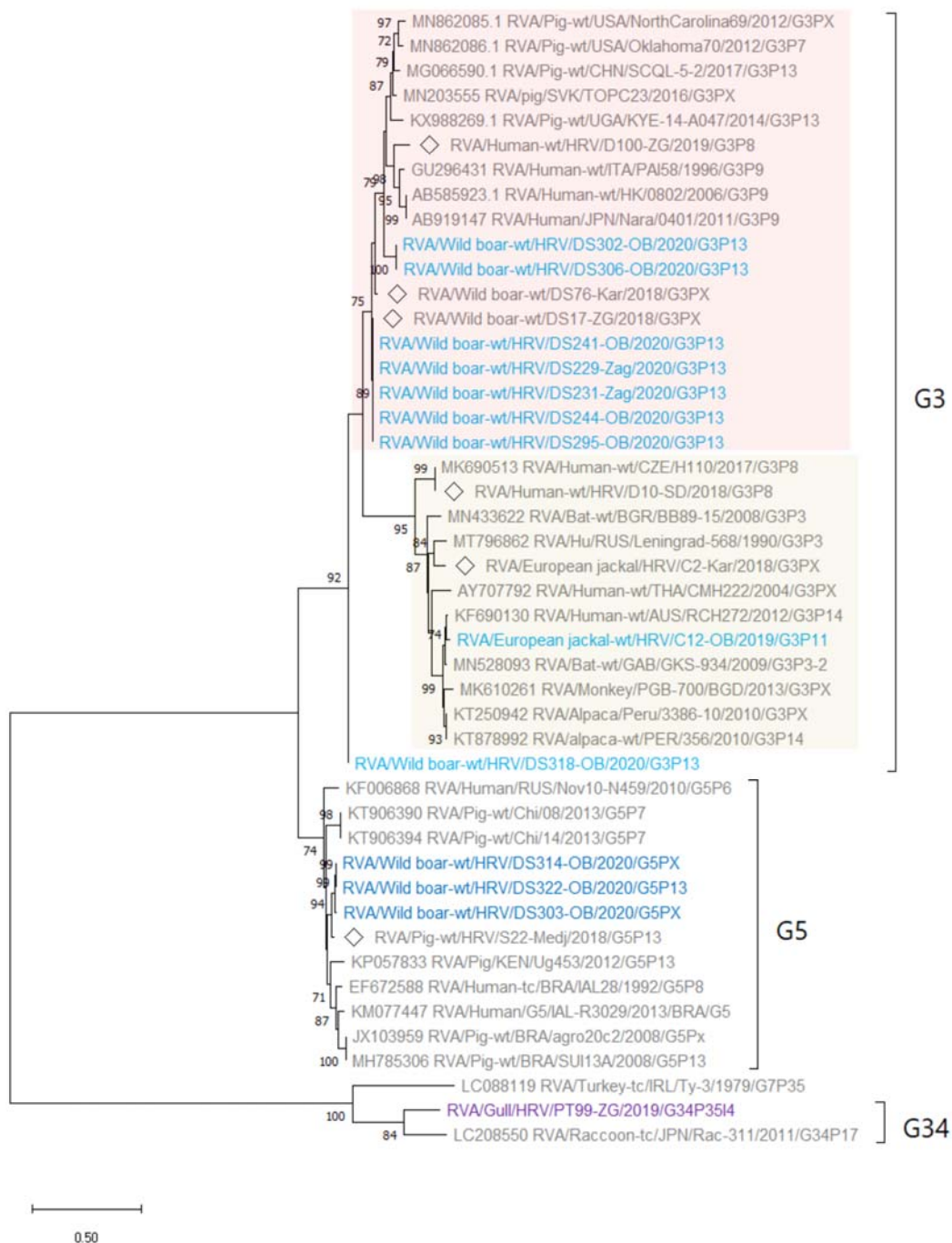
odvojenom klasteru (Slika 6). Drugu liniju čini sekvencija VP7 iz uzorka čaglja Č12, zajedno s referentnim sekvencijama RVA kod čaglja i čovjeka s područja RH te čovjeka, majmuna, šišmiša i alpake iz baze GenBank (Slika 6). Opravdanost podjele na dvije linije ispitana je analizom genske udaljenosti, iz koje je vidljiva je razlika u genskoj udaljenosti kod sekvencija iz iste, odnosno različitih linija unutar genotipa G3 te je kao aproksimativna granična vrijednost određena genska udaljenost od 15,7% (84,3% nukleotidne sličnosti), bez pogrešnog svrstavanja (Slika 7). Sekvencija DS318 značajnije odstupa od ostalih te je na filogenetskom stablu izdvojena zasebno (Slika 6), iako nukleotidna sličnost 85-90% sa sekvencijama divljih svinja genotipa G3 iz ovog istraživanja ukazuje na veći stupanj evolucijske srodnosti s potencijalnom linijom u koju se navedene sekvencije grupiraju.

Filogenetskom analizom utvrđeno je da RVA kod divljih svinja genotipa G5 (DS03, DS314 i DS322) tvori zaseban klaster i da se radi o tri vrlo srodne sekvencije. Njima evolucijski najbliža sekvencija je ona svinjskog RVA iz Međimurske županije, uzorkovanog 2018. godine. U referentnim sekvencijama iz baze GenBank s najvišom nukleotidnom sličnosti prevladavaju sekvencije RVA podrijetlom iz domaćih svinja i čovjeka (Slika 6). Razdvajanje genotipova G3 i G5 u zasebne monofiletske grupe vidljivo je na filogenetskom stablu, ali nema visoku statističku pouzdanost (*bootstrap* vrijednost >70%), što ukazuje da genska udaljenost između linija unutar genotipa G3 nije izraženo manja od udaljenosti između sekvencija genotipova G3 i G5.

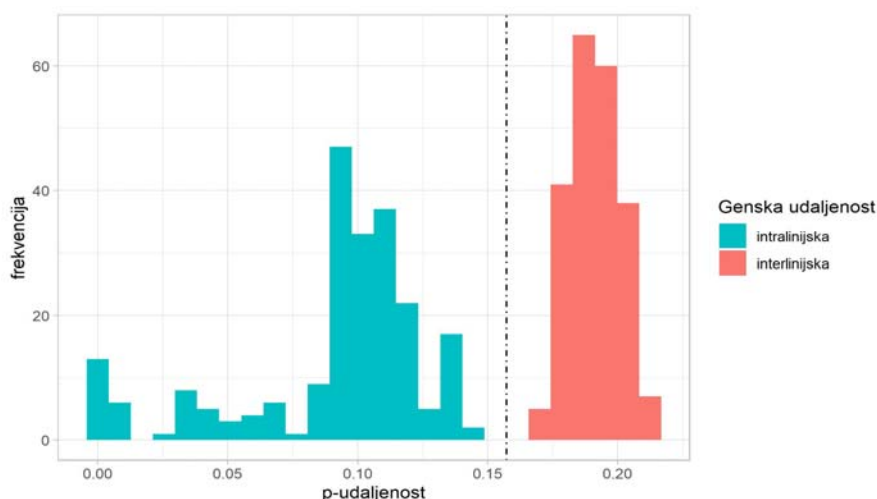
Kao vanjska grupa istaknut je RVA kod galeba, kod kojeg je dokazan rijedak genotip G34, zabilježen prethodno kod rakuna u Japanu. Druga po sličnosti referentna sekvencija je ona RVA genotipa G7 kod purana, koja sugerira da se u slučaju galeba i rakuna radi o ptičjem RVA, a ne o RVA koji tipično cirkuliraju kod sisavaca (Slika 6).

Genotip G10 dokazan je kod dvije lisice i jednog čaglja. Zajedno s referentnom sekvencijom RVA kod krave iz SAD-a čine odvojenu liniju, a u drugoj liniji su grupirane sekvencije podrijetlom od krava i čovjeka s područja RH (Slika 8, A i B). Na Slici 8 (A i B) prikazana su filogenetska stabla za sekvencije različite duljine u svrhu ispitivanja prikladnosti korištenja višestrukog sravnjenja produkta VP7-F/VP7-RINT duljine oko 300 pb u filogenetskoj analizi, što je posebno važno u kontekstu filogenetske analize genotipova G1, G2 i G9 koja se temelji na sekvencijama te duljine. Opravdanost podjele analiziranih sekvencija genotipa G10 na dvije linije provjerena je analizom genske udaljenosti (Slika 8C). Razlika u udaljenosti između linija veća je od razlike između sekvencija unutar pojedine linije

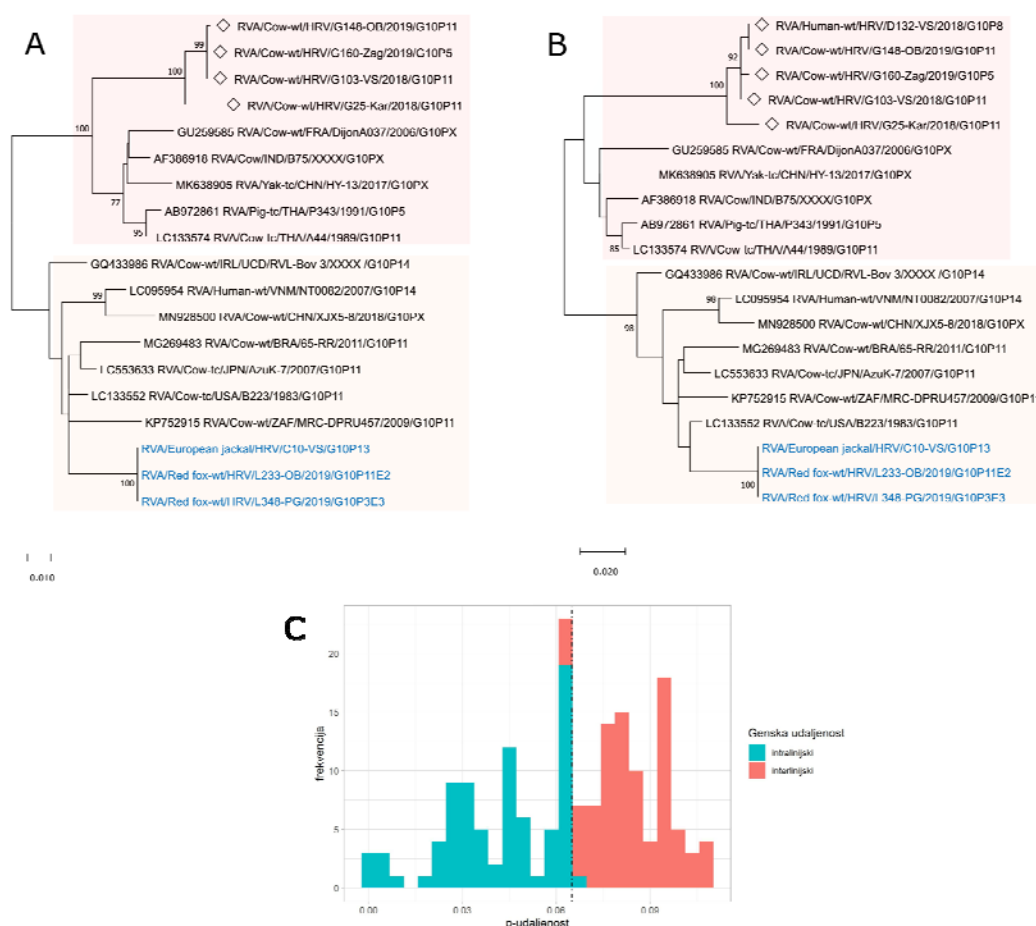
te je udaljenost od 6,5% određena kao najbolja aproksimacija granične vrijednosti s pogrešnim svrstavanjem u 2,9% slučajeva.



Slika 6. Filogenetsko stablo segmenta VP7 za genotipove G3, G5 i G34. Stablo je izrađeno metodom najveće vjerojatnosti uz supstitucijski model T92+G odabran na temelju Bayesovog informacijskog kriterija. Prikazane su *bootstrap* vrijednosti  $\geq 70\%$ . Potencijalne linije unutar genotipa G3 označene su pozadinskim obojenjem. Referentne sekvencije iz baze GenBank označene su sivim slovima, a referentne sekvencije s područja RH, preliminarno prikazane u Brnić i sur. (2020) i Krešić i sur. (2019), sivim slovima i znakom  $\diamond$  ispred imena uzorka.



Slika 7. Analiza genske udaljenosti između potencijalnih linija unutar genotipa G3 prema sravnjenju sekvencija koje tvore filogenetsko stablo prikazano na Slici 6. Procijenjena granična vrijednost iznosi 0,157 i označena je isprekidanom linijom.



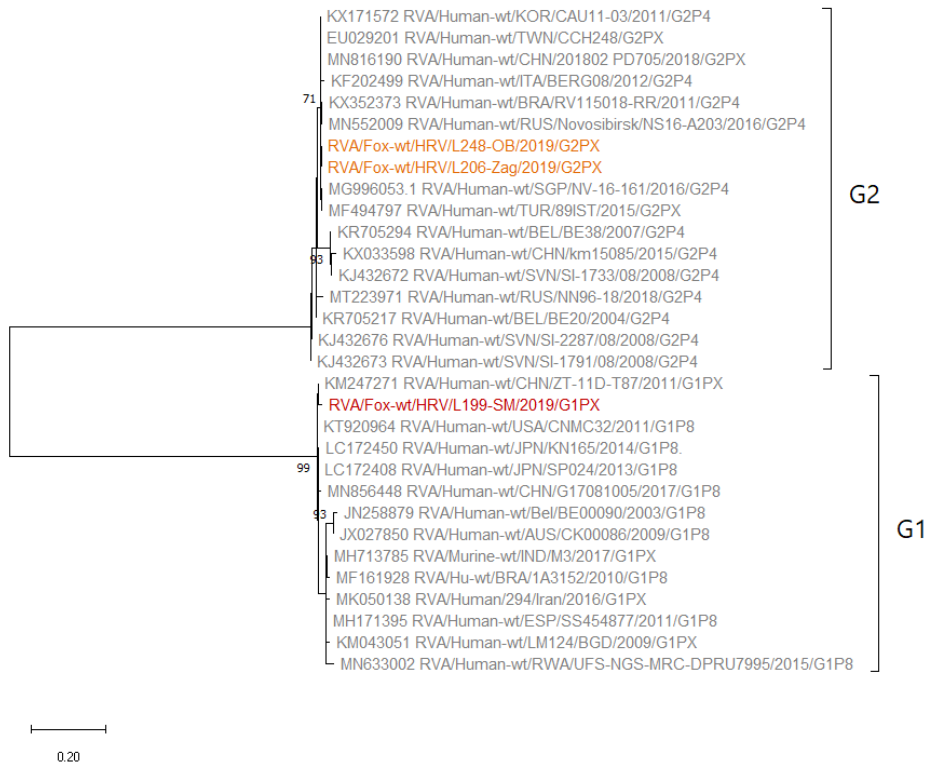
Slika 8. (A) Filogenetsko stablo segmenta VP7 za genotip G10 na temelju sekvencija duljine 893 nukleotida. Stablo je izrađeno metodom najveće vjerojatnosti uz supstitucijski model T92+G odabran na temelju Bayesovog informacijskog kriterija, uz princip označavanja

sekvencija kao na Slici 6. (B) Filogenetsko stablo segmenta VP7 za genotip G10 na temelju prvih 305 nukleotida sravnjenja korištenog pod (A), uz ostale parametre nepromijenjene. (C) Analiza genske udaljenosti između potencijalnih linija prema (A). Procijenjena granična vrijednost iznosi 0.065 i označena je na grafu isprekidanom linijom.

U jednom uzorku lisice dokazan je genom RVA genotipa G1, vrlo sličan RVA kod čovjeka s područja RH (uzorak D187, nukleotidna sličnost 99,25%) kao i referentnoj sekvenciji RVA kod čovjeka u Japanu (KM247271, nukleotidna sličnost 98,97%) (Slika 9). Na razini aminokiselinskog slijeda razlika u trima sekvencijama postoji samo u jednoj poziciji, na kojoj sekvencije L199 i KM257271 kodiraju alanin, a sekvencija D187 valin.

Genotip G2 dokazan je u dva uzorka lisica. Sličnost dviju sekvencija iznosi 99,6% i veća je od nukleotidne sličnosti s referentnim sekvencijama iz baze GenBank, te su stoga uzorci grupirani u zaseban klaster (Slika 9). Najbližnje referentne sekvencije su sekvencije RVA kod ljudi iz Tajvana i Koreje. Referentne sekvencije podrijetlom iz uzoraka svinja izdvajaju se na filogenetskom stablu u zasebnu grupu, s visokom pouzdanošću (Slika 9).

Genotip G9 najčešći je dokazani genotip G kod lisica obrađenih u ovom istraživanju. Na temelju umnoženog dijela segmenta VP7 (početnice VP7-F/VP7-RINT), RVA iz osam uzoraka lisica (L192 iz Karlovačke, L203 iz Istarske, L212 i L271 iz Brodsko-posavske, L215 i L278 iz Osječko-baranjske, L276 iz Vukovarsko-Srijemske, te L245 iz Bjelovarsko-bilogorske županije) zadovoljava kriterij nukleotidne sličnosti od 80%, uz raspon sličnosti od 85,21 do 93,06% s najbližnjom sekvencijom iz baze GenBank, ovisno o uzorku. Kvaliteta sekvencija nije dostatna da bi se provela pouzdana filogenetska analiza, što je većim dijelom uzrokovano nečitkom sekvencijom u smjeru u kojem je korištena početnica VP7-RINT. Unatoč tome, nukleotidna sličnost s referentnim sekvencijama premašuje 80% u dovoljnoj mjeri da pojedini potencijalno pogrešno očitani nukleotidi ne mijenjaju rezultat genotipizacije.



Slika 9. Filogenetsko stablo segmenta VP7 za genotipove G1 i G2. Duljina sekvencija ishodišnog sravnjenja je 304 nukleotida. Stablo je izrađeno metodom najveće vjerojatnosti uz supstitucijski model T92+G odabran na temelju Bayesovog informacijskog kriterija, uz princip označavanja sekvencija kao na Slici 6.

#### 4.2.2. Segment VP4

Dio segmenta VP4 uspješno je umnožen, sekvenciran i genotipiziran iz 21 uzorka. Utvrđeno je ukupno pet različitih genotipova P: P[3], P[11], P[13] i P[35], te jedan potencijalno novi genotip P. Sekvencija VP4 iz uzorka L300 u velikoj mjeri odudara od svih dosad prijavljenih sekvencija u bazi GenBank te bi tek dodatna istraživanja definitivno potvrdila da se radi o još jednom potencijalnom novom genotipu.

Genotip P[13] utvrđen je u 11 uzoraka. Unutar genotipa jasno su odvojene dvije moguće linije, što je dodatno podržano analizom genske udaljenosti unutar i između linija. Procijenjena je granična vrijednost genske udaljenosti 19,3%, uz pogrešno svrstavanje u 4,6% slučajeva (Slika 11). Prva linija sadrži sekvencije RVA kod divljih svinja, sekvenciju S22 (Brnić i sur., 2020) i referentne sekvencije iz domaćih svinja iz baze GenBank te se uglavnom radi o kombinaciji genotipova G3P[13] (Slika 10). Unutar navedene linije ističe se klaster u



kojem se nalaze sekvencije DS302 i DS 306 iz Osječko-baranjske županije te referentna sekvencija RVA kod domaće svinje u Slovačkoj (Slika 10). U drugu liniju svrstani su RVA kod čaglja i lisice. Sekvenciji Č10 najbližija je referentna sekvencija RVA kod lisice L54 s područja RH (Brnić i sur., 2020), uz podudaranje u 95,4% nukleotida.

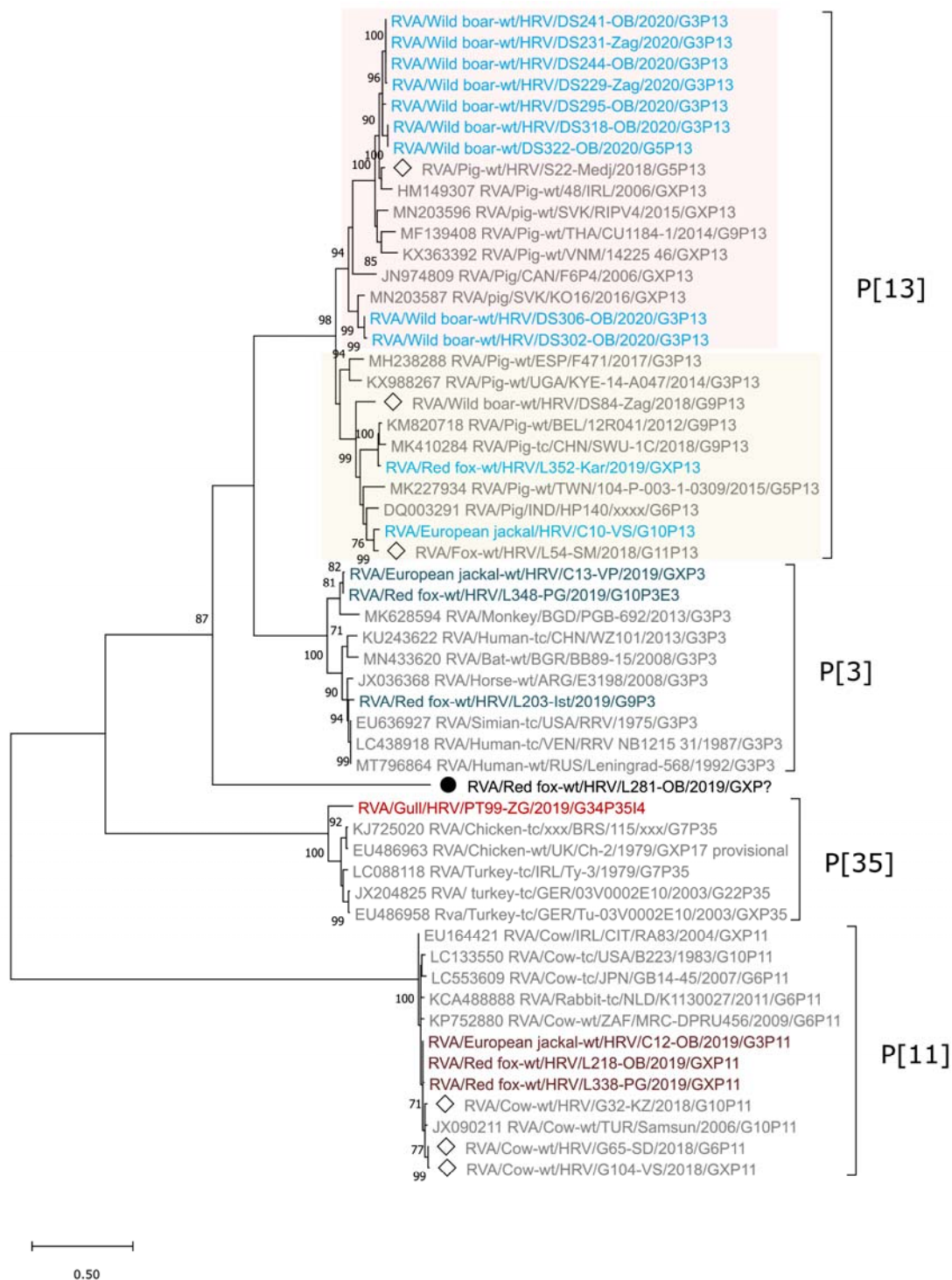
Genotip P[3] utvrđen je u dva pozitivna uzorka lisica i jednom uzorku čaglja. Sekvencije L348 i Č13 grupirane su zajedno i razlikuju se u samo 4 nukleotida (99,5% nukleotidne sličnosti), a njima najbližija referentna sekvencija je ona RVA kod majmuna iz Bangladeša sa nukleotidnom sličnošću 90,87%. Sekvencija L203 grupirana je s referentnim sekvencijama RVA kod čovjeka iz Rusije i Venezuele te majmuna iz Amerike (Slika 10), s kojima se podudara u 93,4% nukleotida.

Za RVA iz uzorka galeba dokazan je genotip P[35], najbližiji referentnim sekvencijama RVA kod purana iz Irske i Njemačke uz nukleotidnu sličnost 83-85%, te sekvencijama RVA kod kokoši (Slika 10).

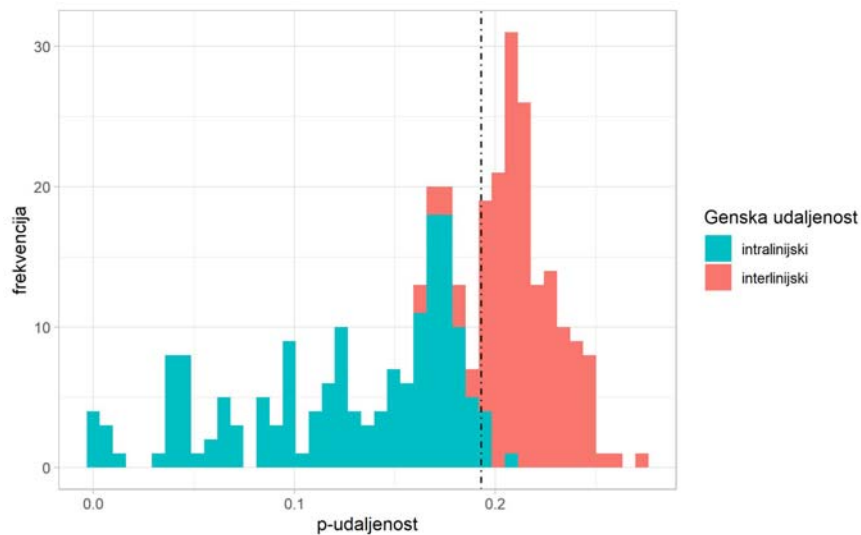
VP4 genotipa P[11] dokazan je u tri uzorka lisica i jednom uzorku čaglja, a najbližije referentne sekvencije su podrijetlom od RVA kod krave i zeca, te sekvencije RVA kod goveda s područja republike Hrvatske (Brnić i sur., 2020). Sekvencija L233 (Osječko-baranjska županija, VP7 segment genotipa G10) također je genotipa P[11], ali zbog nemogućnosti umnožavanja jednakog dijela gena VP4, tj. korištenja početnica sa različitim pozicijama unutar segmenta genoma, nije ju bilo moguće uvrstiti u filogenetsku analizu s ostalim sekvencijama. Na temelju analize dijela kodirajuće regije gena VP4 između pozicija 811 i 1029, sekvencije L233 i Č12 su potpuno identične, dok se najbližija sekvencija u bazi GenBank, LC133550 podrijetlom od RVA kod krave u Americi, razlikuje od dviju navedenih u pet nukleotida (2,3%).

Za razliku od uzoraka koji pripadaju četirima gore navedenim genotipovima P, VP4 kod dvije lisice, L281 i L300, ne zadovoljava prag nukleotidne sličnosti niti za jedan od dosad potvrđenih genotipova, stoga se radi o potencijalno novim genotipovima. Sekvencija L281 na razini nukleotidnog slijeda najbližija je sekvenciji RVA kod svinje genotipa P[23] (pristupni broj HQ268851) uz sličnost 66,54% dok je na razini transliranog aminokiselinskog slijeda najbližija sekvencija RVA kod čovjeka (pristupni broj BCK59646.1) genotipa P[10], uz sličnost 67,82%. Budući da pretragom alatom BLAST nije pronađena sekvencija sličnosti veće od 80%, zadovoljeni su kriteriji za novi genotip. VP4 iz uzorka L300 pokazuje iznimnu

različito od svih ostalih sekvencija. Od ukupno 1020 nukleotida jedino je iz fragmenta između 730-950 razvidno da se radi o segmentu VP4, preciznije o domeni MID (engl. *membrane interaction domain*), s pristupnim brojem PF17477 u bazi Pfam (El-Gebali i sur., 2019). Naime, pretragom navedenog fragmenta mrežnim alatom BLAST u bazama sekvencija pronađeni su nukleotidni sljedovi sličnosti oko 75% s pretraživanom sekvencijom, a sekvencija s najmanjom E-vrijednošću je podrijetlom od RVA genotipa P[38] iz uzorka purana (pristupni broj LC088110). Za najveći dio sekvencije pretragom nije pronađena niti jedna referentna sekvencija. Pretragom uključujući cijeli umnoženi fragment najveća sličnost na razini aminokiselinskog slijeda iznosi 35,40% sa segmentom VP4 RVA kod ptica (pristupni broj KU372514).



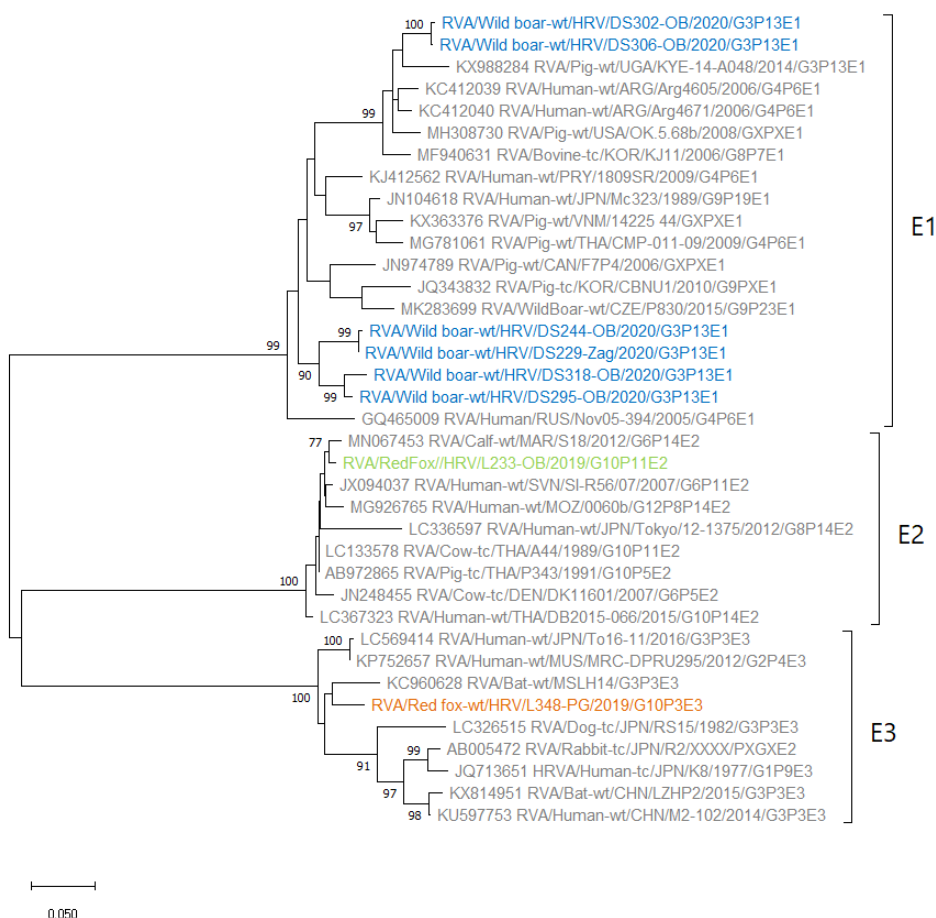
Slika 10. Filogenetsko stablo segmenta VP4. Stablo je izrađeno metodom najveće vjerojatnosti uz supstitucijski model TN93+G odabran na temelju Bayesovog informacijskog kriterija. Prikazane su *bootstrap* vrijednosti  $\geq 70\%$ . Potencijalne linije unutar genotipa P[13] označene su pozadinskim obojenjem. Referentne sekvencije iz baze GenBank označene su sivim slovima, a referentne sekvencije s područja RH sivim slovima i znakom  $\diamond$  ispred imena uzorka.



Slika 11. Analiza genske udaljenosti između potencijalnih linija unutar genotipa P[13]. Procijenjena granična vrijednost iznosi 0,193 i označena je isprekidanom linijom.

#### 4.2.3. Segment NSP4

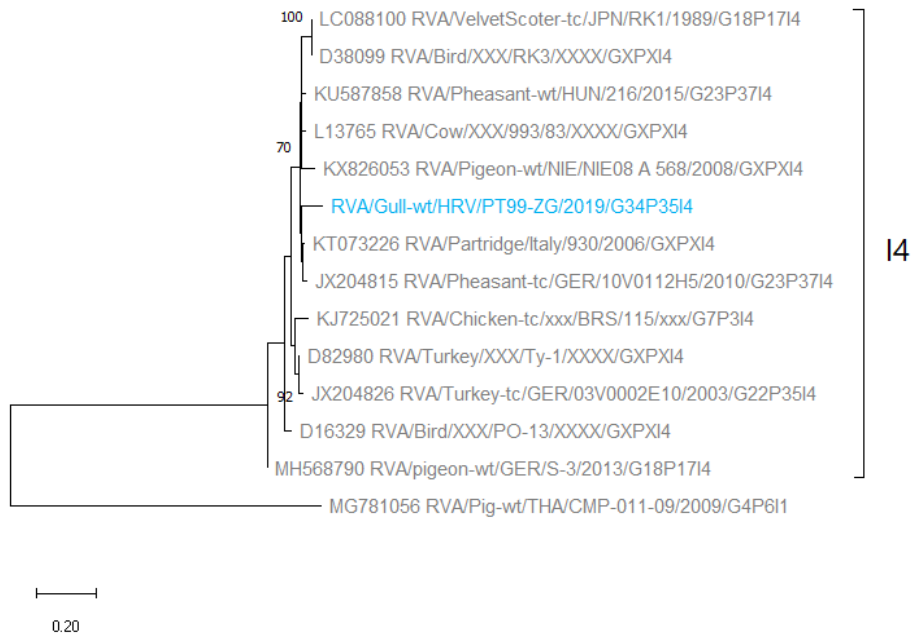
U ukupno osam genotipiziranih segmenata NSP4 dokazana su tri genotipa E: E1, E2 i E3. Genotip E1 dokazan je kod divljih svinja i radi se o uobičajenom genotipu za RVA kod svinja, a također je dokazan kod divljih svinja u Češkoj (pristupni broj MK283699, Moutelíková i sur., 2016). Od šest sekvencija divljih svinja, sekvencije DS302 i DS306 su značajno razdvojene od klastera četiri vrlo slične sekvencije, koji čine DS229, DS244, DS295 i DS318 (Slika 12). Isto odvajanje može se uočiti na filogenetskim stablima za segmente VP7 (genotip G3) i VP4 (genotip P[13]). Genotipovi E2 (genotip karakterističan za RVA kod goveda) i E3 dokazani su kod lisica. Referentne sekvencije genotipa E2 podrijetlom su iz RVA kod goveda, čovjeka i svinje. Ističu se sekvencija RVA kod goveda iz Maroka, kao dokaz u prilog podrijetlu segmenta, te RVA kod djeteta u Sloveniji, kao potencijalno zanimljiv geografski blizak slučaj (Slika 12). Sekvenciji L348, genotipa E3, najbližije referentne sekvencije podrijetlom su od RVA kod šišmiša, zeca, psa i čovjeka.



Slika 12. Filogenetsko stablo segmenta NSP4. Stablo je izrađeno metodom najveće vjerojatnosti uz supstitucijski model T92+G odabran na temelju Bayesovog informacijskog kriterija. Prikazane su *bootstrap* vrijednosti  $\geq 70\%$ . Referentne sekvencije iz baze Genbank označene su sivim slovima.

#### 4.2.4. Segment VP6

Segment VP6 uspješno je umnožen, sekvenciran i genotipiziran za RVA podrijetlom iz galeba, budući da je upravo RT-PCR s početnicama za gen VP6 bila metoda detekcije RVA u uzorcima ptica u ovom istraživanju. Genotipizacijom je utvrđen genotip I4. Gotovo sve najbližnje referentne sekvencije iz baze GenBank su podrijetlom od RVA kod ptica, uz iznimku sekvencije RVA kod krave (Slika 13). Referentna sekvencija s najvećom nukleotidnom sličnošću je podrijetlom od RVA kod jarebice (pristupni broj KT073226), s 93,49% nukleotidnog podudaranja i 98,5% sličnosti u aminokiselinskom slijedu.



Slika 13. Filogenetsko stablo segmenta VP6. Stablo je izrađeno metodom najveće vjerojatnosti uz supstitucijski model T92+G odabran na temelju Bayesovog informacijskog kriterija. Prikazane su *bootstrap* vrijednosti  $\geq 70\%$ . Referentne sekvencije iz baze Genbank označene su sivim slovima.

## 5. RASPRAVA

Poznato je da je RVA patogen sa značajnom rasprostranjenošću kod ljudi, drugih vrsta sisavaca i ptica. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prevalenciju (udio pozitivnih uzoraka u ukupno obrađenim) i genotipove RVA koji cirkuliraju kod divljih životinja s područja Republike Hrvatske te analizirati rezultate u kontekstu potencijala međuvrskog prijenosa ovog virusa. Rezultati pokazuju da je u ekosustavu Republike Hrvatske značajan udio divljih životinja (11%) zaražen RVA i da se ne radi tek o sporadičnoj infekciji. S obzirom na iznimno mali broj objavljenih istraživanja RVA kod divljih životinja te različitih metoda detekcije i eksperimentalnog dizajna (npr. istražuju li se samo pacijenti i bolesne životinje ili uzorak populacije), teško je egzaktno usporediti rezultate s literaturom. U jedina dva objavljena istraživanja RVA kod divljih svinja, zabilježene su prevalencije RVA od 2,5% u Češkoj (Moutelíková i sur., 2016) i 4,4% u Japanu (Okadera i sur., 2013), nešto manje u odnosu na 10,7% pozitivnih jedinki u ovom istraživanju (Tablica 9). Usporede li se podatci o prevalenciji RVA kod divljih svinja u RH s onima u Češkoj (Moutelíková i sur., 2016), postoji statistički značajna razlika ( $p=0,002$ ). Iako se ne radi o istom staništu, usporedba može biti zanimljiva u kontekstu iste vrste, tim više što je u oba istraživanja korišten jednak način uzorkovanja i metoda RT-PCR za dokazivanje genoma virusa. Za RVA kod lisica postoje samo dva istraživanja na pojedinačnim jedinkama (Busi i sur., 2017; Evans, 1984) pa je ovo istraživanje, zajedno s istraživanjem započetim godinu ranije (Krešić i sur., 2019) u okviru projekta Reco, prvo molekularno-epidemiološko istraživanje u svijetu. Sustavno istraživanje RVA kod divljih ptica provedeno je u Mađarskoj i rezultati su pokazali iznimno nisku prevalenciju od 0,3% (Ursu i sur., 2011), što je usporedivo s 0,7% u ovom istraživanju. U istraživanjima RVA kod domaćih životinja zabilježena prevalencija uglavnom je znatno veća. Smatra se da je prosječna prevalencija kod teladi oko 30% (Dhama i sur., 2009), a u velikoj studiji na razini Europe zabilježena je prevalencija RVA kod domaće peradi od 46,2% (Otto i sur., 2012). Za domaće životinje s područja RH prosječna prevalencija u razdoblju 2018.-2019. iznosi 43,2%. Što se tiče podataka za vrste pojedinačno, kod pasa je utvrđena prevalencija RVA 24,3%, kod svinja 44,1%, a kod goveda čak 54,8%. (Brnić i sur., 2020). U kontekstu koncepta “Jednog zdravlja” i zoonotskog potencijala RVA te prethodnih istraživanja u području (Ghosh i Kobayashi, 2014), cirkuliranje RVA kod divljih životinja je očekivano. Razmjerno manja prevalencija u odnosu na domaće životinje također je očekivana iz nekoliko razloga. Prvo, domaće životinje su uglavnom vrlo društvene, a u uzgoju su često u malom prostoru (Tarazona i sur., 2019), što pogoduje širenju infekcije jednom kada do nje

dođe na pojedinoj farmi. Drugo, uzorkovanje u istraživanjima bolesti divljih životinja karakterizira nekoliko specifičnih problema. U prirodi, za razliku od okruženja u kojem žive ljudi i domaće životinje, teški simptomi često znače ugibanje jedinke uslijed nemogućnosti hranjenja ili napada predatora, te stoga utječu na to da je životinja sklona povlačenju i skrivanju pa je teže dostupna za uzorkovanje. Posljedično, pozitivne jedinke obuhvaćene uzorkovanjem uglavnom nemaju izražene simptome (klinički zdrave životinje), što unosi određenu pristranost u sam uzorak (Wobeser, 2007), a vidljivo je i iz Ct vrijednosti pozitivnih uzoraka u ovom istraživanju, koja je nerijetko  $>30$ , premda jedan od uzroka takvih rezultata može biti i degradacija virusne RNA uslijed transporta i skladištenja uzoraka (Matthijnssens i sur., 2015). Stoga se za detektirane slučajeve zaraze kod divljih životinja često kaže da predstavljaju tek „vrh ledenog brijega“ (Wobeser, 2007). Treći razlog je tehničke i metodološke naravi. S obzirom na iznimno mali broj istraživanja RVA kod divljih životinja u svijetu, ne postoji adekvatna baza sekvencija i dizajniranih početnica specifično za pojedinu vrstu istraživanu u ovom radu. Stoga su mnoge od korištenih početnica preuzete iz objavljenih radova u kojima su analizirani uzorci ljudi i domaćih životinja (reference navedene u Tablicama 4 i 5). Posljedično, pozitivni uzorci koji se na razini sekvencije značajno razlikuju od početnica, posebno ako u genu postoji delecija ili insercija, potencijalno se ne mogu detektirati. To se u prvom redu odnosi na uspješnost genotipizacije, odnosno na umnožavanje sekvencija segmenata VP7 i VP4. Za veću uspješnost detekcije i genotipizacije RVA iz analiziranih uzoraka, moguća strategija bila bi provesti sekvenciranje cijelog genoma iz nekoliko pozitivnih uzoraka te prema dobivenim sekvencijama dizajnirati nove početnice. Međutim, navedeni postupak u okviru ovog istraživanja nije bilo moguće provesti. Usprkos tome, usporedne analize različitih metoda detekcije RVA pokazale su da je RT-PCR u stvarnom vremenu jedna od najosjetljivijih i najspecifičnijih metoda te je stoga preferirani odabir u odnosu na imunološke metode (Soltan i sur., 2016). Nadalje, za što precizniju filogenetsku analizu i genotipizaciju, važno je umnožiti što dulji dio gena, a kod postupka prijave za priznavanje novog genotipa RVA, potrebno je imati cjelovitu kodirajuću sekvenciju (CDS) (Matthijnssens i sur., 2008b). Međutim, zbog niske početne koncentracije genoma RVA često je potrebno koristiti ugniježđeni i polu-ugniježđeni PCR (naznačeni u Tablica 5) ili početnice komplementarne visoko konzerviranim regijama pa je umnoženi produkt ponekad dugačak tek 20-ak posto segmenta genoma. To je predstavljalo problem kod filogenetske analize, primjerice segmenta VP4 iz uzorka L233. U svrhu dobivanja sekvencije cijelog segmenta, mogla bi se koristiti metoda umnožavanja jednom početnicom (engl. *single primer amplification method*) koja uključuje ligaciju oligonukleotida na 3' kraj svakog lanca i



umnožavanje na temelju poznavanja sekvencije ligiranog oligonukleotida i sekvencije prethodno umnoženog dijela gena (Lambden i sur., 1992). Što se tiče pristupa sekvenciranju, u istraživanju je korišteno izravno sekvenciranje umnoženog PCR produkta, jednostavan, brz i ekonomičan postupak (Meltzer, 2003). S druge strane, rezultat sekvenciranja ovom metodom je jedna, konsenzusna sekvencija. Glavni nedostatak takvog pristupa je gubitak informacije o varijabilnosti RVA unutar uzorka. U slučaju koinfekcije, bit će sekvenciran genom/genotip virusa koji prevladava ili će se koinfekcija manifestirati kroz nečitek i u značajnoj mjeri višeznačan elektroferogram. Takav problem mogao bi se izbjeći postupkom kloniranja PCR produkata u vektor i sekvenciranjem klonova, koji se prije sekvenciranja mogu razlučiti metodom polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP, primjer navedenoga je pristup korišten u radu Černi i sur. (2015) pri istraživanju virusa hepatitisa E). Međutim, s obzirom na mali titar virusa u uzorcima, općenito slabu uspješnost umnožavanja različitih sekvencija i gore navedene prednosti izravnog sekvenciranja, sekvenciranje klonova nije korišteno u ovom istraživanju.

Genotipizacija i filogenetska analiza RVA iz pozitivnih uzoraka pokazuju iznimnu gensku heterogenost virusa koji cirkuliraju kod divljih životinja u ekosustavu RH. Navedeno je posebno vidljivo na primjeru segmenta VP7, gdje je utvrđena prisutnost sedam različitih genotipova G. Pritom se uočavaju dva svojstva genotipiziranih sekvencija. Prvo se odnosi na cirkuliranje pojedinog genotipa kod različitih vrsta. Za divlje životinje uključene u ovo istraživanje navedena karakteristika uočena je za genotipove G3 (čagalj i divlja svinja) i G10 (čagalj i lisica). Međutim, u kontekstu zoonotskog potencijala RVA i koncepta „Jednog zdravlja“, važno je promotriti i genotipove kod ljudi, domaćih i divljih životinja s područja RH. Uzevši u obzir sve vrste, samo za genotip G34 dokazana je prisutnost isključivo unutar jedne vrste. Nadalje, za genotip G3 uočena je velika evolucijska srodnost između VP7 kod domaćih i divljih svinja, što je indikacija postojanja zajedničkog evolucijskog pretka i implicira pojavu međuvrskog prijenosa RVA. Teza o evolucijskoj i genskoj srodnosti u skladu je i s rezultatima istraživanja domaćih i divljih svinja u Japanu (Okadera i sur., 2013) i Češkoj (Moutelíková i sur., 2016), gdje je ovo svojstvo uočeno za genotipove G4, G5, G9 i G11. Nasuprot tome, filogenetska analiza i analiza genske udaljenosti ukazale su na postojanje jasno odvojenih potencijalnih linija unutar genotipa G3, pri čemu u jednoj liniji prevladavaju RVA kod domaćih i divljih svinja, a u drugoj se nalaze RVA podrijetlom iz šišmiša, majmuna, alpake, čaglja i ljudi (Slika 6). Stoga je izvjesno da je genotip G3 dugo paralelno evoluirao u različitim vrstama, što može sugerirati da je za pouzdanu indikaciju međuvrskog

prijenosa u slučaju genotipa G3, gen VP7 poželjno analizirati do razine linija unutar genotipa. Nadalje, razdvajanje na genotipe G3 i G5 na filogenetskom stablu nema adekvatnu statističku pouzdanost. Moguće objašnjenje je da virus u različitim vrstama evoluira odvojeno u smjeru adaptacije na površinu enterocita domaćina (Theuns i sur., 2015), što može rezultirati genskim razdvajanjem unutar istog genotipa (genotip G3), ali i genskim približavanjem različitih genotipa u istoj vrsti (genotipovi G3 i G5). Veoma su zanimljivi genotipovi G9 i G10. Genotip G9 utvrđen je kod lisica, ali i kod ljudi, domaćih i divljih svinja, a genotip G10 kod čaglja, lisica, ljudi i goveda s područja RH. Također, genotipovi G1 i G2, tipični kod ljudi, zabilježeni su u trima uzorcima lisica. Drugo svojstvo genotipiziranih sekvencija odnosi se na činjenicu da, posebno kod lisica, unutar jedne vrste životinja na relativno malom području cirkuliraju RVA različitih genotipova. Osim četiri genotipa G (G1, G2, G9 i G10) dokazana kod lisica u ovom istraživanju, prethodno je kod lisica s područja RH dokazana prisutnost RVA genotipova G3, G5, G6, G8, G11, kao i rijedak genotip G15 (Krešić i sur., 2019). Kod čagljeva su također utvrđeni različiti genotipovi G, pa se na temelju rezultata ovog istraživanja, uzevši pritom u obzir mali broj obrađenih uzoraka i genotipiziranih RVA, kod ovih dviju vrsta ne može procijeniti tipični genotip. Kod divljih svinja, za razliku od prethodne dvije vrste, može se reći da u obrađenim uzorcima prevladava genotip G3 (72,7% uzoraka), ali također je u tri uzorka dokazan genotip G5, a prethodnih godina su zabilježeni i genotipovi G6 i G9 (Krešić i sur., 2019). Zanimljivo je da analiza rezultata ukazuje da cirkuliranje RVA određenog genotipa nije ograničeno na određeno područje, već se u različitim županijama pojavljuju isti, a u pojedinoj županiji više različitih genotipova. Najbolji primjeri te pojave vide se kod genotipa G9 koji je utvrđen kod lisica iz Karlovačke, Brodsko-posavske, Bjelovarsko-bilogorske i Osječko-baranjske županije, te kod genotipova G3 i G5 kod divljih svinja, koji paralelno cirkuliraju u Osječko-baranjskoj županiji (Slika 6). Nasuprot tome, primjer moguće povezanosti geografskog područja i cirkulirajućeg genotipa G uočen je na području Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije, gdje je genotip G10 utvrđen kod lisice, čaglja goveda i čovjeka (Slika 8, A i B), što je zanimljivo budući da se radi o atipičnom genotipu kod ljudi. Analizom su utvrđene dvije potencijalne linije unutar genotipa G10, iz čega se može pretpostaviti da potencijalno postoje dva odvojena izvora infekcije s pojavama međuvrsnog prijenosa. Jedan mogući događaj međuvrsnog prijenosa je između lisice L233 i čaglja Č10, a drugi između krave G103 i čovjeka D132. Ovaj posljednji slučaj je prethodno opisan kao mogući dokaz autohtonog zoonotskog prijenosa RVA (Vilibić-Cavlek i sur., 2021). Pritom treba imati na umu pristranost uzorkovanja kod ljudi, jer su genotipizirani RVA iz uzoraka hospitalizirane djece pa je moguće da neki zoonotski događaj nije detektiran

u izostanku značajnih simptoma. Kod galeba je utvrđen genotip G34, do sad zabilježen samo kod rakuna u Japanu (Slika 6). Međutim, sekvencije najbližije dvjema navedenima su redom iz uzoraka podrijetlom od ptica, iz čega se može pretpostaviti da se radi o genotipu karakterističnom za RVA kod ptica, koji je po prvi puta dokazan u toj skupini kralješnjaka upravo u ovom istraživanju.

Što se tiče segmenata VP4 i NSP4, analiza rezultata daje nekoliko zanimljivih uvida u karakterizaciju RVA koji cirkuliraju u ekosustavu RH. Genotip P[13] jedini je genotip dokazan kod divljih svinja u ovom istraživanju i dolazi u kombinacijama s genotipovima G3 i G5. Isti genotip utvrđen je kod divljih svinja u Japanu i Češkoj, iako se u tim istraživanjima javljaju i genotipovi P[6], P[23] i P[25] (Moutelíková i sur., 2016; Okadera i sur., 2013). Nadalje, u šest uzoraka dokazan je genotip E1 u kombinaciji s G3P[13]. Navedeni rezultat je značajan zbog toga što se genotip E1 nalazi u genotipskoj konstelaciji karakterističnoj za RVA kod domaćih svinja (Matthijnsens i sur., 2008a; Theuns, 2015), što dodatno potvrđuje rezultate filogenetske analize za segmente VP7 i VP4, gdje su u pravilu najrodnije referentne sekvencije iz uzoraka podrijetlom od domaćih svinja. S epidemiološkog aspekta značajno je da su na filogenetskom stablu, premda dijele kombinaciju genotipova G3P[13]E1 s četiri uzorka, sekvencije DS302 i DS306 grupirane zajedno i odvojene od ostalih sekvencija istog genotipa podrijetlom iz RVA kod divljih svinja. Zbog iznimno male genske udaljenosti i geografske blizine, može se pretpostaviti da se radi o dvjema zaraženim jedinkama iz istog izvora infekcije. Drugi iznimno zanimljiv rezultat je postojanje dviju sekvencija RVA, utvrđenih kod lisica, koje ne zadovoljavaju prag nukleotidne sličnosti nijednog prethodno opisanog genotipa. RVA iz uzorka L281 pokazuje ograničenu, ali postojanu nukleotidnu sličnost sa sekvencijama dostupnima u bazi GenBank, te se može gotovo sa sigurnošću reći da se radi o sekvenciji VP4 dosad neopisanog genotipa. Za razliku od toga, veći dio sekvencije VP4 iz uzorka L300 pokazuje krajnje ograničenu podudarnost od svega 35% na razini aminokiselina s najbližijom sekvencijom iz baza podataka, a pretraga nukleotidnog slijeda mrežnim alatom BLAST za prvih 600 nukleotida ne daje niti jedan rezultat, neovisno o postavkama parametara algoritma. Ipak, kao što je navedeno u rezultatima, dokazana je domena VP4 MID, što uz dobru kvalitetu sekvencije i pozitivan rezultat RT-PCR reakcije za segment VP2 sugerira da postoji mogućnost da se zaista radi o proteinu VP4 RVA, ali su svakako nužna dodatna istraživanja. Kao i u slučaju genotipa G, RVA kod lisica kod kojih je uspješno određen genotip P također ne pokazuju nikakav obrazac, pa su dokazani genotip P[13], genotip P[3] u kombinaciji s G9 i G10, te P[11], koji u jednom uzorku dolazi u

kombinaciji s G10 i genotipom E2. Kombinacija G10P[11]E2 prema rezultatima filogenetske analize i relevantnoj literaturi upućuje na RVA podrijetlom od goveda. Nažalost, za preostala dva uzorka genotipa P[11] genotip G nije uspješno određen, stoga se ne može nagađati radi li se potencijalno o učestalom obrascu. Valja naglasiti da, zbog relativno učestalog preslagivanja segmenata genoma, pojava različitih kombinacija genotipova nije neobična i neočekivana, ali i da je sezonska izmjena prevladavajućih genotipskih kombinacija dobro opisana pojava za RVA kod ljudi (Bányai i sur., 2012). Također je zanimljivo istaknuti RVA kod lisice kombinacije genotipova G10P[3]E3, kod kojeg je genotip E3 najbliži sekvencijama iz uzoraka šišmiša s Mauricijusa i čovjeka iz Kine. Kod čagljeva su dokazane kombinacija genotipova G10P[13] i G3P[11]. Filogenetska analiza ukazuje da su sekvencije RVA iz uzoraka čagljeva i lisica uglavnom vrlo srodne, što može biti povezano sa srodnošću dviju vrsta te istim načinom prehrane i staništem. RVA podrijetlom iz galeba sadrži segment VP4 genotipa P[35], dokazan u više navrata kod purana. Jedna od najbližijih sekvencija iz baze GenBank, podrijetlom iz kokoši iz Ujedinjenog Kraljevstva (Slika 10), označena je kao „provizorni P17“, što je zanimljivo jer se, na temelju filogenetske analize i rezultata BLAST pretraživanja, očito radi o pogrešno određenom genotipu. Međutim, uzorak je prikupljen 1979. godine pa je razlog pogreške najvjerojatnije nedostatak definiranog genotipa u to vrijeme. Zajedno s utvrđenim genotipom I4 (segment VP6), dokazanim u drugim istraživanjima kod golubova i drugih ptica (Pauly i sur., 2017), za RVA kod galeba iz uzorka PT99, kombinacije genotipova G34P[35]I4, može se sa sigurnošću reći da se radi o ptičjem RVA.

Na temelju svega navedenog, a ponajprije na temelju analize rezultata za genotip G10 kod različitih vrsta na području Republike Hrvatske, očito je da je RVA patogen sa značajnim potencijalom međuvrskog prijenosa te zoonotskim potencijalom, čemu uvelike pridonosi pojava preslagivanja segmenata genoma (Martella i sur., 2010). Evolucijska srodnost genotipova domaćih i divljih svinja, lisica i čagljeva te goveda, lisica i čagljeva jasno je vidljiva iz filogenetske analize. U kontekstu potencijala međuvrskog prijenosa RVA kod ljudi, važan je podatak da su kod djece u RH sporadično utvrđeni zoonotski genotipovi G4, G6, G8 i G10 (Brnić i sur., 2020; Vrdoljak i sur., 2019), a genotip G3 jedan je od najčešće utvrđenih genotipova u posljednje dvije rotavirusne sezone (Brnić i sur., 2020). Kao što je već ranije istaknuto, genotipovi G3 i G10 rašireni su u ekosustavu RH kod različitih vrsta. Također, genotip G1 tipičan kod čovjeka dokazan je izolirano u jednom uzorku lisica u ovom istraživanju, te ranije u uzorku podrijetlom od psa u RH (Brnić i sur., 2020). Navedeni genotip

je kod domaćih i divljih životinja vrlo rijedak. U bazi NCBI Virus Variation (Hatcher i sur., 2017) u trenutku pisanja ovoga rada nalazilo se svega 18 sekvencija RVA genotipa G1 kod sisavaca osim čovjeka, što uz jako veliku nukleotidnu sličnost s RVA istog genotipa kod čovjeka upućuje na mogućnost reverznih zoonotskih događaja, tj. prijenosa RVA s ljudi na životinje, pojavu koja je prethodno dokazana za pojedine genotipove (Bwogi i sur., 2017). Slično se može pretpostaviti i za genotip G2, budući da su sekvencije gena VP7 navedenog genotipa iz uzoraka lisica vrlo srodne sekvencijama RVA kod ljudi. Na temelju rezultata ovog istraživanja može se očekivati da će buduća istraživanja RVA kod divljih životinja najvjerojatnije pokazati nove potencijalne slučajeve međuvrskog prijenosa, a za ljude bi od posebnog značaja mogle biti vrste koje su u bliskom kontaktu s ljudskim populacijama ili domaćim životinjama, poput divljih svinja, lisica, čagljeva, glodavaca, šišmiša i mnogih drugih vrsta. Činjenica da je u istraživanju pronađen potencijalno novi genotip P, uz ograničenu uspješnost umnožavanja segmenata genoma RVA, dodatno ukazuje da genotipska raznolikost i heterogenost opisana u ovom radu predstavlja samo dio cjelokupne molekularno-epidemiološke slagalice, kako u ekosustavu RH tako i općenito. Stoga nedvojbeno postoji potreba za dodatnim istraživanjima u ovom području, koja bi u kontekstu „Jednog zdravlja“ mogla pridonijeti cjelovitom razumijevanju evolucije i epidemiologije RVA.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Sekvenciranjem i genotipizacijom utvrđen je veliki broj različitih genotipova koji cirkuliraju kod divljih svinja, crvenih lisica, europskih čagljeva i riječnih galebova u ekosustavu RH. U ukupno 58 uzoraka u kojima je dokazana prisutnost genoma RVA, utvrđeno je sedam genotipova G (G1, G2, G3, G5, G9, G10 i G34), pet genotipova P (P[3], P[11], P[13], P[35] i jedan potencijalno novi genotip) i tri genotipa E (E1, E2 i E3).
2. Filogenetskom analizom utvrđeno je cirkuliranje pojedinog genotipa i vrlo sličnih nukleotidnih sljedova kod više različitih vrsta životinja. Usporedba s referentim sekvencijama kod ljudi i domaćih životinja ukazuje na postojanje nekoliko potencijalnih slučajeva međuvrskog prijenosa.

Genom RVA dokazan je u 11% (58 od 523) analiziranih uzoraka crvenih lisica, europskih čagljeva, divljih svinja i riječnih galebova s područja Republike Hrvatske, čime je potvrđena pretpostavka o značajnoj prevalenciji ovog virusa kod različitih vrsta divljih životinja. Također, po prvi puta dokazan je i genotipiziran RVA kod galebova i utvrđena je kombinacija genotipova G34P[35]I4. Zaključno, s obzirom na ograničen uvid u molekularnu epidemiologiju RVA kod divljih životinja i nedovoljnu istraženost navedenog područja, potrebna su daljnja istraživanja u svrhu određivanja eventualnih karakterističnih genotipova RVA kod pojedinih vrsta divljih životinja, praćenja zdravlja divljih životinja i pravovremene detekcije podrijetla RVA u slučaju pojave emergentnog zoonotskog genotipa RVA kod ljudi.

## 7. LITERATURA

- Adams W. R., Kraft L. M. (1963): Epizootic Diarrhea of Infant Mice: Identification of the Etiologic Agent. *Science* (80-. ). **141**: 359–360.
- Alfieri A. A., Leite J. P. G., Nakagomi O., Kaga E., Woods P. A., Glass R. I., Gentsch J. R. (1996): Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch. Virol.* **141**: 2353–2364.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- Arnold M. M., Sen A., Greenberg H. B., Patton J. T. (2013): The Battle between Rotavirus and Its Host for Control of the Interferon Signaling Pathway. *PLoS Pathog.* **9**: e1003064.
- Badaracco A., Garaicoechea L., Matthijssens J., Louge Uriarte E., Odeón A., Bilbao G., Fernandez F., Parra G. I., Parreño V. (2013): Phylogenetic analyses of typical bovine rotavirus genotypes G6, G10, P[5] and P[11] circulating in Argentinean beef and dairy herds. *Infect. Genet. Evol.* **18**: 18–30.
- Bányai K., Kemenesi G., Budinski I., Földes F., Zana B., Marton S., Varga-Kugler R., Oldal M., Kurucz K., Jakab F. (2017): Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* **48**: 19–26.
- Bányai K., László B., Duque J., Steele A. D., Nelson E. A. S., Gentsch J. R., Parashar U. D. (2012): Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine* **30**: A122–A130.
- Berkova Z., Crawford S. E., Trugnan G., Yoshimori T., Morris A. P., Estes M. K. (2006): Rotavirus NSP4 Induces a Novel Vesicular Compartment Regulated by Calcium and Associated with Viroplasms. *J. Virol.* **80**: 6061–6071.
- Bishop R., Davidson G. P., Holmes I. H., Ruck B. J. (1973): Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa from Children with Acute Non-bacterial Gastroenteritis. *Lancet* **302**: 1281–1283.
- Bridger J. C., Woode G. N., Jones J. M., Flewett T. H., Bryden A. S., Davies H. (1975): Transmission of Human Rotaviruses to Gnotobiotic Piglets. *J. Med. Microbiol.* **8**: 565–569.
- Brnić D., Kovačević A., Čolić D., Šimić I., Škoko I., Krešić N. (2020): Molecular epidemiology and zoonotic potential of rotavirus A in Croatian ecosystem. *Zoonoze i bolesti koje se prenose vektorima u kontekstu "Jednog zdravlja"*. 42–43. K. priopćenje.

- Brnić D., Kovačević A., Krešić N., Šimić I., Škoko I., Konjik V., Sipl M., Jukić Guć J., Krželj V., Šoprek S., Tešović G. (2019): Rotavirus A infection in hospitalized children in Croatia during season 2018/2019: the emergence of equine-like G3P[8] and G1P[8] intergenogroup reassortant strains. 156–157.
- Busi C., Martella V., Papetti A., Sabelli C., Lelli D., Alborali G. L., Gibelli L., Gelmetti D., Lavazza A., Cordioli P., Boniotti M. B. (2017): Group A Rotavirus Associated with Encephalitis in Red Fox. *Emerg. Infect. Dis.* **23**: 1535–1538.
- Bwogi J., Jere K. C., Karamagi C., Byarugaba D. K., Namuwulya P., Baliraine F. N., Desselberger U., Iturriza-Gomara M. (2017): Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human, bovine, caprine and porcine strains. *PLoS One* **12**: e0178855.
- Caillère N., Vilain P., Brottet E., Kaplon J., Ambert-Balay K., Polycarpe D., Filleul L. (2013): A major outbreak of gastroenteritis in réunion Island in 2012: First identification of G12 rotavirus on the Island. *Eurosurveillance* **18(19)**: pii20476.
- Castrucci G., Frigeri F., Ferrari M., Cilli V., Aldrovandi V., Caleffi F., Gatti R. (1984): Comparative study of rotavirus strains of bovine and rabbit origin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **7**: 171–178.
- Černi S., Prpić J., Jemeršić L., Škorić D. (2015): The application of single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis in determining Hepatitis E virus intra-host diversity. *J. Virol. Methods* **221**: 46–50.
- Chandran A., Santosham M. (2008): RotaTeq™: a three-dose oral pentavalent reassortant rotavirus vaccine. *Expert Rev. Vaccines* **7**: 1475–1480.
- Cheung W., Gill M., Esposito A., Kaminski C. F., Courousse N., Chwetzoff S., Trugnan G., Keshavan N., Lever A., Desselberger U. (2010): Rotaviruses Associate with Cellular Lipid Droplet Components To Replicate in Viroplasms, and Compounds Disrupting or Blocking Lipid Droplets Inhibit Viroplasm Formation and Viral Replication. *J. Virol.* **84**: 6782–6798.
- Cook N. (2004): The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infect.* **48**: 289–302.
- Crawford S. E., Mukherjee S. K., Estes M. K., Lawton J. A., Shaw A. L., Ramig R. F., Prasad B. V. V. (2001): Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike. *J. Virol.* **75**: 6052–6061.
- Crawford S. E., Ramani S., Tate J. E., Parashar U. D., Svensson L., Hagbom M., Franco M. A., Greenberg H. B., O’Ryan M., Kang G., Desselberger U., Estes M. K. (2017):



- Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**: 17083.
- Cross A. R., Baldwin V. M., Roy S., Essex-Lopresti A. E., Prior J. L., Harmer N. J. (2019): Zoonoses under our noses. *Microbes Infect.* **21**: 10–19.
- Cui J., Li F., Shi Z.-L. (2019): Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**: 181–192.
- Delogu R., Presti A. Lo, Ruggeri F. M., Cella E., Giovanetti M., Ciccozzi M., Ljubin-Sternak S., Bukovski-Simonoski S., Lukic-Grlic A., Ianiro G., Fiore L. (2013): Full-Genome Characterization of a G8P[8] Rotavirus That Emerged among Children with Diarrhea in Croatia in 2006. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1583–1588.
- Desselberger U. (2014): Rotaviruses. *Virus Res.* **190**: 75–96.
- Dhama K., Chauhan R. S., Mahendran M., Malik S. V. S. (2009): Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* **33**: 1–23.
- Dóro R., Farkas S. L., Martella V., Bányai K. (2015): Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **13**: 1337–1350.
- Dóro R., Mihalov-Kovács E., Marton S., László B., Deák J., Jakab F., Juhász Á., Kisfali P., Martella V., Meleg B., Molnár P., Sántha I., Schneider F., Bányai K. (2014): Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012. *Infect. Genet. Evol.* **28**: 495–512.
- El-Gebali S., Mistry J., Bateman A., Eddy S. R., Luciani A., Potter S. C., Qureshi M., Richardson L. J., Salazar G. A., Smart A., Sonnhammer E. L. L., Hirsh L., Paladin L., Piovesan D., Tosatto S. C. E., Finn R. D. (2019): The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47**: D427–D432.
- Esteban L. E., Rota R. P., Gentsch J. R., Jiang B., Esona M., Glass R. I., Glikmann G., Castello A. A. (2010): Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: Reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. *J. Med. Virol.* **82**: 1083–1093.
- Estes M. K., Greenberg H. B. (2013): Rotaviruses. U: *Fields Virol.* 6th izd. Ur. D. M. Knipe, P. M. Howley Philadelphia: Wolters Kluwer, Health/Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1347-1401.
- Evans R. H. (1984): Rotavirus-Associated Diarrhea in Young Raccoons (*Procyon Lotor*), Striped Skunks (*Mephitis Mephitis*) and Red Foxes (*Vulpes Vulpes*). *J. Wildl. Dis.* **20**: 79–85.
- Fabbretti E., Afrikanova I., Vascotto F., Burrone O. R. (1999): Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.* **80**: 333–

- Gebreyes W. A., Dupouy-Camet J., Newport M. J., Oliveira C. J. B., Schlesinger L. S., Saif Y. M., Kariuki S., Saif L. J., Saville W., Wittum T., Hoet A., Quessy S., Kazwala R., Tekola B., Shryock T., Bisesi M., Patchanee P., Boonmar S., King L. J. (2014): The Global One Health Paradigm: Challenges and Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and Environment Interface in Low-Resource Settings. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e3257.
- Ghosh S., Kobayashi N. (2014): Exotic rotaviruses in animals and rotaviruses in exotic animals. *VirusDisease* **25**: 158–172.
- Grazia S. De, Bonura F., Colomba C., Cascio A., Bernardo F. Di, Collura A., Terranova D. M., Martella V., Giammanco G. M. (2014): Data mining from a 27-years rotavirus surveillance in Palermo, Italy. *Infect. Genet. Evol.* **28**: 377–384.
- Hacker J., Dobrindt U., Kurth R. (Ur.) (2012): Genome Diversity and Evolution of Rotaviruses. *Genome Plast. Infect. Dis. Asm Press.* 214–241
- Hall T. A. (1999): BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 95–98
- Hatcher E. L., Zhdanov S. A., Bao Y., Blinkova O., Nawrocki E. P., Ostapchuck Y., Schäffer A. A., Brister J. R. (2017): Virus Variation Resource – improved response to emergent viral outbreaks. *Nucleic Acids Res.* **45**: D482–D490.
- Heylen E., Zeller M., Ciarlet M., Lawrence J., Steele D., Ranst M. Van, Matthijnssens J. (2015): Comparative analysis of pentavalent rotavirus vaccine strains and G8 rotaviruses identified during vaccine trial in Africa. *Sci. Rep.* **5**: 1–12.
- Hoxie I., Dennehy J. J. (2020): Intragenic recombination influences rotavirus diversity and evolution. *Virus Evol.* **6**:vez059.
- Hyser J. M., Collinson-Pautz M. R., Utama B., Estes M. K. (2010): Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroporin Activity. *MBio* **1**: e00265-10.
- Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Koopmans M, Korsun N, Koukou D, Kroneman A, László B, Lappalainen M, Maunula L, Marques AM, Matthijnssens J, Midgley S, Mladenova Z, Nawaz S, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Steyer A, Sidaraviciute-Ivaskeviciene I, Syriopoulou V, Tran AN, Usonis V, VAN Ranst M, DE Rougemont A, Gray J. (2011): Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect.* **139**(6):895-909.

- Jamnjar-Ciglenceki U., Kuhar U., Sturm S., Kirbis A., Racki N., Steyer A. (2016): The first detection and whole genome characterization of the G6P[15] group A rotavirus strain from roe deer. *Vet. Microbiol.* **191**: 52–9.
- Jenni S., Salgado E. N., Herrmann T., Li Z., Grant T., Grigorieff N., Trapani S., Estrozi L. F., Harrison S. C. (2019): In situ Structure of Rotavirus VP1 RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Mol. Biol.* **431**: 3124–3138.
- Jones K. E., Patel N. G., Levy M. A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J. L., Daszak P. (2008): Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**: 990–993.
- Krešić N., Kovačević A., Šimić I., Bujanić M., Konjević D., Brnić D. (2019): Genetic diversity of Rotavirus A in wildlife in Croatia. 8th International Congress “Veterinary Science and Profession” 62–62. Kongresno priopćenje.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**: 1547–1549.
- Lambden P. R., Cooke S. J., Caul E. O., Clarke I. N. (1992): Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification. *J. Virol.* **66**: 1817–1822.
- Li W., Manktelow E., Kirchbach J. C. von, Gog J. R., Desselberger U., Lever A. M. (2010): Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis -acting functions. *Nucleic Acids Res.* **38**: 7718–7735.
- Lorrot M., Vasseur M. (2007): How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virol. J.* **4**: 31.
- Luchs A., Timenetsky M. do C. S. T. (2016): Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Einstein (São Paulo)* **14**: 278–287.
- Mackenzie J. S., Jeggo M. (2019): The One Health Approach—Why Is It So Important? *Trop. Med. Infect. Dis.* **4**: 88.
- MacLachlan N. J., Dubovi E. J (Ur.) (2016): *Epidemiology and Control of Viral Diseases. U Fenner’s Veterinary Virology. 5. izd.* Boston: Academic Press, pp. 131–153.
- Malherbe H., Harwin R. (1963): The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *S. Afr. Med. J.* **37**: 407–11.
- Malik Y. S., Bhat S., Dar P. S., Sircar S., Dhama K., Singh R. K. (2020): Evolving Rotaviruses, Interspecies Transmission and Zoonoses. *Open Virol. J.* **14**: 1–6.
- Martella V., Bányai K., Ciarlet M., Iturriza-Gómara M., Lorusso E., Grazia S. De, Arista S., Decaro N., Elia G., Cavalli A., Corrente M., Lavazza A., Baselga R., Buonavoglia C.

- (2006): Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: Evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* **344**: 509–519.
- Martella V., Bányai K., Matthijssens J., Buonavoglia C., Ciarlet M. (2010): Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* **140**: 246–255.
- Martella V., Colombrita D., Lorusso E., Draghin E., Fiorentini S., Grazia S. De, Banyai K., Ciarlet M., Caruso A., Buonavoglia C. (2008): Detection of a Porcine-Like Rotavirus in a Child with Enteritis in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 3501–3507.
- Matthijssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S. M., Palombo E. A., Iturriza-Gómara M., Maes P., Patton J. T., Rahman M., Ranst M. Van (2008a): Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *J. Virol.* **82**: 3204–3219.
- Matthijssens J., Ciarlet M., McDonald S. M., Attoui H., Bányai K., Brister J. R., Buesa J., Esona M. D., Estes M. K., Gentsch J. R., Iturriza-Gómara M., Johne R., Kirkwood C. D., Martella V., Mertens P. P. C., Nakagomi O., Parreño V., Rahman M., Ruggeri F. M., Saif L. J., Santos N., Steyer A., Taniguchi K., Patton J. T., Desselberger U., Ranst M. Van (2011): Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* **156**: 1397–1413.
- Matthijssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Bányai K., Estes M. K., Gentsch J. R., Iturriza-Gómara M., Kirkwood C. D., Martella V., Mertens P. P. C., Nakagomi O., Patton J. T., Ruggeri F. M., Saif L. J., Santos N., Steyer A., Taniguchi K., Desselberger U., Ranst M. Van (2008b): Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* **153**: 1621–1629.
- Matthijssens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Ranst M. Van (2010): Phylodynamic Analyses of Rotavirus Genotypes G9 and G12 Underscore Their Potential for Swift Global Spread. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 2431–2436.
- Matthijssens J., Ons E., Coster S. De, Conceição-Neto N., Gryspeerdt A., Ranst M. Van, Raue R. (2015): Molecular characterization of equine rotaviruses isolated in Europe in 2013: Implications for vaccination. *Vet. Microbiol.* **176(1-2)**:179-85
- Matthijssens J., Rahman M., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Kabue J.-P., Muyembe J.-J. T., Ranst M. Van (2006): G8 Rotavirus Strains Isolated in the Democratic Republic of Congo Belong to the DS-1-Like Genogroup. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1801–1809.
- Matthijssens J., Ranst M. Van (2012): Genotype constellation and evolution of group A

- rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* **2**: 426–433.
- McClain B., Settembre E., Temple B. R. S., Bellamy A. R., Harrison S. C. (2010): X-ray Crystal Structure of the Rotavirus Inner Capsid Particle at 3.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **397**: 587–599.
- Meltzer S. J. (1993): Direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Methods Mol Biol.* **15**:137-41.
- Midgley S. E., Bányai K., Buesa J., Halaihel N., Hjulsager C. K., Jakab F., Kaplon J., Larsen L. E., Monini M., Poljšak-Prijatelj M., Pothier P., Ruggeri F. M., Steyer A., Koopmans M., Böttiger B. (2012): Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* **156**: 238–245.
- Mihalov-Kovács E., Gellért Á., Marton S., Farkas S. L., Fehér E., Oldal M., Jakab F., Martella V., Bányai K. (2015): Candidate New Rotavirus Species in Sheltered Dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 660–663.
- Miyazaki A., Kuga K., Suzuki T., Kohmoto M., Katsuda K., Tsunemitsu H. (2011): Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. *Vet. Res.* **42**: 112.
- Mori Y., Sugiyama M., Takayama M., Atoji Y., Masegi T., Minamoto N. (2001): Avian-to-Mammal Transmission of an Avian Rotavirus: Analysis of Its Pathogenicity in a Heterologous Mouse Model. *Virology* **288**: 63–70.
- Motayo B. O., Oluwasemowo O. O., Olusola B. A., Opayele A. V., Faneye A. O. (2019): Phylogeography and evolutionary analysis of African Rotavirus a genotype G12 reveals district genetic diversification within lineage III. *Heliyon* **5**: e02680.
- Moutelíková R., Dufková L., Kamler J., Drimaj J., Plhal R., Prodělalová J. (2016): Epidemiological survey of enteric viruses in wild boars in the Czech Republic: First evidence of close relationship between wild boar and human rotavirus A strains. *Vet. Microbiol.* **193**: 28–35.
- Nakagomi O., Ohshima A., Aboudy Y., Shif I., Mochizuki M., Nakagomi T., Gotlieb-Stematsky T. (1990): Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1198–1203.
- Nakagomi T., Nakagomi O. (1989): RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J. Virol.* **63**: 1431–4.
- Newton K., Meyer J. C., Bellamy A. R., Taylor J. A. (1997): Rotavirus nonstructural

- glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J. Virol.* **71**: 9458–9465.
- Okadera K., Abe M., Ito N., Morikawa S., Yamasaki A., Masatani T., Nakagawa K., Yamaoka S., Sugiyama M. (2013): Evidence of natural transmission of group A rotavirus between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. *Infect. Genet. Evol.* **20**: 54–60.
- Otto P. H., Ahmed M. U., Hotzel H., Machnowska P., Reetz J., Roth B., Trojnar E., Johne R. (2012): Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet. Microbiol.* **156**: 8–15.
- Patton J. T. (2012): Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov. Med.* **13**: 85–97.
- Pauly M., Oni O. O., Sausy A., Owoade A. A., Adeyefa C. A. O., Muller C. P., Hübschen J. M., Snoeck C. J. (2017): Molecular epidemiology of Avian Rotaviruses Group A and D shed by different bird species in Nigeria. *Viol. J.* **14**: 111.
- Preston N. D., Daszak P., Colwell R. R. (2013): The human environment interface: applying ecosystem concepts to health. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **365**: 83–100.
- R Core Team (2019): R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput.
- Ren K., Russell K. (2016): formattable: Create “Formattable” Data Structures. Dostupno na <https://cran.r-project.org/package=formattable>.
- Santiana M., Ghosh S., Ho B. A., Rajasekaran V., Du W.-L., Mutsafi Y., Jésus-Díaz D. A. De, Sosnovtsev S. V., Levenson E. A., Parra G. I., Takvorian P. M., Cali A., Bleck C., Vlasova A. N., Saif L. J., Patton J. T., Lopalco P., Corcelli A., Green K. Y., Altan-Bonnet N. (2018): Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission. *Cell Host Microbe* **24**: 208-220.e8.
- Santos N., Hoshino Y. (2005): Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* **15**: 29–56.
- Savić V. (2017): Novel reassortant clade 2.3.4.4 avian influenza A(H5N5) virus in wild birds and poultry, Croatia, 2016-2017. *Vet. Arh.* **87**: 377–396.
- Šimić I., Kovačević A., Krešić N., Škoko I., Konjik V., Guć J. J., Krželj V., Tešović G., Brnić D. (2019): Molekularne značajke i zoonotski potencijal rotavirusa. *Pediatr. Croat.* **63**: 63–70.
- Tarazona A. M., Ceballos M. C., Broom D. M. (2019): Human Relationships with Domestic

- and Other Animals: One Health, One Welfare, One Biology. *Animals* **10**: 43.
- Taylor J. A., O'Brien J. A., Yeager M. (1996): The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO J.* **15**: 4469–4476.
- Theuns S. (2015): Porcine rotavirus infections in Belgian piglets and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. *Doktorska disertacija. Ghent Univ. Fac. Vet. Med. V*, 212.
- Theuns S., Heylen E., Zeller M., Roukaerts I. D. M., Desmarets L. M. B., Ranst M. Van, Nauwynck H. J., Matthijnssens J. (2015): Complete Genome Characterization of Recent and Ancient Belgian Pig Group A Rotaviruses and Assessment of Their Evolutionary Relationship with Human Rotaviruses. *J. Virol.* **89**: 1043–1057.
- Tian P., Ball J. M., Zeng C. Q., Estes M. K. (1996): The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J. Virol.* **70**: 6973–6981.
- Tortorici M. A. (2006): A base-specific recognition signal in the 5' consensus sequence of rotavirus plus-strand RNAs promotes replication of the double-stranded RNA genome segments. *RNA* **12**: 133–146.
- Tsugawa T., Hoshino Y. (2008): Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology* **380**: 344–353.
- Ursu K., Papp H., Kisfali P., Rigó D., Melegh B., Martella V., Bányai K. (2011): Monitoring of Group A Rotaviruses in Wild-Living Birds in Hungary. *Avian Dis. Dig.* **6**: e30–e31.
- Vilibic-Cavlek T., Barbic L., Mrzljak A., Brnic D., Klobucar A., Ilic M., Janev-Holcer N., Bogdanic M., Jemersic L., Stevanovic V., Tabain I., Krcmar S., Vucelja M., Prpic J., Boljfecic M., Jelcic P., Madic J., Ferencak I., Savic V. (2021): Emerging and Neglected Viruses of Zoonotic Importance in Croatia. *Pathogens* **10**: 73.
- Vlasova A., Amimo J., Saif L. (2017): Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses* **9**: 48.
- Vrdoljak M., Gužvinec M., Trkulja V., Butić I., Ivić I., Krželj V., Tonkić M., Hegeduš Jungvirth M., Payerl Pal M., Tešović G. (2019): Distribution of rotavirus genotypes in three Croatian regions among children ≤5 years of age (2012–2014). *Int. J. Infect. Dis.* **89**: 3–9.
- Wani S. (2003): Detection of a mammalian-like group A rotavirus in diarrhoeic chicken. *Vet. Microbiol.* **94**: 13–18.
- Ward D. (2008): Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther. Clin. Risk*

Manag. **Volume 4**: 49–63.

Wickham H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. .

Wobeser G. A. (2007): Disease in Wild Animals. Dis. Wild Anim. Investig. Manag. Springer. pp:3-51.

Yang L., Tian D., Liu W. (2020): Strategies for vaccine development of COVID-19. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao **36**: 593–604.

<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rewg> (Pristupljeno 5.10.2020.)

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (Pristupljeno 5.10.2020.)

[www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html](http://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html) (Pristupljeno 10.10.2020.)

[www.ecured.cu/Rotavirus](http://www.ecured.cu/Rotavirus) (Pristupljeno 6.8.2020.)

[www.eurorotanet.com/wp-content/uploads/2019/09/EuroRotaNet\\_report-Sept\\_2019\\_v1.pdf](http://www.eurorotanet.com/wp-content/uploads/2019/09/EuroRotaNet_report-Sept_2019_v1.pdf). (Pristupljeno 29.11.2020.)

[www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/rota\\_info\\_surv\\_bulletin/en/](http://www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/rota_info_surv_bulletin/en/) (Pristupljeno 5.10.2020.)



## 8. ŽIVOTOPIS

Daniel Čolić rođen je 1996. godine u Zagrebu.

### Obrazovanje

2018-2021 Diplomski studij molekularne biologije

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska)

Diplomski rad: Genotipizacija rotavirusa A iz divljih životinja s područja  
Republike Hrvatske

2015–2018 Preddiplomski studij molekularne biologije

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska)

Sveučilišni prvostupnik molekularne biologije (univ.bacc.biol.mol)

Završni rad: Strategije ulaska virusa životinja u stanicu

### Radno iskustvo

09/2020-12/2020 Erasmus + stručna praksa

CIC bioGUNE, Derio (Španjolska)

09/2019–03/2020 Stručna praksa i izrada diplomskog rada

Hrvatski veterinarski institut, Zagreb (Hrvatska)

03/2019–07/2019 Stručna praksa

Klinika za infektivne bolesti "dr. Fran Mihaljević", Zagreb (Hrvatska)

### **Konferencije, prezentacije, poster, kongresna priopćenja:**

12/2020, Zagreb (Hrvatska): Zoonoze i bolesti koje se prenose vektorima u kontekstu "Jednog zdravlja"

11/2019, Zagreb (Hrvatska): Suvremene teme u odgoju i obrazovanju (STOO)

7/2019, Porto (Portugal): International Conference on Ethics Education (IAEE7)

5/2019, Zagreb (Hrvatska): Studentski bioetički simpozij: Znanost, etika i budućnost

### **Projekti**

2019-danas Rotaviruses in Croatian Ecosystem (Reco) - istraživački projekt na području virologije i epidemiologije

2018-2020 "U društvu mikroba" -edukacijski projekt osnovan od strane Hrvatskog mikrobiološkog društva

2016,2017 & 2019 "Noć biologije" -edukacijski projekt

### **Certifikati**

Potvrda o položenom Tečaju za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, A kategorija

### **Vještine**

jezici: hrvatski (materinji), engleski (C1), španjolski (B1)

računalne vještine: MS Office, programski jezik R, Mendeley reference management