

Molekularna karakterizacija Seewis orthohantavirusa iz rovki u Hrvatskoj

Mrmić, Stella

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:761032>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Stella Mrmić

**Molekularna karakterizacija Seewis
orthohantavirusa iz rovki u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2023

Ovaj rad je izrađen u Odjelu za znanstvena istraživanja Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, pod mentorstvom dr. sc. Ivan-Christiana Kuroлта, znanstvenog suradnika, te komentorstvom prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Prvenstveno zahvaljujem svome mentoru dr. sc. Ivan-Christianu Kuroltu na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju. Hvala Vam na svim stručnim savjetima, podršci, pomoći i prilici da steknem nova znanja i vještine.

Zahvaljujem se i svojoj komentorici prof. dr. sc. Martini Šerugi Musić na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i stručnim savjetima.

Neizmjereno hvala dr. sc. Barbari Anđelić Dmitrović na svojoj pomoći u svakom aspektu izrade ovog diplomskog rada i na svom utrošenom vremenu. Hvala ti za svaku riječ podrške, svaki savjet, strpljenje i dobru atmosferu. Hvala ti što si uvijek bila tu za sve. Još jednom ti veliko hvala na svemu!

Zahvaljujem se svima na Odjelu za znanstvena istraživanja na svakoj pomoći i dobroj atmosferi.

Hvala i svim mojim prijateljima koji su bili tu za mene uvijek kada je bilo potrebno.

Najveće hvala mojoj obitelji. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene i onda kada ja nisam. Hvala vam na безусловnoj ljubavi. Hvala vam što ste mi uvijek bili oslonac. Ne bih uspjela bez vas!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularna karakterizacija Seewis orthohantavirusa iz rovki u Hrvatskoj

Stella Mrmić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hantavirusi su virusi porodice *Hantaviridae* i reda *Bunyvirales* čiji genom čine tri jednolančana RNA segmenta koji se s obzirom na veličinu dijele na mali (S), srednji (M) i veliki (L) segment. U ovu porodicu spada i *Orthohantavirus seewisense* (SWSV) čiji je domaćin rovka, a ranije je pronađen u brojnim europskim zemljama uključujući i Hrvatskoj susjedne zemlje Sloveniju i Mađarsku. U ovom istraživanju korištena su tkiva devet jedinki rovki. U uzorcima tkiva rovki provjerena je prisutnost SWSV umnažanjem velikog ili L (engl. *large*) segmenta virusa, te je napravljena prva molekularna karakterizacija SWSV na području Hrvatske. SWSV je potvrđen u dvije od devet jedinki, a analiziranim jedinkama rovki pouzdano je određena vrsta korištenjem mitohondrijskih markera. Iz pozitivnih uzoraka vrsta *Sorex araneus* i *Neomys anomalus* uspješno je dobivena sekvenca S segmenta i djelomična sekvenca L segmenta. Utvrđena prisutnost SWSV u *Neomys anomalus* predstavlja jedan od rijetkih nalaza ovoga virusa u toj vrsti rovke. Nadalje, provedena je filogenetska analiza upotrebom Bayesian analize i metodom susjednog sparivanja, a na filogramima se uočava grupiranje sekvenci SWSV-a prema geografskoj rasprostranjenosti. Sekvence SWSV iz Hrvatske, očekivano, grupirale su se sa sekvencama iz geografski bliskih područja. Rezultati ovoga istraživanja daju podlogu za daljnja istraživanja ovoga virusa i njegove potencijalne patogenosti.

Ključne riječi: hantavirusi, RNA virus, filogenija, *Sorex araneus*, *Neomys anomalus*
(52 stranica, 14 slika, 11 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Ivan-Christian Kurolt, znanstveni suradnik

Komentor: Prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Prof. dr. sc. Maja Matulić

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Rad prihvaćen: 9.11.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Molecular characterization of Seewis orthohantavirus from shrews in Croatia

Stella Mrmić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hantaviruses are members of the family *Hantaviridae* and the order *Bunyvirales*, their genome consists of three single-stranded RNA segments categorized by size as small (S), medium (M), and large (L) segment. One of the members of this family is *Orthohantavirus seewisense* (SWSV) whose reservoir are shrews, and it has previously been detected in several European countries, including Slovenia and Hungary, countries neighboring Croatia. The tissues of nine shrews were used in this research. The presence of SWSV was confirmed in shrew tissue samples through the amplification of large (L) segment of the virus, and the first molecular characterization of SWSV in Croatia was performed. SWSV was confirmed in two out of nine shrew individuals, and the analyzed shrew species were reliably determined using mitochondrial markers. A sequence of the S segment and a partial sequence of the L segment were successfully obtained from the positive samples of the species *Sorex araneus* and *Neomys anomalus*. The confirmed presence of SWSV in *Neomys anomalus* in this research presents one of the rare findings of this virus in that shrew species. Moreover, phylogenetic analyses were performed by using Bayesian analysis and the Neighbor-joining method. The phylogenetic trees showed geographic-specific clustering of SWSV sequences. The SWSV sequences from Croatia were, as expected, grouped together with sequences from geographically close areas. The results of this research provide a basis for further investigations of this virus and its potential pathogenicity.

Keywords: hantaviruses, RNA virus, phylogeny, *Sorex araneus*, *Neomys anomalus*
(52 pages, 14 figures, 11 tables, 89 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: dr. sc. Ivan-Christian Kurolt, Scientific assistant
Co-mentor: dr. sc. Martina Šeruga Musić, Prof.

Reviewers:

Prof. Martina Šeuga Musić, PhD

Prof. Maja Matulić, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Thesis accepted: 9.11.2023.

Sadržaj:

| | |
|--|-----------|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1. Hantavirusi | 1 |
| 1.2. Ekologija hantavirusa | 3 |
| 1.3. Filogenija i taksonomija hantavirusa | 5 |
| 1.4. Hantavirusi u Republici Hrvatskoj | 7 |
| 1.5. <i>Orthohantavirus seewisense</i> (SWSV) | 8 |
| 1.5.1. Rezervoari virusa: porodica Soricidae..... | 9 |
| 1.5.2. Geografska rasprostranjenost i značajke porodice Soricidae u Hrvatskoj..... | 10 |
| 1.5.3. Filogenija SWSV..... | 11 |
| 2. Cilj istraživanja | 12 |
| 3. Materijali i metode | 13 |
| 3.1. Materijali | 13 |
| 3.1.1. Biološki uzorci | 13 |
| 3.1.2. Komercijalni kompleti..... | 13 |
| 3.1.3. Puferi i enzimi | 13 |
| 3.1.4. Uređaji..... | 14 |
| 3.1.5. Početnice | 14 |
| 3.1.6. Računalni programi i softveri..... | 15 |
| 3.1.7. Ostalo | 16 |
| 3.2. Metode | 17 |
| 3.2.1. Homogenizacija tkiva i izolacija ukupne RNA | 17 |
| 3.2.2. Mjerenje koncentracije | 17 |
| 3.2.3. Reverzna transkripcija..... | 17 |
| 3.2.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)..... | 18 |
| 3.2.5. Ugniježđena lančana reakcija polimerazom | 19 |
| 3.2.6. Gel elektroforeza | 21 |
| 3.2.7. Pročišćavanje produkata reakcije PCR..... | 21 |
| 3.2.8. Reakcija <i>BigDye Terminator v1.1/v3.1</i> | 21 |
| 3.2.9. Pročišćavanje reakcije <i>BigDye Terminator v1.1/v3.1</i> prije sekvenciranja | 22 |
| 3.2.10. Sekvenciranje i filogenetske analize | 22 |
| 4. Rezultati | 24 |

| | |
|--|----|
| 4.1. Određivanje vrsta rovki | 24 |
| 4.2. Određivanje prisutnosti SWSV u rovkama | 25 |
| 4.2.1. Određivanje prisutnosti SWSV u rovkama metodom PCR "pan-hantavirus" | 25 |
| 4.2.2. PCR reakcije za dobivanje sekvenci S i M segmenta..... | 26 |
| 4.3. Molekularna karakterizacija i filogenetička analiza SWSV | 28 |
| 4.3.1. Filogenetska analiza sekvenci L segmenta..... | 28 |
| 4.3.2. Filogenetska analiza sekvenci S segmenta | 31 |
| 5. Rasprava | 37 |
| 6. Zaključak | 43 |
| 7. Literatura | 44 |

KRATICE

ANDV – *Orthohantavirus andesense*

ARRV – Ash River virus

BV-BRC – *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center*

CBNV – *Orthohantavirus caobangense*

COI – citokrom C oksidaza podjedinica 1

CYTB – citokrom B

DOBV – *Orthohantavirus dobravaense*

EN – endemska nefropatija

HPS – hantavirusni plućni sindrom

HTNV – *Orthohantavirus hantanense*

HVBS – hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom

JJUV – *Orthohantavirus jejuense*

JMSV – Jamez Spring virus

NCBI – Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*)

NJ – metoda susjednog sparivanja (engl. *Neighbor joining*)

ORF – otvoreni okvir čitanja (engl. *open reading frame*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PUUV – *Orthohantavirus pumalaense*

RdRp – RNA polimeraza ovisna o RNA (engl. *RNA dependent RNA polymerase*)

SNV – *Orthohantavirus sinnombreense*

SWSV – *Orthohantavirus seewisense*

TGNV – *Orthohantavirus tagaense*

TPMV – *Orthohantavirus thottapalayamense*

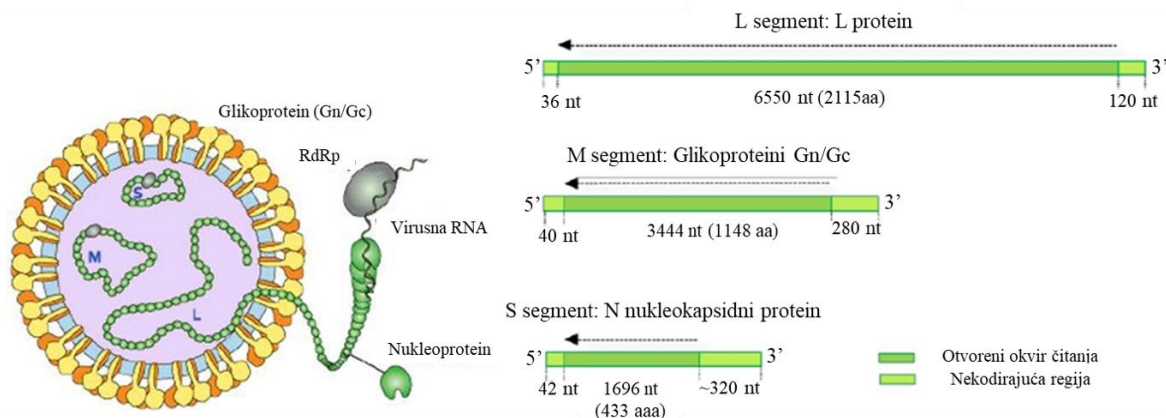
TULV – *Orthohantavirus tulaense*

1. Uvod

1.1. Hantavirusi

Hantavirusi su virusi porodice *Hantaviridae* i reda *Bunyvirales* (Ling 2018). Čestice hantavirusa veličine su 80-120 nm, sferičnog oblika te posjeduju lipidnu ovojnicu. Na površini čestice nalaze se glikoproteini koji tvore tetramere (Gn) i dimere (Gc). (Krüger i sur. 2011). Genom ovih virusa čini jednolančana RNA negativnog smisla, a dijeli se na tri segmenta (Slika 1.). Mali ili S (engl. *small*) segment kodira gen za nukleokapsidni protein koji obavija virusnu RNA i tvori ribonukleoprotein. Srednji ili M (engl. *medium*) segment kodira gen za glikoproteinski prekursor iz kojeg posttranslacijskom modifikacijom nastaju dva površinska glikoproteina (Gn i Gc), za prepoznavanje receptora domaćina. Receptori nepatogenih virusa su $\beta 1$ integrini, a kod patogenih virusa to su $\beta 3$ integrini. S obzirom da u stanicama koje nemaju $\beta 3$ integrine može doći do zaraze smatra se da to nisu jedini receptori na koje se vezuju glikoproteini virusa. Veliki ili L (engl. *large*) segment kodira gen za RNA polimerazu ovisnu o RNA (engl. *RNA dependent RNA polymerase*, RdRp), odgovornu za prepisivanje i replikaciju (Jonsson i sur. 2010). L segment je najkonzerviraniji od tri segmenta (Lwande i sur. 2020), Kod nekih hantavirusa, primjerice *Orthohantavirus pumalaense* (PUUV), utvrđeno je da se nestrukturani proteini kodiraju i na S segmentu (Ronnberg i sur. 2012). Funkcija tih proteina za sada nije poznata.

Rod hantavirusa karakterizira sekvenca visoko konzerviranih i komplementarnih terminalnih nukleotida na trima segmentima koji stvaraju strukturu ukosnice. Takva struktura važna je za prepisivanje i replikaciju. S obzirom na posebnost takve strukture u odnosu na druge rodove, 1986. godine izdvojen je u poseban rod (Schmaljohn i Dalrymple 1983; Krajinović 2007).



Slika 1. Struktura i genom hantavirusa. Preuzeto i prilagođeno iz Sanfeliu 2012.

Današnja virologija hantavirusa započela je još u prošlom stoljeću kada su izbile dvije epidemije bolesti koje dovode do otkrića ovih virusa. Prva veća epidemija bolesti dogodila se u Korejskom ratu (1950.-1953.) kada su se vojnici iz više od 3000 četa razboljeli od hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom (HVBS) (Jonsson i sur. 2010). Uzročnik ove bolesti *Orthohantavirus hantanense* (HTNV) otkriven je 1978. godine, a njegov rezervoar bio je *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) (Rodentia; Muridae) (Lee i sur. 1978). To otkriće potaknulo je utvrđivanje drugih virusa koji se vežu za HVBS u Europi i Aziji. Tako je utvrđen i *Orthohantavirus dobravaense* (DOBV) u *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) (Rodentia; Muridae), te PUUV u *Myodes glareolus* (Schreber, 1780) (Rodentia; Cricetidae), koji je uzročnik endemske nefropatije (EN). EN je slabiji oblik HVBS opisan 1930.-ih. Do 1993. godine smatralo se da su hantavirusi endemični za Europu i Aziju, međutim, tada je izbila prva epidemija u “novom svijetu” u regiji Four Corners u SAD-u, te je bolest nazvana „*Four Corners*“. Danas je poznata kao hantavirusni plućni sindrom (HPS). Utvrđeno je da je uzročnik HPS-a *Orthohantavirus sinnombreense* (SNV) (Jonsson i sur. 2010).

Thottimvirus thottapalayamense (TPMV) je prvi hantavirus izoliran iz rovk. Izoliran je iz jedinke vrste *Suncus murinus* (Linnaeus, 1766) (Eulipotyphla; Soricidae), ulovljene 1964. godine u blizini Vellore u Tamil Nadu, Indiji (Carey i sur. 1971; Zeller i sur. 1989). Dug vremenski period ostao je neklasificiran jer se nije znalo je li došlo do slučajnog prijenosa virusa s glodavca, koji su tada smatrani isključivi domaćini hantavirusa, na rovk (tzv. „*Spillover*“ efekt) ili je rovk domaćin TPMV-a. U odnosu na hantaviruse koje prenose glodavci pokazuje najveću genetsku divergenciju (Song i sur. 2007a). Otkriće ovoga virusa u rovkama dokazalo je da glodavci nisu jedini rezervoari hantavirusa (Schlegel i sur. 2012).

Drugi virus kojeg prenose rovke utvrđen je 2007. godine. *Orthobunyavirus tangaense* (TGNV) otkriven je u vrsti *Crocidura theresae* (Heim de Balsac, 1968) (Eulipotyphla; Soricidae) (Klempa i sur. 2007). Nakon toga otkrića zabilježeno je još hantavirusa u rodu *Crocidura*. Hantavirus zabilježen u vrsti *Scalopus aquaticus* (Linnaeus, 1758) (Talpidae; Eulipotyphla) pokazuje usku povezanost s hantavirusom zabilježenim u vrstama roda *Crocidura* što ukazuje na njihovu složenu evolucijsku prošlost (Schlegel i sur. 2012). Kasnije su zabilježeni i drugi virusi koje prenose rovke, primjerice Boginia virus u vrsti *Neomys fodiens* (Pennant, 1771), *Orthohantavirus jejuense* (JJUV) u vrsti *Crocidura shantungensis*, *Orthohantavirus asikkalaense* (ASIV) u vrsti *Sorex minutus*

(Linnaeus, 1766), *Orthohantavirus kenkemeense* (KKMV) u vrsti *Sorex roboratus* (Hollister, 1913), *Orthohantavirus seewisense* (SWSV) u vrsti *Sorex araneus* (Linnaeus, 1758) (Lee i sur. 2020).

Do danas je zabilježen 21 hantavirus koji može uzrokovati bolesti u ljudi, dok velik broj ostaje neotkriven i neprijavljen, posebno u državama Afrike i na Bliskom Istoku (Jonsson i sur. 2010). Neki od hantavirusa čiji su rezervoari glodavci mogu uzrokovati HVBS ili HPS kod ljudi, dok patogeni potencijal hantavirusa čiji su rezervoari krtice, rovke i šišmiši još nije poznat (Ling i sur. 2014). Godišnje se u Europi prijavi oko 10000 slučajeva bolesti uzrokovanih hantavirusima (Lee i sur. 2020). Dok kod ljudi mogu uzrokovati simptomatske bolesti, kod životinjskih prenositelja uzrokuju kronične infekcije bez simptoma (Krüger i sur. 2011). S druge strane, istraživanje Childs i sur. (1989) pokazuje kako kod jedinki vrste *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Rodentia, Muridae) zaraženih *Orthohantavirus seoulense* (SEOV) dolazi do sporijeg rasta. Također, istraživanje Douglass i sur. (2007) pokazuje sporiji rast jedinki vrste *Peromyscus maniculatus* (Wagner, 1845) (Rodentia; Cricetidae) zaraženih SNV virusom.

1.2. Ekologija hantavirusa

Hantavirusi, za razliku od drugih virusa reda *Bunyvirales*, nemaju člankonožnog vektora (Gu i sur. 2014). U prirodi se patogeni hantavirusi prenose izravno ili neizravno udisanjem aerosola fekalija, urina, sline ili ugrizom zaražene životinje (Radosa i sur. 2013). Do sad je dokazan horizontalni prijenos, a vertikalni prijenos nije prisutan ni u prirodi ni u eksperimentalnim uvjetima (Schmaljohn i Hjelle 1997). Ljudi su slučajni i „krajnji“ domaćin, tj. Ne prenose virus s iznimkom *Orthohantavirus andesense* (ANDV) koji se prenosi s čovjeka na čovjeka (Krüger i sur. 2011).

Dugo vremena se smatralo da su rezervoari hantavirusa isključivo glodavci iako su u Rusiji i na prostorima bivše države Jugoslavije detektirani antigeni hantavirusa u tkivu rovki i krtica iz reda Eulipotyphla i porodice Soricidae i Talpidae (Gavrilovskaya i sur. 1983; Gligic i sur. 1992).

Rezervoari većine hantavirusa su glodavci, a iako mogu biti karakteristični za jednu vrstu, uglavnom su im domaćini srodne vrste. Tako su primjerice neki od rezervoara *Orthohantavirusa tulaense* (TULV), glodavci *Microtus arvalis* (Pallas, 1779) i *Arvicola amphibius* (Linnaeus, 1758) (Rodentia; Cricetidae) (Klempa i sur. 2013). Rezervoari hantavirusa također mogu biti i kukcojedi iz porodica Soricidae i Talpidae. Primjer takvih virusa su: Ash River virus (ARRV), *Orthohantavirus caobangense* (CBNV), Jamez Spring virus (JMSV) (Song i sur. 2007b). Nedavna

istraživanja pokazuju kako rezervoari mogu biti i šišmiši, primjerice Magboi virus u *Nycteris hispida* (Schreber, 1775) (Nycteridae) i Mouyassue virus u *Neromicia nanus* (Peters, 1825) (Vespertillionidae) (Radosa i sur. 2013). Istraživanje Shi i sur. (2018) pokazuje sekvence slične onima hantavirusa u ribama i gmazovima.

Geografska rasprostranjenost hantavirusa ovisna je o rasprostranjenosti njihova domaćina. Hantavirusi su zabilježeni od Europe, Afrike, Azije do Sjeverne i Južne Amerike (Slika 2.) (Plyusnin i sur. 1996). Dijele se na viruse „starog“ i „novog“ svijeta: te dvije skupine virusa razlikuju se prema geografskoj rasprostranjenosti životinje koja prenosi virus i tipu bolesti koje uzrokuju kod ljudi, odnosno HVBS i HPS. Ove dvije skupine dijele neka svojstva, primjerice životni ciklus (prenose se na isti način, zaražavaju ljude, rezervoari su većinom glodavci) i visoku homologiju organizacije nukleinskih sekvenci (Jonsson i sur. 2010).

Rezervoari virusa “starog svijeta”, koji su rasprostranjeni kroz Europu, Aziju i Afriku, glodavci su iz rodova *Apodemus*, *Arvicola*, *Microtus*, *Myodes* i *Rattus*, te kukcojedi porodica Soricidae i Talpidae. Rezervoari virusa “novog svijeta”, koji su rasprostranjeni kroz Sjevernu i Južnu Ameriku, uglavnom su potporodice Neotominae, Sigmodontinae, Murinae i porodica Soricidae i Talpidae (Guo i sur. 2013).



Slika 2. Geografska rasprostranjenost hantavirusa. Preuzeto iz Krajinović 2007.

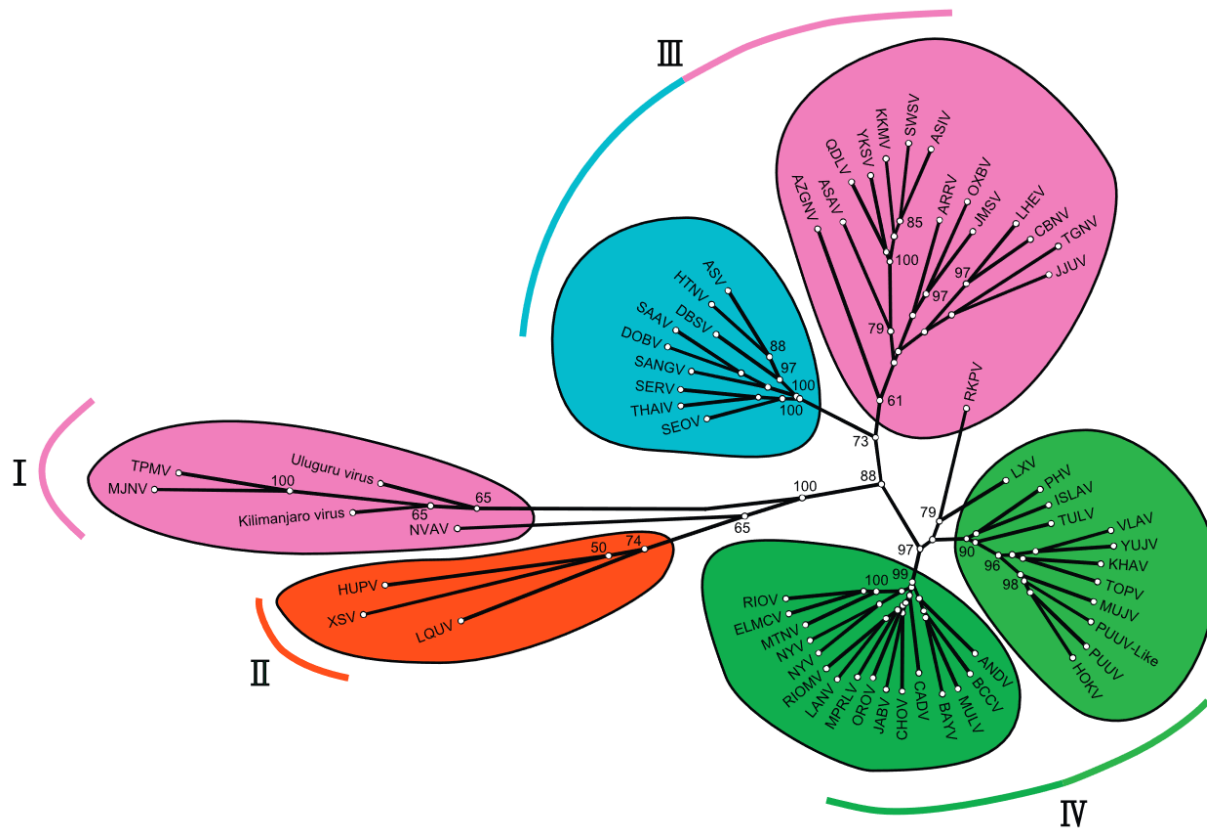
1.3. Filogenija i taksonomija hantavirusa

Porodica *Hantaviridae* dijeli se u četiri potporodice: *Actantavirinae*, *Agantavirinae*, *Mammantavirinae* i *Rapantavirinae*. S obzirom na divergenciju kodirajućih regija S i M segmenta potporodica *Mammantavirinae* dijeli se na četiri roda: *Loanvirus*, *Mobatvirus*, *Orthohantavirus* i *Thottimviurs*. Domaćini te potporodice su šišmiši, rovke, glodavci i krtice (Arai i Yanagihara 2020). Istraživanje Shi i sur. (2018) pokazuje sekvence slične onima hantavirusa u ribama i gmazovima. Ti novootkriveni hantavirusi, čiji su domaćini ribe, svrstani su u potporodice *Actantavirinae* i *Agantavirinae*, a hantavirusi čiji su domaćini gmazovi u potporodicu *Rapantavirinae* (Arai i Yanagihara 2020).

Dosadašnje analize pokazale su da je genetska raznolikost hantavirusa uglavnom rezultat genskog pomaka (engl. *genetic drift*) gdje dolazi do delecija i/ili insercija te nakupljanja nukleotidnih supstitucija. S obzirom na njihov genom sastavljen od tri segmenta ovi virusi podliježu i preslagivanju (engl. *reassortment*) i rekombinaciji između istih segmenata dviju vrsta. Kod hantavirusa ovaj tip promjene događa se između virusa iste vrste (Klempa 2018). Li i sur. (1995) pokazuju da se takva promjena događa i kod SNV; odnosno usporedbom S i M segmenta dvaju izolata virusa uočavaju kako se M segmenti razlikuju 1%, a S segmenti čak 13%. Ovakva promjena dokazana je u nekoliko virusa, primjerice: PUUV, DOBV i SWSV. Utvrđen je i rearanžman između virusa različitih vrsta i linija. Primjerice Ape Aime-Itapua virus (AAIV) nalazi se u istoj filograpi s Jabora virusom (JABV), ali M segment AAIV pokazuje usku povezanost s Pergamino virusom. Takva pojava je rjeđa, ali igra ulogu u prijelazu virusa na drugu vrstu domaćina jer upravo promijenjeni M segment može omogućiti zarazu novog domaćina (Klempa 2018).

U početku se smatralo da hantavirusi imaju samo jednog domaćina, stoga su bili raspodijeljeni u tri glavne filogenetske grupe s obzirom na to koja ih potporodica glodavaca prenosi (Arvicollinae, Murinae i Sigmodontinae) (Plyusnin i sur. 1996). To je dovelo do teorije da virusi ko-evoluiraju sa svojim domaćinima. Otkrićem novih rezervoara hantavirusa i filogenetskim analizama pokazano je kako ta teorija vjerojatno nije točna (Gu i sur. 2014). TPMV je prvi otkriveni hantavirus kojeg ne prenose glodavci. Istraživanje Song i sur. (2007a) pokazuje da se ovaj virus odvaja u zasebnu filogrupu od hantavirusa čiji su rezervoari glodavci.

Prema Guo i sur. (2013) hantavirusi se dijele u četiri filogrupe s obzirom na divergenciju S segmenta (Slika 3.). Filogrupu I čine hantavirusi čiji su domaćini porodica Soricidae te se sastoji od TPMV i Imijin virus (MJNV). Filogrupa I nalazi se na bazalnoj poziciji filogenetskog stabla. Filogrupu II čine hantavirusi čiji su domaćini šišmiši, npr. Huangpi virus (HUPV) i *Loanvirus longquanense* (LQUV). Filogenetske analize pokazuju kako svi hantavirusi, čiji su domaćini šišmiši, dijele zajedničkog pretka. Filogenetske analize podržavaju to da su šišmiši, rovke ili krtice prvi hantavirusni domaćini iz razreda sisavaca (Arai i Yanagihara 2020). Filogrupu III čine hantavirusi čiji su rezervoari kukcojedi i potporodica Murinae. Filogrupa II i III može se podijeliti u podgrupe IIa i IIb te IIIa i IIIb. Filogrupu IV čine hantavirusi čiji su rezervoari potporodice Arvicolinae, Neotominae i Sigmodontinae. Filogenetsko stablo temeljeno na M segmentu pokazuje veoma sličnu topologiju filogenetskom stablu temeljenom na S segmentu. Oba filogenetska stabla ukazuju na 4 filogrupe. Jedina velika razlika je što se u filogenetskom stablu temeljenom na M segmentu na bazalnoj poziciji nalazi filogrupa II. Takva pozicija ukazuje na moguće rearanžmane među hantavirusima filogrupe I i II. Prema filogenetskoj analizi sekvenci L segmenta hantavirusi podijeljeni su u pet filogrupa. Filogrupa II se podijelila na podgrupu kojoj pripadaju Mouyassuc virus, *Mobatvirus novaense* (NVAV) i Altai virus, te drugu podgrupu kojoj pripada virus LQUV (Guo i sur. 2013). Raspodjela hantavirusa u filogrupe odgovara njihovim rezervoarima, uz nekoliko iznimki. Te iznimke vjerojatno su rezultat prijenosa virusa s jedne vrste na drugu (engl. „*Spillover*“) (Castel i sur. 2017). Filogrupi I pripadaju virusi uglavnom iz Azije, filogrupi II virusi iz Azije i Europe, filogrupi III virusi iz Azije, Europe, Sjeverne Amerike i Afrike, a filogrupi IV virusi iz Azije, Europe i Sjeverne Afrike. Genetska raznolikost unutar pojedine grupe može biti rezultat geografske rasprostranjenosti (Avšić-Županc i sur. 2019).



Slika 3. Filogenetsko stablo temeljno na S segmentu. Ružičasta predstavlja viruse čiji su rezervoari kukcojedi (LHEV, Lianghe virus; OXBV, *Orthohantavirus oxobowense*; YKSV, *Orthohantavirus yakeshiense*; QDLV, *Quando lake virus*; ASAV, *Orthohantavirus asamaense*; AZGNV, Azagny virus), crvena boja viruse čiji su rezervoari šišmiši (XSV, *Mobatvirus yuansonense*; LQUV), plava boja viruse čiji su rezervoari potporodica Murinae (ASV, Amur-Soochong virus; DBSV, *Orthohantavirus dabieshanense*; SAAV, Saaremaa virus; SANGV, *Orthohantavirus sangassouense*; SERV, Serang virus; THAIV, *Orthohantavirus thailandense*), a zelena boja viruse čiji su rezervoari potporodica Arvicolinae (RIOMV, Rio Mamore virus; ELMCV, *Orthohantavirus moroense*; MTNV, *Orthohantavirus montanoense*; LANV, *Orthohantavirus nagraense*; OROV, Playa de oro virus; JABV; CHOV, *Orthohantavirus chocloense*; CADV, *Orthohantavirus delgaditoense*; BAYV, *Orthohantavirus bayoui*; MULV, Muleshoe virus; BCCV, *Orthohantavirus nigrorivense*; LXV, *Orthohantavirus luxiense*; ISLAV, Isla Vista virus; VLAV, Vladivostok virus; YUJV, Yuanjiang virus; KHAV, *Orthohantavirus khabarovskense*; TOPV, Topografov virus; MUJV, Muju virus; HOKV, Hokkaido virus). Preuzeto iz Zhang 2014.

1.4. Hantavirusi u Republici Hrvatskoj

U Hrvatskoj prvi slučaj HVBS-a odnosi se na četiri slučaja endemske nefropatije iz 1953. godine, do tada zabilježene samo u skandinavskim državama (Radošević i Mohaček 1954). U Hrvatskoj je 1967. godine na Plitvičkim jezerima izbila prva epidemija HVBS-a. Tada je oboljelo 14 šumskih radnika, a kasnije se utvrdilo da su uzročnici bolesti bili virusi slični PUUV ili HTNV. Sljedeća veća epidemija dogodila se tijekom Domovinskog rata (1995.) kada je zabilježeno 125 oboljelih. Najveća epidemija HVBS-a u Hrvatskoj dogodila se 2002. godine. Takve epidemije pojavljuju se u razmacima otprilike od pet do sedam godina s povremenim pojedinačnim slučajevima u vremenu

između epidemija (Krajinović 2007). Od 2014. godine epidemije HVBS-a su se pojavljivale svake dvije do tri godine. Značajna promjena ekologije uzrokovana je vanjskim čimbenicima poput klime i uroda bukve (Tadin i sur. 2016; Lovrić i sur. 2018; Cekinović Grbeša i sur. 2023). Također u istraživanju Scharninghausen i sur. (2002) pokazuju prisustvo i nepatogenog TULV u vrstama *Microtus arvalis* (Rodentia; Cricetidae) i *Microtus agrestis* (Linnaeus, 1761) (Rodentia; Cricetidae) čime potvrđuju prisutnost TULV u vrsti *Microtus agrestis* po prvi put.

1.5. Orthohantavirus seewisense (SWSV)

SWSV pripada hantavirusima iz porodice *Hantaviridae* čiji su rezervoar rovke. Građa genoma SWSV istovjetna je građi genoma ostalih hantavirusa. S segment SWSV ima i dodatni otvoreni okvir čitanja koji kodira za nukleokapsidni protein na pozitivnom lancu (Schlegel i sur. 2012). Ovaj virus prvi puta je zabilježen u jetri vrste *Sorex araneus* u Švicarskoj 2006. godine (Song i sur. 2007b). Filogenetske analize su pokazale da je usko povezan s CBNV koji zaražava *Anourosorex squamipes* (Soricidae), a da se razlikuje od hantavirusa koje prenose glodavci (Resman i sur. 2013). Iako je SWSV pronađen i u vrstama *Neomys anomalus* (Cabrera, 1907), *Sorex daphaenodon* (Thomas, 1907), *Sorex minutus* i *Sorex tundrensis* (Merriam, 1900) njegov domaćin je uglavnom *Sorex araneus* što bi moglo upućivati na to da je ta vrsta primarni domaćin dok je u ostalim vrstama došlo do prijenosa zaraze (Resman i sur. 2013; Lee i sur. 2020). U Hrvatskoj je SWSV detektiran na lokalitetu PP Medvednica u jedinki vrste *Sorex araneus* (Ling i sur. 2018).

Patogeni potencijal SWSV nije dobro istražen zbog nedostatka virusnog izolata (Ling i sur. 2014). Iako preliminarna istraživanja pokazuju da bi hantavirusi, čiji su rezervoari porodica Soricidae, mogli biti patogeni i dalje nema dokaza za to. Populacije takvih domaćina su manje od onih glodavaca što smanjuje mogućnost dolaska u kontakt s izlučevinama zaraženih životinja (Radosa i sur. 2013; Resman i sur. 2013).



Slika 4. Šumska rovka *Sorex araneus*. Preuzeto sa: <https://www.biol.umk.pl/en/news/?id=26226>.

1.5.1. Rezervoari virusa: porodica Soricidae

Porodica Soricidae pripada redu Soricomorpha. Sadrži tri potporodice: Crocidura, Myosoricinae i Soricinae. Sastoji se i od 26 rodova. Ova porodica rasprostranjena je kroz Euroaziju, Afriku, Sjevernu i dijelom Južnu Ameriku. Nema je na arktičkim otocima, Islandu, nekim pacifičkim otocima i Australiji. Jedinke ove porodice uglavnom nastanjuju vlažna područja, ali ih se može naći i u suhim područjima. Uglavnom su kopnene životinje, ali pojedine vrste vezane su uz vodu, a neke se i zakopavaju. Životni vijek im je 12-18 mjeseci. Ova porodica je široko rasprostranjena, a pojedini rodovi se razlikuju prema rasprostranjenosti i ekologiji (Nowak 1991).

Vrste roda *Crocidura* obitavaju u vlažnim ili suhim šumama, travnjacima, kultiviranim površinama i ponekad u zgradama (Nowak 1991). *Crocidura leucodon* (Hermann, 1780) rasprostranjena je kroz Europu i zapadnu Aziju, a nije prisutna na području južne Francuske i mediteranskih otoka. Nastanjuje poljoprivredna, urbana područja, travnjake, šumska, vlažna ili suha područja. U zapadnoj Francuskoj nastanjuje vlažna područja, a u jugoistočnoj Europi planine i uglavnom vlažna staništa, potoke i rijeke. *Crocidura sualveolens* (Pallas, 1881) rasprostranjena je od Atlantske obale do Japana. Pronalazi se u zapadnoj Francuskoj, Poljskoj, Italiji i u jugoistočnoj Europi. Također nastanjuje šumska i urbana područja te suha ili vlažna (Mitchell-Jones 1999).

Vrste roda *Neomys* često obitavaju i na kopnu, ali većinom ih se može naći u blizini vode (Nowak 1991). *Neomys anomalus* rasprostranjena je kroz kontinentalnu Europu i dijelom Mediterana. Uglavnom nastanjuje područja umjerene klime. Stanište su joj vegetacija stajaćica, močvara, potoka i rijeka te vlažne šume. U trenutcima manjka hrane na navedenim staništima može nastanjivati i kopnena staništa. *Neomys fodiens* rasprostranjena je od Ujedinjenog Kraljevstva i Skandinavije do Sibira. Nastanjuje planinska područja poput Alpa i Pirineja, priobalna staništa, npr. jezera, rijeka i močvara, te vlažne šume i travnjake (Mitchell-Jones 1999).

Vrste roda *Sorex* nastanjuju umjerena i arktička područja sjeverne polutke. Žive u različitim vegetacijama, ali uglavnom na vlažnim područjima (Nowak 1991). *Sorex alpinus* (Schinz, 1837) endemična je za Europu. Rasprostranjena je kroz Alpe, Dinaride i Karpat. Uglavnom živi na planinskim područjima i do 2500 m. U nizinama nastanjuju hladna i vlažna područja, a u šumama vlažna i sjenovita mjesta. *Sorex araneus* je široko rasprostranjena i najbrojnija je od svih vrsta ove porodice. Rasprostranjena je diljem Europe osim Irske, većine Francuske i mediteranske zone. Nastanjuje područja s minimalnim pokrovom, travnjake, šume, živice te jame. (Mitchell-Jones 1999). Klasificira se u 5 filogrupa: Zapadno europska, Sjeverno europska, Istočno europska, Valais i Sibirijaska (Ling i sur. 2018). Kao rezultat široke rasprostranjenosti ove vrste i SWSV se može pronaći u mnogo različitih država (Resman i sur. 2013). *Sorex minutus* rasprostranjena je kroz Euroaziju od Portugala do Sibirije uz iznimke nekih otoka i Škotske. Nastanjuje različita staništa: močvare, livade, planinske šume (Mitchell-Jones 1999).

Vrste roda *Suncus* obitavaju u šumama, kultiviranim poljima ili ljudskim staništima (Nowak 1991). *Suncus etruscus* (Savi, 1822) rasprostranjena je kroz Portugal, Maroko, Arabiju, Italiju. Uglavnom nastanjuje Mediteran. Nastanjuje travnjake, maslinike, vinograde, otvorene šume, močvare, vrtove i gradove (Mitchell-Jones 1999).

1.5.2. Geografska rasprostranjenost i značajke porodice Soricidae u Hrvatskoj

U Hrvatskoj su rasprostranjena četiri roda porodice Soricidae: *Crocidura*, *Neomys*, *Sorex* i *Suncus*. Iz roda *Crocidura* zabilježene su dvije vrste: *Crocidura leucodon* (rasprostranjena je kroz cijelu Hrvatsku osim nekih otoka) i *Crocidura suaveolens* (rasprostranjena je kroz cijelu Hrvatsku). Također zabilježene su 2 vrste roda *Neomys*: *Neomys anomalus* (rasprostranjena je kroz cijelu Hrvatsku) i *Neomys fodiens* (rasprostranjena je kroz gorski i kontinentalni dio Hrvatske). U

Hrvatskoj su prisutne i tri vrste roda *Sorex*: *Sorex alpinus* (rasprostranjena je kroz Gorski kotar, Liku, Dalmaciju te dijelom kontinentalnu Hrvatsku), *Sorex araneus* (rasprostranjena je kroz gorski i kontinentalni dio Hrvatske), *Sorex minutus* (rasprostranjena je kroz cijelu Hrvatsku), te jedna vrsta roda *Suncus*: *Suncus etruscus* (rasprostranjena je kroz Istru, Gorski kotar, Liku i Dalmaciju) (IUCN 2022).

1.5.3. Filogenija SWSV

Filogenetskim analizama pokazano je da SWSV pripada filogrupi II, odnosno podgrupi IIB. Filogrupi IIB pripadaju i: *Orthohantavirus boweense* (BOWW), CBNV, JJUV i KKMV (Castel i sur. 2017). Ovu filogrupu čine virusi čiji su rezervoari kukcojedi kao i filogrupu I. Unatoč tome ova filogrupa dijeli novije pretke s grupom hantavirusa čiji su domaćini potporodica Muridae (filogrupa IIA), umjesto očekivane srodnosti s filogrupom I (Plyusnin i Sironen 2014). To se može objasniti i drukčijom evolucijom virusa pojedinih filogrupa. Virus filogrupe IIB vjerovatno su rezultat horizontalnog prijenosa hantavirusa između glodavaca i kukcojeda (Castel i sur 2017). Filogenetske analize sekvenci SWSV-a pokazale su nisku varijabilnost sekvenci unutar određene filogrupe koju čine sekvence iz iste države, te visoku raznolikost između određenih filogrupa. To ukazuje na dugu evoluciju u izoliranim populacijama *Sorex*. Dokazana je i široka distribucija SWSV-a u *Sorex araneus* u Europi i Rusiji. Filogenetske analize su pokazale da se sojevi SWSV genetski razlikuju u ovisnosti o distribuciji, moguće kao rezultat filogeografije *Sorex araneusa* (Schlegel i sur. 2012). Molekularna karakterizacija ovog virusa u Hrvatskoj još nije provedena.

2. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. utvrditi vrste rovki iz hrvatskih izolata pomoću mitohondrijskih markera, gena za citokrom B (*CTYB*) i gena za podjedinicu 1 citokrom C oksidaze (*COI*)
2. detektirati i potvrditi prisutnost SWSV u organima rovki umnažanjem gena za S, M i L segment virusa
3. genetskim i filogenetskim analizama usporediti SWSV izoliran iz hrvatskih uzoraka s ranije zabilježenim varijantama na području Europe što predstavlja prvu molekularnu karakterizaciju SWSV-a na području Hrvatske

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Biološki uzorci

U istraživanju su korišteni organi 9 različitih rovki koje su slučajno prikupljene tijekom izlova šumskih glodavaca na odabranim lokalitetima u Hrvatskoj u razdoblju od 2003. do 2017. godine (Tablica 1). Izlov su napravili djelatnici Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije, Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje u sklopu drugih znanstvenih i stručnih projekata. Nakon izlova djelatnici Veterinarskog fakulteta, Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom su sekcijom jedinkama odvojili sljedeće organe: pluća, bubreg, slezena, crijeva, jetra. Uzorci su zatim pohranjeni na -80°C do daljnjih analiza.

Tablica 1. Jedinke rovki prikupljeni na različitim lokalitetima u Hrvatskoj.

| Oznaka uzorka | Lokalitet ulova | GPS koordinate | Datum ulova |
|---------------|-----------------|-----------------------|-------------|
| M-528 | Ivanić Grad | N45 38.134 E16 26.011 | 10.06.2003. |
| M-1390 | Sljeme | N45 54.453 E15 58.058 | 17.07.2013. |
| M-1650 | Plitvice | N44 52.186 E15 36.017 | 17.07.2014. |
| M-1824 | Stara Gradiška | N45 11.866 E17 09.268 | 21.06.2016. |
| M-1825 | Stara Gradiška | N45 11.866 E17 09.354 | 21.06.2016. |
| M-1971 | Sunja | N45 24.363 E16 43.719 | 27.09.2016. |
| M-1993 | Čakovec | N46 21.087 E16 23.277 | 07.10.2016. |
| M-2150 | Lipovljani | N45 22.044 E16 52.631 | 26.10.2017. |
| M-2115 | Koprivnica | N46 11.405 E16 50.826 | 13.10.2017. |

3.1.2. Komercijalni kompleti

- *AccuPrep PCR/Gel Purification Kit* (Bioneer, Koreja)
- *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems od Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.1.3. Pufferi i enzimi

- *Hot Start Polymerase* 5U/ μ L (Jena Bioscience Gmbh, Njemačka)
- *10x Crystal Buffer* (Jena Bioscience Gmbh, Njemačka)
- *10x Ruby Buffer* (Jena Bioscience Gmbh, Njemačka)
- 1x TAE pufer
- *Exonuclease I* 20 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* 1 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- *M-MLV Reverse Transcriptase* 200 U/ μ L (Promega, Winsconsin, SAD)
- *M-MLV RT 5x Buffer* (Promega, Winsconsin, SAD)
- *Recombinant Ribonuclease Inhibitor* 40 U/ μ L (Promega, Winsconsin, SAD)

3.1.4. Uređaji

- *MagNA Lyser* (Roche Diagnostics Gmbh, Njemačka)
- analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- *Eppendorf 5424R* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- *CLARIOstar* (Bmg labtech, Njemačka)
- *ProFlex PCR System* (Applied Biosystems od Life Technologies, Singapur)
- *omniDOC Gel Documentation System* (Clever Scientific Ltd, UK)
- *proBLUEVIEW Dual LED Blue/White Light Transilluminator* (Clever Scientific Ltd, UK)
- *3500 Genetic Analyzer* (Applies Biosystems od Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.1.5. Početnice

Početnice korištene u PCR reakcijama navedene su u Tablici 2 i 3.

- Nasumične početnice (Promega, Wisconsin, SAD), 500 μ g/mL

Tablica 2. Početnice korištene za određivanje vrste rovkli.

| Početnica | Sekvenca (5'-3') | Genetski marker | Izvor |
|-----------|------------------------------------|-----------------|----------------------|
| L14771 | CAACATTCGTAAAACCCACC | <i>CYTb</i> | Irwin i sur. 1991 |
| H15149 | AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA | <i>CYTb</i> | Irwin i sur. 1991 |

Tablica 2. Nastavak

| | | | |
|---------|----------------------------|------------|-----------------------|
| LCO1490 | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG | <i>COI</i> | Folmer i sur. 1994 |
| HCO2198 | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA | <i>COI</i> | Folmer i sur. 1994 |

Tablica 3. Početnice za umnažanje S, M i L segmenata SWSV.

| Početnica | Sekvenca (5'-3') | Segment | Izvor |
|--------------|----------------------------|---------|----------------------|
| SWSV-22-fw | GCATACTACGAAACAGAGAGC | S | Schlegel i sur. 2012 |
| SWSV-22-962F | TGGGTMTTYGCRGGWGCACCTGA | S | Schlegel i sur. 2012 |
| SWSV 3'end | TAGTAGTAKRCTCCYTRAARAG | S | Schlegel i sur. 2012 |
| SWSV1590R | GTG TTT GAG GTA KTG GAG TG | S | Schlegel i sur. 2012 |
| BESS1090R | ACAGTCTTTGATGCRATRATGG | S | Radosa i sur. 2013 |
| SWSV S455R | TAAGCAAGATGGTGTCTACG | S | Ovo istraživanje |
| BESM-12F | TCCGCAAGAAAAAGCCACAT | M | Radosa i sur. 2013 |
| MF374395 | TAAATGGTGTGYSTATTTTGGG | M | Ling i sur. 2014 |
| SWSV-M399F | ATCTGTTATGATTTGATTTGC | M | Lee i sur. 2020 |
| SWSV-M430F | CTG CTT GTA AGC CTGAG | M | Lee i sur. 2020 |
| OSV697F | GGACCAGGTGCADCTTGTGAAGC | M | Song i sur. 2007b |
| TM 1199F | TAAVTCAMCAAC ATGTCT | M | Song i sur. 2007b |
| MR534556 | CTATAWGGACCTAACAGCYACT | M | Ling i sur. 2014 |
| MR685709 | GCTTTAGWAATYAAAAACAATSTAC | M | Ling i sur. 2014 |
| BESM-1225R | GCTTCACAGGATGCACCAGGGC | M | Radosa i sur. 2013 |
| SWSV-M1244R | AGGCATGTGGGTGAAC | M | Lee i sur. 2020 |
| SWSV-M1266R | GAAAGTTGTATGTTTTGAAACA | M | Lee i sur. 2020 |
| TM 1485R | CCAGCCAAARCARAATGT | M | Song i sur. 2007b |
| HAN-L-F1 | ATGTAYGTBAGTGCWGATGC | L | Klempa i sur. 2006 |
| HAN-L-F2 | TGCWGATGCHACIAARTGGTC | L | Klempa i sur. 2006 |
| HAN-L-R1 | AACCADTCWGYCCRTCATC | L | Klempa i sur. 2006 |
| HAN-L-R2 | GCRTCRCWGARTGRTGDGCAA | L | Klempa i sur. 2006 |

3.1.6. Računalni programi i softveri

Korišteni računalni programi navedeni su u Tablici 4.

Tablica 4. Korišteni računalni programi i softveri za filogenetsku analizu rezultata.

| Program/softver | Opis | Referenca |
|------------------------|---|---|
| Bioedit ver.7.2. | alat za sravnjivanje sekvenci | Hall 1999 |
| BLAST | <i>online</i> algoritam za prolazak regija sličnosti između proteinskih ili nukleotidnih sekvenci | Altschul i sur. 1990 |
| Cipres | <i>online</i> alat za filogenetske analize | Miller i sur 2010 |
| Clone Manager | softver za simulacije kloniranja, mapiranje, sravnjivanje sekvenci i mnoge druge analize | Sci Ed Software LLC., Westminster, Colorado, SAD |
| FigTree | grafički preglednik filogenetskih stabala | Rambaut 2010 |
| Inkscape | vektorski softver | Inkscape Project 2020. (https://inkscape.org , zadnje pristupljeno 19.09.2023.) |
| jModelTest ver.2.1.6. | alat za statistički odabir najboljeg evolucijskog modela | Darriba i sur. 2012 |
| Mesquite ver. 3.5. | softver za organizaciju i analizu komparativnih podataka o organizmima | Maddison i Maddison 2023 |
| MEGA11 | alat za sravnjivanje sekvenci, stvaranje filogenetskih stabala i za druge evolucijske metode | Tamura i sur. 2021 |
| MrBayes ver. 3.2.7. | program za provođenje Bayesian analize i drugih evolucijskih modela | Ronquist i sur. 2003 |
| Tracer ver.1.7.2. | softver za analizu podataka dobivenih Bayesian metodom | Rambaut i sur. 2018 |

3.1.7. Ostalo

- mješavina dNTP 10 mM (Promega, Wisconsin, SAD)
- *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Loading Dye 6x, agaroza (Clever Scientific od Thistle Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- HiDi Formamide (Applied Biosystems od Thermo Fisher Scientific, SAD)

- SYBR Safe (Invitrogen od Thermo Fischer Scientific, SAD)
- *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science, Njemačka)
- borosilikatne kuglice (MolGen BV, Nizozemska)

3.2. Metode

3.2.1. Homogenizacija tkiva i izolacija ukupne RNA

Za izolaciju nukleinskih kiselina odvojeni su komadi smrznutog tkiva mase 50-100 mg te je dodano 1 mL PBS-a prije mehaničke homogenizacije u *MagNA Lyzer* homogenizatoru (3 puta; t= 30 sek, 6000 rpm) pomoću borosilikatnih kuglica veličine 0,8-1 mm. Ukupnu RNA izolirala sam korištenjem *TriPure Isolation Reagent* prema uputama proizvođača. Na 200 μ L homogenizata dodala sam 800 μ L otopine *TriPure Isolation Reagent*. Smjesi sam zatim dodala 200 μ L kloroforma i pomiješala, nakon čega sam uzorke inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirala 15 minuta na 4°C pri 12000 x g. Prebacila sam vodenu fazu u novu epruvetu. U vodenu fazu dodala sam 500 μ L izopropanola te sadržaj promiješala. Sadržaj sam inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi te centrifugirala 10 minuta na 12000 x g pri 4°C. Zatim sam odlila supernatant i dodala 1 mL hladnog 75% etanola te sam sadržaj centrifugirala 5 minuta na 4°C pri 7500 x g. Supernatant sam odlila te ponovila prethodni korak. Talog RNA sam osušila i dodala 20 μ L sterilne vode bez nukleaza.

3.2.2. Mjerenje koncentracije

Za potrebe daljnje analize izmjerila sam koncentraciju RNA u izolatu koristeći uređaj *CLARIOstar*. Nakon što sam izmjerila koncentracije napravila sam potrebna razrjeđenja za daljnje analize.

3.2.3. Reverzna transkripcija

Za sintezu komplementarne DNA (cDNA), potrebne za daljnje analize, iz ukupne RNA, koristila sam reakciju reverzne transkripcije. U reakciji vezivanja kalupa s početnicama, koristila sam 1 μ L nasumičnih heksamera (500 μ g/mL) i 1 μ g prethodno izolirane ukupne RNA u ukupnom volumenu od 10 μ L. Denaturaciju sekundarnih struktura RNA i vezivanje početnica za kalup napravila sam zagrijavanjem reakcijske smjese 5 minuta pri 70°C te hlađenjem na 4°C, u *ProFlex PCR System* uređaju. Zatim sam pripremila reakcijsku smjesu, za drugi korak reverzne transkripcije, koja je

sadržavala 5x *RT Buffer*, 10 mM *dNTP*, *M-MLV* reverznu transkriptazu (200 U/ μ L) i *Rnasin* (40 U/ μ L) te dodala vodu do volumena od 10 μ L. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 20 μ L. Reakcijski uvjeti su bili sljedeći: 60 minuta pri 37°C, 5 minuta pri 94°C i zatim 4°C.

3.2.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Metoda PCR je korištena kako bi se odredila pripadnost određenoj vrsti rovkii umnažanjem mitohondrijskih markera *CYTB* i *COI*. Također, ista metoda je korištena kako bi se utvrdila prisutnost SWSV-a u tkivima rovkii umnažanjem S, M i L segmenta virusa. U svim navedenim reakcijama korištena je cDNA dobivena kako je ranije opisano. Početnice za PCR reakcije birane su prema relevantnoj literaturi (Tablica 3). S obzirom da nisam imala uspostavljeni PCR protokol, zbog razlika između sekvenci za koju se početnice početno koristile i sekvenci iz ovog istraživanja, radila sam optimizaciju PCR reakcije. Kako bih uspostavila protokol za dobivanje specifičnog fragmenta, pomoću određenih kombinacija početnica, PCR reakcije sam ponavljala pod različitim temperaturama i brojevima ciklusa u gradijentu PCR reakcijama. U reakcijama PCR za određivanje vrsti rovkii koristila sam početnice za umnažanje mitohondrijskih markera *CTYB* i *COI* (Tablica 2). U reakcijsku smjesu za obje reakcije umnažanja dodala sam *10x Crystal Buffer*, 10 mM *dNTP*, *Taq polimerazu*, odgovarajuće *forward* i *reverse* početnice (20 μ M) (Tablica 5) i vodu do ukupnog volumena od 25 μ L. Za reakcije sam koristila uređaj *ProFlex PCR System* (Tablica 6 i 7).

Tablica 5. Kombinacija početnica za umnažanje S, M i L segmenta SWSV.

| Početnice | Veličina produkta (pb) | Segment koji se umnaža |
|---------------------------|------------------------|------------------------|
| SWSV-22-fw SWSV 3'end | 1640 | S |
| SWSV-22-fw SWSV 1590R | 1570 | S |
| HAN-L-F1 HAN-L-R1 | 450 | L |
| SWSV-M399F SWSV-M1266R | 860 | M |
| OSV697 TM 1485R | 788 | M |
| BESM-12F | 1213 | M |

Tablica 5. Nastavak

| | | |
|------------|-----|---|
| BESM-1255R | | |
| BESM-12F | 697 | M |
| MR685-709 | | |

Tablica 6. Prikaz programa PCR za umnažanje mitohondrijskih markera *CTYB* i *COI*.

| PCR ciklus | Temperatura (°C) | Vrijeme | Broj ciklusa |
|-----------------------|---|------------|--------------|
| Početna denaturacija | 95 | 2 minute | 1 |
| Denaturacija | 95 | 30 sekundi | 40 |
| Prijanjanje početnica | 54 (<i>CYTB</i>) 45; 48; 53 (<i>COI</i>) | 30 sekundi | |
| Elongacija | 72 | 30 sekundi | |
| Završna elongacija | 72 | 5 minuta | 1 |
| Završetak | 15 | ∞ | |

Tablica 7. PCR program za umnažanje S, M i L segmenta SWSV.

| PCR ciklus | Temperatura (°C) | Vrijeme | Broj ciklusa |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| Početna denaturacija | 95 | 2 minute | 1 |
| Denaturacija | 95 | 20 sekundi | 35 |
| Prijanjanje početnica | 50.6 (S) 53 (L) 50, 53 (M) | 30 sekundi | |
| Elongacija | 72 | 90 sekundi (S, M) 30 sekundi (L) | |
| Završna elongacija | 72 | 3 minute | 1 |
| Završetak | 12 | ∞ | |

3.2.5. Ugniježdjena lančana reakcija polimerazom

Nakon reakcije PCR umnažanja segmenata SWSV, a kako bi se povećala specifičnost i osjetljivost umnažanja, provela sam ugniježdjeni PCR (engl. *nested PCR*). Kako bih uspostavila protokol ponovno sam PCR reakcije ponavljala pod različitim temperaturama i brojevima ciklusa u gradijent PCR reakcijama. U reakcijsku smjesu dodala sam *10x Ruby Buffer*, *10 mM dNTP*, *Taq polimerazu*,

odgovarajuće *forward* i *reverse* početnice (20 μ M) (Tablica 8) i vodu do ukupnog volumena 25 μ L. Za reakcije sam koristila uređaj *ProFlex PCR System* (Tablica 9).

Tablica 8. Kombinacija početnica za ugniježđeni PCR S, M i L segmenta SWSV.

| Početnice | Veličina produkta (pb) | Segment koji se umnaža |
|---------------------------|------------------------|------------------------|
| SWSV-22-fw SWSV1590R | 1570 | S |
| SWSV-22-fw BESS1090R | 1070 | S |
| SWSV-22-962 SWSV1590R | 1070 | S |
| HAN-L-F2 HAN-L-R1 | 360 | L |
| SWSV-M430F SWSV-M1244R | 815 | M |
| TM119F TM1485R | 1070 | M |
| MR374-395 MR534-556 | 185 | M |

Tablica 9. Program za ugniježđeni PCR S, M i L segmenta SWSV

| PCR ciklus | Temperatura (°C) | Vrijeme | Broj ciklusa |
|-----------------------|--|-------------------------------------|---------------------------|
| Početna denaturacija | 95 (S, M) 94 (L) | 2 minute | 1 |
| Denaturacija | 95 (S, M) 94 (L) | 20 sekundi (S, M) 30 sekundi (L) | 35x (L) 2x, 19x (S, M) |
| Prijanjanje početnica | 62-54; 55 (S)* 53 (L) 50-37; 40 (M)* | 30 sekundi (S, M) 45 sekundi (L) | |
| Elongacija | 72 | 30 sekundi (L) 90 sekundi (S, M) | |
| Završna elongacija | 72 | 3 minute | 1 |

Tablica 9. Nastavak

| | | |
|-----------|----|---|
| Završetak | 12 | ∞ |
|-----------|----|---|

*Kod reakcije umnažanja S i M segmenta provodio se *Touch Down PCR* sa postupnim smanjivanjem temperature 2° u 2 ciklusa i s krajnjom temperaturom u 19. ciklusu

3.2.6. Gel elektroforeza

Produkte reakcije PCR vizualizirala sam pomoću agarozne gel elektroforeze na 1% agaroznom gelu koji sam pripremila u 1x TAE puferu uz dodatak interkalirajuće *SyberSafe* boje (10000x). Kao marker sam koristila *GeneRuler 1 kb DNA ladder*, a produkte reakcije PCR sam nanijela na gel koristeći boju *Qiagen Loading Dye* (6x) u omjeru 1:6. Gel sam fotografirala na uređaju *omniDOC*.

3.2.7. Pročišćavanje produkata reakcije PCR

3.2.7.1. Pročišćavanje produkata PCR metodom EXO-SaP

Sekvenciranju je prethodilo uklanjanje preostalih nukleotida i istaloženih početnica enzimskim pročišćivanjem produkata PCR očekivane veličine. U reakcijskoj smjesi koristila sam enzime alkalnu fosfatazu (1 U/μL) koja katalizira uklanjanje fosfatnih grupa i eksonukleazu 1 koja uklanja jednolančane DNA. Za 25 μL reakcijskog volumena dodala sam 2 μL FastAP (1 U/μL) i 0,5 μL *ExoI* (20 U/μL). Reakcijski uvjeti bili su sljedeći: 37°C tijekom 20 minuta, 80°C tijekom 15 minuta i 4° tijekom 10 minuta. Nakon pročišćavanja izmjerila sam koncentraciju DNA pomoću uređaja *CLARIOstar* kako bi odredila volumen potreban za reakciju *BigDye Termination v1.1/v3.1*.

3.2.7.2 Pročišćavanje iz gela

Umnožene produkte reakcije PCR koji nakon elektroforeze na agaroznom gelu nisu imali samo jedan specifičan fragment, pročišćivala sam izrezivanjem iz gela. Produkte reakcije PCR odgovarajućih veličina izrezala sam koristeći uređaj *proBLUEVIEW Dual LED Blue/White Light Transilluminator* te sam ih zatim pročistila prema protokolu kompleta *Bioneer AccuPrep* prateći upute proizvođača. Nakon pročišćavanja izmjerila sam koncentraciju pomoću uređaja *CLARIOstar* kako bih odredila volumen potreban za reakciju *BigDye Termination v1.1/v3.1*.

3.2.8. Reakcija *BigDye Terminator v1.1/v3.1*

Sekvenciranju je prethodila reakcija *BigDye Terminator v1.1/v3.1*. Pripremila sam reakcijsku smjesu u koju sam dodala 2 μL *BigDye Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequencing Buffer*, 0,5 μL

BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction Mix 2,5X, 1 μL odgovarajuće početnice (1,6 μM), 1,2 μL cDNA i vode do ukupnog volumena 8,8 μL . Za reakciju sam koristila *ProFlex PCR System* (Tablica 10).

Tablica 10. Program za *BigDye Terminator v1.1/v3.1* reakciju.

| PCR ciklus | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | Vrijeme | Broj ciklusa |
|-----------------------|------------------------------------|------------|--------------|
| Početna denaturacija | 96 | 1 minute | 1 |
| Denaturacija | 96 | 10 sekundi | 25 |
| Prijanjanje početnica | 50 | 5 sekundi | |
| Elongacija | 60 | 4 minute | |
| Završetak | 4 | ∞ | 1 |

3.2.9. Pročišćavanje reakcije *BigDye Terminator v1.1/v3.1* prije sekvenciranja

Za svaku *BigDye Terminator v1.1/v3.1* reakciju od 10 μL pripremila sam smjesu od 1 μL EDTA i 1 μL natrijevog acetata. Zatim sam dodala 25 μL 100% etanola i inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirala 45 minuta na 1870 x g. Epruvetice sam ispraznila i dodala 30 μL 75% etanola i centrifugirala 15 minuta na 1870 x g. Talog sam osušila i dodala 60 μL Hi-Di formamida.

3.2.10. Sekvenciranje i filogenetske analize

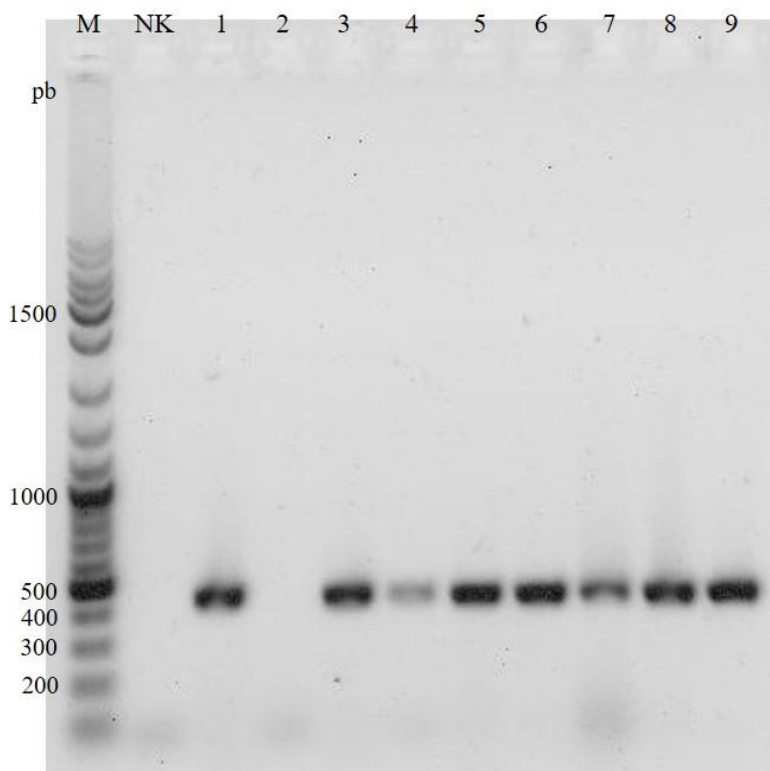
Uzorke sam sekvencirala Sangerovom metodom pomoću uređaja *3500 Genetic Analyzer*. Prilikom filogenetske analize koristila sam računalne programe i softvere prikazane u Tablici 4. Sekvence sam uredila korištenjem BIOEDIT ver.7.2. (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, SAD) (Hall 1999). Kromatogrami su ručno provjereni imaju li višestruke signale (engl. *multiple peaks*) i indele u programu BIOEDIT ver.7.2. (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) (Hall 1999). U slučaju uspješnog sekvenciranja u oba smjera animalnih markera *COI* i *CYTB* i L segmenta SWSV, sekvence su sastavljene iz oba smjera koristeći program BIOEDIT ver.7.2. (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) (Hall 1999). Sekvence animalnih markera iz ovog istraživanja uspoređene su s dostupnim i ranije pohranjenim sekvencama koristeći BLAST (Altschul i sur. 1990) u bazi podataka GenBank. Za S segment koristila sam veći broj početnica koje umnažaju segmente koji se preklapaju. Dobivene sekvence S segmenta sravnila sam pomoću programa Clone Managera (Sci Ed Software LLC., Westminster, Colorado, SAD) kako bih dobila cijelu duljinu

sekvence. Dostupne i ranije objavljene sekvence S, L i M segmenta SWSV preuzela sam iz baze podataka *GenBank National Center for Biotechnology* (NCBI). Višestruko poravnavanje sekvenci iz baze podataka i sekvenci iz ovoga rada sam napravila sam pomoću alata Muscle u programu MEGA11 (Tamura i sur. 2021). Prisutnost stop-kodona u sravnjenjima DNA sekvenci S i L segmenta provjerila sam koristeći program Mesquite ver. 3.5 (Maddison i Maddison 2019.). Najpogodniji evolucijski model odabran je pomoću programa jModelTest ver. 2.1.6 (Darriba i sur. 2012). Bayesian analizu sam napravila koristeći program MrBayes ver. 3.2.7 (Ronquist i sur. 2003) u CIPRES Gateway (Miller i sur. 2010). Dvije iteracije (engl. *run*) sa četiri metode *Metropolis-coupled Monte Carlo Markov chains* (MMCM), provedene su kroz 10,000,000 ponavljanja. Filogenetska stabla su uzorkovana svakih 1000 ponavljanja. Prvih 25% uzorkovanih stabala je odbačeno nakon što je potvrđen učinkoviti uzorak pomoću Tracer ver. 1.7.2. (Rambaut i sur. 2018). Konstruirano je filogenetsko stablo prema pravilu 50%-tne većine, s posteriornim vrijednostima na čvorovima. Metodu susjednog sparivanja (engl. Neighbor Joining, NJ) provela sam pomoću programa MEGA11 (Tamura i sur. 2021) koristeći analizu *bootstrap* s 2000 ponavljanja. Koristila sam evolucijski model Tamura-Nei. Filogenetska stabla sam vizualizirala u programu FigTree (Rambaut 2010) te grafički obradila u programu Inkscape.

4. Rezultati

4.1. Određivanje vrsta rovk

U ovom istraživanju korišteni su organi 9 jedinki rovk prikupljenih na odabranim lokalitetima u Hrvatskoj u razdoblju od 2003. do 2017. godine. Jedinke sam odredila do razine vrste umnažanjem mitohondrijskih markera za *CYTB* i *COI* korištenjem odgovarajućih početnica (Tablica 2). Uspješno sam umnožila i sekvencirala ciljne regije gena *CYTB* (377 pb) i gena *COI* (658 pb) za većinu uzorkovanih jedinki (Slika 5). Popis vrsta rovk prikazan je u Tablici 11. Genetska udaljenost sekvenci iz ovog istraživanja od referentnih sekvenci nije prelazila 1% za *CYTB* marker, odnosno 3,5% za *COI* marker (Tablica 11). Sekvenciranje gena *CYTB* nije uspjelo u slučaju uzorka M-1650, a kod gena *COI* sekvenciranje nije uspjelo u slučaju uzorka M-1390 i M-2115 (Tablica 11). U slučaju uspješnog sekvenciranja za oba gena, podaci o pripadajućoj vrsti podudaraju se za oba mitohondrijskih markera.



Slika 5. Agarozna gel elektroforeza, na 1% gelu, produkata reakcije PCR za *CYTB*. M – marker; NK – negativna kontrola; 1 – M-1390 jetra (J); 2 – M-1650 slezena (SL); 3 – M-1824J; 4 – M-1825SL; 5 – M-1971J; 6 – M-1993S; 7 – M-2115 bubreg (B); 8 – M-2150J; 9 – M-528 pluća (PL).

Tablica 11. Vrste rovke određene umnažanjem mitohondrijskih markera za *CTYB* i *COI* s prikazom genetske udaljenosti između sekvenci iz ovoga istraživanja i referentnih sekvenci dostupnih u bazi podataka NCBI GenBank.

| Oznaka uzorka | Vrsta | <i>CYTB</i> genski marker | | <i>COI</i> genski marker | |
|---------------|--|---------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
| | | Genetska udaljenost (%) | Pristupni broj NCBI | Genetska udaljenosti (%) | Pristupni broj NCBI |
| M-528 | <i>Neomys anomalus</i> | 0,53 | MT855470.1 | 0,46 | KY754522.1 |
| M-1390 | <i>Sorex araneus</i> ⁺ | 0,27 | MH025361.1 | - | - |
| M-1650 | <i>Crocidura leucodon</i> ^o | - | - | 1,08 | LR877380.1 |
| M-1824 | <i>Neomys anomalus</i> | 0,68 | MT855470.1 | 3,44 | KY754522.1 |
| M-1825 | <i>Neomys anomalus</i> | 0,53 | MT855470.1 | 1,22 | KY754522.1 |
| M-1971 | <i>Neomys fodiens</i> | 0,27 | KC537797.1 | 2,24 | NC_025559.1 |
| M-1993 | <i>Crocidura sualveolens</i> | 0 | AB077090.1 | 0,15 | ON682427.1 |
| M-2150 | <i>Neomys anomalus</i> | 0,27 | MT855470.1 | 0,46 | KY754522.1 |
| M-2115 | <i>Sorex araneus</i> ⁺ | 0,53 | MH025361.1 | - | - |

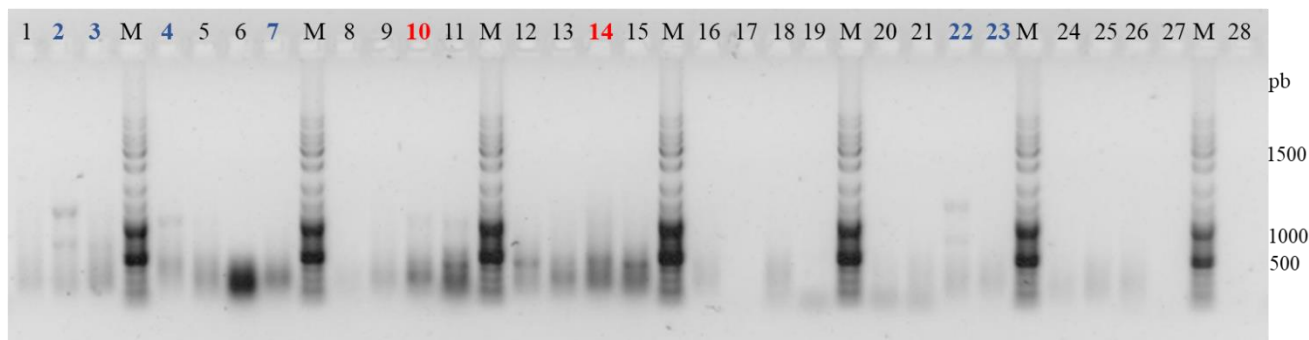
*oznaka „+“ označava uzorke kod kojih je vrsta utvrđena samo umnažanjem *CTYB* genskog markera, a oznaka „o“, uzorke kod kojih je vrsta utvrđena samo umnažanjem *COI* genskog markera

**oznaka „-“, označava uzorke koji nisu uspješno sekvencirani

4.2. Određivanje prisutnosti SWSV u rovkama

4.2.1. Određivanje prisutnosti SWSV u rovkama metodom PCR "pan-hantavirus"

Za određivanje prisutnosti SWSV u tkivima rovki koristila sam metodu PCR „pan-hantavirus“ (Klempa i sur. 2006). U metodi PCR „pan-hantavirus“ dobiveni su amplikoni za četiri od ukupno devet jedinki. Za dvije jedinke SWSV je potvrđen sekvenciranjem djelomičnog L segmenta duljine 347 pb (M-1390 i M-1825), za preostale jedinke sekvenciranje nije uspjelo te smatram kako se radilo o nespecifičnom umnažanju (M-1650 i M-1993) (Slika 6). SWSV sam potvrdila u jedinci vrste *Sorex araneus* (M-1390) i jedinci vrste *Neomys anomalus* (M-1825). Organi u kojima je zabilježena SWSV RNA su jetra kod jedinke *Sorex araneus* i bubreg kod jedinke *Neomys anomalus*.



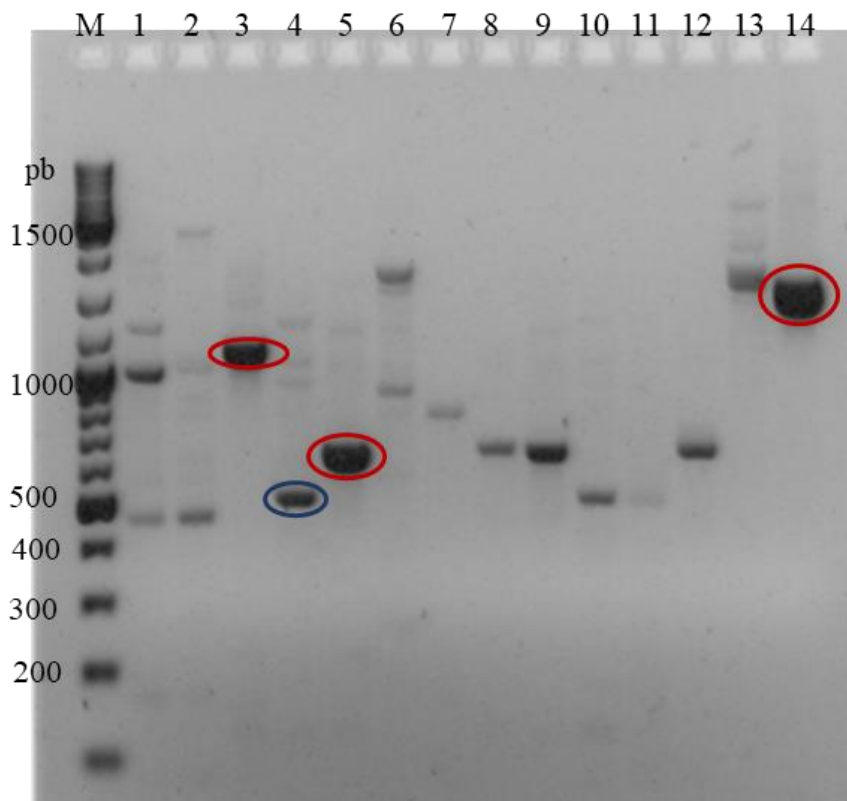
Slika 6. Agarozna gel elektroforeza, na 1% gelu, produkata reakcije PCR „pan-hantavirus“. M - marker; 1 - M-1390 pluća (PL); 2 - M-1650 PL; 3 - M-1993 slezena (SL); 4 - M-1825 S; 5 - M-2150 S; 6 - M-2115 bubreg (B); 7 - M-1993 jetra (J); 8 - M-2115 J; 9 - M-1390 B; 10 - M-1825 B; 11 - M-1824 J; 12 - M-1971 PL; 13 - M-2150 J; 14 - M-1390 J; 15 - M-1971 J; 16 - M-528 PL; 17 - M-1824 B; 18 - M-528 B; 19 - M-2150 S; 20 - M-1824 S; 21 - M-2150 B; 22 - M-1650 B; 23 - M-1993 PL; 24 - M-2115 SL; 25 - M-1971 B; 26 - M-1993 B; 27 - M-1650 SL; 28 - M-1825 J. Crvenom bojom su označeni uzorci u kojim je potvrđena prisutnost SWSV sekvenciranjem djelomičnog L segmenta. Plavom bojom su označeni uzorci koji su bili pozitivni na PCR „pan-hantavirus“, ali sekvenciranje L segmenta nije bilo uspješno i/ili specifično.

4.2.2. PCR reakcije za dobivanje sekvenci S i M segmenta

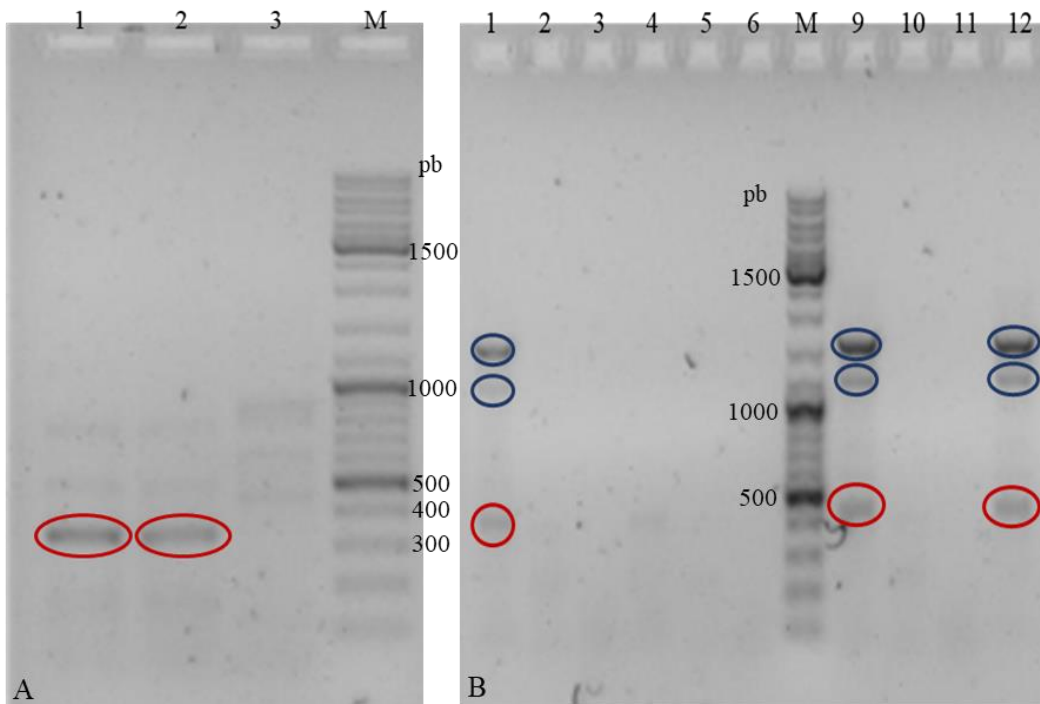
Za dobivanje sekvenci S i M segmenta za filogenetsku analizu uspostavila sam protokol PCR te produkte reakcije PCR sekvencirala (Slika 7). Umnažanje genskih regija s ciljem dobivanja potpune sekvence otvorenog okvira čitanja S segment (engl. *open reading frame*, ORF) bilo je uspješno korištenjem sljedećih početnica: SWSV-22-fw i SWSV 1590R i SWSV 3'end, SWSV-22-fw i BESS1090R te SWSV-22-962 i SWSV 1590R. Navedene su početnice korištene i u uzastopnim reakcijama sekvenciranja, uz dodatno početnicu SWSV S455R, te je time dobivena 1525 pb duga konsenzus sekvencija S segmenta. Najbolji uvjeti PCR reakcije prikazani su u tablici 7 i 9. Ukupna duljina sekvence S segmenta SWSV iznosi 1641 pb dok je ORF dug 1290 pb i obuhvaćen dobivenom 1525 pb dugom konsenzus sekvencijom. Navedena sekvencija dobivena je iz uzorka tkiva jetre jedinke vrste *Sorex araneus* (M-1390) ulovljene na Medvednici.

Za M segment uspješno je dobiven fragment na agaroznom gelu korištenjem kombinacija početnica: OSV697F i TM 1485R te BESSM-12F i MR685709 (Slika 8). Nakon elektroforeze na agaroznom gelu dobiveno je za prvu kombinaciju početnica jedan fragment veličine manje od očekivane, dok je za drugu kombinaciju početnica dobiveno nekoliko fragmenata duljine koja ne odgovara očekivanoj. Sekvenciranje svih fragmenata M segmenta rezultiralo je sekvencijom duljine 275 pb. Međutim dobivena sekvencija nije se uspješno sravnila s ranije objavljenim cjelovitim sekvencijama M segmenta iz baza podataka, primjerice sekvencijom iz Slovenije (NCBI pristupni

broj: KF060936), Poljske (NCBI pristupni broj: MK402018), Finske (NCBI pristupni broj: KY651063). Također se nije uspješno sravnila ni s mp70 prototipom SWSV-a (NCBI pristupni broj: EF636025.1).



Slika 7. Agarozna gel elektroforeza, na 1% gelu, produkata reakcije PCR za S segment. M - marker; 1 - M-1825J (korištene početnice: SWSV-22-fw i BESS1090R); 2 - M-1825J (korištene početnice: SWSV-22-fw i BESS1090R); 3 - M-1390J (korištene početnice: SWSV-22-fw i BESS1090R); 4 - M-1390P (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 5 - M-1390J (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 6 - M-1993J (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 7 - M-1825J (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 8 - M-1390J (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 9 - M- 1390J (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 10 - M-1390P (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 11 - M-1390P (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 12 - M-1993P (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 13 - M-1390P (korištene početnice: SWSV-22-962 i SWSV 1590R); 14 - M-1390J (korištene početnice: SWSV-22-fw i SWSV 1590R). Pojedini uzorci se ponavljaju zbog ponovljene izolacije RNA. Plavo i crveno su zaokruženi fragmenti koji su izrezani, pročišćeni i sekvencirani. Ti fragmenti su odabrani radi njihove koncentracije (u odnosu na koncentraciju markera) i očekivane duljine fragmenta nakon umnažanja. Crveno zaokruženi fragmenti su uspješno sekvencirani.



Slika 8. Agarozna gel elektroforeza, na 1% gelu, produkata reakcije PCR za M segment. A - produkti reakcije PCR korištenjem OSV697F i TM 1485R početnica: M - marker; 1 - M-1390 J; 2 - M-1390 J; 3 - M-1825S. B - produkti reakcije PCR korištenjem BESM-12F i MR685709 početnica: svi produkti reakcije PCR su dobiveni iz M-1390 J razlikuju se prema temperaturi prijanjanja početnica. Plavo i crveno su zaokruženi fragmenti koji su izrezani, pročišćeni i sekvencirani. Ti fragmenti su odabrani radi njihove koncentracije (u odnosu na koncentraciju markera). Crveno su zaokruženi fragmenti koji su uspješno sekvencirani.

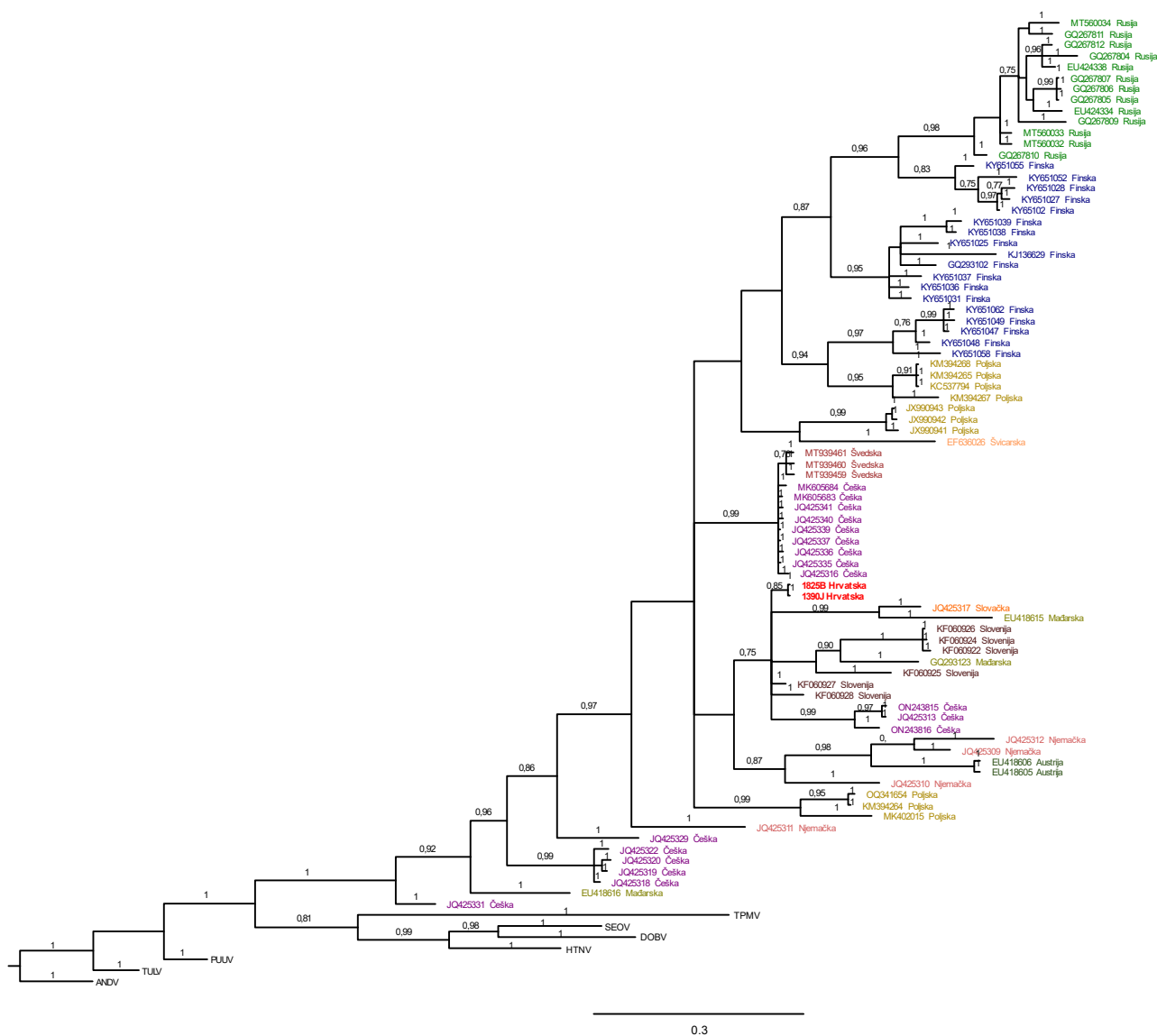
4.3. Molekularna karakterizacija i filogenetička analiza SWSV

4.3.1. Filogenetska analiza sekvenci L segmenta

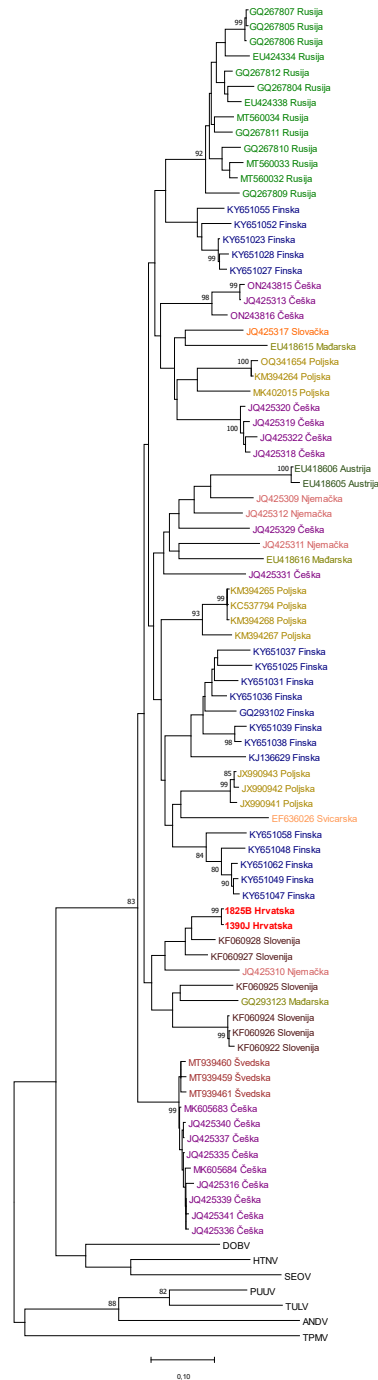
Konstruirana su dva filogenetska stabla temeljena na sekvencama L segmenta dobivenih iz uzorka vrste *Sorex araneus* (M-1390) i *Neomys anomalus* (M-1825) te sekvencama L segmenta preuzetih iz baze podataka NCBI GenBank. Jedno filogenetsko stablo temeljeno je na Bayesian analizi sravnjenja sekvenci L segmenta duljine 258 pb (Slika 9). Drugo filogenetsko stablo temeljeno je na NJ analizi sravnjenja sekvenci L segmenta duljine 258 pb (Slika 10).

Na Bayesian filogenetskom stablu temeljenom na sravnjenju sekvenci L segmenta duljine 258 pb uočavam grupiranje SWSV sekvenci s obzirom na geografsku rasprostranjenost. Sekvence ovoga istraživanja su se, sa velikom podržanosti (posteriorna vrijednost $>0,85$), grupirale skupa, a najrodnije su sekvencama iz Slovenije, Mađarske i Slovačke.

Filogenetsko stablo dobiveno NJ metodom slično je filogenetskom stablu dobivenom Bayesian analizom. Uočavaju se dvije velike filogenetske grupe formirane također prema geografskoj rasprostranjenosti. I u ovom slučaju sekvence ovoga istraživanja grupiraju se skupa i najrodnije su sekvencama iz Slovenije.



Slika 9. Filogram za L segment dobiven Bayesian analizom. GTR+I+G primijenjen je kao najbolji model nukleotidne supstitucije. Analizirani skup podataka sadržavao je ukupno 258 pozicija. Brojevi na granama predstavljaju *posterior probability* vrijednost (≥ 0.75). Stablo je ukorijenjeno s vanjskim grupama: ANDV - *Orthohantavirus andesense* (NC003466); DOBV - *Orthohantavirus dobravaense* (NC005233); HTNV - *Orthohantavirus hantanense* (NC005218); PUUV - *Orthohantavirus pumalaense* (NC005224); SEOV - *Orthohantavirus seoulense* (NC005236); TULV - *Orthohantavirus tulaense* (NC005227); TPMV - *Thottimvirus thottapalayamense* (NC010704). Sekvence ovog istraživanja označene su crvenom bojom.



Slika 10. Filogram za L segment dobiven metodom susjednog sparivanja (engl. *Neighbor joining*, NJ). Tamura-Nei model primijenjen je kao model nukleotidne supstitucije. Analizirani skup podataka sadržavao je ukupno 258 pozicija. Brojevi na granama predstavljaju neparametrijsku vrijednost samopodržanja (engl. *bootstrap*) (≥ 75). Stablo je ukorijenjeno s vanjskim grupama: ANDV - *Orthohantavirus andesense* (NC003466); DOBV - *Orthohantavirus dobravaense* (NC005233); HTNV - *Orthohantavirus hantanense* (NC005218); PUUV - *Orthohantavirus pumalaense* (NC005224); SEOV - *Orthohantavirus seoulense* (NC005236); TULV - *Orthohantavirus tulaense* (NC005227); TPMV - *Thottimvirus thottapalayamense* (NC010704). Sekvence ovog istraživanja označene su crvenom bojom.

4.3.2. Filogenetska analiza sekvenci S segmenta

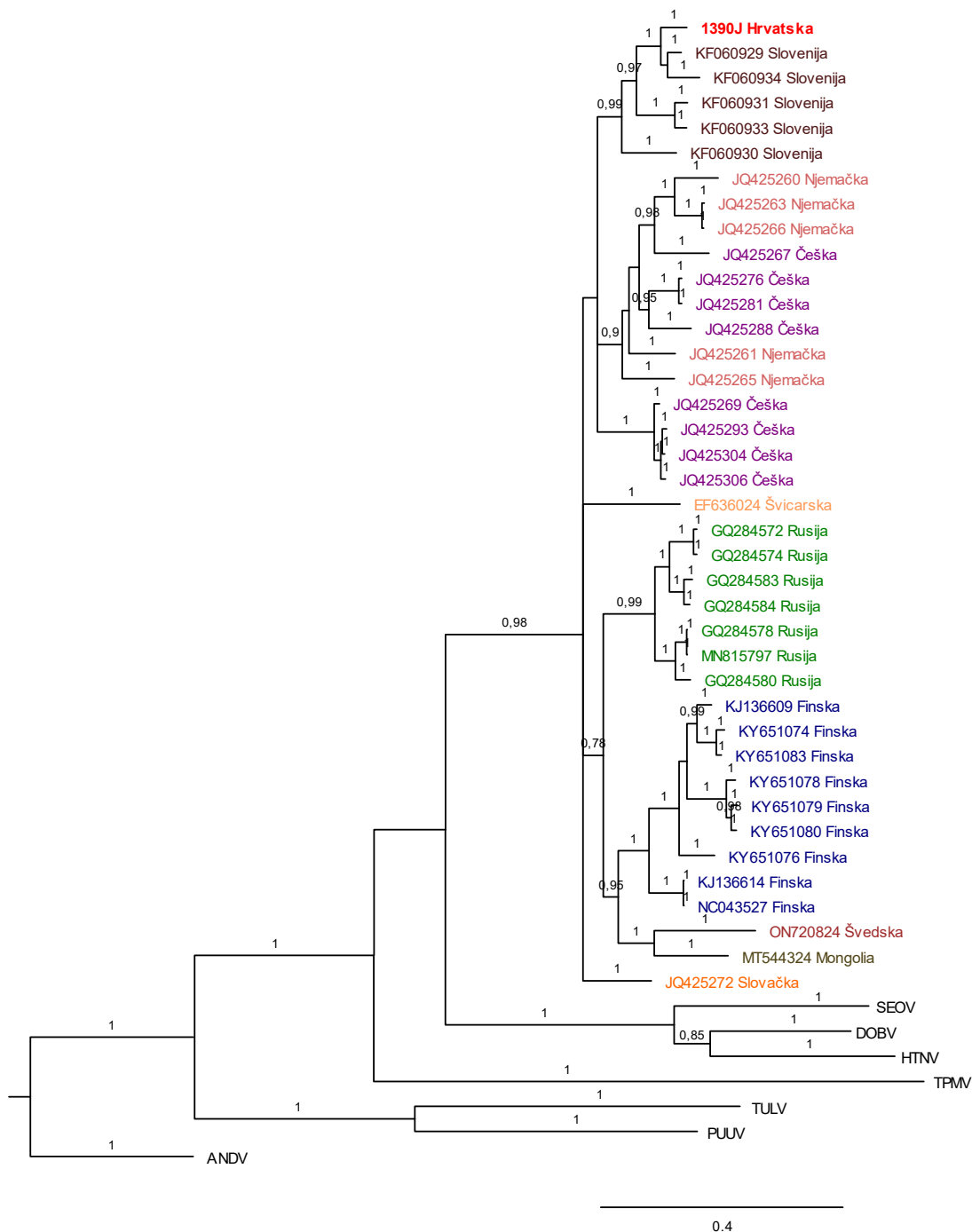
Na temelju sravnjenja sekvenci S segmenta dobivenih iz uzorka vrste *Sorex araneus* (M-1309) i sekvenci S segmenta iz baze podataka NCBI GenBank konstruirala sam četiri filogenetska stabla. Dva filogenetska stabla dobivena su Bayesian analizom. Jedno filogenetsko stablo dobiveno je koristeći cijeli ORF S segmenta (1290 pb), a drugo filogenetsko stablo dobiveno je koristeći djelomičnu sekvencu S segmenta (834 pb) (Slika 11 i 12). Dva filogenetska stabla dobivena su metodom NJ također na temelju cijelog ORF i djelomične sekvence S segmenta (Slika 13 i 14). U analize su uključene ranije objavljene i javno dostupne sekvence iz baze podataka NCBI GenBank.

Filogenetska stabla dobivena Bayesian analizom temeljena na sekvenci S segmenta imaju sličnu topologija. Filogenetska analiza koja se temeljila na sravnjenju sekvenci duljine 834 pb obuhvaćala je veći broj sekvenci u odnosu na analizu sravnjenja za cijeli ORF S segmenta. Sekvence koje su obuhvaćene prvom analizom, a nisu uključene u analizu cijelog ORF su isključene s obzirom na duljinu. Uočavam grupiranje SWSV sekvenci s obzirom na geografsku rasprostranjenost. Na filogenetskom stablu temeljenom na djelomičnoj sekvenci S segmenta (834 pb) uočavam grupiranje sekvenci iz središnje Europe u jednu i sekvenci sa sjevera Europe i Mongolije u drugu veću grupu dok se sekvence iz Švicarske i Slovačke granaju u zasebne grupe. Razlike kod filogenetskog stabla temeljenog na ORF S segmenta su odvajanje sekvenci iz Mongolije, Rusije i Švedske u zasebne grupe. Sekvence ovoga istraživanja grupirane su sa sekvencama središnje Europe i pokazuju najveću srodnost sa sekvencama iz Slovenije. Kod analize cijelog ORF S segmenta uočavam kako se sekvenca dobivena u ovom istraživanju odvaja od ostalih sekvenci u zasebnu podgrupu.

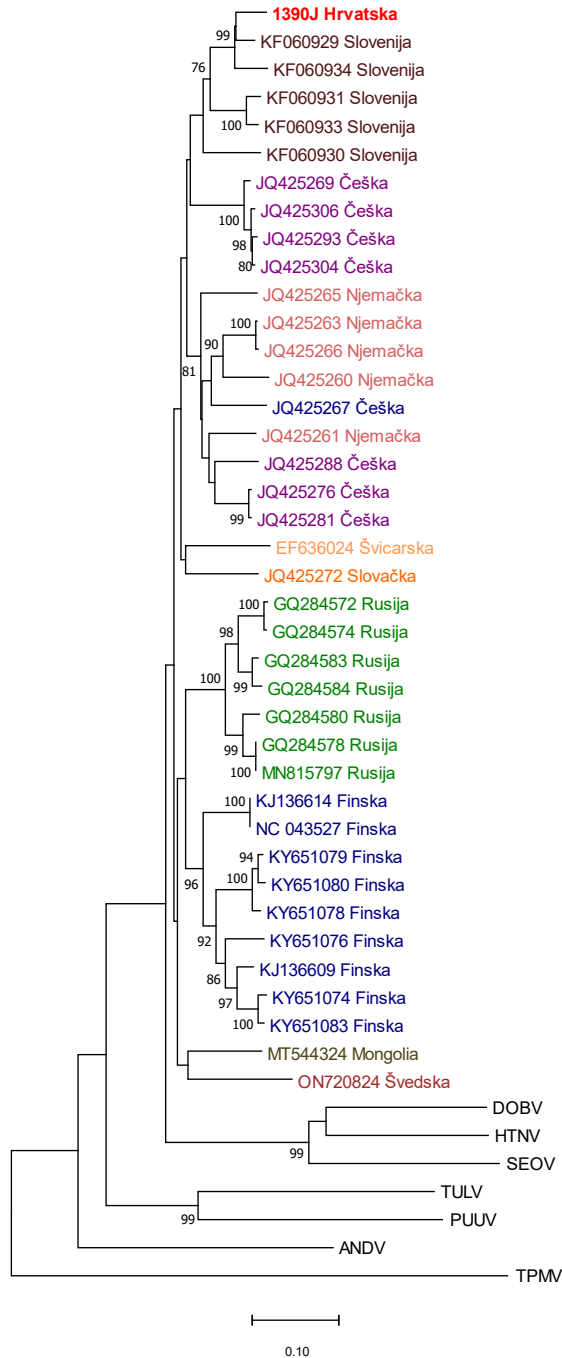
Filogenetska stabla dobivena NJ metodom temeljena na sekvenci S segmenta slična su topologijom i podržanosti filogenetskim stablima dobivenim Bayesian analizom. I u ovom slučaju je Hrvatska grupirana sa sekvencama iz središnje Europe i najrodnija s sekvencama iz Slovenije. Većina vrijednosti samopodržanja (engl. *bootstrap*) pokazuje dobru podržanost grananja (≥ 75).



Slika 11. Filogram za S segment dobiven Bayesian analizom. GTR+I+G primijenjen je kao najbolji model nukleotidne supstitucije. Analizirani skup podataka za cijeli ORF S segmenta sadržavao je ukupno 1290 pozicija. Brojevi na granama predstavljaju *posterior probability* vrijednost (≥ 0.75). Stablo je ukorijenjeno s vanjskim grupama: ANDV - *Orthohantavirus andesense* (NC003466); DOBV - *Orthohantavirus dobravaense* (NC005233); HTNV - *Orthohantavirus hantanense* (NC005218); PUUV - *Orthohantavirus pumalaense* (NC005224); SEOV - *Orthohantavirus seoulense* (NC005236); TULV - *Orthohantavirus tulaense* (NC005227); TPMV - *Thottimvirus thottapalayamense* (NC010704). Sekvence ovog istraživanja označene su crvenom bojom.



Slika 12. Filogram za S segment dobiven Bayesian analizom. GTR+I+G primijenjen je kao najbolji model nukleotidne supstitucije. Analizirani skup podataka sadržavao je ukupno 834 pozicija. Brojevi na granama predstavljaju *posterior probability* vrijednost (≥ 0.75). Stablo je ukorijenjeno s vanjskim grupama: ANDV - *Orthohantavirus andesense* (NC003466); DOBV - *Orthohantavirus dobravaense* (NC005233); HTNV - *Orthohantavirus hantanense* (NC005218); PUUV - *Orthohantavirus pumalaense* (NC005224); SEOV - *Orthohantavirus seoulense* (NC005236); TULV - *Orthohantavirus tulaense* (NC005227); TPMV - *Thottimvirus thottapalayamense* (NC010704). Sekvence ovog istraživanja označene su crvenom bojom.



Slika 14. Filogram za S segment dobiven metodom susjednog sparivanja (engl. *Neighbor joining*, NJ). Tamura-Nei model primijenjen je kao model nukleotidne supstitucije. Analizirani skup podataka sadržavao je ukupno 834 pozicija. Brojevi na granama predstavljaju neparametrijsku vrijednost samopodržanja (eng. *bootstrap*) (≥ 75). Stablo je ukorijenjeno s vanjskim grupama: ANDV - *Orthohantavirus andesense* (NC003466); DOBV - *Orthohantavirus dobravaense* (NC005233); HTNV - *Orthohantavirus hantanense* (NC005218); PUUV - *Orthohantavirus pumalaense* (NC005224); SEOV - *Orthohantavirus seoulense* (NC005236); TULV - *Orthohantavirus tulaense* (NC005227); TPMV - *Thottimvirus thottapalayamense* (NC010704). Sekvence ovog istraživanja označene su crvenom bojom.

Filogenetska stabla temeljena na sekvenci S segmenta pokazuju bolju podržanost od filogenetskih stabala temeljenih na sekvencama L segmenta (Slika 10 i 14). Također uočavam i poneke razlike u topologiji. U filogenetskom stablu dobivenom Bayesian analizom temeljenom na sekvencama L segmenta uočavam grananje na veći broj grupa dok u filogenetskom stablu temeljenom na sekvencama S segmenta uočavamo kako se sekvence grupiraju skupa prema geografskoj rasprostranjenosti (Slika 9 i 11).

5. Rasprava

Od prvoga otkrića hantavirusa do danas potvrđeno je preko 50 vrsta prema trenutnoj virusnoj taksonomiji Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa (*International Committee on Taxonomy of Viruses*; ICTV; <https://ictv.global/>). Brojni autori (Zana i sur. 2019; Kouadio i sur. 2020; Yashina i sur. 2022) opisuju nove hantaviruse, međutim za dio tih opisa nisu priloženi virusni izolati i/ili sekvence cijeloga genoma te se takvi opisi ne navode u trenutnoj taksonomiji. Bez virusnog izolata i/ili sekvence cijelog virusnog genoma nije moguće utvrditi radi li se o novoj virusnoj vrsti ili o varijanti ranije poznatog virusa pa je ICTV odredio da je za klasifikaciju virusa potrebno sekvencirati cijeli genom ili kodirajuće regije. Nepostojanje životinjskog modela otežava istraživanje ovih virusa, a nedostatak sekvenci cijeloga genoma filogenetske analize (Kuhn i sur. 2023). Novi virusi otkrivaju se sporom dinamikom i nedostatak podataka o njima otežava razumijevanje složenih odnosa u ovoj skupini virusa (Mittler i sur. 2019; Kuhn i Schmaljohn 2023). Hrvatska je endemska regija za pojedine hantaviruse, TULV, PUUV, DOBV, a ranije je zabilježen i SWSV (Markotić i sur. 2002; Scharninghausen i sur. 2002; Cvetko i sur. 2005; Ling i sur. 2018). Nakon otkrića, SWSV je opisan u brojnim europskim državama uključujući Hrvatskoj susjedne države Sloveniju i Mađarsku (Kang i sur. 2009a; Yashina i sur. 2010; Schlegel i sur. 2012; Ling i sur. 2014; Zelena i sur. 2019; Lwande i sur. 2020; Kikuchi i sur. 2023; Resman i sur. 2013). U ovom istraživanju određena je prisutnost SWSV-a u rovkama uzorkovanim na području Hrvatske, a ovo istraživanje predstavlja prvu molekularnu karakterizaciju ovoga virusa za Hrvatsku.

Poznato je da se hantavirusi teško izoliraju, u staničnoj kulturi i pomoću pokusnih životinja. Prema istraživanju Prescott i sur. (2017) problem za izolaciju je razrjeđenje virusne kulture nakon nekog vremena. Safronetz i sur. (2014) smatraju kako pojava mutacija u genu *RdRp* čini virus manje zaraznim. Hantavirusi imaju dug ciklus umnažanja te sporo rastu u staničnoj kulturi (Meier i sur. 2021). S obzirom na navedeno izolacija ukupne RNA pokazala se kao bolja metoda za provedbu molekularne karakterizacije hantavirusa (Manso i sur. 2017) pa sam taj pristup koristila u ovom istraživanju kako bih uspješno sekvencirala S, M i L segment SWSV-a.

S obzirom da je L segment najkonzerviraniji segment hantavirusa, metoda PCR „pan-hantavirus“ se koristi za određivanje prisutnosti hantavirusa u uzorku (Lwande i sur. 2020). Početnice za taj PCR su dizajnirane na temelju sravnjenja velikog broja sekvenci L segmenta hantavirusa te stoga takav PCR cilja sve poznate hantaviruse (Klempa i sur. 2006). U ovom istraživanju sam, zbog

pouzdanosti, koristila metodu PCR „pan-hatavirus“ kako bi se utvrdila prisutnost hantavirusa u rovkama. Metoda PCR "pan-hantavirus“ moguće je odrediti samo prisutnost hantavirusa, a za određivanje vrste pojedinog virusa koristi se sekvenciranje umnoženog segmenta, te sam takav protokol pratila i u ovom istraživanju.

S obzirom na konzerviranost L segmenta, i najveću zastupljenost kratkih sekvenci duljine do 347 pb u bazama podataka NCBI GenBank i BV-BRC: Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center, te imajući u vidu da se za pouzdanu filogenetsku analizu treba osloniti na sva tri segmenta, svoje istraživanje sam dizajnirala s ciljem umnažanja sva tri segmenta. Sekvenca S segmenta dobivena u ovom istraživanju nalazi se 47-1571 nukleotidne pozicije cjelovitog S segmenta (1641 pb). Smatram da bih za dobivanje cjelovite sekvence trebala prilagoditi odabir početnica. Analizom se uočava da se pojedine početnice, preuzete iz literature (Schlegel i sur. 2012; Radosa i sur. 2013), ne poklapaju u potpunosti sa sekvencom ovoga istraživanja. Sravnjenjem početnica sa sekvencom iz ovoga istraživanja može se vidjeti da se početnice, koje su uspješno umnožile ciljane regije virusa, poklapaju s dobivenom sekvencom u velikoj mjeri. Početnica BESS1090R se sravnjuje sa sekvencom na 1090 poziciji kao i očekivano. SWSV S455R početnica trebala bi se poklapati sa sekvencom na 455 poziciji što je sravnjenjem također potvrđeno. Za SWSV-22-fw početnicu nema sravnjenja jer ta pozicija nije uključena u dio S segmenta koji sam dobila sekvenciranjem, ali s obzirom da na početku segmenta ne očekujem varijabilnost, iako nisam provjerila sravnjenje, smatram da je ta početnica dobra za umnažanje regija SWSV iz Hrvatske. SWSV 1590R početnica preklapa se na poziciji 1547, a trebala bi se preklapati na poziciji 1590. Početnica, SWSV 3' end čije korištenje nije bilo uspješno, dosta se razlikuje od dobivene sekvence. Ta početnica trebala bi se poklapati na 3' kraju no sravnjenjem se vidi da se poklapa na poziciji 400. Upravo to je vjerojatno razlog zašto reakcije, u kojima se koristila ova početnica, nisu dale rezultate. Još jedan od razloga zašto pojedine početnice nisu dale rezultate je i raznolikost sekvence ovog istraživanja i istraživanja iz kojih su početnice preuzete. Vrijednosti genetskih udaljenosti analizirane sekvence S segmenta i sekvenci S segmenta dobivenih i objavljenih zajedno s ranije navedenim početnicama u istraživanjima Schlegel i sur. (2012) i Radosa i sur. (2013) iznosi od 1 do 11%, dok genetska udaljenost analizirane sekvence i prototipa mp40 iznosi 12% (Song i sur. 2007b). Takva genetska raznolikost, s vrijednostima do 12%, može uzrokovati nepreklapanje početnica sa sekvencom ovog istraživanja te rezultirati ne umnažanjem ciljane regije virusa. Za daljnja istraživanja predlažem upotrebu degeneriranih početnica s ciljem umnažanja i sekvenciranja cjelovitog S segmenta.

Sekvenca M segmenta nije se uspješno sravnila s postojećim sekvencama iz baze podataka. U istraživanju Kang i sur. (2009b) nisu uspješno sekvencirali M segment NVAV-a u vrsti *Talpa europae* (Eulipotyphla, Talpidae). Kang i sur. (2016) ne uspijevaju dobiti sekvence M segmenta za Dahonggou Creek virus. Također pregledom GenBank i BV-BRC baze podataka može se vidjeti kako postoji najmanje podataka za M segment SWSV. S obzirom na navedeno, zaključujem kako je M segment teško sekvencirati, pa je rezultat sekvenciranja M segmenta u ovom istraživanju očekivan. Hantavirusi se teško izoliraju, a isto tako i teško sekvenciraju (Lwande i sur. 2020). Smatram da postoje tri moguća razloga zbog čega se M segment teško sekvencira. Prvi razlog je niska koncentracija virusa, što je moguće razlog lošeg rezultata u ovom istraživanju. Vjerojatnost postajanja dugih fragmenata u uzorcima je niža što je niža koncentracija virusa (Quick i sur. 2017) zbog čega je vjerojatnije umnažanje kraćih fragmenta, što se u ovom istraživanju dogodilo. Problem niske koncentracije je i veća mogućnost kontaminacije i nedovoljna osjetljivost korištene metode PCR. Zbog niske koncentracije virusa u tkivu zaražene životinje ili ljudi sve se više počinje koristiti sekvenciranje visoke protočnosti (Kim i sur 2021). Drugi razlog je starost tkiva korištenog u ovom istraživanju. Neki uzorci prikupljeni su i prije 10 godina pa je degradacija RNA moguća iako su čuvani na -80°C . Uzorci su i nekoliko puta korišteni za izolaciju zbog čega postoji mogućnost fragmentacije RNA. Takva RNA onda otežava rad. Prema istraživanju Song i sur. (2007b) otežano su sintetizirali cDNA jedne analizirane roveke zbog odmrzavanja uzorka tijekom transporta čime je došlo do smanjenja prinosa RNA. Lwande i sur. (2020) koriste uzorke stare 20 godina i pokazuju da je teško sekvencirati cijeli genom iz takvih uzoraka. Treći razlog je varijabilnost M segmenta. M segment je najvarijabilniji od tri segmenta hantavirusa (Kabwe i sur. 2020). Ali i sur. (2014) pokazuju kako se sekvence S segmenta između različitih sojeva PUUV razlikuju oko 16%, dok sekvence M segmenta oko 19%. Levis i sur. (1998) pokazuju visoku divergenciju sekvenci M segmenta između uzoraka prikupljenih na različitim geografskim područjima, ali i onih sekvenci prikupljenih na istom. To je možda i razlog zašto početnice nisu umnožile ciljane regije virusa. Dodatno problem je bio nemogućnost sravnjenja dobivene sekvence sa postojećim sekvencama iz baze podataka čemu je razlog moguća varijabilnost M segmenta. Razlog nepronalaska homologne sekvence sekvenci ovog istraživanja je možda i nedovoljna istraženost, odnosno mali broj sekvenci u bazama podataka (NCBI GenBank i BV-BRC: Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center), ovog segmenta. M segment bi se potencijalno mogao sekvencirati dizajniranjem degeneriranih početnica koje bi se onda uspješno vezale na sekvencu

ovoga istraživanja. Za bolje rezultate trebale bi se upotrijebiti i metode visoke protočnosti sekvenciranja, odnosno sekvenciranja nove generacije. U istraživanju Hiltbrunner i Heckel (2020) pokazuju uspješnost takvog sekvenciranja. Koristili su metodu sekvenciranja *hybrid-capture*. Uspješno su sekvencirali cijeli genom TULV i PUUV i pokazali da se rezultati sravnjenja sekvenci poklapaju s rezultatima temeljenim na analizi djelomičnih segmenata dobivenih Sangerovim sekvenciranjem. Takav pristup dao bi bolje rezultate, ali i smanjio vrijeme cijelog postupka.

S obzirom na dobivena filogenetska stabla zaključujem da za pouzdanije filogenetske analize nije dovoljna upotreba kratkih sekvenci segmenta već je filogeniju potrebno potkrijepiti cjelovitim sekvencama segmenta. Uočeno grupiranje prema geografskoj rasprostranjenosti je u skladu s ranijim istraživanjima (Ling i sur. 2018). U istraživanju Ling i sur. (2018) pokazuju povećanje genetske udaljenosti između sekvenci S segmenta s povećanjem geografske udaljenosti. Kang i sur. (2009a) pokazuju grupiranje sekvenci L segmenta na temelju geografske udaljenosti. L segment pokazuje slične filogenetske odnose kao i S segment, ali s obzirom na najveću zastupljenost sekvenci L segmenta i najveću raznolikost geografskih regija za koje su sekvence L segmenta objavljene u NCBI GenBank bazi podataka (zadnje pristupljeno 20.10.2023.) važna je njegova primjena u filogenetskim istraživanjima. Prema istraživanju Weiss i sur. (2019) djelomične sekvence L segmenta bi mogle potencijalno biti dovoljne za filogenetsku analizu. U tom istraživanju provode filogenetsku analizu na PUUV i pokazuju da su filogenetski odnosi S i M segmenta slični uz male razlike u topologiji. Stope mutacije i replikacije različite su između segmenta stoga se rade filogenetske analize i usporedbe na temelju ta dva segmenta. Unatoč tome imaju malu razliku u evolucijskoj stopi i oba segmenta se koriste za pouzdanu filogenetsku analizu (Schmaljohn i Hjelle 1997). Grupiranje prema geografskoj rasprostranjenosti pokazuju i neki drugi hantavirusi, primjerice PUUV i HTNV (Sironen i sur. 2001; Jalal i sur. 2022). Resman i sur. (2013) pokazuju kako se sekvenca S segmenta iz Slovenije odvajaju od ostalih sekvenci. U ovome istraživanju pokazano je kako se hrvatske sekvence grupiraju i najsirodnije su upravo sa sekvencama iz Slovenije. Međutim, smatram kako sekvence iz ovog istraživanja se odvajaju u posebnu genetsku liniju u odnosu na sekvence iz Slovenije. Takve odnose treba dodatno potvrditi većim uzorkovanjem rovk i na širem geografskom području Hrvatske i dodatnim sekvenciranjem. U istraživanju Ling i sur. (2018) Bayesian analizom L segmenta pokazuju grupiranje sekvence iz Hrvatske sa sekvencama iz Slovenije, Mađarske i Slovačke. U ovom istraživanju Bayesian analizom djelomičnog L segmenta utvrđeni su isti odnosi.

Korištene jedinke ulovljene su lovnim zamkama u kojima tijekom vremena dolazi do propadanja tkiva te time gubitka vrsno-specifičnih morfoloških karakteristika. Takve je jedinke teško odrediti do razine vrste (Bjedov, L., osobna komunikacija, 20. listopada 2023). Također jedinke unutar istog roda, primjerice *Crocidura ordinaria* (Esselstyn, Achmadi, Handika, Swanson, Giarla i Rowe, 2021) i *Crocidura solita* (Esselstyn, Achmadi, Handika, Swanson, Giarla i Rowe, 2021), su morfološki dosta slične što dodatno otežava analizu (Esselstyn i sur. 2021). Stoga je u ovom istraživanju vrsta analiziranih rovkii određivana umnažanjem mitohondrijskih markera za *CYTB* i *COI*. Genetska udaljenost sekvenci ovog istraživanja i referentnih sekvenci nije prelazila 3,5% što je u skladu s intraspecifičnim varijacijama za ovu skupinu (Castiglia i sur. 2007; Jacquet i sur. 2012), a analizirane jedinke su pouzdano određene do razine vrste. Određivanje vrste ovisi i o točnom upisu u bazama podataka. Kako to nije bio fokus ovog rada, to nije dodatno provjereno. Sve zabilježene vrste rasprostranjene su na području Hrvatske i svojstvene su staništima na kojima su uzorkovane. Prisutnost SWSV-a utvrđena je u vrstama *Sorex araneus* i *Neomys anomalus*. Uspoređujući rezultate s drugim istraživanjima vidimo da je SWSV prvi puta detektiran u vrsti *Sorex araneus* (Song i sur. 2007b) i da ta vrsta predstavlja glavnog domaćina ovoga virusa (Schlegel i sur. 2012). Zbog toga nije neobično da je prisutnost SWSV-a utvrđena u njoj. Prisutnost SWSV u vrsti *Neomys anomalus* je do danas utvrđena tek u dva slučaja. Gu i sur. (2014) utvrđuju prisutnost SWSV u jednom uzorku te vrste. U bazama podataka postoji jedna djelomična sekvenca za L segment SWSV-a dobivena iz *Neomys anomalus* (NCBI pristupni broj: EU418604.1). Utvrđena prisutnost SWSV u *Neomys anomalus* u ovom istraživanju je stoga jedan od rijetkih nalaza ovoga virusa u toj vrsti rovkii. Takva prisutnost moguće je rezultat prijenosa virusa s jedne vrste na drugu (engl. „spillover“ efekt). Navedeni prijenos pokazan je i u drugim hantavirusima, primjerice TULV između vrsta *Microtus arvalis* i *Microtus agrestis* (Rodentia, Cricetidae) (Schmidt-Chanasit i sur. 2010).

Posljednjih godina sve se više primjenjuje sekvenciranje nove generacije. Sekvenciranje nove generacije može se primijeniti za sekvenciranje cijeloga genoma virusa, praćenje širenja virusa, razvoj lijekova i utvrđivanje patogena. Taj pristup mogao bi zaobići probleme niskog titra virusa (No i sur. 2019). Tako primjerice Park i sur. (2023) sekvenciraju skoro cijele sekvence genoma upotrebom MinIon-a (Oxford Nanopor uređaja). Cho i sur. (2021) uspješno su sekvencirali cijele sekvence genoma HTNV-a. Ovo istraživanje pokazuje potrebu za korištenjem metoda sekvenciranja nove generacije u istraživanju SWSV-a. Korištenje takvih metoda omogućilo bi

sekvenciranje cijeloga genoma SWSV-a. Tako bi se omogućilo provođenje dodatnih filogenetskih analiza, ali i moguće otkrivanje ovoga virusa i u drugim vrstama rovki u Hrvatskoj.

6. Zaključak

U ovom istraživanju potvrđena je prisutnost SWSV-a u dvije vrste rovki (*Sorex araneus* i *Neomys anomalus*) na području Hrvatske. Utvrđena prisutnost SWSV u vrsti *Neomys anomalus* predstavlja rijetki nalaz tog virusa u ovoj vrsti. Uspješno je sekvenciran ORF S segmenta i djelomične sekvence L segmenta. Na temelju filogenetskih analiza može se zaključiti:

1. sekvence SWSV-a se grupiraju na temelju geografske rasprostranjenosti, sekvence s geografski bliskih područja se grupiraju i pokazuju najveću srodnost
2. filogenetska stabla temeljena na sekvencama L i S segmenta slična su izgledom i potvrđuju filogenetske odnose unutar SWSV virusa

Ovo istraživanje predstavlja prvu molekularnu karakterizaciju SWSV-a na području Hrvatske. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se dobila potpuna sekvenca S segmenta te sekvenca M segmenta za daljnje filogenetske analize. Pronalazak virusa u vrsti *Neomys anomalus* čini podlogu za daljnja istraživanja ovog virusa i u drugim vrstama gdje je moglo doći do prijenosa (engl. *spillover*). Rezultati ovoga istraživanja daju podlogu za daljnja istraživanja ovoga virusa i njegove potencijalne patogenosti.

7. Literatura

- Ali, H. S., Drewes, S., Weber De Melo, V., Schlegel, M., Freise, J., Groschup, M. H., Heckel, G., i Ulrich, R. G. (2015). Complete genome of a Puumala virus strain from Central Europe. *Virus Genes*, *50*(2), 292–298.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410.
- Arai, S., i Yanagihara, R. (2020). Genetic Diversity and Geographic Distribution of Bat-borne Hantaviruses. *Current Issues in Molecular Biology*, 1–28.
- Avšič-Županc, T., Saksida, A., i Korva, M. (2019). Hantavirus infections. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*, e6–e16.
- Carey, D. E., Reuben, R., Panicker, K. N., Shope, R. E., i Myers, R. M. (1971). Thottapalayam virus: A presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *The Indian Journal of Medical Research*, *59*(11), 1758–1760.
- Castel, G., Tordo, N., i Plyusnin, A. (2017). Estimation of main diversification time-points of hantaviruses using phylogenetic analyses of complete genomes. *Virus Research*, *233*, 60–69.
- Castiglia, R., Annesi, F., Aloise, G., i Amori, G. (2007). Mitochondrial DNA reveals different phylogeographic structures in the water shrews *Neomys anomalus* and *N. fodiens* (Insectivora: Soricidae) in Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *45*(3), 255–262.
- Cekinović Grbeša, Đ., Zahirović, N., Flego, V., Livajić, M., Rončević Filipović, M., Knežević, S., i Slavuljica, I. (2023). Epidemiology and Clinical Course of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome in New Endemic Area for Hantavirus Infection in Croatia. *Life*, *13*(8), 1767.
- Childs, J. E., Glass, G. E., Korch, G. W., i LeDuc, J. W. (1989). Effects of hantaviral infection on survival, growth and fertility in wild rat (*Rattus norvegicus*) populations of Baltimore, Maryland. *Journal of Wildlife Diseases*, *25*(4), 469–476.
- Cho, S., Kim, W.-K., No, J. S., Lee, S.-H., Jung, J., Yi, Y., Park, H. C., Lee, G.-Y., Park, K., Kim, J.-A., Kim, J., Lee, J., Lee, D., Song, D. H., Gu, S. H., Jeong, S. T., i Song, J.-W. (2021). Urinary genome detection and tracking of Hantaan virus from hemorrhagic fever with renal syndrome patients using multiplex PCR-based next-generation sequencing. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *15*(9), e0009707.

- Cvetko, L., Markotić, A., Plyusnina, A., Margaletić, J., Miletić-Medved, M., Turk, N., Milas, Z., Avšič-Županc, T., i Plyusnin, A. (2005). Puumala virus in Croatia in the 2002 HFRS outbreak. *Journal of Medical Virology*, 77(2), 290–294.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., i Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), Article 8.
- Douglass, R. J., Calisher, C. H., Wagoner, K. D., i Mills, J. N. (2007). Sin Nombre virus infection of deer mice in Montana: Characteristics of newly infected mice, incidence, and temporal pattern of infection. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(1), 12–22.
- Esselstyn, J. A., Achmadi, A. S., Handika, H., Swanson, M. T., Giarla, T. C., i Rowe, K. C. (2021). Fourteen New, Endemic Species of Shrew (Genus *Crocidura*) from Sulawesi Reveal a Spectacular Island Radiation. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 454(1), 1–108.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., i Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Gavrilovskaya, I. N., Apekina, N. S., Myasnikov, Yu. A., Bernshtein, A. D., Ryltseva, E. V., Gorbachkova, E. A., i Chumakov, M. P. (1983). Features of circulation of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus among small mammals in the European U.S.S.R. *Archives of Virology*, 75(4), 313–316.
- Gligic, A., Stojanovic, R., Obradovic, M., Hlaca, D., Dimkovic, N., Diglisic, G., Lukac, V., Ler, Z., Bogdanovic, R., Antonijevic, B., Ropac, D., Avsic-Zupanc, T., Leduc, J. W., Ksiazek, T., Yanagihara, R., i Gajdusek, D. C. (1992). Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: Epidemiologic and epizootiologic features of a nationwide outbreak in 1989. *European Journal of Epidemiology*, 8(6), 816–825.
- Gu, S. H., Hejduk, J., Markowski, J., Kang, H. J., Markowski, M., Połatyńska, M., Sikorska, B., Liberski, P. P., i Yanagihara, R. (2014). Co-circulation of soricid- and talpid-borne hantaviruses in Poland. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 296–303.
- Guo, W.-P., Lin, X.-D., Wang, W., Tian, J.-H., Cong, M.-L., Zhang, H.-L., Wang, M.-R., Zhou, R.-H., Wang, J.-B., Li, M.-H., Xu, J., Holmes, E. C., i Zhang, Y.-Z. (2013). Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents. *PLoS Pathogens*, 9(2), e1003159.

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hiltbrunner, M., i Heckel, G. (2020). Assessing Genome-Wide Diversity in European Hantaviruses through Sequence Capture from Natural Host Samples. *Viruses*, 12(7), 749.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D., & Wilson, A. C. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32(2), 128–144.
- Jacquet, F., Nicolas, V., Bonillo, C., Cruaud, C., i Denys, C. (2012). Barcoding, molecular taxonomy, and exploration of the diversity of shrews (Soricomorpha: Soricidae) on Mount Nimba (Guinea). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166(3), 672–687.
- Jalal, S., Kim, C.-M., Kim, D.-M., Song, H. J., Lee, J.-C., Shin, M. Y., i Lim, H. C. (2022). Geographical clustering of Hantavirus isolates from Apodemus agrarius identified in the Republic of Korea indicate the emergence of a new Hantavirus genotype. *Journal of Clinical Virology*, 146, 105030.
- Jonsson, C. B., Figueiredo, L. T. M., i Vapalahti, O. (2010). A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 412–441.
- Kabwe, E., Davidiyuk, Y., Shamsutdinov, A., Garanina, E., Martynova, E., Kitaeva, K., Malisheni, M., Isaeva, G., Savitskaya, T., Urbanowicz, R. A., Morzunov, S., Katongo, C., Rizvanov, A., i Khaiboullina, S. (2020). Orthohantaviruses, Emerging Zoonotic Pathogens. *Pathogens*, 9(9), 775.
- Kang, H. J., Arai, S., Hope, A. G., Song, J.-W., Cook, J. A., i Yanagihara, R. (2009a). Genetic diversity and phylogeography of Seewis virus in the Eurasian common shrew in Finland and Hungary. *Virology Journal*, 6(1), 208.
- Kang, H. J., Bennett, S. N., Sumibcay, L., Arai, S., Hope, A. G., Mocz, G., Song, J.-W., Cook, J. A., i Yanagihara, R. (2009b). Evolutionary Insights from a Genetically Divergent Hantavirus Harbored by the European Common Mole (*Talpa europaea*). *PLoS ONE*, 4(7), e6149.
- Kikuchi, F., Arai, S., Hejduk, J., Hayashi, A., Markowski, J., Markowski, M., Rychlik, L., Khodzinskyi, V., Kamiya, H., Mizutani, T., Suzuki, M., Sikorska, B., Liberski, P. P., i Yanagihara, R. (2023). Phylogeny of Shrew- and Mole-Borne Hantaviruses in Poland and Ukraine. *Viruses*, 15(4), 881.
- Kim, W.-K., Cho, S., Lee, S.-H., No, J. S., Lee, G.-Y., Park, K., Lee, D., Jeong, S. T., i Song, J.-W. (2021). Genomic Epidemiology and Active Surveillance to Investigate Outbreaks of Hantaviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.
- Klempa, B. (2018). Reassortment events in the evolution of hantaviruses. *Virus Genes*, 54(5), 638–646.

- Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Denys, C., Koivogui, L., Ter Meulen, J., i Krüger, D. H. (2006). Hantavirus in African Wood Mouse, Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 12(5), 838–840.
- Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Barrière, P., Koivogui, L., ter Meulen, J., i Krüger, D. H. (2007). Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 520–522.
- Klempa, B., Avsic-Zupanc, T., Clement, J., Dzagurova, T. K., Henttonen, H., Heyman, P., Jakab, F., Kruger, D. H., Maes, P., Papa, A., Tkachenko, E. A., Ulrich, R. G., Vapalahti, O., i Vaheri, A. (2013). Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: Definition of genotypes and their characteristics. *Archives of Virology*, 158(3), 521–529.
- Kouadio, L., Nowak, K., Couacy-Hymann, E., Akoua-Koffi, C., Düx, A., Zimmermann, F., Allali, B. K., Kourouma, L., Bangoura, K., Koendgen, S., Witkowski, P. T., Krüger, D. H., Calvignac-Spencer, S., i Leendertz, F. H. (2020). Detection of possible spillover of a novel hantavirus in a Natal mastomys from Guinea. *Virus Genes*, 56(1), 95–98.
- Krajnović, L. C. (2007). Molekularna epidemiologija hantavirusa. *Infektološki glasnik*, 27(3), 123-129.
- Krüger, D. H., Schönrich, G., i Klempa, B. (2011). Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection. *Human Vaccines*, 7(6), 685–693.
- Kuhn, J. H., i Schmaljohn, C. S. (2023). A Brief History of Bunyaviral Family Hantaviridae. *Diseases*, 11(1), 38.
- Kuhn, J. H., Bradfute, S. B., Calisher, C. H., Klempa, B., Klingström, J., Laenen, L., Palacios, G., Schmaljohn, C. S., Tischler, N. D., i Maes, P. (2023). Pending Reorganization of Hantaviridae to Include Only Completely Sequenced Viruses: A Call to Action. *Viruses*, 15(3), 660.
- Li, D., Schmaljohn, A. L., Anderson, K., i Schmaljohn, C. S. (1995). Complete nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: Evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, 206(2), 973–983.
- Lee, H. W., Lee, P. W., i Johnson, K. M. (1978). Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 137(3), 298–308.
- Lee, S.-H., No, J. S., Kim, W.-K., Gajda, E., Perec-Matysiak, A., Kim, J.-A., Hildebrand, J., Yanagihara, R., i Song, J.-W. (2020). Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of Orthohantaviruses in

- Small Mammals in Western Poland. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(1), 193–199.
- Levis, S., Morzunov, S. P., Rowe, J. E., Enria, D., Pini, N., Calderon, G., Sabbatini, M., i Jeor, S. C. St. (1998). Genetic Diversity and Epidemiology of Hantaviruses in Argentina. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(3), 529–538.
- Ling, J., Sironen, T., Voutilainen, L., Hepojoki, S., Niemimaa, J., Isoviita, V.-M., Vaheri, A., Henttonen, H., i Vapalahti, O. (2014). Hantaviruses in Finnish soricomorphs: Evidence for two distinct hantaviruses carried by *Sorex araneus* suggesting ancient host-switch. *Infection, Genetics and Evolution*, 27, 51–61.
- Ling, J., Smura, T., Tamarit, D., Huitu, O., Voutilainen, L., Henttonen, H., Vaheri, A., Vapalahti, O., i Sironen, T. (2018). Evolution and postglacial colonization of Seewis hantavirus with *Sorex araneus* in Finland. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 88–97.
- Lovrić, Z., Kolarić, B., Kosanović Ličina, M. L., Tomljenović, M., Đaković Rode, O., Danis, K., Kaić, B., i Tešić, V. (2018). An outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome linked with mountain recreational activities in Zagreb, Croatia, 2017. *Epidemiology and Infection*, 146(10), 1236–1239.
- Lwande, O. W., Mohamed, N., Bucht, G., Ahlm, C., Olsson, G., i Evander, M. (2020). Seewis hantavirus in common shrew (*Sorex araneus*) in Sweden. *Virology Journal*, 17(1), 198.
- Maddison, W. P., i Maddison, D. R. (2023). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.81. <http://www.mesquiteproject.org>
- Manso, C. F., Bibby, D. F., i Mbisa, J. L. (2017). Efficient and unbiased metagenomic recovery of RNA virus genomes from human plasma samples. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1.
- Markotić, A., Nichol, S. T., Kuzman, I., Sanchez, A. J., Ksiazek, T. G., Gagro, A., Rabatić, S., Zgorelec, R., Avšić-Županc, T., Beus, I., i Dekaris, D. (2002). Characteristics of puumala and Dobrava infections in Croatia. *Journal of Medical Virology*, 66(4), 542–551.
- Meier, K., Thorkelsson, S. R., Quemin, E. R. J., i Rosenthal, M. (2021). Hantavirus Replication Cycle—An Updated Structural Virology Perspective. *Viruses*, 13(8), 1561.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., i Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8.

- Mitchell-Jones, A. J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Krystufek, B., Reijnders, P. J. H., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J. B. M., Vohralik, V., i Zima, J. (1999). The atlas of European mammals. London, U.K: *Academic Press*, str. 40-77.
- Mittler, E., Dieterle, M. E., Kleinfelter, L. M., Slough, M. M., Chandran, K., i Jangra, R. K. (2019). Hantavirus entry: Perspectives and recent advances. *Advances in Virus Research*, 104, 185–224.
- Nowak, R. M. (1991) Walker's Mammals of the World. Baltimore i London: *The Johns Hopkins University Press*. Vol.1, str. 144-167.
- Park, K., Noh, J., Kim, K., Kim, J., Cho, H.-K., Kim, S.-G., Yang, E., Kim, W.-K., i Song, J.-W. (2023). A Development of Rapid Whole-Genome Sequencing of Seoul orthohantavirus Using a Portable One-Step Amplicon-Based High Accuracy Nanopore System. *Viruses*, 15(7), Article 7.
- Plyusnin, A., i Sironen, T. (2014). Evolution of hantaviruses: Co-speciation with reservoir hosts for more than 100MYR. *Virus Research*, 187, 22–26.
- Plyusnin, A., Vapalahti, O., i Vaheiri, A. (1996). Hantaviruses: Genome structure, expression and evolution. *Journal of General Virology*, 77(11), 2677–2687.
- Prescott, J., Feldmann, H., i Safronetz, D. (2017). Amending Koch’s postulates for viral disease: When “growth in pure culture” leads to a loss of virulence. *Antiviral Research*, 137, 1–5.
- Quick, J., Grubaugh, N. D., Pullan, S. T., Claro, I. M., Smith, A. D., Gangavarapu, K., Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T. F., Beutler, N. A., Burton, D. R., Lewis-Ximenez, L. L., de Jesus, J. G., Giovanetti, M., Hill, S. C., Black, A., Bedford, T., Carroll, M. W., Nunes, M., i Loman, N. J. (2017). Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nature Protocols*, 12(6), Article 6.
- Radosa, L., Schlegel, M., Gebauer, P., Ansorge, H., Heroldová, M., Jánová, E., Stanko, M., Mošanský, L., Fričová, J., Pejčoch, M., Suchomel, J., Purchart, L., Groschup, M. H., Krüger, D. H., Ulrich, R. G., i Klempa, B. (2013). Detection of shrew-borne hantavirus in Eurasian pygmy shrew (*Sorex minutus*) in Central Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 403–410.
- Radošević, Z., i Mohaček, I. (1954). The Problem of Nephropathia Epidemica Myhrman-Zetterholm in Relation to Acute Interstitial Nephritis. *Acta Medica Scandinavica*, 149(3), 221–228.
- Rambaut, A.. (2010). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., i Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904.
- Resman, K., Korva, M., Fajs, L., Zidarič, T., Trilar, T., i Županc, T. A. (2013). Molecular evidence and high genetic diversity of shrew-borne Seewis virus in Slovenia. *Virus Research*, 177(1), 113–117.
- Rönnerberg, T., Jääskeläinen, K., Blot, G., Parviainen, V., Vaheri, A., Renkonen, R., Bouloy, M., i Plyusnin, A. (2012). Searching for Cellular Partners of Hantaviral Nonstructural Protein NSs: Y2H Screening of Mouse cDNA Library and Analysis of Cellular Interactome. *PLoS ONE*, 7(4), e34307.
- Ronquist, F., i Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 19(12), 1572–1574.
- Safronetz, D., Prescott, J., Feldmann, F., Haddock, E., Rosenke, R., Okumura, A., Brining, D., Dahlstrom, E., Porcella, S. F., Ebihara, H., Scott, D. P., Hjelle, B., i Feldmann, H. (2014). Pathophysiology of hantavirus pulmonary syndrome in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19), 7114–7119.
- Sanfeliu, M. R. (2012). Microevolution of Puumala hantavirus in its host, the bank vole (*Myodes glareolus*). Doktorska disertacija, Sveučilište u Helsinkiju, Medicinski fakultet, Helsinki.
- Scharninghausen, J. J., Pfeffer, M., Meyer, H., Davis, D. S., Honeycutt, R. L., i Faulde, M. (2002). Genetic Evidence for Tula Virus in *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis* Populations in Croatia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2(1), 19–27.
- Schlegel, M., Radosa, L., Rosenfeld, U. M., Schmidt, S., Triebenbacher, C., Löhr, P.-W., Fuchs, D., Heroldová, M., Jánová, E., Stanko, M., Mošanský, L., Fričová, J., Pejčoch, M., Suchomel, J., Purchart, L., Groschup, M. H., Krüger, D. H., Klempa, B., i Ulrich, R. G. (2012). Broad geographical distribution and high genetic diversity of shrew-borne Seewis hantavirus in Central Europe. *Virus Genes*, 45(1), 48–55.
- Schmaljohn, C., i Hjelle, B. (1997). Hantaviruses: A Global Disease Problem. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), 95–104.
- Schmaljohn, C. S., i Dalrymple, J. M. (1983). Analysis of Hantaan virus RNA: Evidence for a new genus of bunyaviridae. *Virology*, 131(2), 482–491.
- Schmidt-Chanasit, J., Essbauer, S., Petraityte, R., Yoshimatsu, K., Tackmann, K., Conraths, F. J., Sasnauskas, K., Arikawa, J., Thomas, A., Pfeffer, M., Scharninghausen, J. J., Spletstoeser, W., Wenk, M., Heckel, G., i Ulrich, R. G. (2010). Extensive Host Sharing of Central European Tula Virus. *Journal of Virology*, 84(1), 459–474.

- Shi, M., Lin, X.-D., Chen, X., Tian, J.-H., Chen, L.-J., Li, K., Wang, W., Eden, J.-S., Shen, J.-J., Liu, L., Holmes, E. C., i Zhang, Y.-Z. (2018). The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature*, 556(7700), 197–202.
- Sironen, T., Vaheri, A., i Plyusnin, A. (2001). Molecular Evolution of Puumala Hantavirus. *Journal of Virology*, 75(23), 11803–11810.
- Song, J.-W., Baek, L. J., Schmaljohn, C. S., i Yanagihara, R. (2007a). Thottapalayam Virus, a Prototype Shrewborne Hantavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 13(7), 980–985.
- Song, J.-W., Gu, S., Bennett, S. N., Arai, S., Puorger, M., Hilbe, M., i Yanagihara, R. (2007b). Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virology Journal*, 4(1), 114.
- Tadin, A., Margaletić, J., Turk, N., Markotić, A., Vucelja, M., Labaš, N., Štritof, Z., Habuš, J., Svoboda, P., i Bjedov, L. (2016). Influence of beech mast on small rodent populations and hantavirus prevalence in Nacional Park „Plitvice lakes“ and Nature Park „Medvednica“. *Šumarski list*, 140(9–10), 455–463.
- Tamura, K., Stecher, G., i Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*. 38.
- Weber, F., Dunn, E. F., Bridgen, A., i Elliott, R. M. (2001). The Bunyamwera Virus Nonstructural Protein NSs Inhibits Viral RNA Synthesis in a Minireplicon System. *Virology*, 281(1), 67–74.
- Weiss, Klempa, Tenner, Kruger, i Hofmann. (2019). Prediction of the Spatial Origin of Puumala Virus Infections Using L Segment Sequences Derived from a Generic Screening PCR. *Viruses*, 11(8), 694.
- Yashina, L. N., Abramov, S. A., Gutorov, V. V., Dupal, T. A., Krivopalov, A. V., Panov, V. V., Danchinova, G. A., Vinogradov, V. V., Luchnikova, E. M., Hay, J., Kang, H. J., i Yanagihara, R. (2010). Seewis Virus: Phylogeography of a Shrew-Borne Hantavirus in Siberia, Russia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(6), 585–591.
- Yashina, L. N., Panov, V. V., Abramov, S. A., Smetannikova, N. A., Luchnikova, E. M., Dupal, T. A., Krivopalov, A. V., Arai, S., i Yanagihara, R. (2022). Academ Virus, a Novel Hantavirus in the Siberian Mole (*Talpa altaica*) from Russia. *Viruses*, 14(2), 309.
- Zana, B., Kemenesi, G., Buzás, D., Csorba, G., Görföl, T., Khan, F. A. A., Tahir, N. F. D. A., Zeghib, S., Madai, M., Papp, H., Földes, F., Urbán, P., Herczeg, R., Tóth, G. E., i Jakab, F. (2019).

Molecular Identification of a Novel Hantavirus in Malaysian Bronze Tube-Nosed Bats (*Murina aenea*). *Viruses*, 11(10), 887.

Zelena, H., Strakova, P., Heroldova, M., Mrazek, J., Kastl, T., Zakovska, A., Ruzek, D., Smetana, J., i Rudolf, I. (2019). Molecular Epidemiology of Hantaviruses in the Czech Republic. *Emerging Infectious Diseases*, 25(11), 2133–2135.

Zeller, H. G., Karabatsos, N., Calisher, C. H., Digoutte, J. P., Cropp, C. B., Murphy, F. A., i Shope, R. E. (1989). Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. II. Evidence suggesting the placement of viruses in the family Bunyaviridae. *Archives of Virology*, 108(3–4), 211–227.

Zhang, Y.-Z. (2014). Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. *Virus Research*, 187, 15–21.

IUCN (2022) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2. <https://www.iucnredlist.org/> (zadnje pristupljeno 18.10.2023.)

Životopis

Rođena sam 18. svibnja 1999. u Šibeniku gdje sam završila Gimnaziju Antuna Vrančića. Preddiplomski studij sam završila na Odjelu za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Tijekom preddiplomskog studija sudjelovala sam u radionicama na manifestaciji „Biolog-i-ja“. Na Odjelu za biologiju bila sam demonstrator na vježbama iz kolegija „Alge, gljive i lišajevi“. Diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2021. godine. Tijekom diplomskog studija sudjelovala sam u organizaciji manifestacije „Dan i noć na PMF-u“. Stručnu praksu sam odradila na Zavodu za molekularnu biologiju. Svoj diplomski rad izradila sam u Odjelu za znanstvena istraživanja Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Rezultati ovog diplomskog rada izloženi su na „12th International Conference on Hantaviruses“ u Koreji i pripremljeni su za objavu.