

Genomika i molekularna epidemiologija virusa iz porodica Paramyxoviridae i Pneumoviridae u Hrvatskoj

Slović, Anamarija

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:217:260179>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Anamarija Slović

**GENOMIKA I MOLEKULARNA
EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA IZ
PORODICA *PARAMYXOVIRIDAE* I
PNEUMOVIRIDAE U HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Anamarija Slović

**GENOMICS AND MOLECULAR
EPIDEMIOLOGY OF
PARAMYXOVIRUSES AND
PNEUMOVIRUSES IN CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dubravka Forčića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

Najiskrenije zahvaljujem mentoru dr. sc. Dubravku Forčiću na ukazanom povjerenju, uloženom trudu i velikoj podršci u ovom istraživanju, te kritičkom čitanju i sugestijama u izradi ovog rada.

Hvala svim članovima Centra na ugodnoj radnoj atmosferi, a posebno zahvaljujem kolegicama dr. sc. Jeleni Ivančić-Jelečki, dr. sc. Tanji Košutić Gulija, dr. sc. Maji Jagušić, ing. Renati Jug i dr. sc. Maji Šantak na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu tijekom izrade ove disertacije, kao i brojnim korisnim savjetima.

Hvala mojoj obitelji na razumijevanju i pruženoj podršci tijekom školovanja.

**GENOMIKA I MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA IZ PORODICA
PARAMYXOVIRIDAE I *PNEUMOVIRIDAE* U HRVATSKOJ**

ANAMARIJA SLOVIĆ

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji
Sveučilište u Zagrebu

Porodice *Paramyxoviridae* i *Pneumoviridae* obuhvaćaju širok raspon virusnih patogena od kojih mnogi imaju utjecaj na ljudsko zdravlje. Najčešći uzročnici bolesti kod male djece iz ovih porodica su ljudski virusi parainfluence (eng. *Human parainfluenza viruses*, HPIV), te ljudski respiratorni sincicijski virus (eng. *Human respiratory syncytial virus*, HRSV) i ljudski metapneumovirus (eng. *Human metapneumovirus*, HMPV). U ovom istraživanju ispitana je molekularna evolucija HPIV, HRSV i HMPV virusa na području Zagreba tijekom nekoliko uzastopnih godina (2011.-2016.), koji su odgovorni za akutne respiratorne bolesti u pedijatrijskoj populaciji. Spoznaje o odnosima između postojećih genotipova na određenom području važne su za predviđanje epidemija te omogućavaju pravovremenu kontrolu širenja, što je od posebne važnosti za navedene viruse, s obzirom da ne postoji specifični antivirusni tretman niti cjepivo protiv ovih virusa. Molekularno-epidemiološkim analizama utvrđeno je postojanje velikog broja različitih virusnih sojeva, a rezultati ove studije doprinose poznavanju obrazaca cirkulacije ovih virusa kao i boljem razumijevanju molekularne epidemiologije.

(158 stranica, 47 slika, 31 tablice, 243 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: filogenetska analiza, genska varijabilnost, molekularna evolucija, genotipizacija, filodinamika

Mentor: dr. sc. Dubravko Forčić, znanstveni savjetnik

Ocjenjivači: 1. prof. dr. sc. Dijana Škorić, redoviti profesor

2. dr. sc. Jelena Ivančić-Jelečki, znanstveni suradnik

3. izv. prof. dr. sc. Sunčanica Ljubin Sternak, prim.dr.med.

GENOMICS AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF PARAMYXOVIRUSES AND PNEUMOVIRUSES IN CROATIA

ANAMARIJA SLOVIĆ

Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology
University of Zagreb

The families *Paramyxoviridae* and *Pneumoviridae* comprise broad spectrum of viral pathogens, many of which affect human health. The most common causatives of infections in pediatric population from these families include Human parainfluenza viruses (HPIV), Human respiratory syncytial virus (HRSV) and Human metapneumovirus (HMPV). In this study, molecular evolution of HPIV, HRSV and HMPV viruses responsible for acute respiratory infections in Zageb region during several subsequent years (2011-2016) was investigated. The knowledge of current relations between existing viral genotypes in a particular region enables better predictions of future epidemics and facilitates viral control, which is especially important as there is no vaccine or treatment available for these viruses. Molecular epidemiological analyses revealed circulation of numerous different viral strains. Therefore, the results of this study contribute to a better understanding of circulation patterns and molecular epidemiology of these viruses.

(158 pages, 47 figures, 31 tables, 243 references, original in Croatian)

Keywords: phylogenetic analysis, genetic variability, molecular evolution, genotyping, phylodynamics

Supervisor: Senior Research Scientist Dubravko Forčić, Ph.D.

Reviewers: 1. Professor Dijana Škorić, Ph.D.

2. Research Associate Jelena Ivančić-Jelečki, Ph.D.

3. Associate Professor Sunčanica Ljubin-Sternak, MD, Ph.D.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1 Porodice <i>Paramyxoviridae</i> i <i>Pneumoviridae</i>	2
2.2 HPIV.....	2
2.3 HRSV i HMPV.....	4
2.4 Virusna čestica	6
2.5 Organizacija genoma.....	7
2.6 Virusni proteini	8
2.6.1 Proteini na površini virusne čestice.....	10
2.6.2 Dodatni proteini.....	12
2.7 Infektivni ciklus.....	13
2.8 Molekularna epidemiologija	15
2.8.1 Molekularna epidemiologija HPIV-a	16
2.8.2 Molekularna epidemiologija HRSV-a i HMPV-a.....	18
2.9 Molekularna evolucija virusa	21
2.9.1 Filogenetske analize	22
2.9.2 Analiza selektivnog pritiska	22
2.9.3 Dinamika populacije	23
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1 Materijali	26
3.1.1 Biološki materijal	26
3.1.2 Stanične linije.....	26
3.1.3 Kemikalije i otopine	26
3.1.3.1 Kemikalije za održavanje i infekciju staničnih kultura	26
3.1.3.2 Kemikalije i otopine za izolaciju RNA	27
3.1.3.3 Kemikalije i otopine za reverznu transkripciju	28

3.1.3.4	Kemikalije i otopine za lančanu reakciju polimerazom	29
3.1.3.5	Kemikalije i otopine za elektroforezu u agaroznom gelu.....	32
3.1.3.6	Kemikalije i otopine za pročišćavanje produkata amplifikacije iz gela...	33
3.1.3.7	Kemikalije za sekvencijsku reakciju	33
3.1.3.8	Kemikalije za pročišćavanje produkata sekvencijske reakcije.....	33
3.1.4	Oprema	34
3.1.5	Računalni programi	35
3.1.6	Potrošni materijal	35
3.2	Metode.....	36
3.2.1	Održavanje stanične kulture	36
3.2.2	Infekcija staničnih kultura s HPIV2	37
3.2.3	Izolacija ukupne virusne RNA	37
3.2.4	Reverzna transkripcija (RT)	38
3.2.5	Lančana reakcija polimerazom.....	39
3.2.5.1	Amplifikacija gena HPIV1	40
3.2.5.2	Amplifikacija gena HPIV2	42
3.2.5.3	Amplifikacija gena HPIV3	44
3.2.5.4	Amplifikacija gena HRSV-a	45
3.2.5.5	Amplifikacija gena HMPV-a	46
3.2.6	Elektroforeza u agaroznom gelu i pročišćavanje produkata amplifikacije	49
3.2.7	Sekvencijska reakcija	49
3.2.8	Pročišćavanje produkata sekvencijske reakcije.....	50
3.2.9	Sekvenciranje i analiza nukleotidnog slijeda	51
3.2.10	Bioinformatičke analize	51
3.2.10.1	Filogenetske analize	52
3.2.10.2	Analize raznolikosti sekvenci.....	52
3.2.10.3	Analiza selektivnog pritiska	53
3.2.10.4	Analiza glikozilacije, entropije i hidrofobnih svojstava proteina	53
3.2.10.5	Filodinamičke analize	54

4. REZULTATI	56
4.1. Molekularna epidemiologija HPIV1	56
4.1.1 Filogenetska analiza sojeva HPIV1	57
4.1.2 Analiza gena za površinske glikoproteine i gena P	59
4.1.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci	61
4.1.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci	62
4.1.3 Dinamika populacije	65
4.2 Molekularna epidemiologija HPIV2	66
4.2.1 Filogenetska analiza sojeva HPIV2	67
4.2.2 Analiza površinskih glikoproteina	71
4.2.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci	71
4.2.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci	71
4.2.3 Dinamika populacije	73
4.3 Molekularna epidemiologija HPIV3	74
4.3.1 Filogenetska analiza sojeva HPIV3	75
4.3.2 Analiza površinskih glikoproteina	78
4.3.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci	79
4.3.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci	80
4.3.3 Dinamika populacije	81
4.4 Molekularna epidemiologija HRSV-a	83
4.4.1 Filogenetska analiza sojeva HRSV	84
4.4.2 Analiza fragmenta HVR2 gena G	90
4.4.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci	90
4.4.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci	90
4.4.4 Dinamika populacije	95
4.5 Molekularna epidemiologija HMPV-a	97
4.5.1 Filogenetska analiza sojeva HMPV	99
4.5.1.1 Distribucijski obrasci podklastera grupe A	101
4.5.2 Analiza površinskih glikoproteina	105
4.5.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci	105
4.5.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci	106
4.5.3 Dinamika populacije	108

4.6 Analiza proteina M porodica <i>Paramyxoviridae</i> i <i>Pneumoviridae</i>	109
4.6.1 Varijabilnost proteina M sojeva HPIV	110
4.6.2 Varijabilnost proteina M sojeva HMPV i HRSV	115
5. DISKUSIJA.....	117
5.1 Molekularna epidemiologija HPIV1	118
5.2 Molekularna epidemiologija HPIV2	120
5.3 Molekularna epidemiologija HPIV3	122
5.4 Molekularna epidemiologija HRSV-a.....	124
5.5 Molekularna epidemiologija HMPV-a.....	127
5.6 Analiza proteina M porodica <i>Paramyxoviridae</i> i <i>Pneumoviridae</i>	130
6. ZAKLJUČCI	133
7. LITERATURA	135
8. ŽIVOTOPIS.....	157

1. UVOD

RNA virusi uzročnici su preko 75% svih bolesti uzrokovanih virusima (Makeyev i Bamford, 2004). Porodice *Paramyxoviridae* i *Pneumoviridae*, obje svrstane u red *Mononegavirales*, uključuju velik broj ljudskih i životinjskih virusa odgovornih za mnoge bolesti. Ovi virusi odgovorni su za značajan broj infekcija od kojih su mnoge smrtonosne, posebice kod male djece i imunokompromitiranih osoba, što ove viruse čini globalnim javnozdravstvenim problemom. Najčešći uzročnici respiratornih bolesti kod male djece iz ovih porodica su ljudski virusi parainfluence 1-4 (eng. *Human parainfluenza viruses*, HPIV1-4), te ljudski respiratorni sincicijski virus (eng. *Respiratory syncytial virus*, HRSV) i ljudski metapneumovirus (eng. *Human metapneumovirus*, HMPV). Genom ovih virusa čini jednolančana negativno orijentirana RNA molekula, a karakterizira ih izrazita genska raznolikost te kontinuirana prilagodba i evolucija kao i sposobnost ponovnih infekcija (Lamb i Parks, 2013).

S obzirom da mutacije mogu značajno utjecati na biološka svojstva virusa, cilj istraživanja je pratiti genomiku divljih sojeva paramiksovirusa i pneumovirusa, kako bi se proširile spoznaje o raznolikosti i evoluciji cirkulirajućih virusa. Spoznaje o odnosima između postojećih genotipova na određenom području važne su za predviđanje epidemija te omogućavaju pravovremenu kontrolu širenja, što je od posebne važnosti za navedene viruse, s obzirom da ne postoji specifični antivirusni tretman niti cjepivo protiv ovih virusa. U ovom radu su genski karakterizirani sojevi HPIV1-3, HRSV-a i HMPV-a, koji su prikupljeni tijekom nekoliko epidemioloških sezona (2011-2016). Provedene molekularno-epidemiološke analize zasnivale su se na sekvenciranju najvarijabilnijih regija genoma, iz čega je utvrđeno postojanje velikog broja različitih virusnih sojeva. Bioinformatičke analize uključivale su usporedbe s globalno prisutnim sojevima virusa, odnosno usporedbe pojavnosti i frekvencije uočenih genotipova, kao i smjene dominantnih genotipova. Također je ispitana antigenska stabilnost i virusna evolucija višestrukim sravnjenjem proteina važnih za izbjegavanje imunološkog odgovora, te djelovanje selektivnog pritiska. Brzina evolucije pojedinih gena izražena je na temelju izračuna stope evolucije, a također je ispitana i genska raznolikost populacije tijekom vremena, što je omogućilo zaključivanje o vremenu cirkulacije pojedinih genotipova na ovom području prije kliničke detekcije. Za dodatne analize odabirani su sojevi prema rezultatima filogenetske analize, kojima su sekvencirani dodatni dijelovi genoma, s naglaskom na površinske proteine, u svrhu razumijevanja varijabilnosti i sposobnosti adaptacije ovih virusa.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Porodice *Paramyxoviridae* i *Pneumoviridae*

Virusne porodice *Paramyxoviridae* i *Pneumoviridae* svrstane su u red *Mononegavirales* te uključuju brojne ljudske i životinjske viruse odgovorne za mnoge bolesti. U porodicu *Paramyxoviridae* pripadaju neki od najrasprostranjenijih uzročnika bolesti kod ljudi, uključujući virus ospica, virus zaušnjaka te HPIV1-4 (Lamb i Parks, 2013). Unatoč poboljšanjima u vidu prevencije i terapije, virusi ovih porodica odgovorni su za značajan broj infekcija, posebice u pedijatrijskoj populaciji. Porodica *Paramyxoviridae* dijeli se na sedam rodova: *Aquaparamyxovirus*, *Ferlavirus*, *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Respirovirus*, *Henipavirus* i *Morbillivirus* (Adams i sur., 2017), a klasifikacija se zasniva na morfološkim karakteristikama, organizaciji genoma, biološkoj aktivnosti proteina kao i odnosu nukleotidnog slijeda koji kodira za proteine (Lamb i Parks, 2013).

Porodica *Pneumoviridae* tek odnedavno čini zasebnu porodicu, a za odvajanje od dotadašnje porodice *Paramyxoviridae* zaslužne su jasne morfološke razlike u veličini i izgledu nukleokapside, organizacija genoma te filogenetska udaljenost od drugih paramiksovirusa (Afonso i sur., 2016). No, unatoč odvajanju u dvije zasebne porodice, virusi ovih porodica dijele određene biološke karakteristike, poput načina ulaska u domaćina te ciljnog organa. U porodicu pripadaju dva roda, *Metapneumovirus* i *Orthopneumovirus*, a neki od najznačajnijih predstavnika ove porodice su HRSV i goveđi respiratorni sincicijski virus te HMPV i ptičji metapneumovirus (Afonso i sur., 2016).

2.2 HPIV

HPIV su genetski i antigenski podijeljeni u četiri serotipa: serotipovi 1-3 povezani su s bolestima donjeg dišnog puta (krup, upala pluća, bronhiolitis), dok serotip 4 izaziva blažu bolest gornjeg dišnog puta. Kao grupa, serotipovi 1-3 su nakon HRSV-a najčešći uzročnici ozbiljnih virusnih bolesti respiratornog sustava kod novorođenčadi i male djece, dok je HPIV4 rjeđe prisutan i obično izaziva blažu bolest. Izolirani su između 1956. i 1960. godine iz pacijenata koji su bolovali od respiratornih bolesti, a ime su dobili zbog sličnosti simptoma bolesti, veličini virusne čestice, te činjenici da ovi virusi posjeduju sposobnost hemaglutinacije i neuraminidaznu aktivnost, kao i virus gripe (Karron i Collins, 2013). Podijeljeni su u dva roda unutar porodice *Paramyxoviridae*: HPIV1 i HPIV3 pripadaju rodu *Respirovirus*, a HPIV2 i

HPIV4 pripadaju rodu *Rubulavirus* (Amarasinghe i sur., 2017). Postoji jasna razlika između serotipova, što je također potkrijepljeno i niskom razinom očuvanosti aminokiselinskih slijedova između površinskih proteina (Karron i Collins, 2013).

Repliciraju se u epitelnim stanicama dišnog puta, uzrokujući niz respiratornih bolesti, poput rinitisa, faringitisa, laringitisa, traheobronhitisa, te bronhiolitis, upalu pluća i krup (Karron i Collins, 2013). Nakon infekcije u serumu su prisutna protutijela na gotovo sve proteine HPIV-a, međutim jedini antigeni koji potiču stvaranje neutralizirajućih protutijela su hemaglutinin-neuraminidazni (eng. *hemagglutinin-neuraminidase*, HN) i fuzijski (eng. *fusion*, F) protein, čineći ih glavnim antigenima koji potiču protektivnu imunost (Kasel i sur., 1984; Spriggs i sur., 1987). Unatoč tome, odgovor imunološkog sustava na infekciju HPIV-om kod male djece je nedostatan; prilikom primarne infekcije s divljim tipovima HPIV-a lokalno se stvaraju IgA protutijela koja slabo neutraliziraju virus (Yanagihara i McIntosh, 1980). Također primijećen je slabiji odgovor male djece nakon imunizacije živim oslabljenim cjepivom protiv HPIV3, dok kod starije djece u ovom slučaju dolazi do jačeg odgovora protutijela na protein HN (Karron i sur., 2003). Slabiji odgovor protutijela na infekcije u ovoj dobnoj skupini posljedica je nerazvijenosti imunološkog sustava, kao i prisustva pasivno prenesenih majčinskih protutijela, te djelomično objašnjava pojavu reinfekcija tijekom rane dobi (Crowe i sur., 2001; Glezen i sur., 1984; Karron i sur., 2003). Sposobnost ponovnih infekcija neovisna je o promjeni antigenskih svojstava HPIV-a (Karron i Collins, 2013), za razliku od primjerice virusa gripe kod kojeg sposobnost ponovne infekcije ovisi o značajnim promjenama antigenskih svojstava.

HPIV su pristuni globalno, te uzrokuju respiratorne bolesti u svim dobnim skupinama, s najjačim posljedicama kod novorođenčadi i male djece. Istraživanja pokazuju da je barem 60% djece do dvije godine starosti bilo zaraženo s HPIV3, a do četvrte godine života čak do 80% djece biva zaraženo ovim virusom (Karron i Collins, 2013). Infekcije s HPIV1 i HPIV2 javljaju se u nešto kasnijoj dobi, te do pete godine života gotovo sva djeca bivaju zaražena s HPIV2, a oko 75% djece u ovoj dobnoj skupini bude zaraženo s HPIV1 (Karron i Collins, 2013). Također, najčešći simptomi infekcije s HPIV3 u najranijoj dobi (do 6 mjeseci starosti) su upala pluća i bronhiolitis, dok se krup uzrokovan s HPIV1 i HPIV2 češće javlja između 1. i 2. godine života (Henrickson, 2003). Hospitalizacije uslijed zaraze ovim virusima nisu toliko česte (kao u slučaju HRSV-a), te je procijenjeno da je otprilike 23 000 djece do 5. godine života

prehladi, a ubrzo je ovaj uzročnik otkriven i kod djece s respiratornim bolestima. Osim malene djece, HRSV može uzrokovati bolest u svim dobnim skupinama, a najveće posljedice uzrokuje među starijom populacijom, kao i osobama s oslabljenim imunološkim sustavom (Collins i Karron, 2013). Više od 30 milijuna slučajeva godišnje uzrokovano je ovim virusom, te je poznat kao najčešći uzročnik hospitalizacija uslijed respiratornih bolesti kod male djece (Nair i sur., 2010). Procijenjeno je da je ovaj patogen godišnje odgovoran za 3 milijuna hospitalizacija i 59 600 smrtnih slučajeva kod djece mlađe od 5 godina na globalnoj razini, koji su posljedica akutne infekcije donjeg dišnog puta. Kod djece mlađe od 6 mjeseci, HRSV je godišnje odgovoran za 27 300 smrtnih slučajeva, s čak 1,4 milijuna hospitalizacija (Shi i sur., 2017). Virus ne izaziva dugotrajnu imunost te su ponovne zaraze HRSV-om vrlo česte, a zbog nedostatka licenciranog cjepiva značajan trošak vezan je uz liječenje bolesti uzrokovanih ovim patogenom.

HMPV je izoliran 2001. godine iz pacijenata koji su bolovali od bolesti nepoznatog porijekla, čiji su simptomi nalikovali simptomima bolesti koje uzrokuje HRSV (van den Hoogen i sur., 2001). Međutim, serološki podaci ukazuju na to da je ovaj virus uzrokovao infekcije prije više od 50 godina, te nije bio otkriven zbog slabijeg rasta u kulturi, kao i odgođenog citopatičnog učinka (van den Hoogen i sur., 2001). Iako je bolest koju izaziva blaža nego u slučaju HRSV-a, danas je prepoznat kao važan uzročnik bolesti respiratornog trakta, posebice kod djece i starije populacije (Collins i Karron, 2013), te za ovaj virus također ne postoji razvijeno cjepivo. Procijenjeno je da je u Sjedinjenim Američkim Državama HMPV odgovoran za oko 20 000 hospitalizacija godišnje kod djece mlađe od 5 godina (Edwards i sur., 2013).

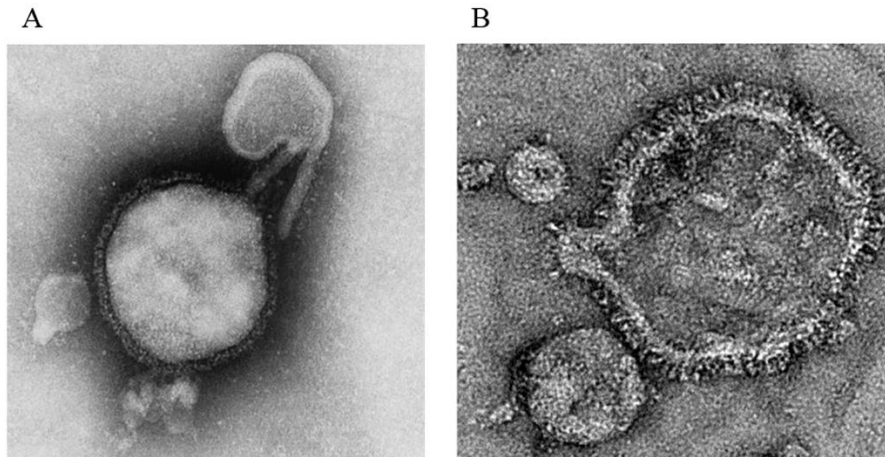
Ljudi su jedini prirodni domaćini ovih visoko zaraznih virusa, iako je pokazano da oba virusa mogu prijeći na nečovjekolike primare (Belshe i sur., 1977; Taylor, 2017). Primarni način širenja ovih virusa je kapljичnim putem ili kontaktom s kontaminiranim objektima, a repliciraju se u epitelnim stanicama respiratornog trakta; infektivni virusi nisu izolirani iz krvi pacijenata (Collins i Karron, 2013). Kao i u slučaju infekcija s HPIV1-4, majčinska protutijela i nezrelost imunološkog sustava da odgovori na infekciju tijekom rane dobi smanjuje mogućnost kontrole infekcije. Pokazano je da pasivno prenesena majčinska IgG protutijela ublažavaju simptome ili odgađaju razvoj bolesti prilikom infekcije HRSV-om, što je ovisno o titru prenesenih protutijela, stoga su prerano rođena djeca posebno podložna infekciji (Glezen i sur., 1981). Međutim, iako su majčinska protutijela djelotvorna u ranoj dobi, ona suprimiraju stvaranje dugoživućeg odgovora specifičnih protutijela (Parrott i sur., 1973; Shinoff i sur.,

2008). Kao i u slučaju HPIV-a, sposobnost reinfekcije neovisna je o promjeni antigenskih svojstava kod ovih virusa, što se dovodi u vezu sa inhibicijom stvaranja dugotrajnog imunološkog odgovora. Međutim, s obzirom da je bolest blaža tijekom ponovne infekcije, nije potpuno jasno do koje mjere ovi virusi inhibiraju protektivni odgovor (Henderson i sur., 1979).

Pokušaji proizvodnje cjepiva protiv HRSV-a započeli su već 1960-ih godina, kada je koncentrirani virus inaktiviran formalinom te pomiješan s adjuvansom dan maloj djeci. Posljedično, djeca koja su primila takvo cjepivo su nakon prirodne infekcije ovim virusom razvila snažniju bolest od kontrolne grupe, te su zabilježena dva smrtna slučaja (Kim i sur., 1969), nakon čega se odustalo od proizvodnje cjepiva koja bi uključivala formalinom inaktivirani virus. Za sada je jedini oblik prevencije davanje profilaktičkih monoklonskih protutijela pedijatrijskoj populaciji koja je pod najvećim rizikom od razvoja snažne bolesti uslijed zaraze HRSV-om (prerano rođena djeca, imunodeficijentni, srčani bolesnici), dok za HMPV takvo protutijelo nije razvijeno. Prvotno je razvijeno protutijelo palivizumab (Synagis™; MedImmune) koje je usmjereno na glikoprotein F, a naknadno je modifikacijom 13 aminokiselinskih pozicija razvijeno monoklonsko protutijelo motavizumab (MEDI-524, MedImmune) koje bolje veže antigen te ima jaču sposobnost neutralizacije (Wu i sur., 2007). Iako oba protutijela pridonose smanjenju broja hospitalizacija, te su uz kontrolu infekcije jedini način prevencije infekcija HRSV-om, njihova primjena je vrlo skupa. U narednim studijama evaluacije neškodljivosti i učinkovitosti motavizumaba pojavile su se blaže nuspojave (Feltes i sur., 2011), te motavizumab nije odobren za korištenje u profilaksi.

2.4 Virusna čestica

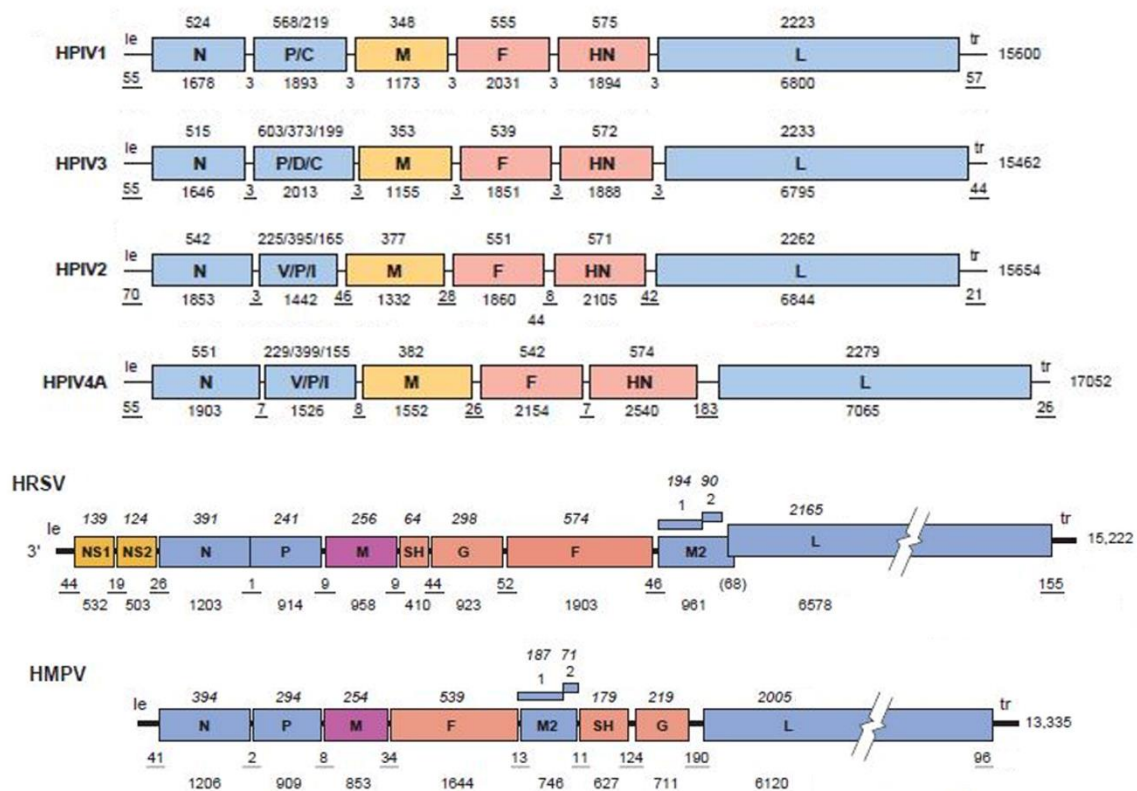
Pod elektronskim mikroskopom, čestice HPIV-a su pleomorfne oblika, a filamentozne čestice karakteristične su za HPIV2 (Karron i Collins, 2013; Yao i Compans, 2000). Ovojnica na površini viriona porijeklom je od stanice domaćina, a same virusne čestice veličine su od 150 – 200 nm, iako su primijećeni i veći agregati. U ovojnicu viriona uklopljeni su glikoproteini koji su vidljivi kao šiljci koji se protežu iz čestice (slika 2a) (Henrickson, 2003). Virioni HRSV najčešće poprimaju filamentoznu formu promjera 60 do 200 nm, ali mogu poprimiti i sferičan oblik u kojemu je promjer takvih čestica 100 do 350 nm (slika 2b) (Collins i Karron, 2013). Pod elektronskim mikroskopom nukleokapsida je vidljiva kao struktura riblje kosti, koja je kod pneumovirusa uža (Collins i Karron, 2013), što je još jedna od karakteristika na temelju koje su ove dvije porodice razdvojene, a na površini ovojnice vidljivi su glikoproteini.



Slika 2. Struktura virusne čestice. A) Čestica HPIV3 pod elektronskim mikroskopom (Henrickson, 2003); B) Čestica HRSV pod elektronskim mikroskopom (Rima i sur., 2017).

2.5 Organizacija genoma

Genom obje porodice čini jednolančana, nesegmentirana RNA molekula negativnog polariteta (-RNA) veličine 15-19 kilobaza, te sadrži 6 do 10 gena. Na 3' i 5' krajevima genoma nalaze se nekodirajuće regije važne za kapsidaciju, transkripciju i replikaciju virusa (eng. *leader*, le; *trailer*, tr) (slika 3). Također, početak i kraj svakog gena sadrži očuvane sekvence koje služe za kontrolu transkripcije, a između njih nalaze se intergenske regije varijabilne duljine (Lamb i Parks, 2013). Duljina genoma i antigenoma kod paramiksovirusa je umnožak broja šest, što omogućava efikasnu replikaciju i transkripciju ovih virusa, dok kod pneumovirusa ne postoji ovaj zahtjev (Collins i Karron, 2013; Henrickson, 2003).



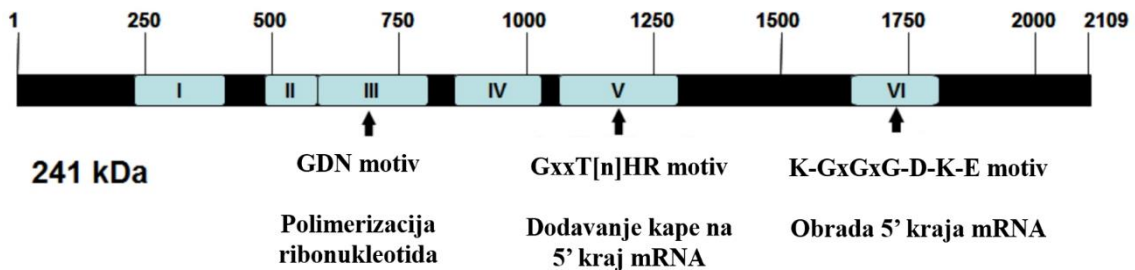
Slika 3. Shematski prikaz organizacije genoma HPIV, HRSV i HMPV. Genomi su prikazani u orijentaciji 3' - 5', broj parova baza prikazan je ispod svakog dijagrama, a duljina proteina (u aminokiselinama) prikazana je iznad dijagrama. Preuzeto i prilagođeno prema Collins i Karron (2013) i Karron i Collins (2013).

2.6 Virusni proteini

Virusna čestica sastoji se od helikalne nukleokapside koja sadrži genomsku RNA vezanu s nukleokapsidnim (eng. *nucleocapsid*, N) proteinom, uz koju su vezani fosfoprotein (eng. *phosphoprotein*, P) i veliki (eng. *large*, L) protein, koji djeluje kao RNA-ovisna RNA polimeraza. Ovaj kompleks naziva se još i ribonukleoproteinski kompleks (RNP), te je odgovoran za transkripciju i inicijaciju virusne replikacije. Nukleokapsida ovih virusa se privremeno i mjestimično razmata tijekom replikacije i prepisivanja kako bi se omogućio pristup kalupu, a protein N na ovaj način štiti genom od nukleaznog cijepanja. Uloga ovog proteina je i u sprječavanju vezanja mRNA na genomsku RNA, a također služi i kao mjesto interakcije za sklapanje nukleokapsida u pupajuće viruse. Vezanje proteina N s RNA neovisno je o slijedu nukleotidne sekvence, već je ovisno o interakcijama s fosfodieterskom okosnicom. U ovom kompleksu protein P djeluje kao kofaktor polimeraze omogućavajući vezanje proteina

L na nukleokapsidni kalup, a sudjeluje i u sprječavanju agregacije slobodnih proteina N prilikom sklapanja novih nukleokapsida (Lamb i Parks, 2013).

Protein L je u inficiranim stanicama prisutan u maloj količini, a u virusnoj čestici se nalazi oko 50 kopija ovog proteina koji kolokaliziraju s proteinom P. Ovaj protein sadrži sve enzimatske aktivnosti potrebne za sintezu funkcionalne mRNA, uključujući polimerizaciju nukleotida, obradu 5' kraja, te poliadenilaciju 3' kraja mRNA. Osim transkripcije, L protein odgovoran je i za replikaciju genomske i antigenomske RNA (Lamb i Parks, 2013). S obzirom da RNA ovisnoj RNA polimerazi nedostaje svojstvo popravka (eng. *proofreading*) ovi virusi imaju visoku stopu pogreške prilikom replikacije genoma, s otprilike jednom greškom po genomu prilikom svake replikacije (Drake i sur., 1998; Drake, 1993). Na slici 4 shematski su prikazane očuvane domene L proteina u virusima roda *Mononegavirales*.



Slika 4. Očuvane regije proteina L kod RNA virusa s nesegmentiranim genomom negativnog polariteta. Prikazani su motivi uključeni u enzimatske aktivnosti tijekom sinteze mRNA. Preuzeto i prilagođeno prema Li i Zhang (2012).

Najzastupljeniji protein u čestici je matriks (eng. *matrix*, M) protein koji omogućava sklapanje novih viriona povezujući citoplazmatske dijelove virusnih glikoproteina s ribonukleinskim kompleksom (Harrison i sur., 2010). Za sklapanje virusnih čestica nužno je usmjeravanje virusnih komponenti na specifična mjesta pupanja, odnosno izlaska iz stanica, a važnost interakcija proteina M s virusnim glikoproteinima pokazana je gubitkom kolokalizacije kada su citoplazmatski dijelovi glikoproteina bili skraćeni (Ghildyal i sur., 2005; Waning i sur., 2002). Također, pokazano je da su regije blizu C-terminalnog kraja proteina N neophodne za interakciju s proteinom M kod HPIV1 (Coronel i sur., 2001), a to je također pokazano za još neke viruse iz porodice *Paramyxoviridae*, poput virusa ospica, parainfluence 5 te virusa Nipah (Iwasaki i sur., 2009; Ray i sur., 2016). Mutacije u proteinu M dovode do smanjenog nastanka virusnih čestica (Patterson i sur., 2001; Runkler i sur., 2007), a gotovo da

nema nastanka čestica kada je gen M deletiran (Cathomen i sur., 1998; Inoue i sur., 2003), potvrđujući ključnu ulogu proteina M tijekom infekcije. Unatoč nepostojanju sličnosti u primarnoj sekvenci proteina M između različitih virusa, pokazano je da je tercijarna struktura ovog proteina očuvana (Battisti i sur., 2012), što je u skladu sa sličnom funkcijom koju ovaj protein obnaša u obje porodice.

2.6.1 Proteini na površini virusne čestice

Protein koji služi za prihvaćanje na stanične receptore (vezni protein) kod HPIV-a je protein HN, dok virusi porodice *Pneumoviridae* posjeduju vezujući glikoprotein (eng. *attachment glycoprotein*, G). Ovi proteini pripadaju tipu II integralnih membranskih proteina, koji su u membranu usidreni pomoću signalne sekvence blizu N-terminalnog kraja (slika 5a) (Lamb i Parks, 2013). Kod HPIV-a HN obnaša dvojnu funkciju: hemaglutinacijska funkcija odgovorna je za vezanje na receptor, a u kulturi stanica uzrokuje aglutinaciju eritrocita, dok je neuraminidazna aktivnost odgovorna za cijepanje sijalične kiseline u kasnijim stadijima infekcije kako bi se potaknulo otpuštanje novonastalih viriona (Henrickson, 2003). Protein HN tvori tetramere, a u membranu je ugrađen tako da je globularna glava tetramera na vanjskoj strani membrane te ovaj dio proteina HN sadrži hemaglutinacijsku i neuraminidaznu aktivnost kao i većinu antigenskih mjesta. Protein G pneumovirusa ne uzrokuje hemaglutinaciju, niti posjeduje neuraminidaznu aktivnost, te nema strukturnih sličnosti s vezujućim proteinima drugih paramiksovirusa. HRSV sadrži i solubilnu formu G proteina koja se izlučuje iz stanica, a nastaje translacijom od nizvodnog start kodona (Lamb i Parks, 2013).

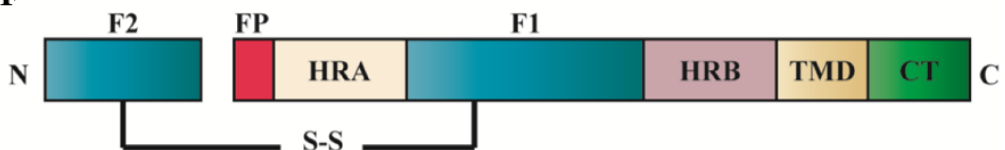
Drugi površinski protein je protein F koji je karakterističan za obje porodice. Proteini F su homotrimeri koji se sintetiziraju kao prekursori (F₀) čijim cijepanjem nastaje biološki aktivna forma proteina sastavljena od dva lanca (F₁ i F₂) povezana disulfidnim vezama. Ovaj protein pripada tipu I integralnih membranskih proteina; nakon cijepanja pomoću staničnih endonukleaza F₁ lanac služi za ugradnju u membranu ciljne stanice, omogućavajući fuziju s ciljnom stanicom stoga se još naziva i fuzijski peptid, dok F₂ lanac na svojem N-terminalnom kraju sadrži sekvencu signalnog peptida (slika 5b). Dominantna forma koja se pakira u virione je prefuzijska forma F proteina, a u postfuzijsku formu prelazi nakon fuzije membrana (El Najjar i sur., 2014). Mehanizam aktivacije proteina F kod HPIV-a uključuje i protein HN čija uloga u stimulaciji konformacijske promjene proteina F nije potpuno poznata, međutim za protein F pneumovirusa je pokazano da može samostalno uzrokovati fuziju (Kahn i sur., 1999; Porotto i sur., 2003; Schowalter i sur., 2006). Opisana su dva glavna modela aktivacije proteina

F u kojima sudjeluje i vezni protein: disocijacijski i asocijacijski model. U prvom slučaju F i vezni protein dolaze zajedno na staničnu površinu, a pritom se protein F zadržava u metastabilnoj prefuzijskoj formi, te nakon vezanja receptora dolazi do konformacijskih promjena u veznom proteinu uslijed kojih se F protein otpusti iz ovog kompleksa omogućavajući njegovu aktivaciju. Drugi model pretpostavlja da se ova dva proteina prenose na površinu stanice neovisno, te dolazi do konformacijske promjene u veznom proteinu uslijed vezanja na receptor, omogućavajući kompleksne interakcije s proteinom F koje vode do aktivacije proteina F (El Najjar i sur., 2014).

A. Vezni protein



B. Protein F



Slika 5. Očuvane domene veznog proteina (A) i proteina F (B) kod paramiksovirusa i pneumovirusa. Kratice: transmembranska domena (TMD); fuzijski peptid (FP); ponavljajuće regije koje sadrže slijed od 8 aminokiselina (HRA, HRB); citoplazmatski dio (CT); disulfidne veze (S-S). Preuzeto i prilagođeno prema El Najjar i sur. (2014).

Treći membranski glikoprotein (eng. *small hydrophobic protein*, SH) karakterističan je za pneumoviruse, a kod paramiksovirusa prisutan je u virusu zaušnjaka; ovaj protein pripada tipu II integralnih membranskih proteina koji je prisutan u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom apratu i na staničnoj površini (Deng i sur., 2011; Rixon i sur., 2004). Njegova uloga nije potpuno jasna, posebno uslijed spoznaje da ekspresija proteina SH nije nužna za replikaciju HRSV-a u kulturi stanica, međutim pokazano je da je takav virus atenuiran *in vivo* (Bukreyev i sur., 1997; Whitehead i sur., 1999). Izvanstanična domena proteina SH kod HRSV-a je slabo imunogenična (Akerlind-Stopner i sur., 1993; Schepens i sur., 2014), te protutijela koja se stvaraju na ovaj protein nemaju sposobnost neutralizacije virusa (Schepens, 2015), što je također pokazano i za protein SH HMPV-a (Skiadopoulos i sur., 2006). Protein SH djeluje kao

viroporin formirajući transmembranski pentamerni prsten koji čini kanal kroz koji se prenose kationi i male molekule (Carter i sur., 2010; Gan i sur., 2012). Iako mehanizam još uvijek nije sasvim poznat, pokazano je da protein SH HRSV-a onemogućava ili odgađa apoptozu inhibicijom signalnog puta TNF- α (Fuentes i sur., 2007), dok je protein SH HMPV-a slabije istražen, iako je među najvarijabilnijim dijelovima genoma (Biacchesi i sur., 2003).

2.6.2 Dodatni proteini

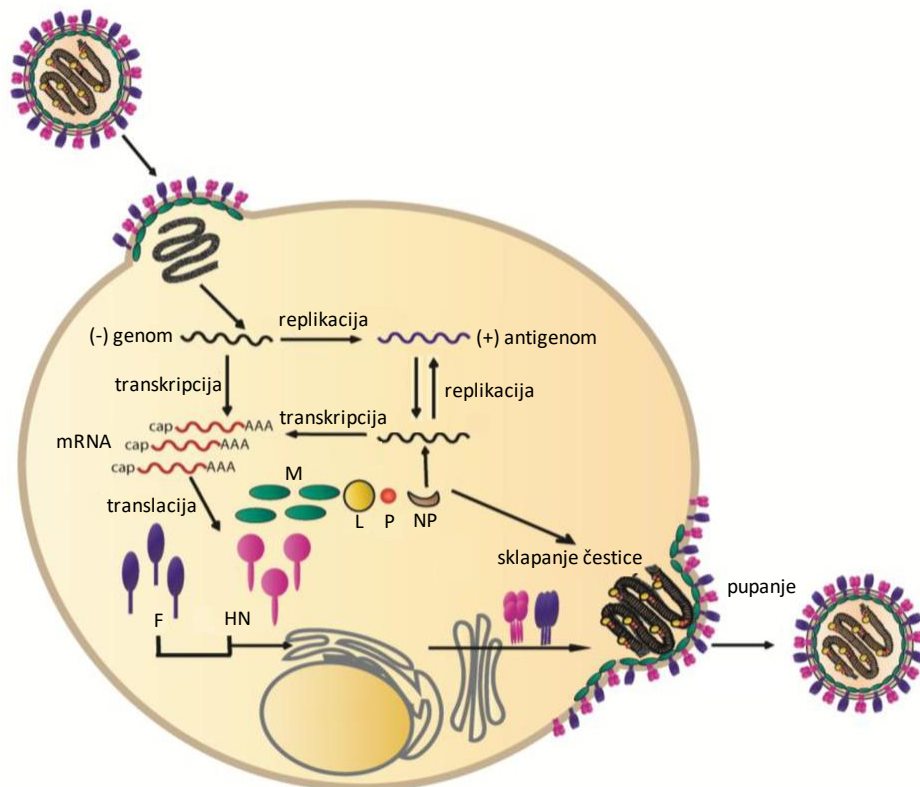
Dodatni geni kodiraju za regulatorne proteine specifične za pojedine rodove, a prisutni su kao dodatne transkripcijske jedinice (preklapajući otvoreni okviri čitanja) drugih gena, poput primjerice gena C čiji se okvir čitanja preklapa s otvorenim okvirom čitanja gena P. Ovaj gen prisutan je u HPIV-u roda *Respirovirus*, a s ovih alternativnih mjesta inicijacije translacije može nastati do četiri proteina C (C', C, Y1 i Y2) (Bartlett i sur., 2008). Drugi mehanizam kojim nastaju dodatni proteini kod paramiksovirusa uključuje dodavanje jednog ili više gvanina tijekom transkripcije. Ovi nukleotidi nisu kodirani u genomu virusa, te se proces dodavanja dodatnih gvanina naziva RNA editiranje (eng. *RNA editing*). Na ovaj način nastaje protein D kod HPIV3, dok HPIV1 jedini od proučavanih paramiksovirusa ne podliježe ovom mehanizmu. HPIV koji pripadaju rodu *Rubulavirus* eksprimiraju protein V. Dodatni proteini imaju ulogu u kontroli sinteze virusne RNA, inhibiciji staničnog antivirusnog odgovora i otpuštanju virusa iz zaraženih stanica (Bartlett i sur., 2008; Hasan i sur., 2000; Nishio i sur., 2008).

Jedan od kriterija za razdvajanje ovih dviju virusnih porodica je i postojanje gena M2 kod pneumovirusa, dok su geni NS1 i NS2 jedinstveni za rod *Orthopneumovirus*. Proteini NS1 i NS2 su nestrukturni proteini karakteristični za HRSV, te iako nisu esencijalni za rast virusa u kulturi stanica niti čimpanzama, delecija ovih gena u oba slučaja uzrokuje smanjenu replikaciju (Teng i Collins, 1999). Pokazano je za ljudski i goveđi RSV da su ovi produkti važni supresori indukcije interferona tipa I, dok je manje jasna veza u kontroli sinteze RNA (Spann i sur., 2004). Drugi gen karakterističan za porodicu *Pneumoviridae* je gen M2 koji sadrži dva preklapajuća okvira čitanja čijom translacijom nastaju proteini M2-1 i M2-2; protein M2-1 je protein koji nema homologa u drugim virusima. Kod HRSV-a preklapanje ovih dvaju okvira čitanja obuhvaća 32 nukleotida, a mehanizam translacije okvira čitanja M2-2 nije potpuno jasan, te je pokazano da je za inicijaciju translacije M2-2 nužna terminacija translacije M2-1 gena (Ahmadian i sur., 2000), ali da translacija proteina M2-2 ovisi i o strukturnim karakteristikama sekvence uzvodno od regije preklapanja (Gould i Easton, 2005). Posebnost u organizaciji genoma kod HRSV-a je preklapanje M2 i L gena u 68 nukleotida, što nije uočeno kod drugih

paramiksovirusa. Ovi proteini sudjeluju u regulaciji transkripcije i replikacije RNA: protein M2-1 djeluje kao transkripcijski elongacijski faktor povećavajući procesivnost RNA ovisne RNA polimeraze, dok M2-2 potiče prebacivanje transkripcije u proces replikacije (Collins i Karron, 2013). Za razliku od RVS-a, protein M2-1 kod HMPV-a nije nužan za replikaciju virusa u kulturi stanica, međutim M2-1 gen nužan je za replikaciju virusa *in vivo* (Buchholz i sur., 2005), dok je za protein M2-2 pokazano da sudjeluje u izbjegavanju urođenog imunološkog odgovora (Ren i sur., 2014).

2.7 Infektivni ciklus

Infekcija započinje vezanjem veznog glikoproteina na stanični receptor; kod HPIV-a to uključuje vezanje na sijaličnu kiselinu koja se nalazi na staničnom receptoru, dok se za pneumoviruse pretpostavlja da se vežu na glikozaminoglikane (koji sadrže heparan sulfat i hondroitin sulfat B) na receptorima (Hallak i sur., 2000; Henrickson, 2003). Nakon vezanja na receptor, dolazi do aktivacije proteina F koji potiče fuziju virusne ovojnice sa staničnom membranom, omogućavajući ulazak nukleokapside u citoplazmu stanice gdje se odvijaju svi koraci replikacije (slika 6).



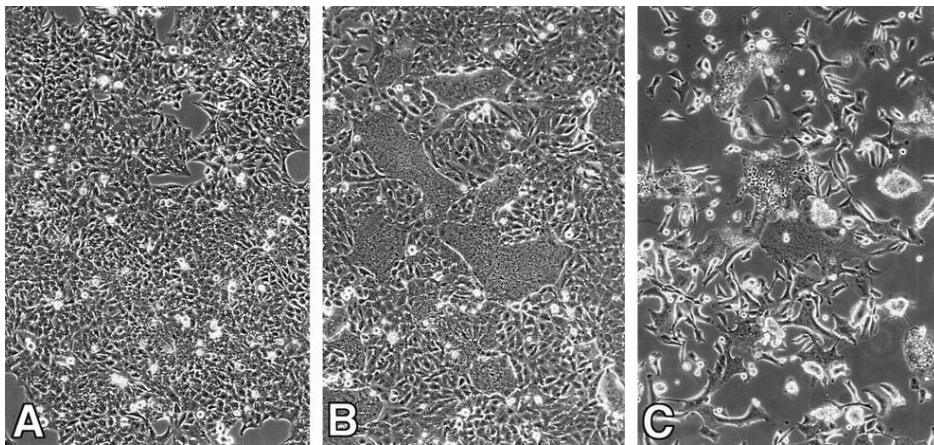
Slika 6. Infektivni ciklus paramiksovirusa i pneumovirusa, prilagođeno prema El Najjar i sur. (2014).

Primarna transkripcija genoma odvija se pomoću virusne RNA-ovisne RNA polimeraze koja prepisivanje počinje na 3' kraju genoma slijedeći tzv. stop-start mehanizam, gdje polimeraza nakon obrade prepisane mRNA započinje transkripciju nizvodnog gena. Transkripcija se odvija u 3' - 5' smjeru do kraja genoma, a efikasnost je manja što je gen više udaljen od 3' kraja s obzirom da inicijacija transkripcije nizvodnih gena nije savršen mehanizam uslijed otpuštanja polimeraze s kalupa. Na ovaj način nastaje gradijent mRNA transkripata, omogućavajući virusu stvaranje virusnih proteina u točnim omjerima koji su potrebni za sklapanje virusne čestice (Lamb i Parks, 2013). Također, terminacija na krajevima gena nije potpuno efikasna, te ponekad nastaju mRNA transkripti sastavljeni od dva ili više susjednih gena, a takve mRNA kod HRSV-a čine otprilike 10% ukupne mRNA (Tran i sur., 2004).

Nakon akumulacije virusnih proteina, polimeraza započinje proces replikacije koji uključuje stvaranje pozitivno orijentiranog antigenoma koji je potpuno komplementaran genomu. Antigenom je također vezan s proteinom N. U inficiranim stanicama se nalazi manje

kopija ove forme jer je jedina funkcija antigenoma da služi kao kalup za stvaranje novih genoma, s obzirom da ne sadrži funkcionalne okvire čitanja. Novonastali genomi mogu služiti kao a) kalup za sintezu novih mRNA u procesu sekundarne transkripcije, b) kalup za sintezu dodatnih antigenoma ili c) pakiranje u virione koji se pupanjem otpuštaju iz stanice (El Najjar i sur., 2014).

Nukleokapsida nastaje u citoplazmi vezanjem slobodnog proteina N na genom, na koje se potom veže kompleks proteina L i P. Glikoproteini, nukleokapsida i protein M transportiraju se s mjesta sinteze do plazmatske membrane, a sam proces sklapanja novih viriona odvija se na područjima ispod unutarnje strane stanične membrane gdje su agregirane sve potrebne komponente za formiranje virusne čestice. Važnu ulogu u ovom procesu obnaša protein M koji osigurava povezivanje nukleokapside s virusnim glikoproteinima, a novi virusi iz stanice izlaze pupanjem. U ovom stadiju infekcije virusni glikoproteini se ekspimiraju i na površini membrane inficiranih stanica, omogućavajući direktno širenje virusa između stanica fuzijom membrana. Na ovaj način nastaju višejezgrene tvorbe (sinciciji), dovodeći do citopatičnog učinka karakterističnog za ove viruse (slika 7) (Lamb i Parks, 2013).

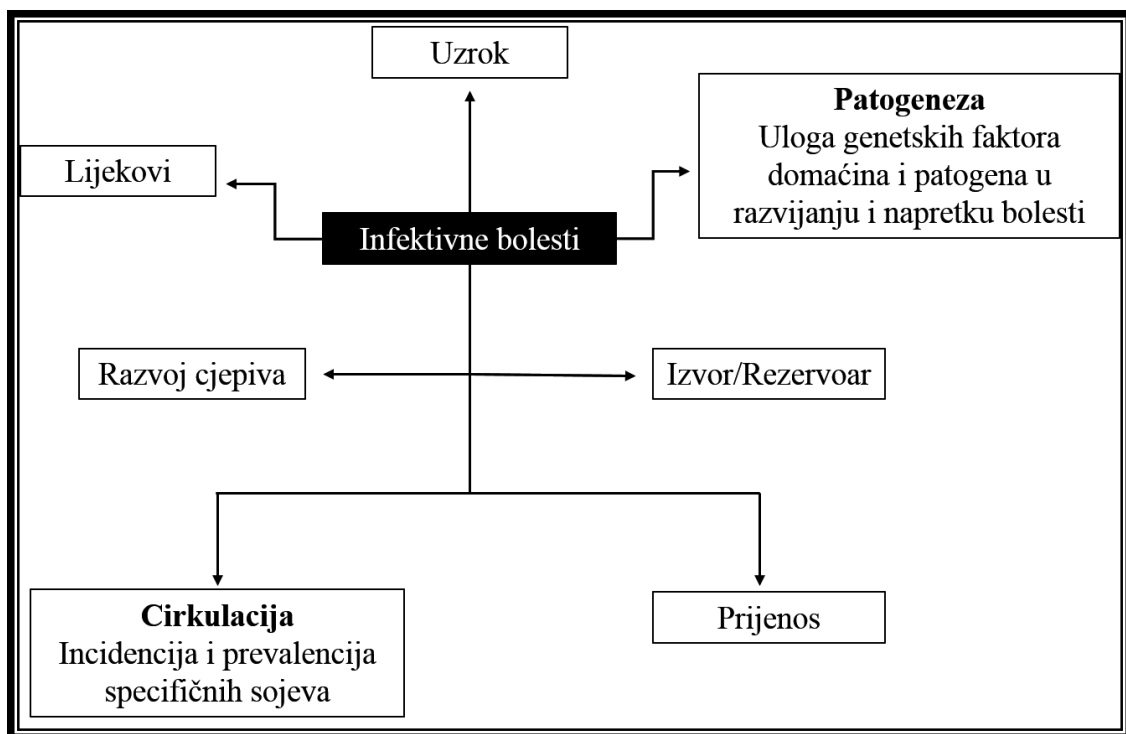


Slika 7. Citopatični učinak HRSV-a u kulturi stanica HEp-2 vidljiv pod svjetlosnim mikroskopom prvog (A), trećeg (B) i petog (C) dana nakon infekcije. Nakon trećeg dana vidljiv je sincicij, a petog dana većina stanica je mrtva (Domachowske i Rosenberg, 1999).

2.8 Molekularna epidemiologija

Molekularna epidemiologija je grana epidemiologije koja integrira molekularnu biologiju i tradicionalne epidemiološke studije, omogućavajući istraživanje infektivnih bolesti korištenjem molekularnih tehnika (Eyboosh i sur., 2017). Termin je prvi puta korišten 1973.

godine kako bi se opisala distribucija podtipova virusa gripe u svijetu (Kilbourne, 1973). Molekularno-epidemiološke studije omogućavaju bolje razumijevanje patogeneze bolesti, te doprinose djelotvornijim strategijama u prevenciji i kontroli bolesti (Eybpoosh i sur., 2017). U istraživanjima infektivnih bolesti provedene molekularno-epidemiološke studije omogućile su važne informacije o uzročnicima, patogenezi, cirkulaciji, prijenosu, te prevenciji i terapiji (Eybpoosh i sur., 2017). Na slici 8 prikazane su glavna područja u istraživanju infektivnih bolesti u koje su uključene molekularno-epidemiološke studije.



Slika 8. Područja infektivnih bolesti istraživanih pomoću molekularne epidemiologije. Preuzeto i prilagođeno prema Eybpoosh i sur. (2017).

2.8.1 Molekularna epidemiologija HPIV-a

HPIV dijele zajedničke antigene, stoga tijekom infekcije potiču stvaranje heterotipnih protutijela, međutim serološki ih je moguće razdvojiti korištenjem specifičnog hiperimunog životinjskog seruma (Henrickson, 2003). Postoje dva glavna podtipa HPIV4 (A i B podtip), koji su otkriveni na temelju testova inhibicije hemadsorpcije i neutralizacije, dok za preostala tri HPIV-a ovakva podjela ne postoji. Međutim, molekularnim analizama pokazano je da se ovi virusi značajno razlikuju, te da kod sva četiri serotipa postoje subgrupe koje su karakterizirane jedinstvenim antigenkim i genskim karakteristikama (Henrickson, 1991; Ray i sur., 1992).

Iako su progresivne promjene antigenskih svojstava relativno spore, recentnije izolirani sojevi pokazuju konstantne genske promjene u usporedbi s izvorno izoliranim sojevima (Henrickson, 2003). Odnos između različitih HPIV-ova prikazan je kao postotak aminokiselinske očuvanosti površinskih glikoproteina, HN i F (tablica 1).

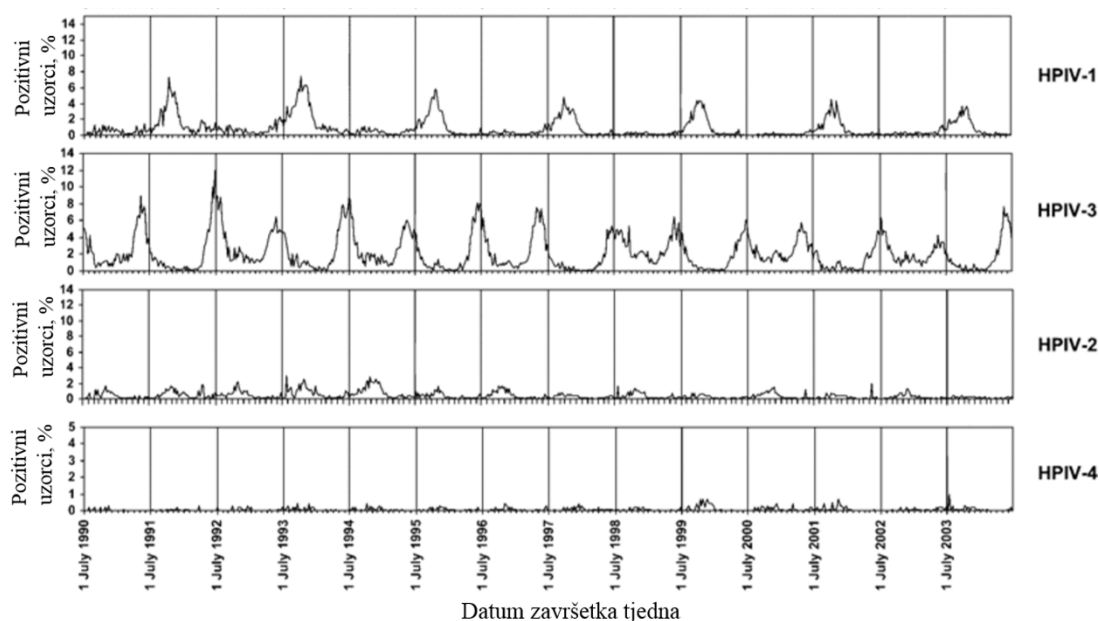
Tablica 1. Odnos očuvanosti aminokiselinskih sekvenci površinskih proteina HPIV-a, iskazan kao %. Prilagođeno iz Karron i Collins (2013).

	PROTEIN F				PROTEIN HN			
	HPIV3	HPIV2	HPIV4A	HPIV4B	HPIV3	HPIV2	HPIV4A	HPIV4B
HPIV1	43	22	24	23	47	22	24	24
HPIV3		24	25	25		23	22	23
HPIV2			33	24			38	38
HPIV4A				95				87

Molekularno-epidemiološke studije HPIV1-3 baziraju se na sekvencama površinskih glikoproteina, primarno na sekvencama proteina HN (Almajhdi i sur., 2012; Goya i sur., 2016a; Mao i sur., 2012), iako postoje i podjele na temelju proteina F (Godoy i sur., 2016; Prinoski i sur., 1991).

Sezonska pojava HPIV-a najbolje je definirana u područjima umjerene klime, a prvenstveno su ti epidemiološki obrasci definirani za Sjedinjene Američke Države (slika 9). Primijećeno je da je pojava epidemija HPIV1 u Sjevernoj Americi u korelaciji sa sezonskom pojavom krupa, odnosno velike epidemije HPIV1 javljaju se tijekom jeseni neparanih godina (Henrickson, 2003). Novija istraživanja potvrđuju ovakvu pojavu epidemija HPIV1 i u drugim dijelovima svijeta (Morgan i sur., 2013; Villaran i sur., 2014; Wang i sur., 2015). Za razliku od HPIV1, epidemije HPIV2 mogu se javiti svake jeseni, dok HPIV3 uzrokuje epidemije svake godine u kasno proljeće i ljeto (Karron i Collins, 2013). Unatoč važnosti HPIV3 u pedijatrijskoj

populaciji, malo je informacija o molekularno-epidemiološkim obrascima dostupno za europsko područje.



Slika 9. Sezonska pojavnost HPIV-a u Sjedinjenim Američkim Državama, od 1990. do 2014. godine. Preuzeto i prilagođeno iz Fry i sur. (2006).

2.8.2 Molekularna epidemiologija HRSV-a i HMPV-a

HRSV je na temelju razlika u neutralizaciji poliklonskim serumom podijeljen u dvije antigenske grupe, A i B, s najviše antigenskih razlika u proteinu G (Johnson i sur., 1987b; Mufson i sur., 1985). Između ove dvije grupe, proteini F dijele 50% antigenskih značajki, za razliku od proteina G gdje su te značajke očuvane 1-7% (Hendry i sur., 1988). U eksperimentalnoj infekciji štakora protein F je pružao učinkovitu zaštitu protiv obje grupe, dok se protein G pokazao znatno manje učinkovitim u zaštiti od heterologne grupe virusa (Johnson i sur., 1987a). Grupe HRSV dijele čak 81% sličnosti u nukleotidnom slijedu, s time da je ta varijabilnost značajna za određene gene: G, SH i M2-2 su najvarijabilniji geni, a raznolikost je najveća u SH i G izvanstaničnoj domeni (Collins i Karron, 2013; Johnson i sur., 1987b). S obzirom na značajne razlike između grupe A i B, pretpostavlja se da one nisu varijante koje razlikuje par antigenskih mjesta, već predstavljaju dvije linije divergentne evolucije (Mufson i sur., 1985). Na temelju analiza sekvenci cijelih genoma, procijenjeno je da su se ove grupe odvojile prije otprilike 350 godina (Zlateva i sur., 2005). Također, značajne razlike primijećene

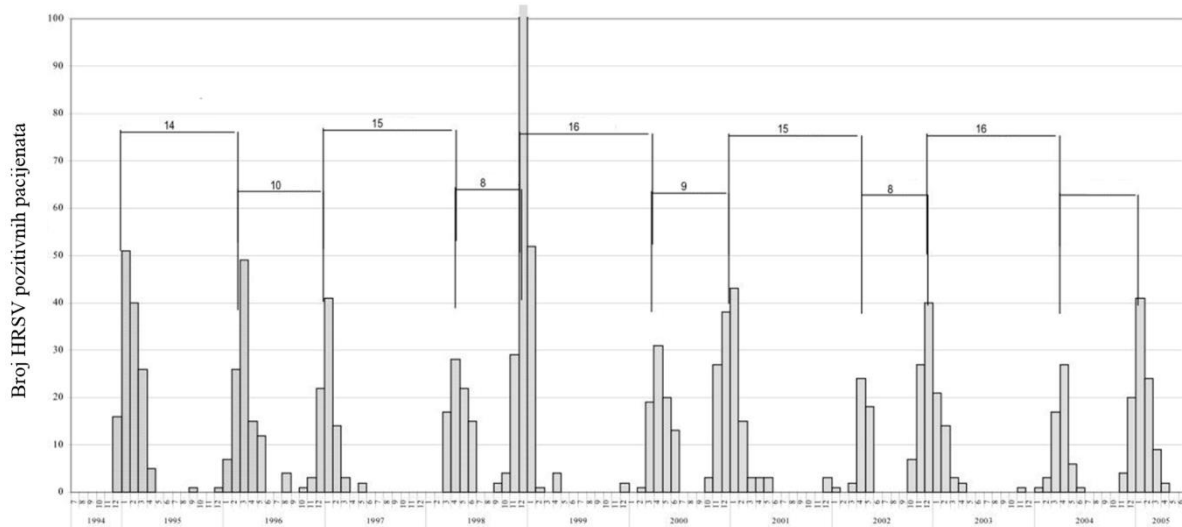
su i unutar samih grupa, te protein G može varirati i do 20% između različitih sojeva. Za razliku od proteina G, protein F je antigenski relativno stabilan (Collins i Karron, 2013).

Mnogobrojna istraživanja proteina G potvrđuju značajne promjene u ovom proteinu, popraćene promjenama u reaktivnosti s monoklonskim protutijelima. Također je pokazano da u izvanstaničnoj domeni proteina G postoje pozitivno selektirana mjesta od kojih su neka dio poznatih epitopa (Zlateva i sur., 2005; Zlateva i sur., 2004). Ovaj dio proteina G sadrži dvije velike domene koje se značajno razlikuju između sojeva, te poprimaju strukturu nalik mucinu (veliki glikoprotein kojeg proizvodi većina epitelnih stanica), a između njih nalazi se središnja očuvana domena dugačka 13 aminokiselina (Collins i Karron, 2013). Pokazano je da se domene nalik mucinu više razlikuju na aminokiselinskoj razini nego na nukleotidnoj razini što je suprotno od većine proteina, te sugerira da je ovaj protein pod selektivnim pritiskom koji potiče aminokiselinske supstitucije. Za razliku od proteina G, u proteinu F se slabije toleriraju aminokiselinske promjene uslijed potrebe za očuvanjem strukturnih i funkcionalnih karakteristika (Johnson i sur., 1987a).

Tijekom jedne sezone primijećena je cirkulacija nekoliko različitih genotipova na određenoj lokaciji, a često je taj obrazac različit od obrasca cirkulacije genotipova na drugoj geografskoj lokaciji u istom vremenu (Peret i sur., 2000). Nadalje, lokalno prisutni sojevi se zamjenjuju tijekom godina, odnosno dominantni genotipovi se izmjenjuju u narednim godinama. Osim smjene dominantnih genotipova, primijećeno je i da se grupe A i B izmjenjuju u predomnaciji i to u relativno pravilnim vremenskim razmacima (1-2 godine), što je vjerojatno još jedan način na koji ovaj virus izbjegava imunološki odgovor (Anderson i sur., 1991; Freymuth i sur., 1991; Peret i sur., 1998). Za razliku od epidemija koje uzrokuje virus gripe gdje epidemije potiče novi dominantni soj, u slučaju HRSV-a epidemije pokreću lokalno pristupni sojevi, kao i novi genotipovi koji se u populaciju unose iz drugih regija. Širenje novonastalog soja najbolje je pokazano na primjeru sojeva genotipa BA grupe B, koji imaju duplikaciju od 60 nukleotida u proteinu G. Ovi sojevi pojavili su se 1998. godine, a ubrzo su se proširili globalno te smijenili sve dotadašnje sojeve grupe B; danas se gotovo isključivo detektiraju samo sojevi koji imaju ovu duplikaciju (Trento, 2003; Trento i sur., 2010). Zanimljivo je da se duplikacija od 72 nukleotida unutar istog segmenta proteina G relativno nedavno dogodila i u grupi A, a ti sojevi pokazuju slične obrasce cirkulacije kao i sojevi grupe B (Eshaghi i sur., 2012; Kim i sur., 2014; Pierangeli i sur., 2014).

HMPV je također podijeljen u dvije antigenske različite grupe, A i B (Boivin i sur., 2002; van den Hoogen i sur., 2001), a razina očuvanosti nukleotidne sekvence između ove dvije grupe je slična kao i kod HRSV-a, te iznosi 80% (Collins i Karron, 2013). Sličan je odnos primijećen i između proteina, osim što je protein F vrlo očuvan, što utječe na visoku razinu zaštite između heterolognih grupa (Skiadopoulos i sur., 2004). Kod HMPV-a se jedino na protein F stvaraju neutralizacijska protutijela čineći ga glavnim antigenom koji potiče protektivnu imunost (Cseke i sur., 2007; Skiadopoulos i sur., 2006). Cirkulacija sojeva ovog virusa slična je primijećenim obrascima kod HRSV-a: obje grupe mogu istovremeno cirkulirati na određenom prostoru, a također postoje studije koje pokazuju smjenu u dominaciji između dvije glavne grupe ovog virusa (Schildgen i sur., 2011).

U područjima umjerene klime epidemije uzrokovane HRSV-om javljaju se svake godine, obično tijekom zimskih mjeseci i rano u proljeće (slika 10). Pojava epidemija varira ovisno o geografskoj lokaciji, a ovisna je o umjerenj vlažnosti zraka (Welliver, 2007). Infekcije HMPV mogu se javiti tijekom cijele godine, dok epidemiološki obrasci slijede pojavu HRSV-a u područjima umjerene klime, najčešće s jednim do dva mjeseca odmaka (Schildgen i sur., 2011).



Slika 10. Sezonska pojavnost infekcija HRSV-om u Hrvatskoj, od 1994.-2005. godine. Preuzeto i prilagođeno iz Mlinaric-Galinovic i sur. (2008).

2.9 Molekularna evolucija virusa

S obzirom na brzinu evolucijskih procesa kod RNA virusa, te mali genom zbog kojega je relativno lagano povezati promjenu u fenotipu, RNA virusi predstavljaju dobar modelni organizam za proučavanje evolucije. Također, evolucija RNA virusa događa se na vremenskoj skali koja se preklapa s provođenjem učinkovitih mjera odgovora. To je potaknulo razvoj metoda koje implementiraju informacije o točnom vremenu uzorkovanja, omogućavajući određivanje porijekla i puteva prijenosa virusa analizom nukleotidnih slijedova. Ovakve molekularno-epidemiološke studije daju uvid u procese virusne evolucije, s ciljem razvoja boljih strategija u liječenju i kontroli širenja virusa (Holmes, 2013). Mjera brzine virusne evolucije očituje se u stopi nukleotidnih supstitucija po nukleotidnom mjestu i godini (supstitucije/mjesto/godina); ova mjera uključuje djelovanje prirodne selekcije s obzirom da se detektiraju samo mutacije koje su povoljne za virus te su fiksirane u populaciji. Stopa nukleotidnih supstitucija daje uvid u obrasce virusne evolucije, a na gensku varijaciju virusa utječe kombinacija epidemioloških, imunoloških i evolucijskih procesa, što je objedinjeno terminom filodinamika (Grenfell i sur., 2004).

U istraživanju infektivnih bolesti ključno je razjasniti kako dinamika epidemija i imunološki odgovor domaćina utječu na visoku varijabilnost patogena uočenu na razini individualnog domaćina te na razini populacije. Još uvijek nije potpuno razjašnjena poveznica između epidemioloških procesa i evolucije patogena, a upravo je ona ključna za razumijevanje i predviđanje rezistencije na lijekove, kao i dizajn cjepiva te pojavu novih bolesti. Novi sojevi i filogenetske skupine nastaju mutacijama, međutim njihovo zadržavanje u populaciji ovisno je o prevladavajućim imunološkim procesima (Grenfell i sur., 2004).

Iz klasičnih epidemioloških podataka nije moguće direktno odrediti uzorke prijenosa i širenja, u čemu uvelike mogu pomoći filodinamički modeli, a najčešće je cilj ovakvih analiza povezivanje epidemioloških procesa s uočenom filogenijom virusa (Volz i sur., 2013). Međutim, za ovakve analize nužno je konstantno praćenje virusa i to na skali koja je istovjetna epidemiološkim procesima koji se ispituju, kao što se podaci generiraju za virus gripe. Iz tih podataka dobiveni su podaci o cirkulaciji određenih sojeva gripe na specifičnoj geografskoj lokaciji, te je bilo moguće rekonstruirati njihov unos u ta područja (Holmes i Grenfell, 2009). U skladu s time, trenutno je u tijeku implementacija programa standardiziranog nadzora HRSV-a kojeg uvodi Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO) s ciljem boljeg razumijevanja širenja ovog virusa i bolesti koju uzrokuje u rizičnim skupina, a

sakupljeni podaci će se moći koristiti u svrhu povezivanja evolucije ovog virusa i učinkovitosti budućeg cjepiva (WHO, 2017).

2.9.1 Filogenetske analize

Filogenetske analize predstavljaju okosnicu istraživanja virusne evolucije, a najčešće se baziraju na istraživanjima najvarijabilnijih dijelovima genoma. Tada se rekonstrukcija ancestralne sekvence vrši pomoću modela evolucije nukleotidne, odnosno aminokiselinske sekvence. Model supstitucije za određeni skup podataka obuhvaća pretpostavke o sastavu nukleotidnih baza, stopi i frekvenciji supstitucija baza na različitim pozicijama sravnjenja, te odnosu tranzicija i transverzija. Najčešće korištene metode za rekonstrukciju filogenetskog stabla su metoda najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*, ML) i zaključivanje po Bayesu (eng. *Bayesian inference*). Ove dvije metode su bitno različite u svojim postavkama; ML pristup pronalazi stablo s najvećom vjerojatnošću za određeni skup podataka, odnosno računa koje je najbolje stablo koje je moglo proizvesti izvorni skup podataka (koji je u ovom slučaju nukleotidno sravnjenje). Zaključivanje po Bayesu se zasniva na izračunu posteriornih vjerojatnosti stabala pomoću prethodnih vjerojatnosti, odnosno objašnjava koja je vjerojatnost uočavanja određene topologije stabla s obzirom na izvorne podatke. Ove dvije metode se često koriste u kombinaciji posebno prilikom detekcije novih genotipova; velike razlike u rezultirajućim filogenetskim stablima ukazuju na kompleksne evolucijske odnose koji nisu u potpunosti obuhvaćeni samo jednom metodom (Wohl i sur., 2016).

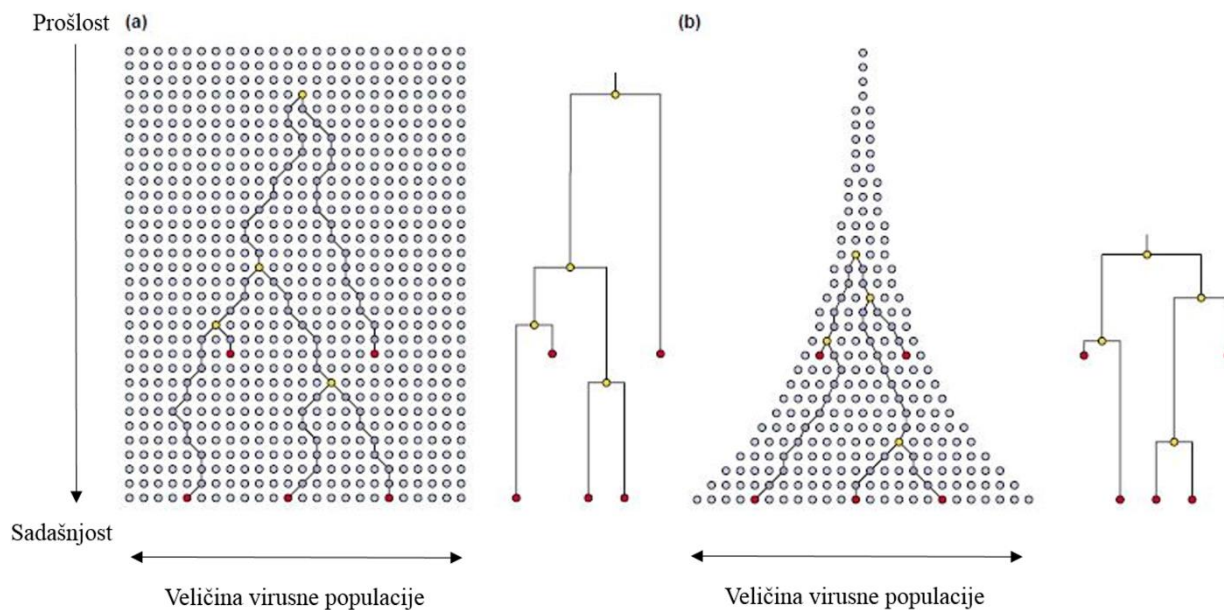
2.9.2 Analiza selektivnog pritiska

Prirodna selekcija djeluje na različite aspekte virusne biologije, omogućavajući virusima stjecanje povoljnih karakteristika, poput izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina, kao i prilagodbu na nove domaćine (Holmes, 2013). Djelovanje selekcije moguće je odrediti na razini kodirajuće nukleotidne sekvence analizama koje određuju omjer stope nesinonimnih supstitucija (dN) i sinonimnih supstitucija (dS) po mjestu, odnosno dN/dS. Nesinonimne supstitucije rezultiraju promjenom u aminokiselini, te mogu utjecati na funkciju proteina stoga podliježu djelovanju selekcije, dok sinonimne supstitucije ne dovode do promjene u aminokiselini. Za gen ili kodon koji je pod djelovanjem pozitivne selekcije ovaj će omjer poprimiti vrijednost veću od 1, dok će u slučaju negativne (purificirajuće) selekcije ovaj omjer poprimiti vrijednost manju od 1. Omjer ovih supstitucija koji je jednak vrijednosti 1

ukazuje na djelovanje neutralne evolucije, odnosno u ovom slučaju mutacija ne poboljšava niti umanjuje fitnes virusa (Yang i Bielawski, 2000).

2.9.3 Dinamika populacije

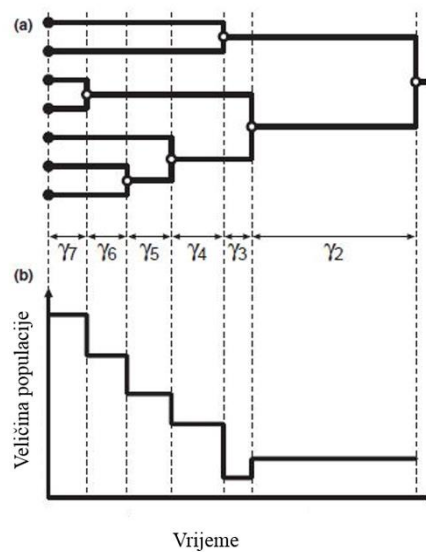
Varijacije u veličini virusne populacije tijekom vremena reflektiraju razne procese, uključujući aspekte bazične epidemiologije. U slučaju virusa s visokom stopom supstitucije i kratkim generacijskim vremenima, veličina virusne populacije reflektirana je genskom varijabilnošću tih virusa. Istraživanje promjena u dinamici populacije važno je za razumijevanje epidemioloških trendova koji na koncu uzrokuju bolest, što omogućuje efektivan odgovor s ciljem sprječavanja širenja epidemija. Jedna od najpopularnijih metoda kojom se matematičkim modelom nastoji opisati biološke fenomene reflektirane u genomskim podacima je koalescentno zaključivanje (eng. *coalescent inference*) (Drummond i Bouckaert, 2015; Lam i sur., 2010). Model se zasniva na stablu koje je konstruirano pod pretpostavkom molekularnog sata omogućavajući da horizontalne udaljenosti na stablu predstavljaju vrijeme, za razliku od filogenetskog stabla gdje horizontalna udaljenost predstavlja supstitucijske promjene po mjestu (ili promjene stanja koje se prati) (Drummond i Bouckaert, 2015). Pod pretpostavkom molekularnog sata, stopu evolucije moguće je procijeniti korištenjem uzoraka koji su sakupljeni u različitim vremenskim točkama i za koje je podatak o vremenu uzorkovanja poznat. Tada je iz vremenske distribucije na unutarnjim čvorovima stabla (koji označavaju vrijeme koje je prošlo otkada su promatrani geni dijelili jedinstvenog pretka) moguće procijeniti kako se veličina populacije mijenjala tijekom vremena (Kingman, 1982; Pybus i sur., 2000). Populacija se u ovom slučaju promatra retrogradno, te se na koncu uočena divergencija koristi za izračun vremena zadnjeg zajedničkog pretka, omogućavajući važne zaključke o porijeklu i vremenskom okviru epidemije (Kingman, 1982; Lam i sur., 2010) (slika 11).



Slika 11. Prikaz upotrebe koalescentnog modela za procjenu veličine virusne populacije tijekom vremena; virusna populacija konstantne veličine (a); virusna populacija eksponencijalnog rasta (b). Kružićima su predstavljeni teoretski pojedinačni virusi u svakoj generaciji (svaki redak predstavlja generaciju u određenom vremenu). Crvenim kružićima naznačeni su uzorkovani virusi, a žuti kružići predstavljaju hipotetske pretke uzorkovanih virusa, odnosno koalescentni događaj. Preuzeto i prilagođeno iz Drummond i sur. (2003).

Najčešće korištena metoda za prikaz promjena u dinamici populacije je pomoću Bayesian skyline plot, koji predstavlja grafički prikaz promjena u genskoj raznovrsnosti tijekom vremena. U uvjetima neutralne evolucije ove promjene reflektiraju promjene u broju zaraženih individua (Holmes i Grenfell, 2009), odnosno uočena nukleotidna raznolikost predstavlja relativnu veličinu virusne populacije (Drummond i sur., 2005). Prednost ovog modela je njegova fleksibilnost, s obzirom da nije jednostavno opisati epidemiološku dinamiku tijekom vremena koristeći egzaktne parametre. Ovaj model izbjegava opisivanje točnih mehanizama odgovornih za promjenu u dinamici na način da se stablo podijeli u vremenske intervale, a pritom je veličina populacije konstantna unutar pojedinih intervala, ali varira između tih intervala (slika 12). Međutim, ovakvi neparametarski modeli generalno zahtijevaju puno više podataka jer za zaključivanje ne koriste prethodne informacije o demografskoj dinamici (du Plessis i Stadler, 2015). Za svaki interval se procjenjuje efektivna veličina populacije, koja predstavlja broj individua koju bi idealna populacija u ovom demografskom modelu trebala imati kako bi predstavljala stvarnu veličinu populacije; ova veličina prikazuje

se u ovisnosti o vremenu (Drummond i sur., 2005; Lam i sur., 2010). Prilikom analiziranja demografske povijesti virusa efektivna veličina populacije se interpretira kao efektivan broj infekcija u danoj populaciji domaćina (Pybus i sur., 2000), a praktično se taj broj procjenjuje iz već navedenih parametara genske raznolikosti i distribucije koalescentnih vremena, dobivenih na temelju analize stvarnih uzoraka. Iako ova mjera ne mora nužno predstavljati stvarni ekvivalent broja infekcija, procijenjena stopa pada, odnosno rasta populacije primjenjiva je na stvarnu zaraženu populaciju (Lam i sur., 2010).



Slika 12. Procjena demografske povijesti populacije na temelju genealogije filogenetskog stabla; a) filogenetsko stablo u kojemu su duljine grana proporcionalne vremenu i b) veličina populacije procijenjena za svaki interval. Punim kružićima predstavljani su uzorkovani virusi, a prazni kružići predstavljaju hipotetske pretke; γ_i predstavljaju koalescentne intervale. Veličina populacije procjenjuje se za svaki interval na temelju jednadžbe $N_i = \gamma_i(i-1)/2$, gdje i predstavlja broj različitih sojeva u intervalu. Preuzeto i prilagođeno iz Ho i Shapiro (2011).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Biološki materijal

Klinički uzorci (sekret nazofarinksa) prikupljeni su u suradnji s djelatnicima Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo tijekom rutinske dijagnostike. Dijagnostika se provodi metodom direktne imunofluorescencije (DFA Light Diagnostics, Temecula, CA) kojom se uz specifična monoklonska protutijela utvrđuje prisutnost virusa; u testu se detektiraju sljedeći virusi: HPIV1-3, HRSV, HMPV, virus gripe i adenovirusi. Uzorci su čuvani na -80 °C u virusnom transportnom mediju, a sve daljnje molekularne analize provedene su isključivo na uzorcima u kojima je ovom metodom utvrđena prisutnost HPIV1-3, HRSV-a i HMPV-a. Ukupno je molekularno analizirano 55 uzoraka u kojima je utvrđena prisutnost HPIV1, 26 HPIV2 pozitivnih uzoraka, 166 HPIV3 pozitivnih uzoraka, 904 HRSV pozitivnih uzoraka i 238 HMPV pozitivnih uzoraka. Analizirani su uzorci sakupljeni od 2011. do 2016. godine za HPIV1, HMPV i HRSV pozitivne uzorke, a vremenski period za HPIV2 i HPIV3 obuhvatio je uzorke od 2011. do 2015. godine. Ovo istraživanje odobreno je od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu (broj potvrde 380-59-10106-16-20/293, 13. prosinca 2016. godine).

3.1.2 Stanične linije

Vero su epitelne stanice normalnog bubrega afričkog zelenog majmuna (*Cercopithecus aethiops*). Stanična linija je porijeklom iz banke stanica European Collection of Authenticated Cell Cultures u kojoj se nalazi pod kataloškim brojem 84113001.

3.1.3 Kemikalije i otopine

3.1.3.1 Kemikalije za održavanje i infekciju staničnih kultura

- MEM-H (AppliChem)
- fetalni teleći serum (FTS) (Moregate)
- tripsin (Difco)
- acetilirani tripsin (Sigma-Aldrich)

- neomicin (N) (Gibco-Life Technologies)
- etilen-diamino-tetraoctena kiselina (EDTA) (Merck)
- tripan plavo (Sigma-Aldrich)
- fiziološka otopina s fosfatnim puferom (eng. *Dulbecco's phosphate buffered saline*, D-PBS) (Lonza)
- Podloga za uzgoj stanica: MEM-H + 10% FTS. U podloge se dodaje antibiotik neomicin u konačnoj koncentraciji 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$.
- Enzimatsko odvajanje stanica od podloge: 0,25%-tna otopina tripsin-EDTA
- Podloga za infekciju stanica virusom: MEM-H + antibiotik neomicin u konačnoj koncentraciji 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, te acetilirani tripsin u koncentraciji 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. U pripremljenu podlogu dodaje se virusna suspenzija.

3.1.3.2 Kemikalije i otopine za izolaciju RNA

- gvanidin tiocijanat (Sigma-Aldrich)
- 2 M natrijev acetat pH 4,2 (Amresco)
- 0,75 M natrijev citrat (Amresco)
- 10%-tni sarkozil (Amresco)
- fenol (Kemika)
- kloroform:izoamilni alkohol 24:1 (Sigma-Aldrich)
- β -merkptoetanol (Sigma-Aldrich)
- etanol, apsolutni (Kemika)
- izopropanol (Kemika)
- dietilpirokarbonat (DEPC) (Sigma-Aldrich)
- voda bez RNaza i DNaza (Sigma-Aldrich)
- destilirana voda (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)
- Matična otopina D:
4 M gvanidin tiocijanat

25 mM natrijev citrat

0,5% sarkozil

Otopina se zagrije na 60 °C, filtrira kroz filter s porama veličine 0,22 µm. Otopina se pohranjuje na 4 °C, te se može koristiti do 3 mjeseca.

- Radna otopina D:

10 mL matična otopina D

72 µL β-merkaptoetanol

Otopina se pohranjuje na 4 °C, te se može koristiti do mjesec dana.

- Voda tretirana DEPC-om:

1000 mL destilirana voda

1 mL DEPC

Voda s DEPC-om ostavi se nekoliko sati na sobnoj temperaturi i potom autoklavira na 121 °C.

- Fenol zasićen vodom, pH 3,5:

100 g fenol

100 mL voda tretirana DEPC-om

Fenol se otopi u vodi zagrijavanjem na 50 °C, te se otopina ostavi preko noći da se odvoje faze. Vodena faza se potom aspirira, a otopina se pohranjuje na 4 °C i može se koristiti do mjesec dana.

3.1.3.3 Kemikalije i otopine za reverznu transkripciju

- MuLV (eng. *Moloney Murine Leukemia Virus*) reverzna transkriptaza, 50 U/µL (Thermo Fisher Scientific)
- nasumični heksanukleotidi, 50 µM (Thermo Fisher Scientific)
- oligo deoksitimidin (oligo(dT)) početnice, 50 µM (Thermo Fisher Scientific)
- inhibitor RNaza, 20 U/µL (Thermo Fisher Scientific)
- MgCl₂, 25 mM (GE Healthcare)

- 10 × PCR pufer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0) (GE Healthcare)
- 2'-deoksinukleozid-5'-trifosfati (dNTP), svaki u koncentraciji 10 mM (Sigma-Aldrich)
- voda bez RNaza i DNaza (Sigma-Aldrich)
- 10 mM otopina dNTP:

0,5 mL dNTP

1,5 mL voda bez RNaza i DNaza

Sve kemikalije i otopine pohranjuju se na -20 °C.

3.1.3.4 Kemikalije i otopine za lančanu reakciju polimerazom

- OneTaq DNA polimeraza, 5U/μL (New England Biolabs)
- 5 × PCR pufer (110 mM KCl, 110 mM NH₄Cl, 100 mM Tris-HCl, 9 mM MgCl₂, 0,3% IGEPAL CA-630, 0,25% Tween 20, pH 8,9) (Sigma-Aldrich)
- dNTP, svaki u koncentraciji 10 mM (Sigma-Aldrich)
- voda bez RNaza i DNaza (Sigma-Aldrich)
- specifične početnice (tablica 2), 20 μM (Thermo Fisher Scientific, MWG)
- otopina dNTP, 10 mM: priprema opisana u poglavlju 3.1.3.3.

Tablica 2. Početnice za amplifikaciju virusnih gena.

Virus	Naziv	Slijed nukleotida (5' – 3')
HPIV1	F6556(+)	GGCACAACACAGAGAGTACTCAG
	HN8840(-)	CGGAGAGTTCAAGTGACATTCTG
	HN6784(+)	CATACAACAATCAAATCTATCC
	HN7882(+)	CCACTTCCTACACTTGGATACATTGC
	HN7678(+)	CTGTAATAGCTGCAGGAACAAGG
	HN8803(+)	GAGGAATTCTGAGTTGACTCCTG
	F4632(+)	GTGTTCCAACCTGCAATTCCGA
	F7012(-)	AGCCAGATGTGTGTCCTTCCTGC
	F4735(+)	GACACCCATTAGCTCTAAATCG
	F5892(-)	CAGTCCCTTAACCTGTTTCAGTG
	F5725(+)	TAGCAACAGCATTTCAGCTCC

Tablica 2. - nastavak

	F6950(-)	TCGGGTTGTAGACCAATATGAAC
	P1651(+)	ATGATGATGATGCTACAGCGGC
	P3829(-)	CAGCACATCAAGATACCTGACTCC
	P1671(+)	GCTGCAGGGATAGGAGGAATT
	P2900(-)	CATGACTTGCACTCCTAGAT
	P2694(+)	AGAACAACCACAACCACAG
	P3737(-)	GAGAGGGAGAGGTTCTACTGTC
	HPIV1 2694(+)	AGAACAACCACAACCACAG
	HPIV1 5892(-)	CAGTTCCTTAACCTGTTTCAGTG
	HPIV1 3571(+)	CCAGCAATCAAAATCAATATC
	HPIV1 4868(-)	GGCTGGGCTTTTTGAGACTCT
HPIV2	HPIV2 HN1(+)	CTGATTATTATGTGATAGYGTAG
	HPIV2 HN2(-)	GATAAAATAGCGTGAGGACTGCT
	HPIV2 HN3(+)	ACAATCAATCCTGCAGTTGG
	HPIV2 HN4(-)	CATTCTGGCCTATRTCATAATC
	HPIV2 F1(+)	ATCATAGGTCCGAAGTATGATC
	HPIV2 F2(-)	GTGTCACGACACAGTCATTG
	HPIV2 F3(+)	GGTGC GAAGGTAATTGATC
	HPIV2 F4(-)	GGGTGTTAAATTGGGTTAGARG
	HPIV2 M1(+)	AGAAGGCTGGACATGATA
	HPIV2 M2(-)	TCTGCATTGTAGGATTTCA
	HPIV2 M3(+)	AGACCTATCCTTAAGTTCA
	HPIV2 M4(-)	TGCATACTATCATTGGATG
HPIV3	HN2 7494(+)	CTGTAAACTCAGACTTGGTA
	HN2 8697(-)	ACTCAGGATAGAGTATGTCAG
	HN 6531(+)	GGCACCAATCTAGCACTACA
	HN8702(-)	GTGACACTCAGGATAGAGTA
	HN1	GACAAGCCRTATGTAYTRAC
	HN1 7665(-)	TCTTCTATGCCCGATGATGC
	HN2 7494(+)	CTGTAAACTCAGACTTGGTA
	HN2 8697(-)	ACTCAGGATAGAGTATGTCAG
	F4737(+)	CCTTCTTTACCTGGCGAGTTCAG
	F6867(-)	ATGGACGTCTCCAGCTCATTAC
	F4747(+)	CTGGCGAGTTCAGATACTATCC
	F5641(+)	AGGTTGTGAAGCAGCAGGAC
	F5922(-)	AAAGGGAGTCTGACTTGGAGAG
	F6857(-)	CCAGCTCATTACCAGCATCCT
	HPIV3 3436(+)	GAGCAGTACAATGAGATCACTAG

Tablica 2. - nastavak

	HPIV3 5922(-)	AAAGGGAGTCTGACTTGGAGAG
	HPIV3 3448(-)	GAGATCACTAGTTGCAGTCA
	HPIV3 4903(-)	CAGGTATGACTRCTGACRGTG
HRSV	SH1(+)	CACAGTKACTGACAAYAAAGGAGC
	F164(-)	GTTATGACACTGGTATAACCAACC
	ABG490(+)	ATGATTWYCAYTTTGAAGTGTC
	F9AB(-)	CAACTCCATKRTTATTTGCC
	G2(-)	GAACACTTCAAARTGRWAATCAT
	G3(+)	ACAAAGTYACACYAACAAC
	HRSV P1(+)	GGAGARTAYAGAGGTACACCA
	HRSV M6(+)	GACACMTCAGATGAAGTGTCTC
	HRSV M7(-)	AGATCTTTRACTGTAGTTAACATA
	HRSV M8(+)	AACTCAAGAAGTCCWGTGCT
	HRSV M9(-)	GAATTCTATWGTKATGGATGT
HMPV	HMPV G1ab(+)	AAGGCGATGTCATWAAAARTGAYGG
	HMPV G1ab(-)	ACGTCTAYRGCAACTTTDGCAGTG
	HMPV G2a(-)	AGCTGCGGTAAGGTCTTTTAAGAG
	HMPV G2b(-)	CGTACCGATAGGGTCTTTTCAAAG
	HMPV G2a(+)	CTAGCAGTGATGGGTCTTCAAAAAC
	HMPV G2b(+)	GATCCAGTGATGGATCCTCAGAAAC
	HMPV G3a(+)	CGAGCAATAGACATGYTCAAAGCA
	HMPV G3a(-)	CTGTTGDGTTGSHTGCTGTG
	HMPV G3b(+)	GAGTGGAGAACATTCGRGC
	HMPV G3b(-)	TCATTGGRGTCTTYTTGCTTGG
	HMPV F(+)	GTYAGCTTCAGTCAATTCAACAGAAG
	HMPV F(-)	CCTGTGCTRACTTTGCATGGG
	HMPV F1(+)	ACTGTTGAAGCTGCWATAAGCAG
	HMPV F2(-)	TCAGCAGARACTGTYTTGAG
	HMPV F3(+)	TCATGYAGYACTATAACT
	HMPV F4(-)	CCATGTAAATYACRGAGCT
	HMPV F6(+)	GCAGGRTCMACTGTTTACTACC
	HMPV F7(-)	CTATCWGGCCAMCTCCAGTA
	HMPV SH1(+)	ATGCCYTGCAAGACAGTG
	HMPV SH2(-)	CTRTYGCYCGAATGTTCTC
	HMPV P1(+)	AGAGTGCCAAACACAGARCTA
	HMPV M1(+)	CGARAGCACAAGYGGTGAATC
	HMPV M2(-)	GCTTATTGCAGCTTCAACAGT
HMPV M3(+)	GAGYTCRGCCAAATCAGTT	

Tablica 2. - nastavak

	HMPV M4(-)	ATCAYCACTTTCCAAGACAT
--	------------	----------------------

3.1.3.5 Kemikalije i otopine za elektroforezu u agaroznom gelu

- Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Sigma-Aldrich)
- HCl (Kemika)
- boratna kiselina (Kemika)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- agaroz (Sigma-Aldrich)
- etidijev bromid (Sigma-Aldrich)
- boja bromfenolplavo (Sigma-Aldrich)
- glicerol (Kemika)
- destilirana voda (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)

- 10 × TBE-pufer:

89 mM Tris-HCl

89 mM boratna kiselina

2 mM EDTA

pH 8,3

- Otopina za nanošenje uzoraka na agarozni gel (6×):

30% v/v glicerol

0,05% bromfenolplavo-ksilencijanol

Otopina se čuva na -20 °C.

- Otopina etidijeva bromida:

50 mg etidijev bromid

5 mL destilirana voda

Otopina se čuva na tamnom mjestu na 4 °C.

- Agarozni gel:

1,5%-tni gel: 0,75 g agaroze

50 mL 1 × TBE-pufer

Agarozna i pufer se kuhaju dok se agarozna ne rastali, otopina se ohladi na približno 50 °C i doda se 2,5 µL etidijevog bromida u konačnoj koncentraciji 0,5 µg/mL.

3.1.3.6 Kemikalije i otopine za pročišćavanje produkata amplifikacije iz gela

- fenol (Kemika)
- kloroform (Sigma-Aldrich)
- 3 M natrijev acetat pH 5,2 (Amresco)
- etanol, apsolutni (Kemika)
- DEPC (Sigma-Aldrich)
- voda bez RNaza i Dnaza (Sigma-Aldrich)
- destilirana voda (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)
- Voda tretirana DEPC-om: priprema je opisana u poglavlju 3.1.3.2

3.1.3.7 Kemikalije za sekvencijsku reakciju

- komplet za sekvencijsku reakciju BigDyeTerminator v3.1 Cycle (FS AmpliTaq-DNA polimeraza, dITP, dTTP, dATP, dCTP, fluorescentno obilježeni 2'3'-dideoksinukleozid-5'-trifosfat, MgCl₂, Tris-HCl, pH 9,0) (Thermo Fisher Scientific)

3.1.3.8 Kemikalije za pročišćavanje produkata sekvencijske reakcije

- 125 mM EDTA (Sigma-Aldrich)
- etanol (Kemika)
- HiDi formamid (Thermo Fisher Scientific)

3.1.4 Oprema

- Hera Safe kabineti za rad u aseptičnim uvjetima s okomitim strujanjem zraka (Heraeus Instruments)
- digestor (Plast-Vent)
- inkubatori s kontroliranom temperaturom i CO₂ HeraCell 150 (Heraeus Instruments)
- stolne centrifuge s hlađenjem 5810 R i 5415 R (Eppendorf)
- stolna centrifuga bez hlađenja 5424 (Eppendorf)
- magnetska miješalica Bell-Stir (Bellco Glass Inc.)
- miješalica za epruvete (vorteks) Unimag ZX (Uniequip), EV-100 (Technica Železniki) i MS2 Minishaker (IKA)
- termoblok ThermoStat plus (Eppendorf)
- pH metar MP220 (Mettler Toledo)
- hladnjaci 4 °C, zamrzivači -20 °C (Obod-Bauknecht, Electrolux, Gorenje)
- zamrzivači -80 °C (New Brunswick Scientific, Thermo Fisher Scientific)
- termociklički amplifikatori Veriti, 2720 i ProFlex (Thermo Fisher Scientific)
- vaga PB303-S DeltaRange (Mettler Toledo)
- oprema za horizontalnu elektroforezu HE 33 (kadica, češljevi, držač gela) (Hofer Scientific Instruments)
- izvor napajanja za elektroforezu (Hofer Scientific Instruments)
- transiluminator UVTM-25 (Hofer Scientific Instruments)
- vodena kupelj (Sigma-Aldrich)
- plinski plamenik
- spremnici s tekućim dušikom
- automatske jednokanalne pipete (varijabilni volumeni 1-10 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL) (Eppendorf, Costar, Gilson)
- pipetor (Costar)
- stalci za mikroeprevete za lančanu reakciju polimerazom (96 mjesta) (Thermo Fisher Scientific); prije svake upotrebe stalci su autoklavirani na +121 °C/20 min/1,03 bar
- automatski sekvencer Genetic Analyser 3130 s programima Run 3130 Data Collection i Sequencing Analysis (Thermo Fisher Scientific), kapilare za sekvenciranje (Thermo Fisher Scientific)
- invertni mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)

- Neubauerova komorica za brojanje stanica (W. Schreck Hofheim)
- autoklav AMB220N (Astell)
- Erlenmayerove tikvice (100, 500 mL)
- graduirane staklene čaše
- staklene boce
- skalpel
- pinceta
- spremnici za infektivni otpad

3.1.5 Računalni programi

- program Clone Manager Suite (SciEd Central)
- ClustalX verzija 2.1 (<http://www.clustal.org/clustal2/>)
- Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (MAFFT) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft>)
- jModelTest verzija 2.1.4 (Darriba i sur., 2012)
- Molecular Evolutionary Genetics Analyses (MEGA) verzija 6 (Tamura i sur., 2013)
- Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST) verzija 1.8.2 i pripadajući programi (Drummond i sur., 2012)
- MrBayes verzija 3.2 (<http://mrbayes.sourceforge.net>)
- FigTree verzija 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)
- DNAsp verzija 5 (Librado i Rozas, 2009)
- TempEST verzija 1.5 (Rambaut i sur., 2016)
- BioEdit verzija 7.2.5 (Hall, 1999)
- Phobius (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>)
- NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)
- NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

3.1.6 Potrošni materijal

- plastične T-boce za uzgoj staničnih kultura površine 25 cm² (Corning)
- plastični nastavci sa i bez filtera za jednokanalne automatske pipete (10, 20, 100, 200 µL i 1000 µL) (Sarstedt, Eppendorf)

- pipete za jednokratnu upotrebu (2, 5, 10, 25 i 50 ml) (TPP, Corning, Sarstedt)
- filteri s porama promjera 0,22 μm i 0,45 μm (Sarstedt)
- mikroeprovete za kvalitativnu lančanu reakciju polimerazom (Sarstedt); mikroeprovete su prije upotrebe autoklavirane na +121 °C/20 min/1,03 bar
- optičke pločice za reakciju sekvenciranja s pripadajućim septama (Thermo Fisher Scientific)
- Eppendorf epruvete od 0,5, 1,5 i 2,0 mL (Eppendorf); epruvete su prije upotrebe autoklavirane na +121 °C/20 min/1,03 bar
- epruvete za centrifugiranje (15 i 50 mL) (TPP, Corning)
- filter papir
- staničevina
- staklena vuna

3.2 Metode

3.2.1 Održavanje stanične kulture

Vero stanična kultura korištena je za izolaciju HPIV2. Vero stanice su adherentne stanice. Uzgoj stanica provodi se u inkubatoru u kontroliranim uvjetima pri 37 °C u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂. Uzgoj stanica započinje odmrzavanjem ampule stanica koje su pohranjene u tekućem dušiku na način da se ampula sa stanicama nakratko stavi na 37 °C. Nakon toga stanice se istalože centrifugiranjem pri 150 × g kroz 5 min, a supernatant se pažljivo ukloni. Talog stanica se potom resuspendira u maloj količini svježeg medija za uzgoj, prenese u T-bocu od 25 cm² i doda se 10 mL istog medija. Stanice se supkultiviraju svakih 2-3 dana u omjeru 1:3 do 1:6, a maksimalno se mogu koristiti do 40 supkultivacija.

Stanična suspenzija se prilikom supkultivacije priprema na način da se sa stanične kulture ukloni medij nakon čega se stanicama dodaje 0,25 %-tna otopina tripsin-EDTA u volumenu koji prekriva stanični sloj, kako bi se stanice odvojile od podloge enzimatskom digestijom. Nakon 2-3 min stanice se pregledaju mikroskopski kako bi se potvrdilo odvajanje. Potom se stanična suspenzija pomiješa s medijem za uzgoj u omjeru 1:4 kako bi FTS iz medija inaktivirao tripsin. Ovisno o omjeru supkultivacije (1:3 do 1:6) prenese se određeni alikvot stanične suspenzije u novu T-bocu za uzgoj stanica gdje je već pripremljen svježi medij za uzgoj stanica.

Stanična kultura za infekciju se priprema na način da se stanice istalože centrifugiranjem na $150 \times g$ kroz 5 min, te se talog stanica pomiješa sa svježim medijem za uzgoj i resuspendira. Uzme se alikvot stanične suspenzije koji se pomiješa s bojom tripan plavo, nanese u Neubauerovu komoricu i pod mikroskopom se broje žive i mrtve stanice. Mrtve stanice obojane su plavo zbog oštećene membrane te se na taj način razlikuju od živih, nebojanih stanica. Brojanje se vrši unutar 8 velikih kvadrata (svaki kvadrat površine je 1 mm^2 i sastoji se 16 kvadratića, a dubina komorice je 0,1 mm). Broj stanica po mL suspenzije (N) računa se prema izrazu:

$$N = X_{sr} \times F_r \times 10^4$$

gdje je X_{sr} srednja vrijednost izbrojanih stanica unutar 8 kvadrata, a F_r faktor razrjeđenja.

Broj stanica koji se nasaduje u T-boce za infekciju podesi se tako da stanice u T-boci 25 cm^2 popune cijelu površinu stijenke T-boce, odnosno da stanični sloj koji se koristi za infekciju bude konfluentan nakon 24 sata, što je u ovom pokusu iznosilo 2×10^5 stanica/ cm^2 .

3.2.2 Infekcija staničnih kultura s HPIV2

Sa izrasle stanične kulture ukloni se medij, a stanice se isperu 3 puta s MEM-H medijem bez seruma. Na stanični sloj doda se 0,5 mL kliničkog uzorka koji je profiltiran kroz filter veličina pora $0,45 \mu\text{m}$. Uzorak se na stanice dodaje u mediju MEM-H bez seruma, koji sadrži antibiotik i acetilirani tripsin. Inficirane stanice se inkubiraju kroz 1 sat pri $35 \text{ }^\circ\text{C}$ u atmosferi koja sadrži 5% CO_2 . Neadsorbirani virus se ukloni, a stanični sloj se ispere 2 puta s D-PBS-om te se na njega doda svježja podloga za uzgoj i inkubacija se nastavlja na $35 \text{ }^\circ\text{C}$ u atmosferi koja sadrži 5% CO_2 . Acetilirani tripsin dodaje se u medij svaka 3 dana u konačnoj koncentraciji $1 \mu\text{g/mL}$. Nakon uočavanja citopatogenog efekta na stanicama, supernatant stanične kulture se sakupi u epruvete za centrifugiranje, te se potom centrifugira pri $1200 \times g$ tijekom 5 min i alikvotira u manje volumene za potrebe daljnjih analiza.

3.2.3 Izolacija ukupne virusne RNA

Ukupna virusna RNA izolira se prema modificiranoj metodi Chomczynski i Mackey (1998). RNA se ekstrahira iz $500 \mu\text{L}$ kliničkog uzorka ili $250 \mu\text{L}$ supernatanta stanične kulture u koji se redom doda: 1 volumen radne otopine D, 0,1 volumena 2 M natrijevog acetata pH 4,2, $500 \mu\text{L}$ fenola i $200 \mu\text{L}$ mješavine kloroforma i izoamilnog alkohola u omjeru 24:1. Nakon

dodavanja svih reagensa uzorak se promiješa na miješalici i inkubira na sobnoj temperaturi 2-3 min. Uzorak se centrifugira 20 min na $16100 \times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a vodena faza se prenese u novu epruvetu. Na vodenu fazu dodaje se ledeno hladan izopropanol u volumnom omjeru 1:1. RNA se precipitira 1,5 sat pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a zatim se uzorak centrifugira 30 min na $16100 \times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant se dekantira, a talog se ispere dva puta s $300\text{ }\mu\text{L}$ ledeno hladnog 75%-tnog etanola centrifugiranjem 5 min na $16100 \times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant se dekantira, a isprani talog posuši na zraku, te otopi u $10\text{ }\mu\text{L}$ vode bez RNaza i DNaza i odmah koristi za reverznu transkripciju.

3.2.4 Reverzna transkripcija (RT)

Za prepisivanje ukupne virusne RNA u komplementarnu DNA (cDNA) koriste se kratke oligonukleotidne početnice duljine 6 nukleotida koje se vežu nasumično duž virusne RNA (eng. *random hexamers*), omogućavajući transkripciju kompletnog virusnog genoma. Reakcijske smjese priređuju se u mikroeprevetama volumena $0,2\text{ mL}$ od komponenti prikazanih u tablici 3. Mikroepreveta se zatim stavi u termociklički amplifikator i reakcijski uvjeti se podese kako je navedeno u tablici 4.

Tablica 3. Reakcijske smjese za RT.

Komponenta	Volumen (μL)
$10 \times$ PCR pufer	2
25 mM MgCl_2	1
10 mM dNTP	4
50 μM nasumične početnice	1
20 U/ μL inhibitor RNaze	1
50 U/ μL MuLV reverzna transkriptaza	1
izolirana RNA	10
Ukupni volumen	20

Tablica 4. Reakcijski uvjeti za RT.

	Faza reakcije		
	Reverzna transkripcija	Denaturacija MuLV	Hlađenje
Vrijeme/ temp.	60 min/ $42\text{ }^{\circ}\text{C}$	5 min/ $99\text{ }^{\circ}\text{C}$	5 min/ $5\text{ }^{\circ}\text{C}$

Priređena cDNA se do daljnje uporabe čuva na 4 °C ili se u slučaju dulje pohrane smrzava na -20 °C.

3.2.5 Lančana reakcija polimerazom

Pri pripremi uzoraka za amplifikaciju DNA lančanom reakcijom polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) sve kemikalije i reakcijske smjese drže se na ledu, a za sva pipetiranja koriste se nastavci s barijerom. Za sve amplifikacije koristi se reakcijska smjesa koja je navedena u tablici 5, uz korištenje specifičnih početnica koje su navedene u daljnjem tekstu. Reakcijska smjesa ukupnog je volumena 50 µL, stoga se količina dodane vode bez RNaza i DNaza prilagođava s obzirom na volumen DNA koji se koristi u amplifikaciji, koji je za svaki virusni gen naznačen u daljnjem tekstu.

Tablica 5. Reakcijska smjesa za amplifikacije DNA.

Komponenta	Volumen (µL)
5 × PCR-pufer	10
10 mM dNTPs	4
20 µM početnica forward*	1
20 µM početnica reverse*	1
DNA-polimeraza	0,25
voda bez RNaza i DNaza	do 50
DNA kalup*	20, 10, 5, 2
Ukupni volumen	50

*Primijenjene početnice i količina DNA navedene su za svaki tip amplifikacije u tekstu.

Prikazana je općenita shema uvjeta za amplifikaciju, dok se temperatura pri kojoj se početnice vežu prilagođava za svaki gen s obzirom na korištene početnice, a navedena je u daljnjem tekstu. Osim toga se i vrijeme ekstenzije i broj ciklusa amplifikacije prilagođava ovisno o veličini fragmenta koji se umnaža, što je također navedeno u daljnjem tekstu.

Shema uvjeta za amplifikaciju DNA.

Korak	Početna denaturacija	35-45* ciklusa			Završna ekstenzija
		Denaturacija	Vežanje početnica	Ekstenzija	
Vrijeme/ temp.	5 min/ 95 °C	30 s/ 95 °C	30 s/ 48-60* °C	1-2* min/ 68 °C	10 min/ 68 °C

*Različito za pojedini gen, navedeno u daljnjem tekstu.

3.2.5.1 Amplifikacija gena HPIV1

a) Amplifikacija gena HN provodila se metodom ugnježđenog PCR-a (eng. *nested* PCR). Za prvi PCR korištena je cijela smjesa RT, odnosno ukupno 20 μ L DNA, te početnice F6556(+) i HN8840(-). Prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 6556, odnosno 8840, u referentnom HPIV1 genomu koji se u banci gena GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) nalazi pod pristupnim brojem AF457102. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 2248 parova baza. Temperatura vežanja početnica bila je 48 °C prvih 15 ciklusa, te je povišena na 50 °C za sljedećih 30 ciklusa, a vrijeme ekstenzije iznosilo je 2 min. Za umnažanje cijelog gena HN rađena su još dva PCR-a. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, a uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 6. Broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem AF457102.

Tablica 6. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena HN HPIV1.

Početnica	Temperatura vežanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HN6784(+) HN7882(-)	52 °C 15 ciklusa 54 °C 30 ciklusa	1 min 20 s	1098
HN7678(+) HN8803(-)	52 °C 10 ciklusa 54 °C 30 ciklusa	1 min 20 s	1125

b) Amplifikacija gena F provodila se na isti način kao što je opisano za gen HN. Za prvi PCR korišteno je 20 μ L DNA, te početnice F4632(+) i F7012(-). Broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem AF457102. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 2380 parova baza. Temperatura vežanja početnica bila je 51 °C prvih 15 ciklusa, te je povišena na 55 °C za

sljedećih 30 ciklusa, a vrijeme ekstenzije iznosilo je 2 min i 30 s. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u te su ponovno rađena dva PCR-a, a uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 7. Broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem AF457102.

Tablica 7. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena F HPIV1.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
F4735(+) F5892(-)	55 °C 30 ciklusa	1 min 30 s	1157
F5725(+) F6950(-)	55 °C 30 ciklusa	1 min 30 s	1225

c) Amplifikacija gena P rađena je na već prethodno opisane načine. Za prvi PCR korišteno je 20 μ L DNA, te početnice P1651(+) i P3829(-). Broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem AF457102. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 2178 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 51 °C prvih 15 ciklusa, te je povišena na 55 °C za sljedećih 30 ciklusa, a vrijeme ekstenzije iznosilo je 2 min i 30 s. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u te su ponovno rađena dva PCR-a, a uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 8. Broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem AF457102.

Tablica 8. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena P HPIV1.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
P1671(+) P2900(-)	52 °C 15 ciklusa 54 °C 30 ciklusa	1 min 20 s	1229
P2694(+) P3737(-)	52 °C 15 ciklusa 54 °C 30 ciklusa	1 min 20 s	1043

d) Za amplifikaciju gena M je u prvom PCR-u korišteno 20 μ L DNA, te početnice p2694(+) i p5892(-). Broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem AF457102. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 3198 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 51 °C prvih 10 ciklusa, te je povišena na 54 °C za sljedećih 30 ciklusa, a vrijeme ekstenzije iznosilo je 3 min i 40 s. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, uz početnice p3571(+) i p4868(-). Temperatura vezanja početnica bila je 55 °C tijekom 40 ciklusa. Duljina ekstenzije iznosila je 1 min 30s, a očekivana veličina fragmenta je 1297 parova baza.

3.2.5.2 Amplifikacija gena HPIV2

a) Za detekciju HPIV2 u kliničkim uzorcima u prvom PCR-u je korišteno 20 μ L DNA, odnosno cijela smjesa RT. Korištene su početnice HPIV2 F1(+) i HPIV2 F4(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 4708, odnosno 6720 u referentnom HPIV2 genomu koji se u banci gena GenBank nalazi pod pristupnim brojem NC_003443. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 2012 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 50 °C, a vrijeme ekstenzije 3 min. Amplifikacija je provođena u 40 ciklusa. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, uz početnice HPIV2 F1(+) i HPIV2 F2(-), a uvjeti PCR-a bili se jednaki kao u prvom PCR-u. Očekivana veličina amplificiranog fragmenta je 1074 parova baza. Prvi nukleotid početnice HPIV2 F2(-) komplementaran je poziciji 5782 u referentnom genomu NC_003443.

b) Za amplifikaciju cijelog gena F smjesa RT je podijeljena na dva dijela, te je kao kalup korišteno 10 μ L DNA u dvije PCR reakcije. Uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 9. Prvi nukleotid početnice HPIV2 F3(+) komplementaran je poziciji 5647 u referentnom genomu NC_003443.

Tablica 9. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena F HPIV2.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HPIV2 F1(+) HPIV2 F2(-)	50 °C 40 ciklusa	3 min	1074
HPIV2 F3(+) HPIV2 F4(-)	50 °C 40 ciklusa	3 min	1073

c) Za amplifikaciju gena HN je smjesa RT podijeljena na dva dijela, te je kao kalup korišteno 10 μ L DNA u dvije PCR reakcije. Uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 10. Prvi nukleotid početnice HPIV2 HN1(+) komplementaran je poziciji 6591, HPIV2 HN2(-) poziciji 7806, HPIV2 HN3(+) poziciji 7687, a HPIV2 HN4(-) poziciji 8795 referentnog genoma NC_003443.

Tablica 10. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena HN HPIV2.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HPIV2 HN1(+) HPIV2 HN2(-)	50 °C 40 ciklusa	3 min	1215
HPIV2 HN3(+) HPIV2 HN4(-)	50 °C 40 ciklusa	3 min	1108

d) Za amplifikaciju gena M korišteno je 10 μ L DNA. Korištene su početnice HPIV2 M1(+) i HPIV2 M4(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 3333, odnosno 4819 u referentnom genomu NC_003443. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 1486 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 50 °C, a vrijeme ekstenzije 3 min. Amplifikacija je provođena u 40 ciklusa. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, a amplifikacija se odvijala u dvije PCR reakcije. Uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 11. Prvi nukleotid početnice HPIV2 M2(-) komplementaran je poziciji 4149, a HPIV2 M3(+) poziciji 4819 u referentnom genomu NC_003443.

Tablica 11. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena M HPIV2.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HPIV2 M1(+) HPIV2 M2(-)	50 °C 40 ciklusa	2 min	816
HPIV2 M3(+) HPIV2 M4(-)	50 °C 40 ciklusa	2 min	779

3.2.5.3 Amplifikacija gena HPIV3

a) Za detekciju HPIV3 u kliničkim uzorcima u prvom PCR-u je korišteno 10 μ L DNA. Korištene su početnice HPIV3 HN2 7494(+) i HPIV3 HN2 p8697(-); broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem EU424062. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 1203 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 54 °C prvih 10 ciklusa, te je snižena na 51 °C za sljedećih 30 ciklusa, a vrijeme ekstenzije iznosilo je 1 min i 20 s.

b) Amplifikacija gena HN provodila se u dva koraka. Za prvi PCR korišteno je 10 μ L DNA, odnosno pola smjese RT, te početnice HPIV3 HN6531(+) i HPIV3 HN8702(-); broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem EU424062. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 2171 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 52 °C prvih 10 ciklusa, te je snižena na 50 °C za sljedećih 30 ciklusa, a vrijeme ekstenzije iznosilo je 1 min i 20 s. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, a amplifikacija se odvijala u dvije PCR reakcije. Uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 12. Broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem EU424062.

Tablica 12. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena HN HPIV3.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HPIV3 HN1 6662mut(+) HPIV3 HN1 7665(-)	54 °C 10 ciklusa 51 °C 30 ciklusa	1 min 20 s	1003
HPIV3 HN2 7494(+) HPIV3 HN2 8697(-)	54 °C 10 ciklusa 51 °C 30 ciklusa	1 min 20 s	1203

c) Amplifikacija gena F provodila se na isti način kao što je opisano za gen HN. Za prvi PCR korišteno je 10 μ L DNA, te početnice HPIV3 F4737(+) and HPIV3 F6867(-); broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem EU424062. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 2130 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 54 °C, a vrijeme ekstenzije 2 min i 20 s. Amplifikacija je provedena u 40 ciklusa. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA

dobivene u prvom PCR-u te su ponovno rađena dva PCR-a, a uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 13. Broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem EU424062.

Tablica 13. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena F HPIV3.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HPIV3 F4747(+) HPIV3 F5922(-)	55 °C 40 ciklusa	1 min 20 s	1175
HPIV3 F5641(+) HPIV3 F6857(-)	55 °C 40 ciklusa	1 min 20 s	1216

d) Za amplifikaciju gena M korišteno je 10 μ L DNA za prvi PCR. Korištene su početnice HPIV3 3436(+) i HPIV3 5922(-); broj u imenu početnice naznačuje prvi nukleotid u komplementarnoj poziciji u referentnom genomu HPIV1 pod pristupnim brojem EU424062. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 1474 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 58 °C, a vrijeme ekstenzije 2 min. Amplifikacija je provođena u 40 ciklusa. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 5 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, te početnice HPIV3 3448(+) i HPIV3 4903(-). Temperatura vezanja početnica bila je 56 °C, a vrijeme ekstenzije 1 min i 30s. Amplifikacija je provođena u 35 ciklusa. Očekivana veličina fragmenta je 1455 parova baza.

3.2.5.4 Amplifikacija gena HRSV-a

a) Za detekciju HRSV u kliničkim uzorcima rađena su dva PCR-a, a u prvom PCR-u je korišteno 10 μ L DNA. Korištene su početnice SH1(+) i F164(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 3825, odnosno 5786 u referentnom genomu A2 koji se u banci gena GenBank nalazi pod pristupnim brojem M11486. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 1961 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 50 °C, a vrijeme ekstenzije 2 min. Amplifikacija je provođena u 40 ciklusa. Kao kalup za drugi PCR korišteno je 2 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, uz početnice ABG490(+) i F9AB(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 5122, odnosno 5622 u referentnom genomu M11486. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 501 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 50 °C, a vrijeme ekstenzije 1 min. Amplifikacija je provođena u 40 ciklusa.

b) Za amplifikaciju gena M korišteno je 10 μ L DNA. Korištene su početnice HRSV P1(+) i HRSV M9(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 3333, odnosno 4819 u referentnom genomu M11486. Očekivana veličina produkta amplifikacije je 2189 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 50 °C, a vrijeme ekstenzije 2 min. Amplifikacija je provedena u 40 ciklusa. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 2 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, a amplifikacija se odvijala u dvije PCR reakcije. Uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 14. Prvi nukleotid početnice HRSV M6(+) komplementarna je poziciji 2926, M8(+) poziciji 3436, a HRSV M7(-) poziciji 3608 u referentnom genomu M11486.

Tablica 14. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena M HRSV-a.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HRSV M6(+) HRSV M7(-)	50 °C 40 ciklusa	1 min	685
HRSV M8(+) HRSV M9(-)	50 °C 40 ciklusa	1 min	846

3.2.5.5 Amplifikacija gena HMPV-a

a) Amplifikacija gena F HMPV-a odvijala se u dva koraka, u prvom PCR-u korišteno je 10 μ L DNA, te početnice HMPV F1(+) i HMPV F7(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 2705, odnosno 4802 u referentnom genomu CAN97-83 koji se u banci gena GenBank nalazi pod pristupnim brojem AY297749. Očekivana veličina fragmenta je 2097 parova baza, temperatura vezanja početnica bila je 49 °C, a vrijeme ekstenzije 3 min. Amplifikacija je provedena u 35 ciklusa.

Amplifikacija gena F rađena je u ukupno četiri PCR reakcije, a u svim reakcijama korišteno je 5 μ L DNA. U svrhu detekcije HMPV-a u kliničkim uzorcima korišten je fragment dobiven početnicama HMPV F(+) i HMPV F(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 3637, odnosno 4143 u referentnom genomu CAN97-83. Uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 15. Prvi nukleotid početnica HMPV F2(-) komplementaran je poziciji 3307, HMPV F3(+) 3145, HMPV F4(-) 3859, a HMPV F6(+) poziciji 4006 u referentnom genomu CAN97-83.

Tablica 15. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena F HMPV-a.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HMPV F1(+) HMPV F2(-)	55 °C 35 ciklusa	1 min	619
HMPV F3(+) HMPV F4(-)	55 °C 35 ciklusa	1 min	705
HMPV F(+) HMPV F(-)	55 °C 35 ciklusa	1 min	523
HMPV F6(+) HMPV F7(-)	55 °C 35 ciklusa	1 min	815

b) Za amplifikaciju gena G HMPV-a kao kalup je korišteno 10 µL DNA u prvom PCR-u, uz početnice HMPV G1ab(+) i HMPV G2ab(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 5473, odnosno 7264 u referentnom genomu CAN98-75 (AY297748). Temperatura vezanja početnica bila je 50 °C tijekom 5 ciklusa, te je povišena na 55 °C sljedećih 30 ciklusa. Vrijeme ekstenzije iznosilo je 2 min, a očekivana veličina produkta je 1791 parova baza. Za daljnje amplifikacije kao kalup je korišteno 5 µL DNA dobivene u prvom PCR-u.

Za amplifikaciju gena G grupe A korištene su specifične početnice G2a(+) i G3a(-), te G3a(+) i G2a(-). Prvi nukleotid početnice G2a(+) komplementaran je poziciji 5500, G3a(-) poziciji 6503, G3a(+) poziciji 6256, a G2a(-) poziciji 7232 u referentnom genomu grupe A (CAN97-83, AY297749).

Za amplifikaciju gena G grupe B korištene su početnice G2b(+) i G3b(-), te G3b(+) i G2b(-). Prvi nukleotid početnice G2b(+) komplementarna je poziciji 5486, G3b(-) poziciji 6427, G3b(+) poziciji 6221, a G2b(-) poziciji 7234 u referentnom genomu grupe B (CAN98-75, AY297748). Uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 16.

Tablica 16. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena G HMPV-a.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HMPV G2a(+) HMPV G3a(-)	55 °C 35 ciklusa	2 min	1003

Tablica 16. -nastavak

HMPV G3a(+) HMPV G2a(-)	55 °C 35 ciklusa	2 min	976
HMPV G2b(+) HMPV G3b(-)	55 °C 35 ciklusa	2 min	941
HMPV G3b(+) HMPV G2b(-)	55 °C 35 ciklusa	2 min	1013

c) Za amplifikaciju gena SH HMPV-a korišteno je 10 μ L DNA, te početnice HMPV SH1(+) i HMPV SH2(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 5233, odnosno 6245 u referentnom genomu CAN98-75 (AY29774). Temperatura vezanja početnica bila je 55 °C, a vrijeme ekstenzije 1 min 30 s. Amplifikacija je provođena u 40 ciklusa. Očekivala veličina fragmenta iznosi 1004 parova baza.

d) Za amplifikaciju gena M HMPV-a korišteno je 10 μ L DNA. Korištene su početnice HMPV P1(+) i HMPV M4(-); prvi nukleotid početnica komplementaran je pozicijama 1075, odnosno 3086 u referentnom genomu CAN97-83 (AY297749). Očekivana veličina produkta amplifikacije je 2011 parova baza. Temperatura vezanja početnica bila je 53 °C, a vrijeme ekstenzije 2 min. Amplifikacija je provođena u 40 ciklusa. Kao kalup u drugom PCR-u korišteno je 2 μ L DNA dobivene u prvom PCR-u, a amplifikacija se odvijala u dvije PCR reakcije. Uvjeti reakcije i specifične početnice navedeni su u tablici 17. Prvi nukleotid početnice HMPV M1(+) komplementaran je poziciji 2054, M3(+) poziciji 2569, a HMPV M2(-) poziciji 2725 u referentnom genomu CAN97-83 (AY297749).

Tablica 17. Uvjeti i početnice za amplifikaciju gena M HMPV-a.

Početnica	Temperatura vezanja početnica	Duljina ekstenzije	Veličina fragmenta (parovi baza)
HMPV M1(+) HMPV M2(-)	55 °C 40 ciklusa	1 min	670
HMPV M3(+) HMPV M4(-)	55 °C 40 ciklusa	1 min	512

3.2.6 Elektroforeza u agaroznom gelu i pročišćavanje produkata amplifikacije

Prije nanošenja na agarozni gel uzorci se pomiješaju s puferom za nanošenje u omjeru 5:1. Elektroforeza produkata amplifikacije traje 30 min u 1,5%-tnom gelu, te se provodi na sobnoj temperaturi u $1 \times$ TBE-puferu pri 100 mV.

Produkti amplifikacije se za potrebe sekvenciranja izrežu iz agaroznog gela i pročiste preko staklene vune (Sun i sur., 2012). Epruveta od 0,5 mL se priredi na način da se pomoću zagrijane igle probuši rupica na dnu epruvete, te se u epruvetu stavi staklena vunica do visine od otprilike 1-2 mm. U epruvetu se potom stavi komadić izrezanog agaroznog gela, epruveta se stavi u Eppendorf epruvetu od 1,5 mL i potom centrifugira 3 min na $5500 \times g$. Epruveta s ostatkom agaroznog gela se baci, a filtratu koji je prošao u donju epruvetu tijekom centrifugiranja se izmjeri volumen te se doda voda bez RNaza i DNaza do ukupno 250 μ L. Potom se redom dodaje 250 μ L fenola i 250 μ L kloroforma, epruveta se promiješa te centrifugira na $16100 \times g$ tijekom 10 min. Vodena faza se odvoji u novu epruvetu (1,5 mL) te se doda 0,1 volumen natrijevog acetata (3M, pH 5,2) i 3 volumena apsolutnog etanola i zatim inkubira pri 4 °C tijekom 30 min, te potom centrifugira na $16100 \times g$ tijekom 25 min. Vodena faza se dekantira, a talog se osuši na zraku i otopi u 13 μ L vode bez RNaza i DNaza.

3.2.7 Sekvencijska reakcija

Sekvencijska reakcija je lančana reakcija polimerazom u kojoj se koristi smjesa deoksinukleotida i njihovih analoga, fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju hidroksilnu skupinu ni na 2' ni na 3' ugljicima šećera pa njihovom ugradnjom dolazi do prestanka sinteze lanca DNA. Nastali DNA fragmenti razdvajaju se kapilarnom elektroforezom, a veličina fragmenta ovisna je o vremenu ugradnje dideoksinukleotida. Ugradnju dideoksinukleotida omogućuje posebno prilagođena *Taq*-DNA-polimeraza koja ne posjeduje 3'→5' egzonukleaznu aktivnost i ima značajno smanjenu sposobnost razlikovanja deoksinukleotida od dideoksinukleotida. Reakcijska smjesa se priredi kako je navedeno u tablici 18, specifične početnice koje su korištene navedene su već za pojedini virusni gen u poglavlju 3.2.5.

Tablica 18. Reakcijska smjesa za sekvencijsku reakciju.

Komponenta	Volumen (μL)
BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Mix	4
BigDyeTerminator v3.1 5 \times Sequencing Buffer	2
DNA (10-20 ng/ μL)	6,5-13
3,2 pM početnica	1
voda bez RNaza i DNaza	do 20
Ukupni volumen	20

Shema uvjeta amplifikacije:

Korak	35 ciklusa amplifikacije		
	Denaturacija	Vežanje početnica	Ekstenzija
Vrijeme/ temp.	10 s/+96 °C	5 s/+50 °C	4 min/+60 °C

3.2.8 Pročišćavanje produkata sekvencijske reakcije

Kako bi se uklonili neugrađeni dideoksinukleotidi, produkti sekvencijske reakcije pročiste se prema sljedećem protokolu:

- U Eppendorf epruvetu od 1,5 mL doda se 5,0 μL 125 mM EDTA, 20 μL reakcijske smjese i 60 μL apsolutnog etanola, uzorak se promiješa na miješalici i inkubira 15 min na sobnoj temperaturi.
- Uzorak se centrifugira 30 min pri 5000 $\times g$.
- Supernatant se u potpunosti ukloni.
- Na talog se doda 60 μL 70%-tnog etanola.

- Uzorak se centrifugira 15 min pri $4500 \times g$.
- Supernatant se u potpunosti ukloni, talog se osuši na zraku i otopi u 10 μL HiDi formamida.

3.2.9 Sekvenciranje i analiza nukleotidnog slijeda

Fragmenti DNA sintetizirani u sekvencijskoj reakciji i pročišćeni od neugrađenih nukleotida razdvoje se kapilarnom elektroforezom.

- Pročišćeni produkti sekvencijske reakcije otopljeni u HiDi formamidu nanese se u pločicu za automatsko uzorkovanje (eng. *autosampler*).
- Kapilarna elektroforeza izvodi se u genskom analizatoru 3130 Genetic Analyzer s četiri kapilare duljine 36 cm, polimerom POP-7 i 1 \times pufer s EDTA.
- Detekcija fluorescentnog signala se provodi pomoću laserskog čitača.
- Signali se automatski skupljaju pomoću programa Run 3130 Data Collection i obrađuju uz pomoć programa Sequencing Analysis.

3.2.10 Bioinformatičke analize

Nukleotidni slijed dobiven sekvenciranjem uspoređuje se s nukleotidnim slijedom željenog gena koji je objavljen u banci gena GenBank. Usporedba i spajanje fragmenata se napravi pomoću računalnog programa Clone Manager Suite. Višestruka sravnjenja sekvenci rađena su pomoću programa ClustalX verzija 2.1 i MAFFT koji je dostupan na mrežnoj stranici <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft>. Sravnjenja su rađena s automatskim postavkama parametara u oba slučaja. Program MAFFT korišten je za sravnjenja sekvenci gena M. Sravnjenja su pregledana i prilagođena za daljnje analize pomoću programa BioEdit verzija 7.2.5. Potom je na temelju višestrukog sravnjenja odabran najvjerojatniji model evolucije analiziranih sekvenci pomoću programa jModelTest verzija 2.1.4. Pomoću ovog programa odabire se model koji najvjerojatnije opisuje nukleotidne supstitucije u danom setu sekvenci, a ukupno se testira 88 supstitucijskih modela. Vrednovanje i odabir modela temeljio se na usporedbi rezultata dobivenih prema Akaikeovom informacijskom kriteriju (eng. *Akaike information criteria*, AIC) i Bayesovom informacijskom kriteriju (eng. *Bayesian information criteria*, BIC). Za uzorke manje veličine odabir modela uključivao je korekciju AIC vrijednosti, tzv. AICc koja u izračun uzima i veličinu samog uzorka.

3.2.10.1 Filogenetske analize

Filogenetska stabla izrađena su metodom najveće vjerojatnosti pomoću programa MEGA verzija 6. Za svaku analizu definiran je model supstitucije prema rezultatima odabira supstitucijskog modela, a testiranje pouzdanosti filogenije vršeno je pomoću 1000 pseudoreplikacija (eng. *bootstrap*), dok su ostali parametri tijekom analize uključivali automatske postavke. Za izradu filogenetskih stabala metodom Bayesovog zaključivanja korišteni su programi MrBayes verzija 3.2 i BEAST verzija 1.8.2, koji koriste metodu Markovljevog lanca Monte Carlo (eng. *Markov chain Monte Carlo*, MCMC) pomoću koje se procjenjuje posteriorna distribucija parametara. U ovim analizama također je definiran supstitucijski model. Konvergencija je ispitana pomoću parametra efektivne veličine uzorka (eng. *effective sample size*, ESS) programom Tracer verzija 1.5, koji je sastavni dio paketa BEAST. Prvih 10% rezultata odbacuje se automatski u programu (eng. *burn-in*), a vrijednosti parametra ESS više od 200 uzete su kao mjera dobre konvergencije MCMC lanaca. Pouzdanost procjena izražena je kao 95%-tni interval najveće posteriorne gustoće (eng. *highest posterior density*, HPD). Konvergencija MCMC lanaca u programu MrBayes ispitana je pomoću standardne devijacije podijeljenih frekvencija, koja je mjera sličnosti stabala generiranih pomoću dvije neovisne analize; analiza je zaustavljena kada je standardna devijacija pala ispod vrijednosti 0,01. Stabla su zatim generirana pomoću programa TreeAnnotator verzija 1.8.2, uz postavku odbacivanja 10% rezultata, te vizualizirana pomoću FigTree verzija 1.4.2.

3.2.10.2 Analize raznolikosti sekvenci

Raznolikost između sekvenci računata je programom MEGA verzija 6, kao broj nukleotidnih ili aminokiselinskih promjena u sravnjenju ispitivanog gena, odnosno proteina. Aminokiselinski slijed dobiven je translacijom nukleotidnog slijeda pomoću standardnog genetskog koda u programu MEGA 6. Varijabilnost sekvenci HPIV1 i HPIV3 ispitana je pomoću programa DNAsp verzija 5.0, a korišteni su izračuni nukleotidne raznolikosti (π) (Nei i Miller, 1990), omjer nesinonimnih i sinonimnih supstitucija izražen kao Ka/Ks (koji odgovara dN/dS), te broj polimorfnih mjesta u sravnjenju.

Unutargenotipske i međugenotipske nekorrigirane udvojene udaljenosti (p-udaljenosti) računata su kao udio nukleotidnih mjesta na kojima se uspoređivane sekvence razlikuju pomoću programa MEGA 6. Korigirane udvojene vrijednosti uključivale su i procjenu standardne pogreške pomoću 1000 pseudoreplikacija.

3.2.10.3 Analiza selektivnog pritiska

Selektivni pritisak analiziran je uz pomoć HyPhy paketa dostupnog na serveru Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>) (Delpont i sur., 2010; Kosakovsky Pond i Frost, 2005a; Kosakovsky Pond i sur., 2005c). U tu svrhu korištene su četiri metode kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati: prebrojavanje supstitucija najvjerojatnijeg pretka (eng. *single-likelihood ancestor counting*, SLAC), vjerojatnost fiksniranih efekata (eng. *fixed-effects likelihood*, FEL), vjerojatnost fiksniranih efekata unutarnjih grana (eng. *internal branch fixed-effects likelihood*, IFEL) te brza nesputana Bayesova aproksimacija (eng. *fast unconstrained Bayesian approximation*, FUBAR). Ove metode određuju selektivni pritisak na razini pojedinog kodona, čime je omogućeno da se pozitivna selekcija detektira i ukoliko djeluje na manji broj mjesta (Kosakovsky Pond i Frost, 2005b). Metoda SLAC spada u metode prebrojavanja, te se zasniva na rekonstrukciji ancestralne sekvence pomoću ML i procjeni broja nesinonimnih i sinonimnih promjena koje su se dogodile u svakom kodonu tijekom evolucijske povijesti. Druga klasa metoda uključuje FEL i IFEL koje koriste ML pristup za procjenu nesinonimnih i sinonimnih supstitucijskih stopa na svakom mjestu; pretpostavlja se da je selektivni pritisak za svako mjesto konstantan. Metoda FUBAR slična je metodi FEL, ali za procjenu stopa supstitucije po mjestima koristi pristup Bayesovog zaključivanja (Kosakovsky Pond i Frost, 2005b; Murrell i sur., 2013).

Kao kriterij prihvaćanja korištena je p-vrijednost niža od 0,05 (za SLAC, FEL i IFEL) te posteriorna vjerojatnost viša od 0,90 za metodu FUBAR; dN/dS je u ovoj analizi određen pomoću metode SLAC.

3.2.10.4 Analiza glikozilacije, entropije i hidrofobnih svojstava proteina

Vežanje šećera (glikana) na dušikov atom u asparaginskim ostacima u proteinima naziva se N-vezana glikozilacija, a motiv koji se glikozilira uključuje N-X-S/T sekvencu u kojoj X ne smije biti prolin ili asparaginska kiselina. Vežanje šećera na kisikov atom u aminokiselinskim ostacima u proteinima naziva se O-vezana glikozilacija, te uključuje glikozilaciju serinskih i treoninskih ostataka. Glikozilacija je ispitana metodama dostupnim na NetNGlyc 1,0 serveru (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), odnosno NetOGlyc 4,0 serveru (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Za obje analize odabrane su automatske postavke parametara.

Analiza aminokiselinske varijabilnosti određena je računanjem Shannonove entropije pomoću programa BioEdit 7.2.5, te grafički prikazana u odnosu na poziciju u sravnjenju. Vrijednosti Shannonove entropije računaju se na način da se dodijele vrijednosti prema frekvenciji pojavnosti aminokiseline na svakoj pojedinoj poziciji sravnjenja. Moguće su vrijednosti od 0 (ukoliko je u sravnjenju na određenoj poziciji prisutna samo jedna aminokiselina) do 4,322 u slučaju kada bi svih 20 mogućih aminokiselina bilo prisutno na toj poziciji.

Analiza hidrofobnih, odnosno hidrofilnih svojstava proteina ispitana je izradom Kyte-Doolittleovog profila pomoću alata ProtScale dostupnog na ExPASy portalu (<http://web.expasy.org/protscale>), uz automatske postavke. U ovoj analizi hidrofilnim aminokiselinskim ostacima se dodjeljuju negativne vrijednosti, a hidrofobnim ostacima pozitivne.

3.2.10.5 Filodinamičke analize

Za filodinamičke analize testiran je vremenski signal sekvenci pomoću programa TempEST 1.5, u svrhu provjere analiziranih sekvenci, odnosno sadrže li testirane sekvence dovoljnu razinu genskih promjena u odnosu na vrijeme uzorkovanja, kako bi se moglo zaključivati o povezanosti između divergencije i vremena. U tu svrhu uključene su sve sakupljene sekvence, uz točan datum uzorkovanja koji je korišten za rekonstrukciju filogenetskog stabla u kojemu grane predstavljaju produkt supstitucije i vremena metodom Bayesovog zaključivanja u programu BEAST 1.8.2, kao što je opisano u poglavlju 3.2.10.1. Potom se regresija genskih udaljenosti (od korijena stabla do svih završetaka) u odnosu na vrijeme uzorkovanja koristi za testiranje modela molekularnog sata. Nedostatak trenda znači da podaci ne sadrže vremenski signal i nisu prikladni za analize koje uključuju modele molekularnog sata (Rambaut i sur., 2016), te takve sekvence nisu pogodne za daljnje analize.

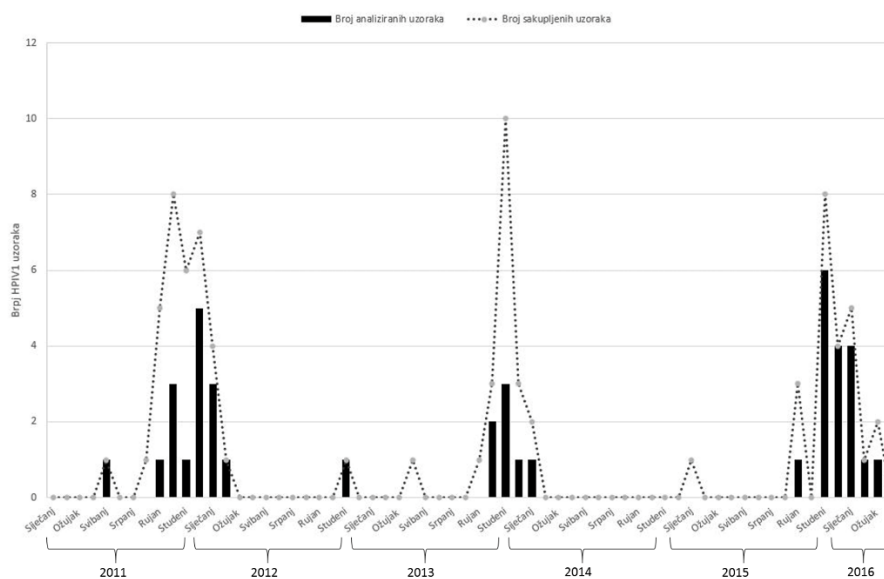
Genska raznolikost populacije tijekom vremena ispitana je korištenjem demografskog modela Bayesian skyline plot, koji je dostupan u programu BEAST 1.8.2. U istoj analizi izračunata je stopa evolucije i vrijeme najrecentnijeg pretka (eng. *time of the most recent ancestor*, TMRCA) određenog seta podataka. Za analizu je uključen i najvjerojatniji model evolucije određen programom jModelTest 2.1.4, uz model striktnog molekularnog sata (eng. *strict clock*) ili nekoreliranog relaksiranog molekularnog sata (eng. *lognormal uncorrelated*

relaxed clock). Analiza se provodila dok nije uočena konvergencija MCMC lanaca, kao što je opisano u poglavlju 3.2.10.1.

4. REZULTATI

4.1. Molekularna epidemiologija HPIV1

U ovu studiju uključeno je ukupno 78 kliničkih uzoraka koji su u testu DFA sa specifičnim monoklonskim protutijelom bili pozitivni na HPIV1. Uzorci su sakupljeni tijekom 6 uzastopnih godina, od siječnja 2011. do ožujka 2016. godine. Tijekom ovog perioda uočene su 3 epidemiološke sezone: prva sezona obuhvaća uzorke od kolovoza 2011. godine do veljače 2012. godine kada su prikupljena ukupno 32 uzorka, druga sezona obuhvaća uzorke od rujna 2013. godine do siječnja 2014. godine s ukupno 19 prikupljenih uzoraka, te zadnja epidemiološka sezona od rujna 2015. godine do veljače 2016. godine tijekom koje je prikupljeno 23 uzorka. Osim ovih glavnih epidemija, uočena je i sporadična pojava HPIV1, međutim u svim slučajevima ta pojava uključuje samo jedan uzorak (slika 13). U periodu od veljače 2014. godine do kraja te godine nije prikupljen niti jedan uzorak. Prema ovim podacima epidemije HPIV1 događaju se svake druge godine, a početak im je tijekom jesenskih mjeseci neparnih godina (slika 13).



Slika 13. Mjesečna raspodjela analiziranih uzoraka HPIV1 sakupljenih od siječnja 2011. godine do ožujka 2016. godine.

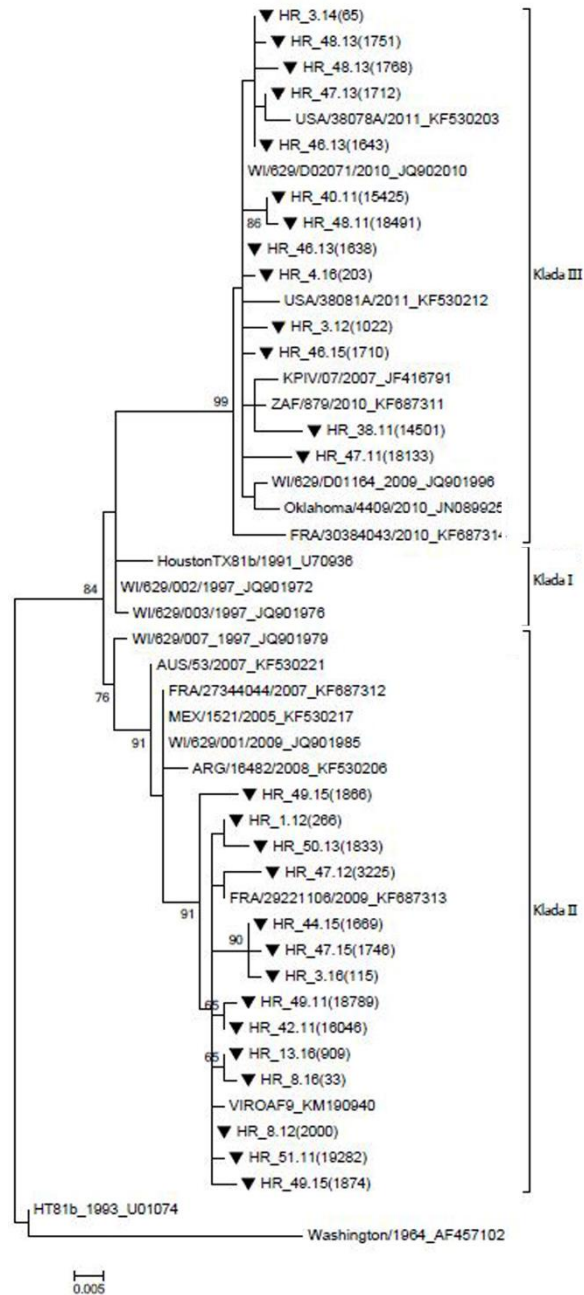
Većina bolesnika kojima je detektiran HPIV1 imala je infekciju gornjih dišnih puteva, ukupno njih 40%. Druge bolesti javile su se u podjednakom broju slučajeva: u 18% dijagnosticiran je laringitis, 10% bronhioilitis i u 14% slučajeva upala pluća. Kod preostalih 18% slučajeva bili

su naznačeni samo nespecifični simptomi, poput angine i temperature. Najveći broj uzoraka odnosi se na djecu do 2 godine starosti (63%), zatim slijedi dobna skupina od 2. do 5. godine s 22% infekcija HPIV1 virusom, te preostalih 15% uzoraka pripada dobnoj skupini starijih od 5 godina.

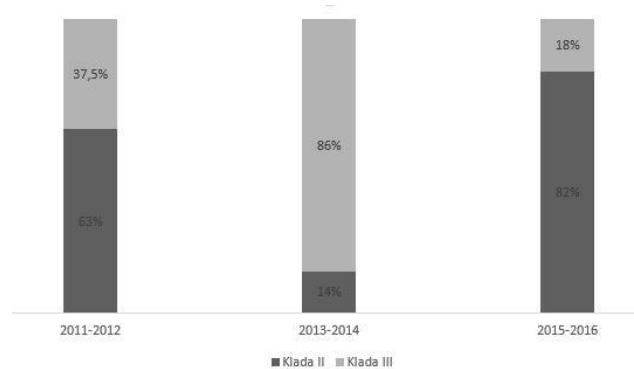
4.1.1 Filogenetska analiza sojeva HPIV1

HPIV1 detektiran je u DFA pozitivnim uzorcima pomoću RT-PCR-a za fragment gena HN. Fragment je dugačak 503 nukleotida, a odnosi se na pozicije 8125-8627 u referentnom genomu AF457102, te pripada izvanstaničnom dijelu proteina HN. Ovom metodom je ukupno analizirano 55 uzoraka HPIV1, koji su odabrani na temelju datuma prikupljanja, uvjeta čuvanja uzoraka i količini dostupnog uzorka, od kojih je 39 uzoraka bilo pozitivno (70,9%). Sekvence su prijavljene u bazu GenBank pod pristupnim brojevima KT33631-KT33652.

U filogenetsku analizu uključeno je 27 uzoraka koji su imali jedinstvenu sekvencu u analiziranom fragmentu, uz referentne sekvence gena HN koje su dostupne u banci gena GenBank. Ukupno je odabrana 21 referentna sekvenca iz različitih dijelova svijeta tijekom 49 godina. Iz odnosa na filogenetskom stablu (slika 14) jasno se raspoznaju 3 glavne skupine, koje odgovaraju kladama (monofiletska grupa virusa) detektiranim na temelju analize cijelih genoma HPIV1 (Beck i sur., 2012). Uzorci iz ove studije raspodijeljeni su u kladu II i kladu III, dok uzorci koji bi pripadali kladi I nisu detektirani. Iz topologije stabla vidljivo je da su uzorci HPIV1 iz ove studije srodni uzorcima s drugih geografskih lokacija, ali i da su uzorci koji pripadaju kladi III više različiti od uzoraka klade II, koji su se svi smjestili na istu granu stabla. Također, nije primijećena sličnost sa starijim uzorcima (U70936, AF457102 i U01074). Uočena je različita raspodjela klada ovisno o sezoni epidemije (slika 15).



Slika 14. Filogenetsko stablo fragmenta gena HN (pozicije 8125-8627 u referentnom genomu AF457102). Stablo je izrađeno metodom ML uz 1000 pseudoreplikacija, te supstitucijski model HKY+G, odabran na temelju kriterija BIC. Na čvorovima su prikazane samo vrijednosti više od 65%. Označena je pripadnost pojedinim kladama, a sojevi iz ove studije naznačeni su trokutićem. Uzorak HR_48.13(1768) identičan je uzorcima HR_44.13(1564) i HR_49.13(1794); uzorak HR_44.15(1669) uzorcima HR_48.15(1828), HR_33.15(1487), HR_48.15(1806), HR_49.15(1842) i HR_49.15(1839); HR_4.16(203) uzorku HR_1.16(30); HR_1.12(266) uzorku HR_3.12(1020); HR_42.11(16046) uzorcima HR_48.11(18494) i HR_51.11(19355).



Slika 15. Raspodjela analiziranih uzoraka HPIV1 u klade tijekom epidemioloških sezona.

4.1.2 Analiza gena za površinske glikoproteine i gena P

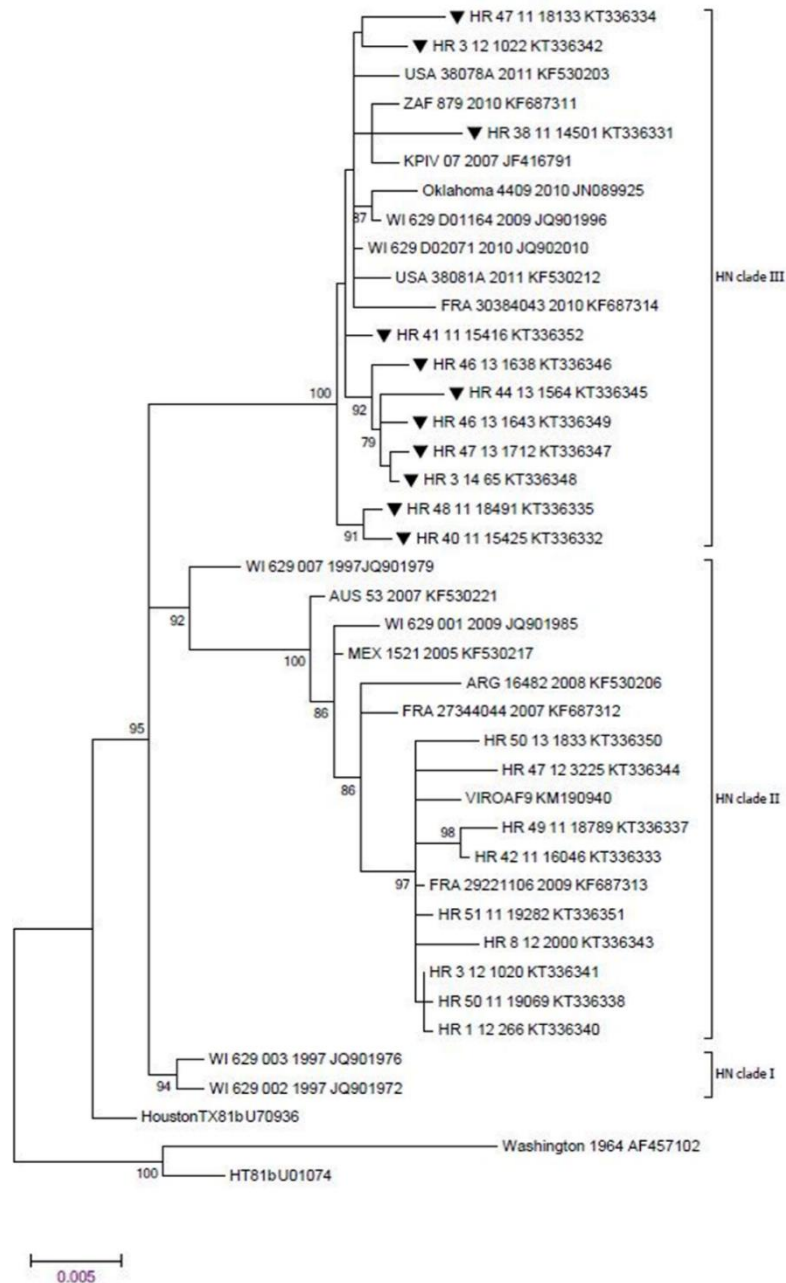
Za analizu raznolikosti gena odabrani su uzorci na temelju slike 14. Ukupno su odabrana 22 uzorka za sekvenciranje kompletnog gena HN (tablica 19). Filogenetskim analizama na temelju ovih gena potvrđena je topologija na temelju gena HN (slika 16). Od ovih uzoraka, kompletna sekvenca gena F dobivena je za 11 uzoraka, a za gen P za 12 uzoraka (tablica 19). Dva uzorka (KT992800 i KT992806) imala su produljenu 5' nekodirajuću regiju gena F za 6 nukleotida (AAAAGA); ova insercija pronađena je i u uzorcima HPIV1 dostupnim u bazi GenBank pod pristupnim brojevima JQ902004 i KF687314.

Tablica 19. Uzorci HPIV1 analizirani u ovoj studiji i njihovi pristupni brojevi u banci gena GenBank. x, nije analizirano.

Broj uzorka/klada	Soj virusa	GenBank pristupni broj		
		P gen	F gen	HN gen
1./III	HR/38.11(14501)	KU050084	KT992797	KT336331
2./III	HR/40.11(15425)	x	x	KT336332
3./II	HR/42.11(16046)	KU050085	KT992798	KT336333
4./III	HR/47.11(18133)	KU050086	KT992799	KT336334
5./III	HR/48.11(18491)	KU050087	KT992800	KT336335
6./II	HR/48.11(18494)	KU050088	x	KT336336
7./II	HR/49.11(18789)	x	x	KT336337
8./II	HR/50.11(19069)	x	x	KT336338
9./II	HR/51.11(19355)	KU050089	x	KT336339
10./II	HR/1.12(266)	x	x	KT336340
11./II	HR/3.12(1020)	x	x	KT336341
12./III	HR/3.12(1022)	x	KT992801	KT336342
13./II	HR/8.12(2000)	KU050090	KT992802	KT336343
14./II	HR/47.12(3225)	KU050091	KT992803	KT336344
15./III	HR/44.13(1564)	KU050092	KT992804	KT336345

Tablica 19. - nastavak

16./III	HR/46.13(1638)	KU050093	KT992805	KT336346
17./III	HR/47.13(1712)	KU050094	KT992806	KT336347
18./III	HR/3.14(65)	x	x	KT336348
19./III	HR/46.13(1643)	x	x	KT336349
20./II	HR/50.13(1833)	KU050095	KT992807	KT336350
21./II	HR/51.11(19282)	x	x	KT336351
22./III	HR/41.11(15416)	x	x	KT336352



Slika 16. Filogenetsko stablo cijelog gena HN. Stablo je izrađeno metodom ML uz 1000 pseudoreplikacija, te supsticijski model GTR+G, odabran na temelju kriterija AIC. Na čvorovima su prikazane samo vrijednosti više od 65%. Označena je pripadnost pojedinim kladama, a sojevi iz ove studije naznačeni su trokutićem.

4.1.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci

Genska raznolikost izražena je pomoću vrijednosti π koja označava prosječan broj nukleotidnih razlika po mjestu između dvije sekvence, te pomoću vrijednosti Ka/Ks . Vrijednosti su izračunate za kodirajuće i nekodirajuće regije sva 3 gena, te dodatno za gen C

koji je prisutan kao alternativni okvir čitanja gena P. Slična razina nukleotidne raznolikosti dobivena je za sve gene. Veće razlike su uočene kod izračuna Ka/Ks gdje se pokazalo da su promjene u kodirajućoj regiji gena F u većini sinonimnog tipa (tablica 20). U slučaju nekodirajućih regija, najraznolikije su bile 5' nekodirajuće regije gena F ($\pi=0,0544$) i HN ($\pi=0,0400$) (tablica 20).

Tablica 20. Genska raznolikost uzoraka HPIV1 analiziranih u ovoj studiji. ORF, otvoreni okvir čitanja; UTR, nekodirajuća regija; x, nije primjenjivo.

Regija	Ukupan broj supstitucija	Nukleotidna raznolikost (π)	Ka/Ks
P gen	132	0,0255	x
ORF P	114	0,0255	0,2143
ORF C	37	0,0219	0,1958
5' UTR P	9	0,0250	x
3' UTR P	9	0,0262	x
F gen	143	0,0236	x
ORF F	92	0,0186	0,0635
5' UTR F	45	0,0544	x
3' UTR F	6	0,0227	x
HN gen	160	0,0237	x
ORF HN	132	0,0215	0,2073
5'UTR HN	8	0,0400	x
3'UTR HN	20	0,0501	x

4.1.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci

Raznolikost aminokiselinske sekvence računata je na temelju sravnjenja proteinskih sekvenci u programu MEGA 6.0, kao broj potpuno očuvanih mjesta u odnosu na ukupan broj pozicija u sravnjenju. Najveća razina očuvanosti izračunata je za protein F (97,5%, 541/555), dok je protein P bio najvarijabilniji (91,4%, 519/568). Proteini C i HN imali su sličnu razinu očuvanosti: 190/204 (93,1%) za protein C i 536/575 (93,2%) u proteinu HN. Neke od

aminokiselinskih supstitucija razlikovale su kladu II i kladu III. Najviše takvih specifičnih supstitucija pronađeno je u proteinu HN gdje je čak 18 od 39 (46,1%) promjena razlikovalo ove klade.

Nadalje, izračunata je varijabilnost aminokiselinskih sekvenci u funkcionalnim regijama ovih proteina, koja je izražena kao omjer broja razlika u odnosu na duljinu regije (tablica 21). Funkcionalne regije proteina P uključuju N-proksimalnu i C-terminalnu domenu (Lamb i Parks, 2013), dok je za protein HN identificirano ukupno 7 funkcionalnih regija (Beck i sur., 2012; Henrickson i Savatski, 1997). Za protein F domene nisu poznate, te su određene pomoću programa Phobius usporedbom s poznatim funkcionalnim domenama Sendai virusa, mišjim virusom parainfluence koji je antigenski srodan virusu HPIV1 (Fouillot-Coriou i Roux, 2000). Predviđene funkcionalne domene i varijabilnost prikazana je u tablici 21. Obje domene proteina P imale su sličnu razinu očuvanosti aminokiselinske sekvence, a kod proteina HN je najvarijabilnija bila citoplazmatska domena. Za signalni peptid proteina F je izračunata najveća razina varijabilnosti, dok su preostale domene proteina F bile visoko očuvane (tablica 21).

Tablica 21. Aminokiselinske razlike u funkcionalnim regijama analiziranih proteina. HRR, regija sedmerostrukog ponavljanja (eng. *heptad repeat region*).

Protein	Ime regije (pozicija)	Duljina regije	Broj razlika	Broj razlika/duljina regije
P	N-proksimalna (1-324)	324	43	0,132
	C-terminalna (325-568)	244	6	0,024
F	F2, signalni peptid (1-22)	22	3	0,136
	F2, ektodomena (23-106)	84	1	0,011
	Mjesto cijepanja (107-112)	6	0	0
	F1, fuzijski peptid (113-138)	26	0	0
	F1, HRR 2 (139-497)	359	6	0,016
	F1, transmembranska regija (498-519)	22	2	0,090
	F1, citoplazmatska domena (520-555)	36	2	0,055

Tablica 21. - nastavak

HN	Citoplazmatska domena (1-35)	35	9	0,257
	Transmembranska regija (36-60)	25	4	0,160
	Regija drška (61-191)	131	6	0,045
	Regija visoke strukturne homologije I (192-341)	150	5	0,033
	Nestrukturna regija (342-457)	116	10	0,086
	Regija visoke strukturne homologije II (458-504)	47	1	0,021
	C-terminalna regija (505-575)	71	5	0,070

Potencijalna mjesta glikozilacije predviđena su *in silico* za površinske proteine HPIV1, protein F i HN. S obzirom da takvi podaci nisu prethodno opisani u literaturi, za analizu su uključene i sekvence proteina F koje su bile dostupne u banci GenBank do prosinca 2015. godine. Ukupno je uključeno 55 javno dostupnih sekvenci proteina F, dok su za analizu glikozilacije proteina HN uključene referentne sekvence prikazane na slici 14.

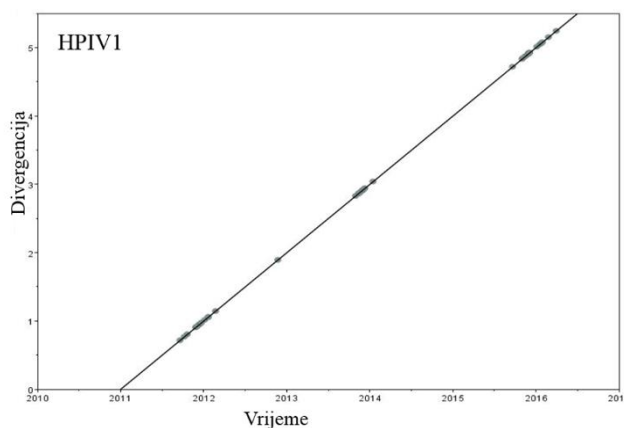
Pet potencijalnih N-glikoziliranih mjesta bilo je očuvano u svim proteinima F, na pozicijama 100, 241, 529, 532 i 552. U proteinu HN predviđeno je ukupno 7 očuvanih mjesta N-glikozilacije na pozicijama 19, 77, 173, 277, 361, 449 i 551. S obzirom da aminokiseline na pozicijama 1-60 pripadaju citoplazmatskoj i transmembranskoj domeni, nije za očekivati da je pozicija 19 zaista glikozilirana. Primijećen je različit uzorak glikozilacije ovisno o pripadnosti pojedinoj kladi: klada II sadrži samo prethodno navedena potpuno očuvana mjesta glikozilacije, a u kladi III postoje još dva dodatna mjesta glikozilacije (pozicije 448 i 511).

Analizom O-glikozilacije proteina F predviđena je ekstenzivna glikozilacija u ukupno 6 regija ovog proteina: prvi dio 102 i 105; drugi dio 207, 211 i 215; treći dio 223/399 i 409; četvrti dio 453; peti dio 485 i šesti dio na poziciji 495. Samo je uzorak HR/8.12(2000) imao glikozilirana sva ova mjesta, dok je za druge uzorke predviđeno puno manje glikoziliranih pozicija.

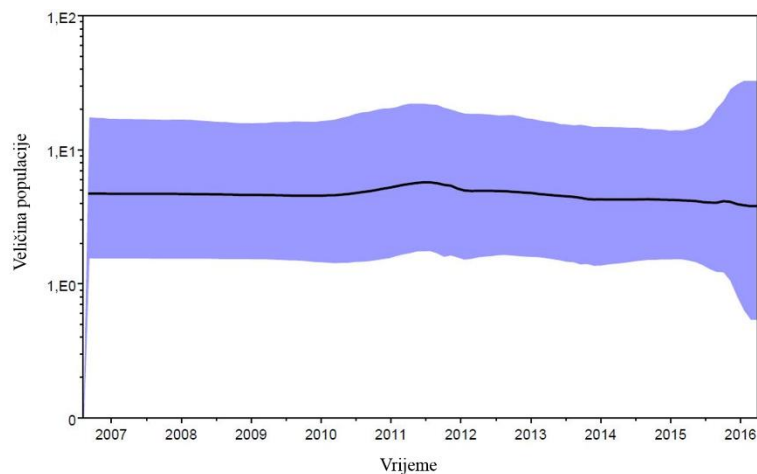
Kod proteina HN identificirano je pet regija koje su potencijalno O-glikozilirane: prvi dio 72, 74, 75 i 79; drugi dio 181, 184, 187; treći dio 272; četvrti 493-495 i 500-501 i peti dio na poziciji 511. U kladi II postojalo je jedinstveno mjesto glikozilacije na poziciji 511, dok su specifična mjesta glikozilacije za kladu III uključivala pozicije 72 i 494.

4.1.3 Dinamika populacije

U filodinamičku analizu uključeno je 39 uzoraka kojima je određen fragment gena HN. Sekvence su podvrgnute testiranju vremenskog signala pomoću programa TempEST. Ovom analizom dobivena je pozitivna korelacija između vremenskog intervala i genskih promjena (slika 17), tj. sekvence su bile dovoljno divergentne za daljnju analizu pomoću programa BEAST 1.8.2. Stopa supstitucije i TMRCA određeni su pod pretpostavkom striktnog molekularnog sata, a za procjenu genske raznolikosti populacije tijekom vremena korištena je metoda Bayesian skyline plot u programu Beast verzija 1.8.2. Stopa supstitucije iznosila je $2,39 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $1,27 \times 10^{-3}$ - $3,61 \times 10^{-3}$), dok je TMRCA ovih uzoraka procijenjeno u drugoj polovici 1999. godine (95%-tni HPD 1991 - 2006). Virusna populacija bila je konstantne veličine tijekom cijelog proučavanog intervala, osim manjih fluktuacija koje su primijećene u drugoj polovici 2011. godine (slika 18).



Slika 17. Regresija genskih udaljenosti (od korijena stabla do svih završetaka) u odnosu na vrijeme uzorkovanja za 39 uzoraka kojima je određena sekvenca fragmenta gena HN.



Slika 18. Demografska povijest HPIV1 prikazana pomoću metode Bayesian skyline plot. Analiza se temelji na fragmentu gena HN duljine 503 nukleotida. Crna crta predstavlja srednju vrijednost, a plava površina označava 95%-tni HPD. Analiza je provedena tijekom 15×10^6 MCMC koraka, te striktnim molekularnim satom.

4.2 Molekularna epidemiologija HPIV2

Tijekom 5 uzastopnih godina (siječanj, 2011. – prosinac, 2015.) u testu DFA sa specifičnim monoklonskim protutijelom na HPIV2 bilo je pozitivno ukupno 26 uzoraka. Za dobivanje zadovoljavajuće količine virusnog materijala za daljnje analize, virus je izoliran na stanicama Vero. Od 26 uzoraka, iz 8 uzoraka se nije uspio uzgojiti virus, stoga je u daljnje molekularne analize uključeno 18 uzoraka (tablica 22). U većini slučajeva je HPIV2 detektiran u jesen (15 od 18 slučajeva, 83,3%), te je manjina uzoraka sakupljena tijekom ljetnih mjeseci (3 od 18, 16,7%). Niti jedan uzorak nije sakupljen tijekom zime ili proljeća. Najveći broj uzoraka odnosi se na djecu do 2 godine starosti (72,2%), zatim slijedi dobna skupina od 2. do 5. godine s 2 slučaja (11,1%), te preostalih 3 pacijenata pripada dobnoj skupini starijih od 5 godina (16,7%). Većina bolesnika u kojima je detektiran HPIV2 imala je infekciju gornjih dišnih puteva (tablica 22).

Tablica 22. Popis izolata HPIV2 analiziranih u ovoj studiji. IGDP, infekcija gornjih dišnih puteva.

Ime izolata ^a	Datum prikupljanja	Dijagnoza
HPIV2i/Zagreb.HR/47.11(16406)	28.10.2011.	Krup
HPIV2i/Zagreb.HR/47.11(16475)	30.10.2011.	Pneumonija
HPIV2i/Zagreb.HR/49.11(16967)	09.11.2011.	Nepoznato
HPIV2i/Zagreb.HR/49.11(16971)	09.11.2011.	IGDP
HPIV2i/Zagreb.HR/49.11(17034)	12.11.2011.	IGDP
HPIV2i/Zagreb.HR/28.12(2706)	27.06.2012.	Krup
HPIV2i/Zagreb.HR/29.12(2725)	04.07.2012.	IGDP
HPIV2i/Zagreb.HR/38.12(2858)	03.09.2012.	Bronhiolitis
HPIV2i/Zagreb.HR/41.12(2950)	27.09.2012.	Krup
HPIV2i/Zagreb.HR/42.12(2995)	05.10.2012.	IGDP
HPIV2i/Zagreb.HR/44.12(3036)	15.10.2012.	Krup
HPIV2i/Zagreb.HR/50.12(3257)	29.11.2012.	Bronhiolitis
HPIV2i/Zagreb.HR/50.12(3263)	29.11.2012.	IGDP
HPIV2i/Zagreb.HR/51.12(3316)	06.12.2012.	IGDP
HPIV2i/Zagreb.HR/42.14(1472)	20.10.2014.	IGDP
HPIV2i/Zagreb.HR/47.14(1688)	22.11.2014.	Pneumonija
HPIV2i/Zagreb.HR/47.15(1779)	22.11.2015.	Pneumonija
HPIV2i/Zagreb.HR/49.15(1849)	02.12.2015.	IGDP

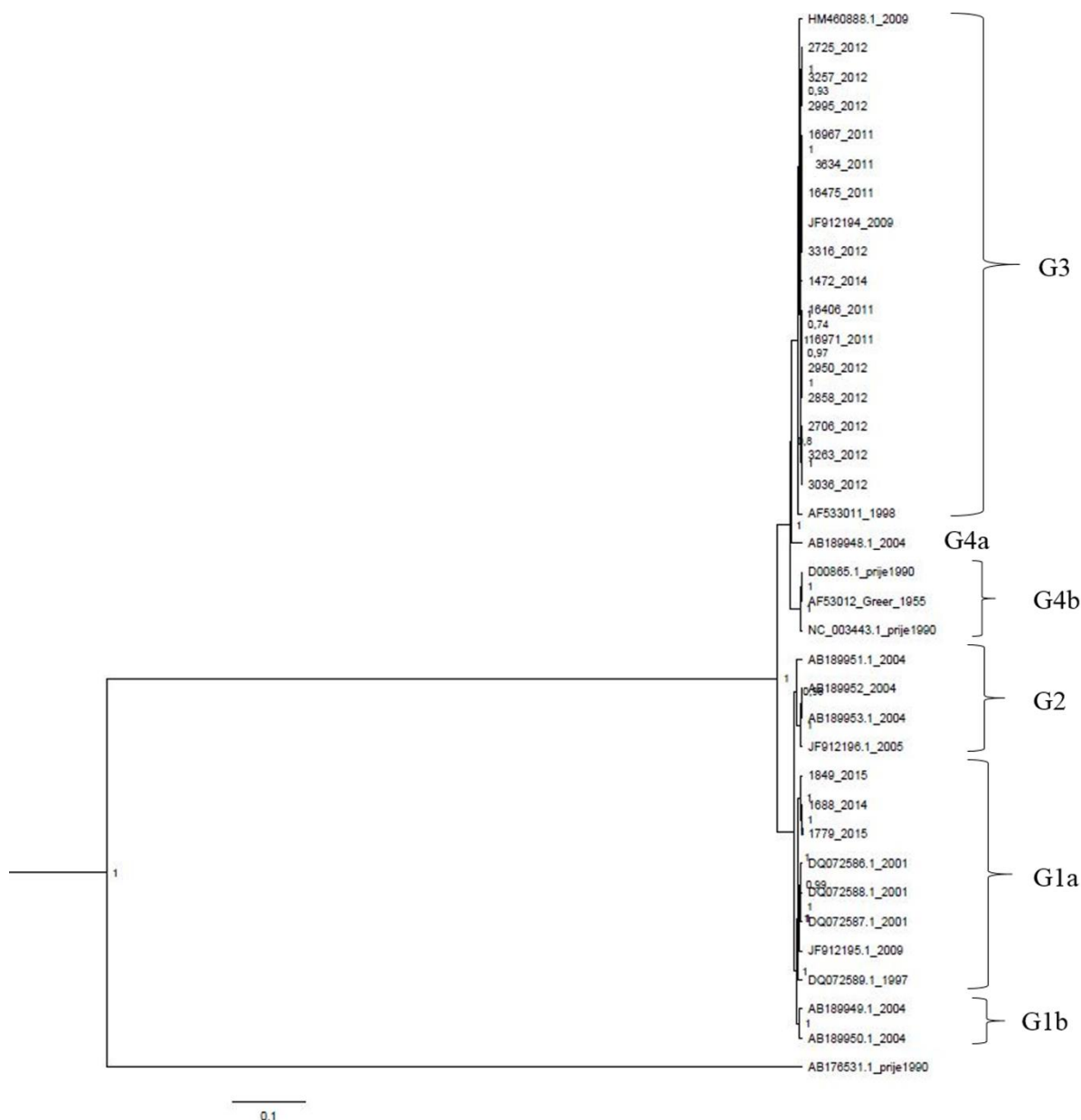
^abroj izolata dan je u zagradi.

4.2.1 Filogenetska analiza sojeva HPIV2

Izoliranim uzorcima određena je sekvenca gena F i HN, te su se filogenetske analize temeljile na kodirajućim regijama ovih gena. Uzorci su prijavljeni u bazu GenBank pod pristupnim brojevima KT315655- KT315667 i MF16350- MF16351.

Za filogenetsku analizu gena HN uključeno je 18 uzoraka iz ove studije, te sve referentne sekvence gena HN iz banke GenBank do kraja 2015. godine, njih ukupno 19 (slika 19). U prethodnim studijama (Almajhdi i sur., 2012; Terrier i sur., 2008) termini klaster i podklaster korišteni su u svrhu definiranja grupa uočenih filogenetskom analizom sojeva HPIV2, te je u ovoj studiji preuzeta ta terminologija. Iz topologije stabla razlikuju se jasno sva

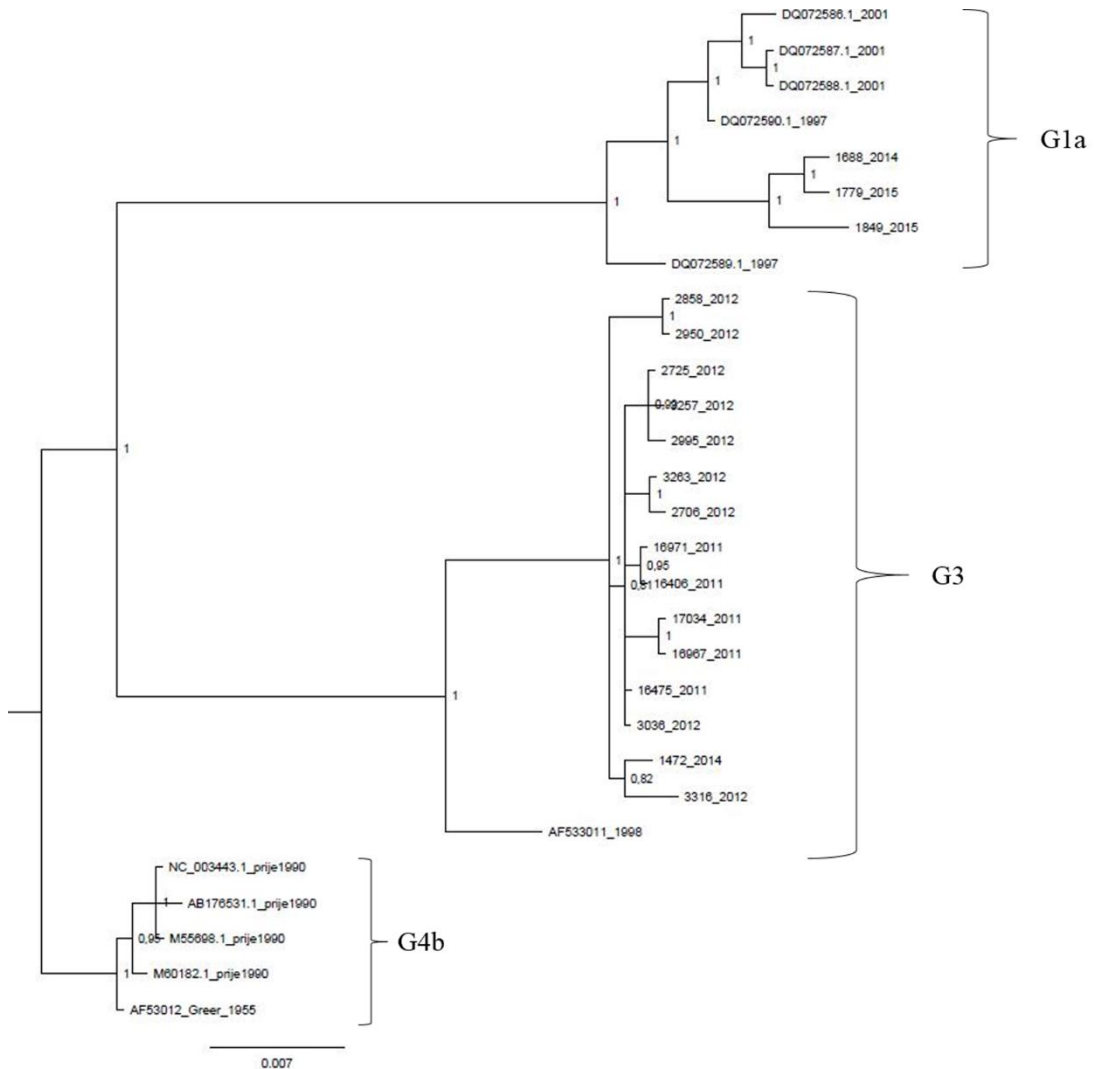
4 klastera, s dodatnim podklasterima. Većina sojeva iz ove studije pripada klasteru G3 (slika 19), u kojemu se nalaze sojevi iz Saudijske Arabije (HM460888) i Oklahome (JF912194), oba izolirana 2009. godine, ali i soj AF533011 izoliran 1998. godine u Sjedinjenim Američkim Državama. U klaster G1a pripadaju 3 soja izolirana u ovoj studiji (slika 19), zajedno s francuskim sojevima i sojem iz Oklahome, izoliranim 2009. godine. Sojevi ovog klastera izolirani su 2014. i 2015. godine, a od sojeva G3 klastera razlikovali su se 6,29-6,35% na nukleotidnoj razini.



Slika 19. Filogenetsko stablo gena HN HPIV2 koje uključuje 19 referentnih uzorka i 18 sojeva detektiranih u ovoj studiji. Stablo je izrađeno u programu MrBayes verzija 3.2, uz supstitucijski model HKY+I, odabran na temelju kriterija BIC. Na čvorovima su prikazane samo posteriorne vrijednosti više od 0,6. Označena je pripadnost pojedinim klasterima, sojevi iz ove studije naznačeni su brojem izolata, a sojevi iz banke gena GenBank označeni su pristupnim brojevima. Dodatno su naznačene godine izolacije.

U filogenetsku analizu gena F uključeno je 18 uzoraka iz ove studije, te sve referentne sekvence gena F iz banke GenBank do kraja 2015. godine (slika 20). U slučaju rekonstrukcije filogenetskog stabla pomoću kodirajućih sekvenci gena F u banci gena GenBank ne postoje

klasteri G2 i podklasteri G1b i G4a. Kao i u slučaju analize na temelju gena HN, uzorci iz ove studije pripadaju u dva klastera, G3 i G1a. Na razini nukleotidne sekvence sojevi klastera G1a razlikovali su se od ostalih sojeva 7,3-7,8%.



Slika 20. Filogenetsko stablo gena F HPIV2 koje uključuje 11 referentnih uzorka i 18 sojeva detektiranih u ovoj studiji. Stablo je izrađeno u programu MrBayes verzija 3.2, uz supstitucijski model GTR+G, odabran na temelju kriterija AICc. Na čvorovima su prikazane samo posteriorne vrijednosti više od 0,6. Označena je pripadnost pojedinim klasterima, sojevi iz ove studije naznačeni su brojem izolata, a sojevi iz banke gena GenBank označeni su pristupnim brojevima. Dodatno su naznačene godine izolacije.

4.2.2 Analiza površinskih glikoproteina

U daljnje analize uključeno je svih 18 sekvenci gena HN i F određenih u ovoj studiji, u svrhu određivanja nukleotidne i aminokiselinske raznolikosti među sojevima, kao i očuvanosti aminokiselinskih pozicija u poznatim funkcionalnim domenama proteina.

4.2.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci

Na nukleotidnoj razini gena HN sojevi iz ove studije bili su očuvani u 1556 pozicija od 1716, odnosno razina očuvanosti za sve sojeve je iznosila 90,7%. Tri soja koja pripadaju klasteru G1a na nukleotidnoj razini su se razlikovali u samo 1,4%. Identičnu kodirajuću sekvencu imali su sojevi 2995 i 3257, te 17034 i 16967. Prosječna nekorigirana p-vrijednost iznosila je 0,025, dok je prosječna korigirana p-vrijednost između ova dva klastera iznosila 0,077 (standardna pogreška 0,006), a najudaljeniji sojevi bili su sojevi 2995 i sojevi istovjetne sekvence 3257 koji pripada u G3 klaster i soj 1688 koji pripada u G1a klaster, s p-vrijednošću 0,080.

Na nukleotidnoj razini gena F sojevi iz ove studije bili su očuvani u 1524 pozicija od 1656, s razinom očuvanosti sličnoj kao za gen HN (92%). Tri soja koja pripadaju klasteru G1a na nukleotidnoj razini su se razlikovali u samo 0,9%. Identičnu kodirajuću sekvencu imali su sojevi 2950 i 2858, 17034 i 16967, te 16475 i 3036. Prosječna nekorigirana p-vrijednost iznosila je 0,021, dok je prosječna korigirana p-vrijednost između ova dva klastera iznosila 0,065 (standardna pogreška 0,006). Najudaljeniji sojevi bili su sojevi 1849 koji pripadaju u klaster G3 i soj 3316 (G1a klaster), s p-vrijednošću 0,067.

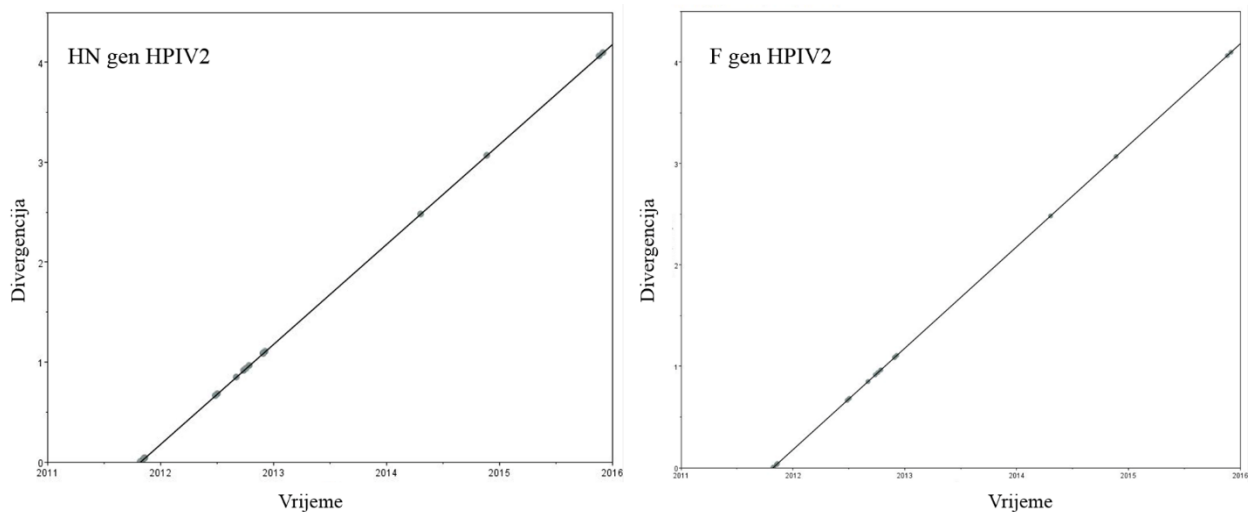
4.2.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci

Proteini HN uzoraka iz ove studije bili su vrlo očuvani na razini proteinske sekvence, s aminokiselinskom očuvanosti od 93,5%. Ukupno je bilo 10 jedinstvenih sekvenci proteina HN; uzorci klastera G1a su svi bili različitih sekvenci, a među klasterima je bilo čak 22 aminokiselinskih razlika. Domene koje su bitne za neuraminidaznu aktivnost proteina HN (uključuju pozicije 168-RIPS-171, 228-NRKSCS-233, 393-GAEGR-397 i 502-RXNPT-506) (Iorio i sur., 1991; Iorio i sur., 1989; Jorgensen i sur., 1987) očuvane su u svim analiziranim uzorcima. Pokazano je da su aminokiseline na pozicijama 83 i 186, koje čine dio epitopa identificiranih unutar regija 83-91 i 150-186 (Tsurudome i sur., 1989), odgovorne za smanjenu fuziju sa ciljnim stanicama (Yuasa i sur., 1995). Ove pozicije bile su očuvane u svim sojevima.

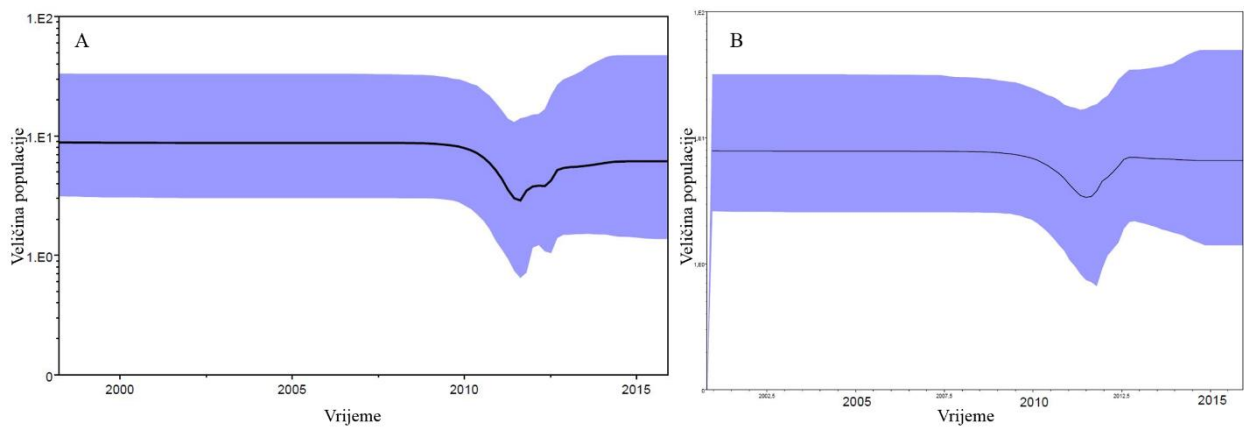
Predviđena mjesta N-glikozilacije bila su očuvana u gotovo svim sojevima; ukupno je bilo predviđeno 8 potencijalnih mjesta glikozilacije za sojeve klastera G3 (pozicije 6, 272, 284, 335, 341, 454, 501 i 517). Iznimka je soj 1472 koji je imao dodatno mjesto glikozilacije na poziciji 115. Za sojeve klastera G1a predviđen je jednak obrazac N-glikozilacije, osim što su svi ovi sojevi imali dodatno mjesto N-glikozilacije na poziciji 316, što ih je razlikovalo od sojeva grupe G3. Analizom selektivnog pritiska, ovo je mjesto identificirano kao pozitivno selektirano pomoću 3 različite metode, što potvrđuje značaj ove supstitucije. Analizom potencijalne O-glikozilacije potvrđen je različit obrazac glikozilacije između ova dva klastera. U klasteru G3 svi sojevi imali su 5 potencijalnih mjesta O-glikozilacije (pozicije 325, 326, 332, 343 i 442), dok su sojevi G1a imali samo 3 predviđena mjesta O-glikozilacije: pozicije 325, 326 i 442 kod sojeva iz 2015. godine (1849 i 1779), te 326, 351 i 442 kod soja 1688.

Za proteine F uzoraka iz ove studije izračunata je još viša razina aminokiselinske očuvanosti (95,7%). Ukupno je bilo 11 jedinstvenih sekvenci proteina F; u uzorcima klastera G1a identičnu sekvencu imali su sojevi 1688 i 1779. Unatoč višoj razini očuvanosti proteina F, pronađeno je 12 aminokiselinskih razlika među dva klastera. Mjesto cijepanja neaktivne forme proteina F uključuje sekvencu 103-RQERFA-108, te promjene u ovoj regiji mogu utjecati na proteolitičko cijepanje kojim nastaje aktivna forma proteina F (Bando i sur., 1991). Svi sojevi G3 klastera na poziciji 104 imaju glutamin, dok je kod sojeva klastera G1a na toj poziciji došlo do supstitucije u arginin (slika 21). Le Bayon i sur. (2013) pokazali su da treonin na poziciji 96 pojačava fuziju, u usporedbi s alaninom. Svi analizirani sojevi imali su alanin na ovoj poziciji.

slijedio ponovni porast veličine populacije. Nakon tog vremena rezultati su pokazali konstantnu veličinu populacije (slika 23).



Slika 22. Regresija genskih udaljenosti (od korijena stabla do svih završetaka) u odnosu na vrijeme uzorkovanja za gene HN i F uzoraka HPIV2.

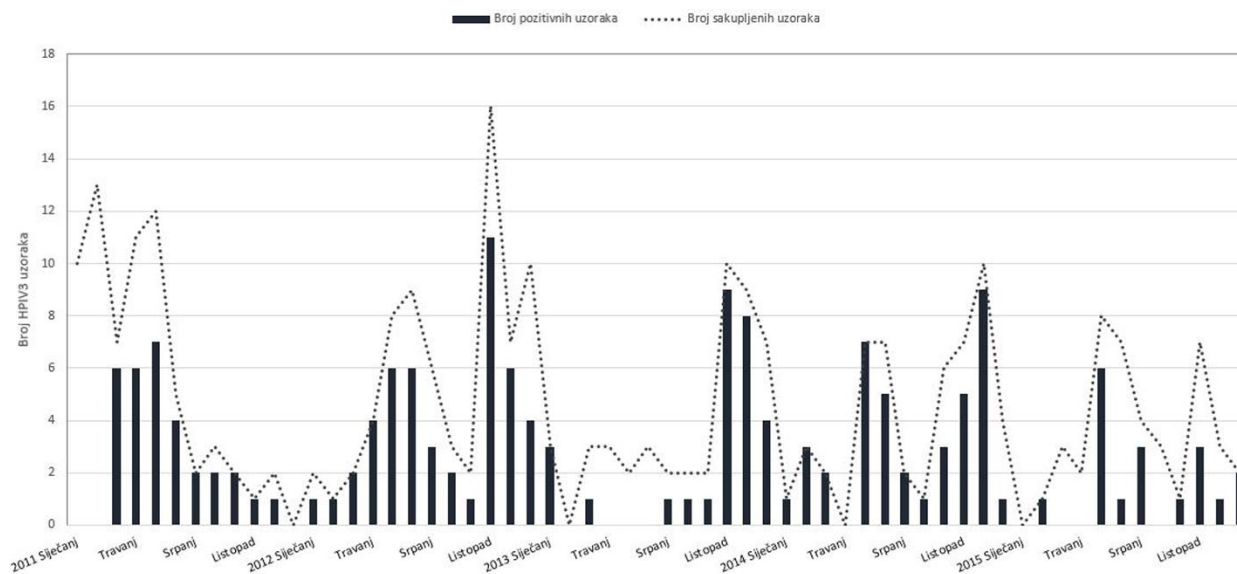


Slika 23. Demografska povijest uzoraka HPIV2 prikazana pomoću metode Bayesian skyline plota koji je izrađen analizom gena HN (a) i gena F (b). Crna crta predstavlja srednju vrijednost, a plava površina označava 95%-tni HPD. U slučaju gena HN je analiza provođena tijekom 30×10^6 MCMC koraka, a za gen F 60×10^6 , te striktnim molekularnim satom.

4.3 Molekularna epidemiologija HPIV3

U ovu studiju uključeno je ukupno 275 kliničkih uzoraka koji su u testu DFA sa specifičnim monoklonskim protutijelom bili pozitivni na HPIV3. Uzorci su sakupljeni tijekom

5 uzastopnih godina, od siječnja 2011. do prosinca 2015. godine. Tijekom ovog perioda, infekcije ovim virusom javljale su se tijekom cijele godine, s vrhuncem epidemije u kasno proljeće (svibanj) i jesen (listopad) (slika 24). U 2012., 2014. i 2015. godini uočene su obje epidemiološke sezone tijekom godine, dok je u 2011. uočena samo proljetna sezona, a u 2013. godini jesenska.



Slika 24. Mjesečna raspodjela analiziranih uzoraka HPIV3 sakupljenih od siječnja 2011. godine do prosinca 2015. godine.

Najčešća klinička dijagnoza pacijenata kojima je detektiran HPIV3 bila je infekcija gornjih dišnih puteva, u ukupno 59,6% slučajeva, zatim slijedi bronhiolitis, dijagnosticiran u 13,8% slučajeva, upala pluća u 12,4% slučajeva, u 8% slučajeva dijagnosticiran je laringitis, te za preostalih 6,2% uzoraka dijagnoza nije poznata. Najveći broj uzoraka odnosi se na djecu do 2 godine starosti (79,3%), zatim slijedi dobna skupina od 2. do 5. godine s 14,9% infekcija virusom HPIV3, te preostalih 5,8% uzoraka pripada dobnoj skupini starijih od 5 godina.

4.3.1 Filogenetska analiza sojeva HPIV3

HPIV3 detektiran je u DFA pozitivnim uzorcima pomoću RT-PCR-a za fragment gena HN, dugačak 582 nukleotida, a odnosi se na pozicije 7494-8697 u referentnom genomu EU424062. Za analizu je odabrano 166 uzoraka na temelju datuma prikupljanja i količine dostupnog uzorka, od kojih je 152 uzorka bilo pozitivno (91,6%). Od ukupno 141 uzorka za

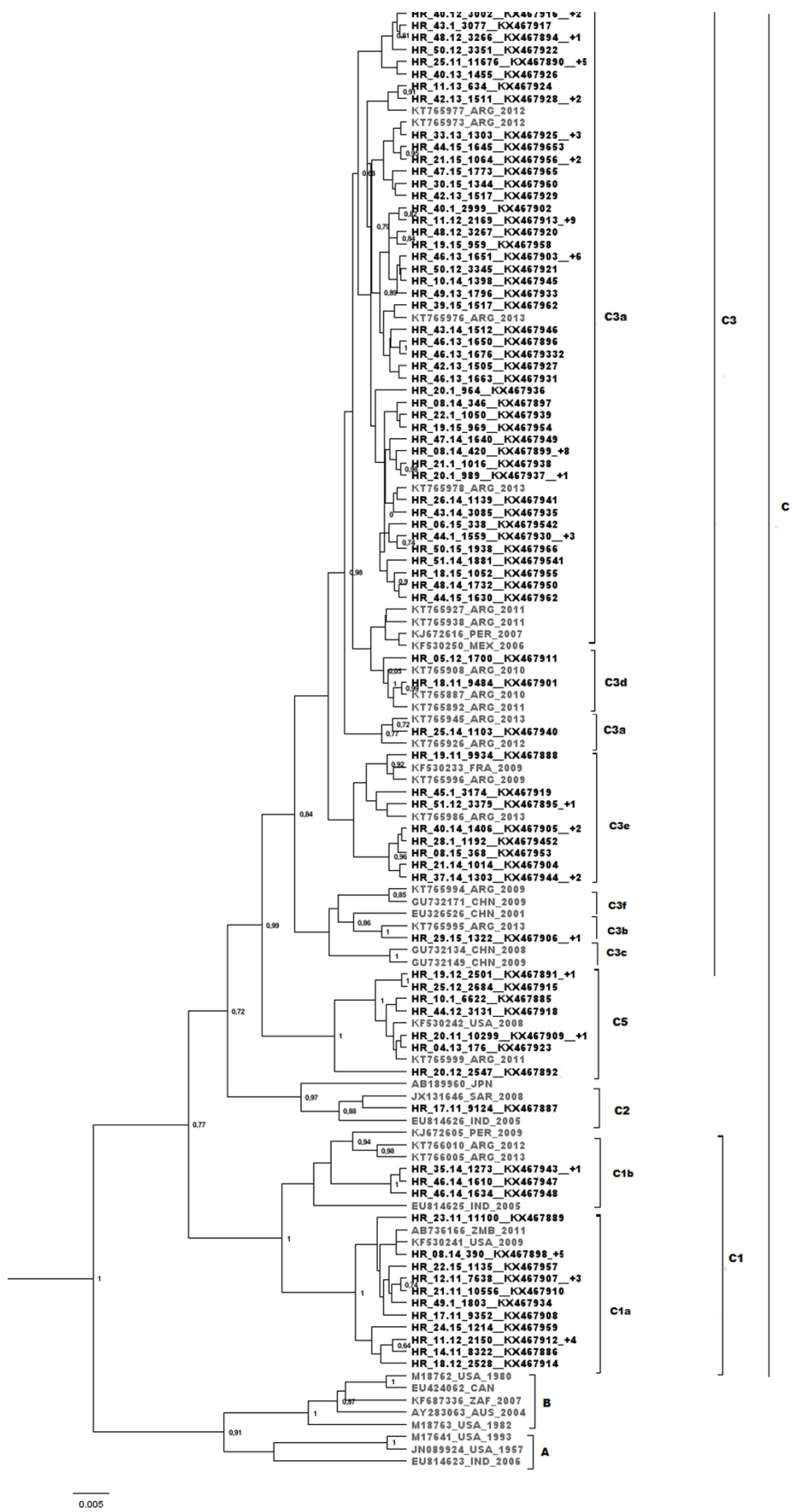
koje je bilo moguće dobiti kompletnu sekvencu fragmenta, čak 79 sekvenci je bilo jedinstvenog slijeda što ukazuje na visoku raznolikost. Sekvence fragmenta HN su prijavljene u bazu GenBank pod pristupnim brojevima KX467885-KX467966.

U filogenetsku analizu uključena su 42 referentna genoma poznatih genotipova (Almajhdi, 2015; Goya i sur., 2016b; Mao i sur., 2012) i 79 jedinstvenih sekvenci detektiranih u ovoj studiji (slika 25). Topologija stabla i izračunate genske udaljenosti bili su u skladu sa referentnom topologijom što se tiče podjele u klasteru i podklasteru, unatoč tome što je u ovoj analizi korišten kraći fragment gena HN (slika 25, tablica 23 i 24).

Svi uzorci iz ove studije pripadali su klasteru C, a većina uzoraka pripadala je podklasteru C3 (tablica 23). Podklasteri C1 i C3 detektirani su tijekom svih 5 godina, dok je jedan uzorak iz podklastera C2 detektiran samo 2011. godine (tablica 23). Također je uočena tendencija dominiranja C3 podklastera s početkom u 2012. godini kada je 59% uzoraka pripadalo ovom podklasteru, te više od 80% uzoraka u 2015. godini.

Tablica 23. Raspodjela HPIV3 analiziranih uzoraka na temelju filogenetske analize i izračuna genskih udaljenosti. x, nije detektirano.

Godina	2011	2012	2013	2014	2015	Ukupno
Podklaster						
C1	8	12	2	1	4	27
C2	1	x	X	x	x	1
C3	7	26	21	32	18	104
C5	2	6	X	1	x	9
Ukupno	18	44	23	34	22	141



Slika 25. Filogenetsko stablo fragmenta gena HN duljine 582 nukleotida uzoraka HPIV3.

Slika 25. (nastavak) Stablo uključuje 42 referentna uzorka i 79 sojeva detektiranih u ovoj studiji, a izrađeno je metodom po Bayesu, uz supstitucijski model TN93+G, odabran na temelju kriterija BIC. Na čvorovima su prikazane samo posteriorne vrijednosti više od 0,6. Označena je pripadnost pojedinim klasterima, sojevi iz ove studije otisnuti su crnom bojom te je naznačen broj uzoraka s istom sekvencom u fragmentu gena HN. Sivom bojom naznačene su referentne sekvence.

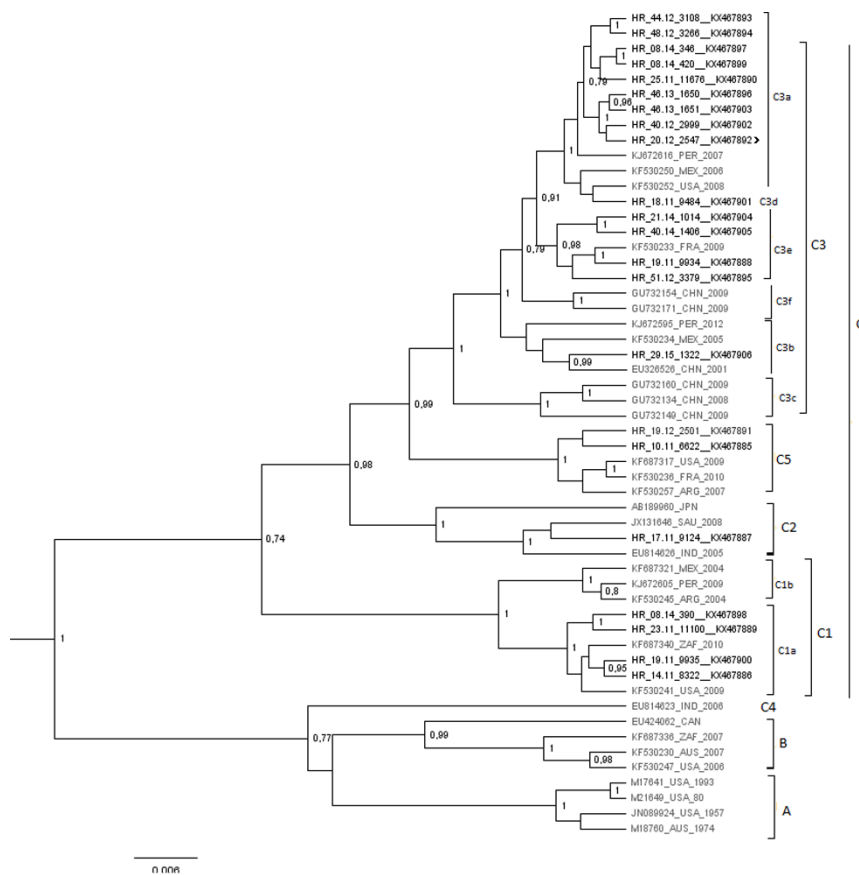
U podklasterima C1 i C3 uočeno je odvajanje nekih uzoraka u zasebne grane, odnosno genske loze. Kako bi se potvrdila ta pretpostavka, izračunate genske udaljenosti uspoređene su s prethodno objavljenim kriterijima za definiranje genskih loza, u kojima je definirano da rang p-vrijednosti za gensku lozu iznosi između 0,010 i 0,019 (Goya i sur., 2016a). Na temelju ovih rezultata, podklasteri su dodatno podijeljeni u C1a, C1b, C3a, C3b, C3d i C3e genske loze (slika 25, tablica 24).

Tablica 24. Nekorigirane udvojene genske udaljenosti (p) između genskih loza podklastera C1 i C3 izračunate korištenjem fragmenta gena HN dugačkog 582 nukleotida.

	C1a	C1b				
C1a	0,008					
C1b	0,021	0,008				
	C3a	C3b	C3c	C3d	C3e	C3f
C3a	0,007					
C3b	0,019	0,010				
C3c	0,016	0,013	0,003			
C3d	0,010	0,018	0,014	0,007		
C3e	0,011	0,015	0,013	0,011	0,007	
C3f	0,011	0,011	0,008	0,010	0,007	0

4.3.2 Analiza površinskih glikoproteina

U svrhu potvrde ovih rezultata, odabrano je 22 uzorka s obzirom na njihov razmještaj na filogenetskom stablu (slika 25), te je tim uzorcima određena sekvenca cijelog HN gena. Za izradu filogenetskog stabla korišten je kodirajući dio gena HN (1716 nukleotida), te 32 referentne sekvence (slika 26). Topologija stabla odgovarala je stablu konstruiranom pomoću fragmenta gena HN, osim u slučaju jednog uzorka (HR/20.12(2547)) koji je na temelju cijelog gena HN svrstan u C3a, a na temelju fragmenta gena HN u podklaster C5.



Slika 26. Filogenetsko stablo kodirajuće regije HN gena koje uključuje 32 referentna uzorka i 22 sojeva detektiranih u ovoj studiji. Stablo je izrađeno metodom po Bayesu, uz supstitucijski model GTR+I+G, odabran na temelju kriterija BIC. Na čvorovima su prikazane samo vrijednosti više od 0,6. Označena je pripadnost pojedinim kladama, sojevi iz ove studije prikazani su crnom bojom, a sivom bojom naznačene su referentne sekvence.

4.3.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci

Za daljnje analize određena je sekvenca gena F za ista 22 uzorka kojima je u prethodnom koraku određena sekvenca gena HN. Oba fragmenta spojena su u jedan dugački fragment od ukupno 3748 nukleotida (pristupni brojevi u GenBank bazi KX467885-KX467906), s obzirom da im je isti razmještaj u genomu HPIV3 te su nukleotidne razlike računane za specifične regije (tablica 25). Najvarijabilnija regija bila je 3' nekodirajuća regija F gena ($\pi=0,070$), a najviša razina očuvanosti izračunata je za 5' nekodirajuću regiju ovog gena ($\pi=0,016$) (tablica 25). Sve 3 intergenske regije su bile potpuno očuvane (tablica 25).

4.3.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci

Sličan omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija izračunat je za oba gena (tablica 25), što je reflektirano u sličnoj razini očuvanosti na razini aminokiselinske sekvence: 94,4% u proteinu F i 94,8% u proteinu HN (tablica 25).

Tablica 25. Genska raznolikost glikoproteina F i HN uzoraka HPIV3 analiziranih u ovoj studiji. ORF, otvoreni okvir čitanja, UTR, nekodirajuća regija, x, nije primjenjivo. Pozicije za pojedine regije definirane su u odnosu na F-HN fragment duljine 3748 nukleotida.

	Regija (pozicija)	Duljina regije	Broj polimorfnih mjesta (S)	Nukleotidna raznolikost (π)	Ka/Ks omjer	Aminokiselinska očuvanost (%)
	M-F intergenska regija (1-3)	3	0	0,000	x	x
Gen F	3' UTR F (4-196)	193	53	0,070	x	x
	F ORF (197-1816)	1620	181	0,024	0,055	94,44
	5' UTR F (1817-1854)	38	5	0,016	x	x
	F-HN intergenska regija (1855-1857)	3	0	0,000	x	x
Gen HN	3' UTR HN (1858-1930)	73	16	0,032	x	x
	HN ORF (1931–3649)	1729	189	0,023	0,043	94,76
	5' UTR HN (3650–3745)	96	17	0,028	x	x
	HN-L intergenska regija (3746-3748)	3	0	0,000	x	x

Nadalje su analizirana svojstva ovih glikoproteina, poput N-glikozilacije, prisutnosti cisteinskih ostataka i disulfidnih mostova, te antigenska mjesta, za što je dodatno uključeno 27

sekvenci proteina F dostupnih u bazi GenBank i 50 sekvenci gena HN, uz sve sekvence određene u ovoj studiji. Sekvence gena F iz baze obuhvaćale su period od 1980. godine do 2014., a gen HN period od 1957. godine do 2014. Prethodno definirana mjesta N-glikozilacije proteina HN (van Wyke Coelingh i sur., 1987) bila su očuvana u svim uzorcima, osim što su kod dva uzorka pronađena dodatna mjesta na pozicijama 441 (uzorak HR19.12(2501)) i 30 (uzorak HR44.12(3108)). Također je pokazano da je svih 14 cisteinskih ostataka (Lawrence i sur., 2004) u proteinu HN bilo očuvano, osim u slučaju uzorka izoliranog 2005. godine u Indiji (EU814626), gdje je na pozicijama 363 i 571 pristuan serin. Prethodno definirana mjesta N-glikozilacije proteina F (van Wyke Coelingh i sur., 1987) bila su očuvana u svim analiziranim uzorcima. Očuvanost cisteinskih ostataka pokazana je i na primjeru proteina F, gdje je svih 11 cisteinskih ostataka (van Wyke Coelingh i Tierney, 1989) bilo očuvano, osim za uzorak HR/17.11(9124) koji je na poziciji 18 imao serin.

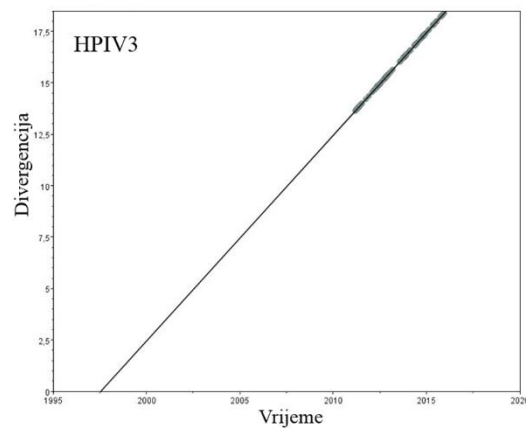
Antigenska mjesta za proteine HN i F definirana su još 1980-ih (van Wyke Coelingh i Tierney, 1989), a unatoč vremenskom periodu većem od 20 godina, sva ova mjesta bila su očuvana i u uzorcima iz ove studije. Dva mjesta koja služe za vezanje na stanicu domaćina u proteinu HN su bifunkcionalno mjesto I, koje uključuje aminokiseline T193 i D126, te mjesto II na aminokiselinama H552 i N551 (Palermo i sur., 2007; Porotto i sur., 2007). Ova mjesta bila su očuvana u svim analiziranim uzorcima. Jedina promjena uočena je blizini prvog veznog mjesta u dva uzorka, HR21.14(1014) i HR40.14(1406), kod kojih došlo do promjene V191I.

Za vezanje na α 2,6-vezanu sijaličnu kiselinu odgovorne su aminokiseline na pozicijama 275, 277, 372 i 426 proteina HN (Fukushima i sur., 2015). Ove pozicije, kao i regija omče oko D216 aminokiseline (Streltsov i sur., 2015) bile su potpuno očuvane u analiziranim uzorcima. Jedina promjena detektirana je na poziciji 279 u uzorku HR46.13(1650), koja uključuje pojavu asparagina na poziciji gdje svi drugi sojevi imaju aspartat. U istom je uzorku detektirana promjena u regiji omče, koja uključuje pojavu treonina na poziciji gdje je u svim drugim uzorcima prisutan izoleucin.

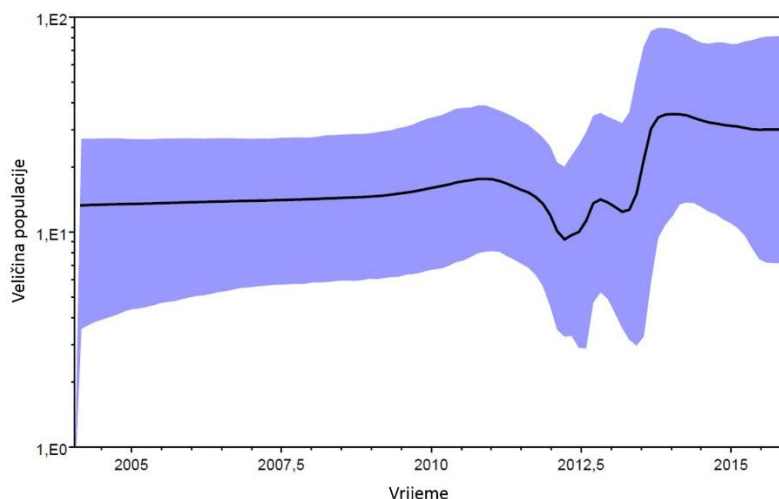
4.3.3 Dinamika populacije

U filodinamičku analizu uključeno je svih 141 uzorka kojima je određen fragment gena HN. Sekvence su podvrgnute testiranju vremenskog signala, te je dobivena pozitivna korelacija između vremenskog intervala i genskih promjena (slika 27). Daljnjim analizama određena je stopa supstitucije i TMRCA. Oni su određeni pod pretpostavkom striktnog molekularnog sata,

a za procjenu genske raznolikosti populacije tijekom vremena korištena je metoda Bayesian skyline plot u programu Beast verzija 1.8.2. Stopa supstitucije iznosila je $1,62 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $1,13 \times 10^{-3}$ - $2,13 \times 10^{-3}$), dok je TMRCA ovih uzoraka procijenjen u prvoj polovici 1999. godine (95%-tni HPD 1993 - 2004). Tijekom promatranog perioda primijećene su značajne promjene u veličini virusne populacije: do 2010. godine populacija je bila konstantne veličine, nakon čega je zamijećen blagi porast, te nagli pad populacije od 2011. godine. Ponovni porast populacije počeo je 2012. godine, nakon čega su zamijećene fluktuacije u veličini populacije, sve do druge polovice 2013. godine kada je virusna populacija počela rasti (slika 28).



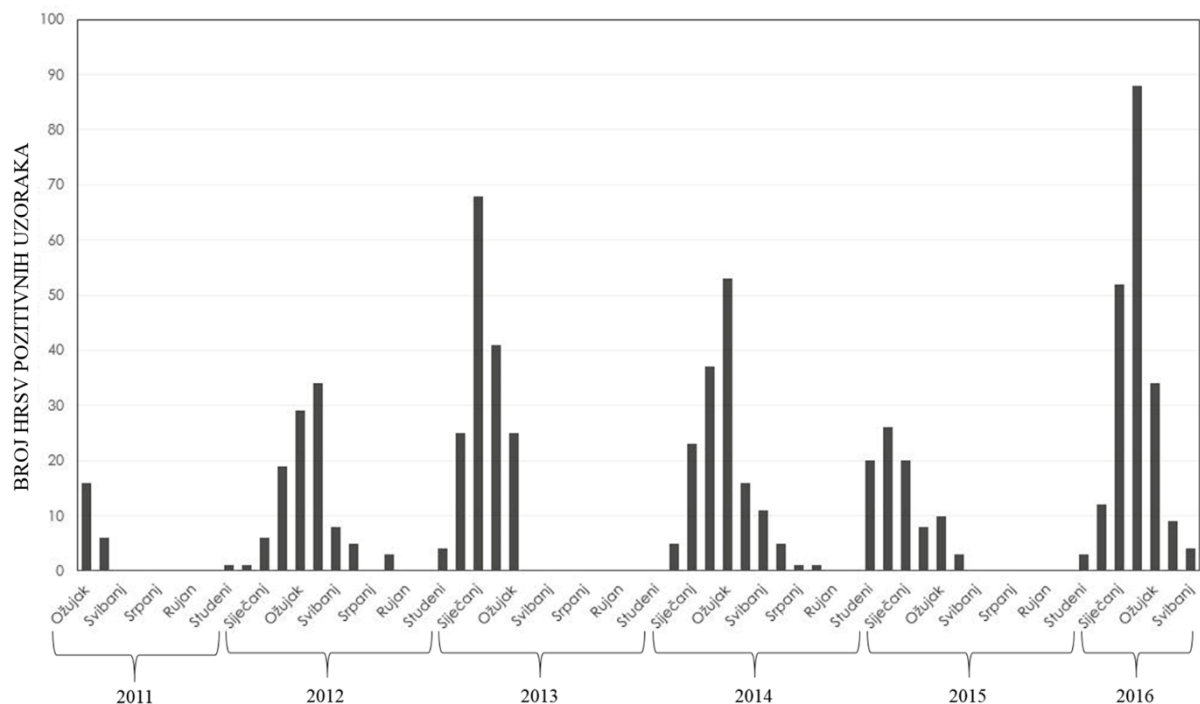
Slika 27. Regresija genskih udaljenosti (od korijena stabla do svih završetaka) u odnosu na vrijeme uzorkovanja za fragment gena HN uzoraka HPIV3.



Slika 28. Demografska povijest HPIV3 prikazana pomoću metode Bayesian skyline plot koji je izrađen analizom fragmenta HN duljine 582 nukleotida. Crna crta predstavlja srednju vrijednost, a plava površina označava 95%-tni HPD. Analiza je provedena tijekom 20×10^7 MCMC koraka, te striktnim molekularnim satom.

4.4 Molekularna epidemiologija HRSV-a

Tijekom 6 uzastopnih godina (ožujak, 2011. – svibanj, 2016.) ukupno je 1443 kliničkih uzoraka u testu DFA sa specifičnim monoklonskim protutijelom bilo pozitivno na HRSV. U DFA pozitivnim uzorcima je HRSV detektiran pomoću RT-PCR-a za fragment gena G, te je s obzirom na dostupnost kliničkog materijala ispitano 904 uzoraka, od čega je ukupno 767 uzoraka bilo pozitivno (84,8%). U nekim pozitivnim uzorcima količina virusa nije bila dovoljna za dobivanje sekvenci zadovoljavajuće kvalitete, pa su u daljnje analize uključene 732 sekvence. Tijekom ovog perioda, infekcije HRSV-om najčešće su se javljale u kasnu jesen i proljeće (slika 29).



Slika 29. Mjesečna raspodjela analiziranih uzoraka HRSV sakupljenih od ožujka 2011. godine do svibnja 2016. godine.

Podaci o starosti pacijenata i kliničkim dijagnozama bili su dostupni za 715, odnosno 735 uzoraka od ukupno 767 PCR pozitivnih uzoraka. Najčešća klinička dijagnoza pacijenata bio je bronhiolitis (40%), zatim infekcija gornjih dišnih puteva (28%), upala pluća sa 16% slučajeva, te bronhitis koji je dijagnosticiran u 5% slučajeva; kod preostalih 11% slučajeva na uputnoj dijagnozi bili su naznačeni samo nespecifični simptomi poput povišene tjelesne temperature. Najveći broj uzoraka odnosi se na djecu do 6 mjeseci starosti (46%), zatim slijedi dobna skupina od 1. do 2. godine s 22% infekcija virusom HRSV, a dobnoj skupini od 7 mjeseci do godine dana ukupno je pripadalo 17% uzoraka. U dobnoj skupini od 2. do 5. godine starosti HRSV je detektiran u 13% slučajeva, te preostalih 3% uzoraka pripada dobnoj skupini starijih od 5 godina.

4.4.1 Filogenetska analiza sojeva HRSV

Filogenetske analize HRSV-a temelje se na drugoj hipervarijabilnoj regiji (HVR2, eng. *second hypervariable region*) gena G, za koju je pokazano da je zbog velike varijabilnosti pogodna za epidemiološke analize (Johnson i sur., 1987b; Peret i sur., 1998). Ova regija odnosi se na pozicije 5274-5543 u soju A2 (M11486) koji pripada grupi A, odnosno 652-981 u soju

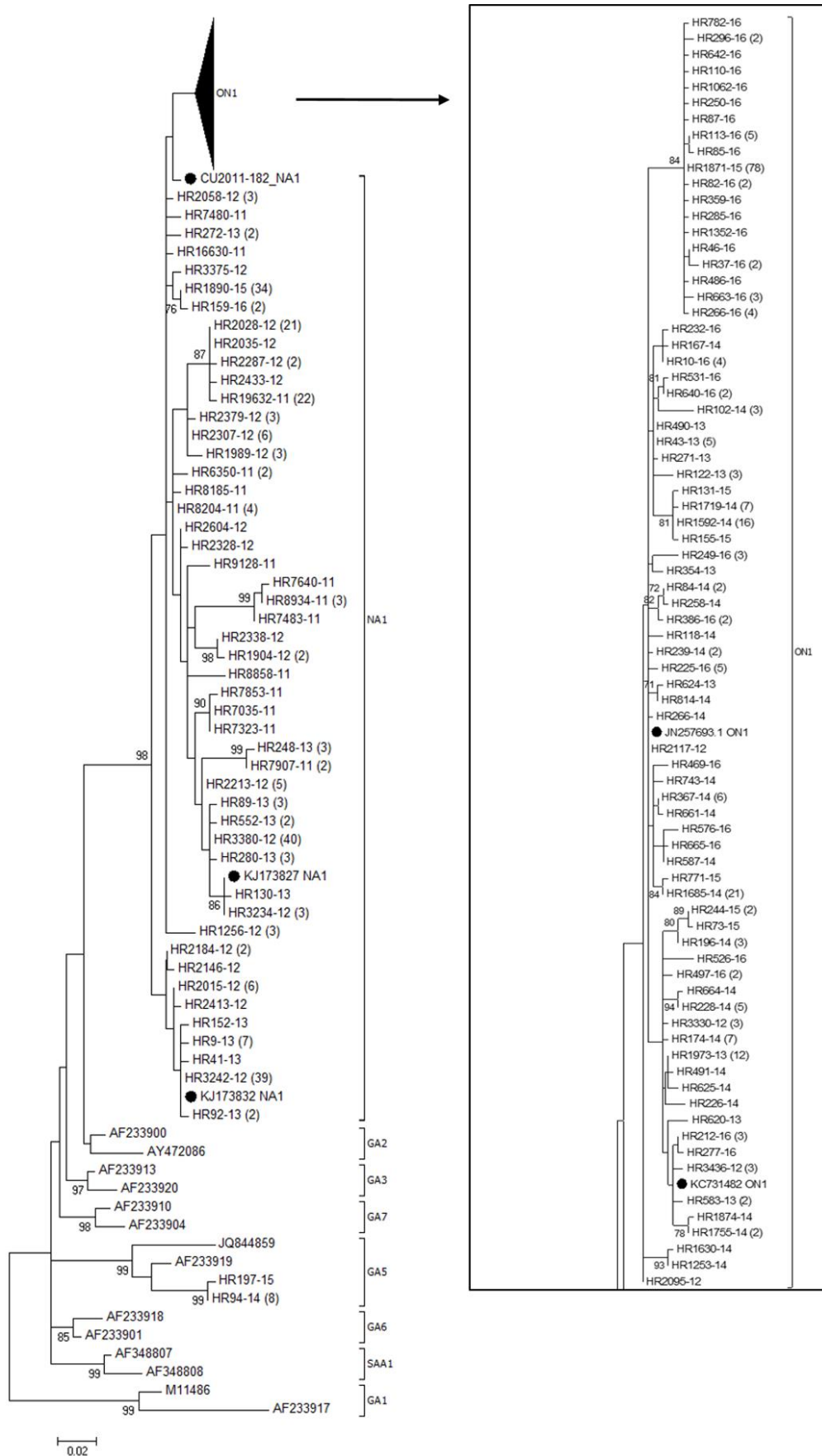
BA4128/99B (AY333364), koji predstavlja prototip genotipa B. Sekvence HVR2 su prijavljene u bazu GenBank pod pristupnim brojevima KT371536–KT371609, KT371681–KT371705, KU375579–KU375588, te KX497066- KX497131.

Grupi A pripadalo je ukupno 533 (73%) sojeva, dok je 199 (27%) sojeva pripadalo u grupu B. Tijekom analiziranog perioda sojevi grupe A bili su najčešće detektirani sojevi u svim godinama, osim 2014. godine kada je više detektirano sojeva koji su pripadali grupi B (tablica 26). Detektirano je 5 genotipova te je uočena cirkulacija više genotipova istovremeno (slika 30 i 31, tablica 26). U sojevima grupe A, prve 3 godine studije najviše je uzoraka pripadalo genotipu NA1. U ožujku 2012. godine detektirana je prisutnost genotipa ON1, a već 2014. godine je najviše sojeva u ovoj grupi pripadalo genotipu ON1, te je do kraja studije bio najčešće detektiran genotip. Genotip BA9 bio je dominantni genotip grupe B tijekom cijelog analiziranog perioda, dok je BA10 detektiran iznimno rijetko (tablica 26).

Tablica 26. Raspodjela HRSV pozitivnih uzoraka po genotipovima tijekom analiziranog perioda.

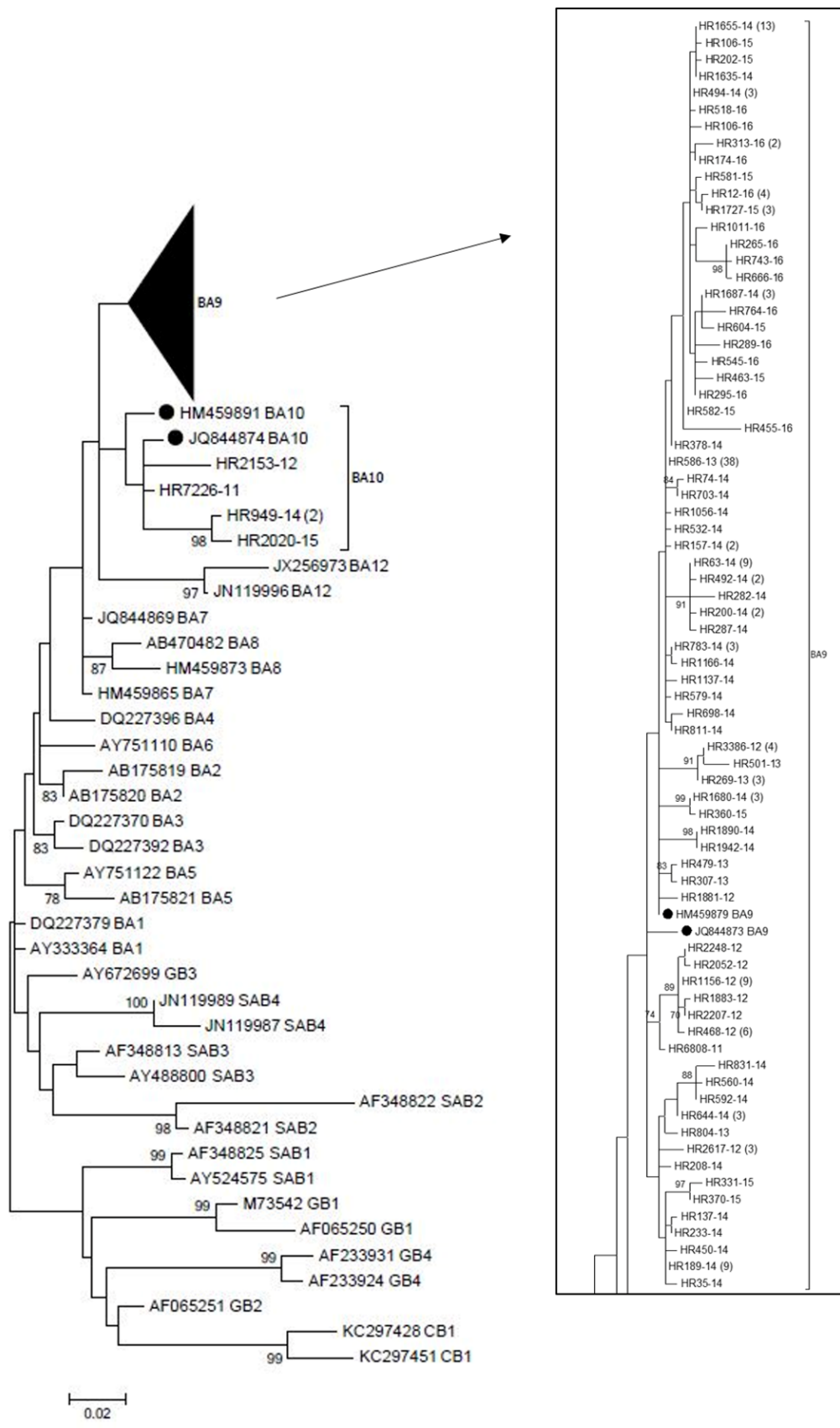
Godina	Grupa A			Grupa B	
	NA1	ON1	GA5	BA9	BA10
2011.	22	0	0	1	1
2012.	103	5	0	24	1
2013.	97	17	0	25	0
2014.	0	79	8	104	2
2015.	5	33	1	17	0
2016.	31	132	0	24	0
Ukupno	258	266	9	195	4

U filogenetsku analizu uključeni su samo uzorci koji su imali jedinstvenu sekvencu u fragmentu HVR2, uz referentne sekvence koje su dostupne u banci gena GenBank. Za grupu A uključeno je 128 jedinstvenih HVR2 sekvenci i 19 referentnih uzoraka, a u grupi B bilo je 78 jedinstvenih sekvenci, te 36 referentna uzorka (slika 30 i 31).



Slika 30. Filogenetsko stablo sojeva HRSV grupe A.

Slika 30. (nastavak) Stablo je izrađeno metodom ML uz 1000 pseudoreplikacija, te supstitucijski model K80, odabran na temelju kriterija AICc. Na čvorovima su prikazane samo vrijednosti više od 70%. Označena je pripadnost pojedinim genotipovima, a sojevi iz ove studije u nazivu nose prefiks HR. Brojevi u zagradama označavaju broj uzoraka s istom sekvencom u fragmentu HVR2. Kružićem su označeni referentni sojevi za genotipove NA1 i ON1; sojevi ON1 posebno su izdvojeni i prikazani na desnoj strani.



Slika 31. Filogenetsko stablo sojeva HRSV grupe B.

Slika 31. (nastavak) Stablo je izrađeno metodom ML uz 1000 pseudoreplikacija, te supstitucijski model HKY + G, odabran na temelju kriterija AICc. Na čvorovima su prikazane samo vrijednosti više od 70%. Označena je pripadnost pojedinim genotipovima, a sojevi iz ove studije u nazivu nose prefiks HR. Brojevi u zagradama označavaju broj uzoraka s istom sekvencom u fragmentu HVR2. Kružićem su označeni referentni sojevi za genotipove BA9 i BA10; sojevi BA9 posebno su izdvojeni i prikazani na desnoj strani.

4.4.2 Analiza fragmenta HVR2 gena G

4.4.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci

Podjednaka razina varijabilnosti na nukleotidnoj razini izračunata je za genotipove NA1 (27%), ON1 (30%) i BA9 (31%). Uzorci koji su pripadali u preostala dva genotipa međusobno su bili gotovo identični, s 3% razlika na nukleotidnoj razini za uzorke genotipa BA10, te 1% razlika kod uzoraka genotipa GA5. Usporedbom sekvence prvog uzorka genotipa ON1 koji je detektiran u Hrvatskoj i kanadskog soja ON67-1210A (JN257693) pronađena je samo jedna sinonimna promjena na poziciji 717 u genu G, koja se ne nalazi u dupliciranoj regiji, iako su ova dva uzorka vremenski značajno udaljena.

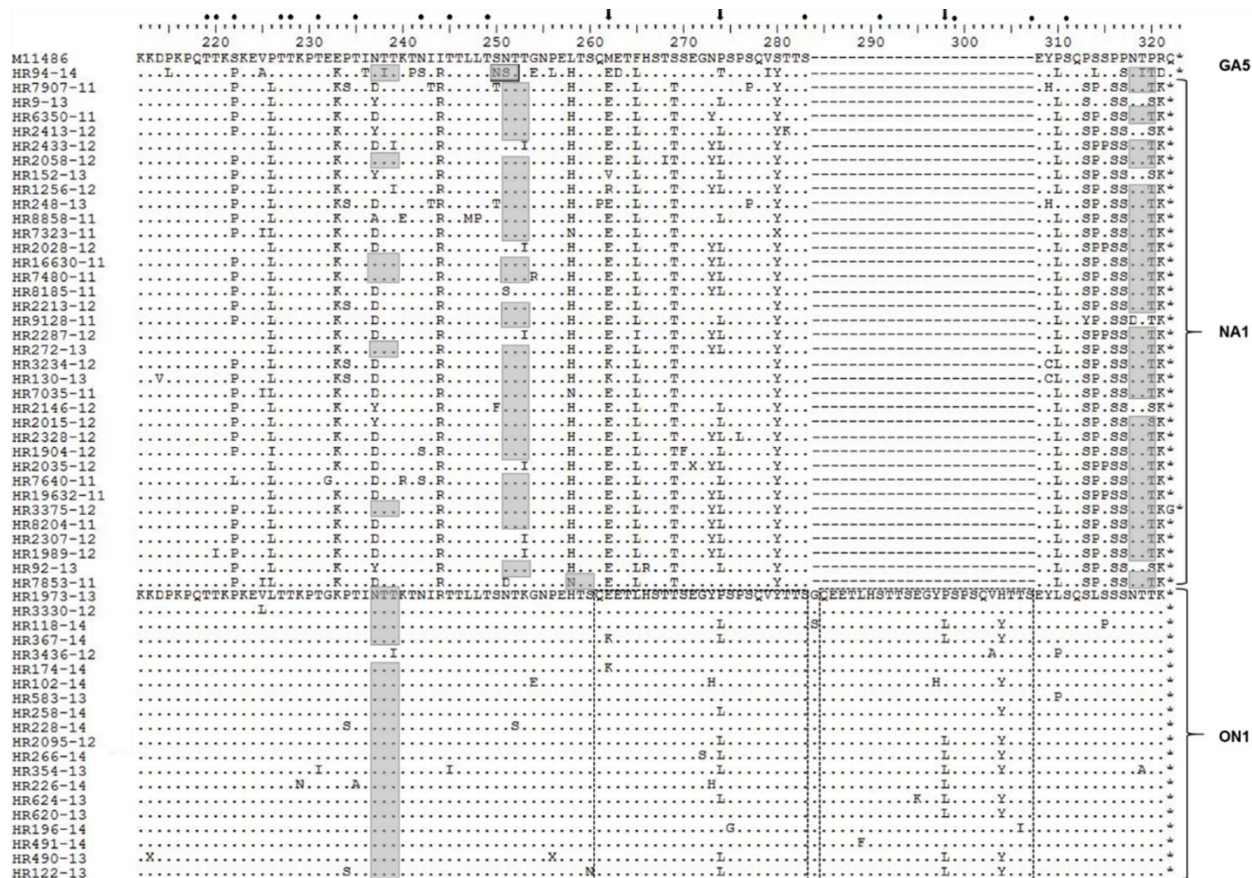
Velika varijabilnost u genotipu NA1 potvrđena je izračunom p-vrijednosti, koje su obuhvatile širok raspon, od 0,004 do 0,07 (srednja vrijednost iznosila je 0,031). Sličan raspon p-vrijednosti izračunat je i za genotip BA9 (0,003-0,069; srednja vrijednost 0,030). Za genotip ON1 p-vrijednosti iznosile su od 0,003 do 0,058, a srednja vrijednost iznosila je 0,027.

4.4.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci

Visoka razina varijabilnosti uočena je i analizom aminokiselinskih sekvenci, te je razina očuvanosti iznosila 56% za genotip NA1, 54% za genotip ON1 i 48% za sojeve genotipa BA9. Uzorci genotipa BA10 međusobno su se razlikovali na 5 aminokiselinskih pozicija, s razinom očuvanosti aminokiselinskog slijeda od 95%, dok su uzorci genotipa GA5 imali identičnu aminokiselinsku sekvencu. Predviđena duljina proteina G za genotip NA1 je 297, a za genotip GA5 298 aminokiselina. Kod genotipa ON1 je protein G dugačak 321 aminokiselinu (slika 32). Ukupno je 36 jedinstvenih aminokiselinskih slijedova bilo detektirano u genotipu NA1, a čak 55, odnosno 58 jedinstvenih slijedova u genotipu ON1 i BA9. S obzirom na visoku varijabilnost u aminokiselinama, na slikama 32 i 33 prikazane su samo neke od sekvenci, koje obuhvaćaju sve relevantne razlike u aminokiselinskom slijedu. Dvije razlike u odnosu na referentni soj A2

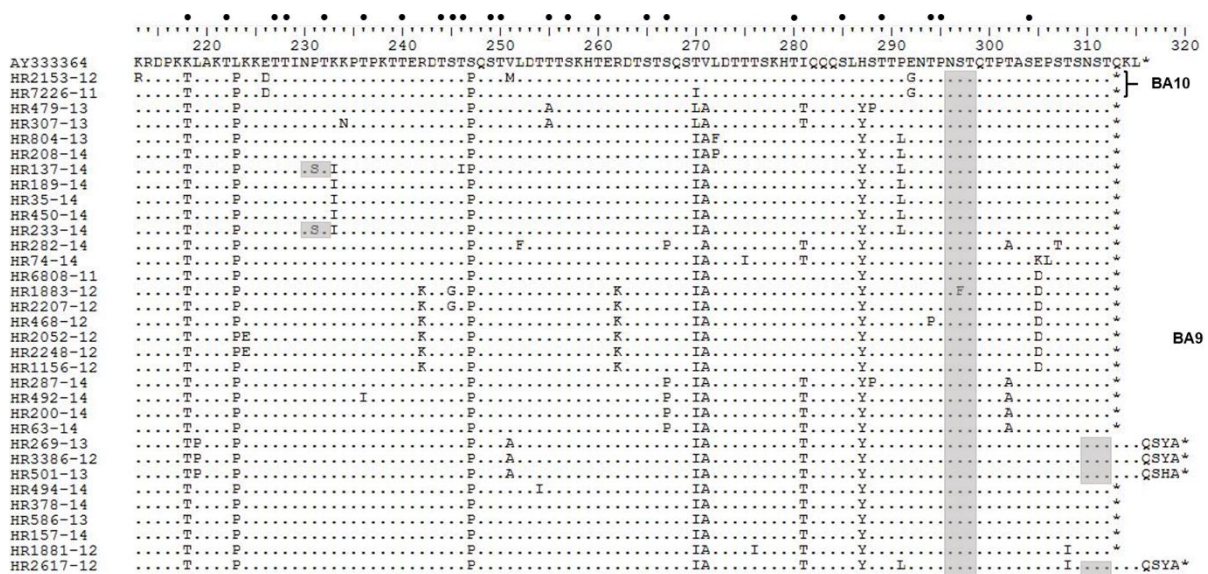
uočene su u svim uzorcima (I244R i P317S). Aminokiseline na pozicijama 232 i 253 razlikovale su genotipove NA1 i ON1; E232G smatra se specifičnom za genotip ON1 (Eshaghi i sur., 2012), međutim pronađena je i u tri soja NA1 genotipa (HR7483-11, HR8934-11 i HR7640-11; slika 32).

U genotipu NA1 većina sojeva imala je dva potencijalna mjesta N-glikozilacije (pozicije 251 i 318), dok su sojevi ON1 imali samo jedno potencijalno mjesto glikozilacije (pozicija 237), ili nisu imali predviđena potencijalna mjesta N-glikozilacije (ukupno 18 sojeva, na slici 32 predstavljeni sojem HR3436-12). Dodatno su neki sojevi NA1 imali potencijalno mjesto glikozilacije na asparaginu na poziciji 237. U genotipu GA5 predviđena su 3 mjesta N-glikozilacije, od kojih je jedno mjesto isto kao u sojevima NA1 (slika 32). Većina sojeva u grupi A imala je nekoliko potencijalnih O-glikoziliranih mjesta, neka od kojih se nalaze unutar duplicirane regije (slika 32).



Slika 32. Aminokiselinsko sravnjenje translahiranih fragmenata HVR2 sojeva HRSV grupe A prikazanih u odnosu na soj A2 (M11486). Naznačena je pripadnost pojedinom genotipu, a sekvence genotipa ON1 prikazane su u odnosu na soj HR1973-13. Iste aminokiseline naznačene su točkama, crtice označavaju praznine u sravnjenju koje odgovaraju nukleotidnim insercijama, te zvjezdica označava stop kodon. Pozitivna selekcija naznačena je strelicama, potencijalna N-glikozilacijska mjesta su osjenčana, a O-glikozilacijska mjesta su označena točkicama iznad sravnjenja. Duplicirane regije naznačene su isprekidanim kvadratima.

Predviđena duljina proteina G u grupi B bila je 312 aminokiselina, odnosno 319 aminokiselina u uzorcima koji na poziciji 952 (u odnosu na referentni soj BA4128/99B) gena G imaju citozin, umjesto treonina. U odnosu na referentni soj ponovno su uočene neke supstitucije koje su pronađene u svim sojevima (K218T/P i S247P), dok su supstitucije E226D i E292G razlikovale dva genotipa (prva aminokiselina odnosi se na genotip BA9, slika 33). Predviđena su 3 potencijalna mjesta N-glikozilacije (slika 33), te do 24 moguća mjesta O-glikozilacije, a na temelju obrazaca glikozilacije se ova dva genotipa nisu razlikovala (slika 33).

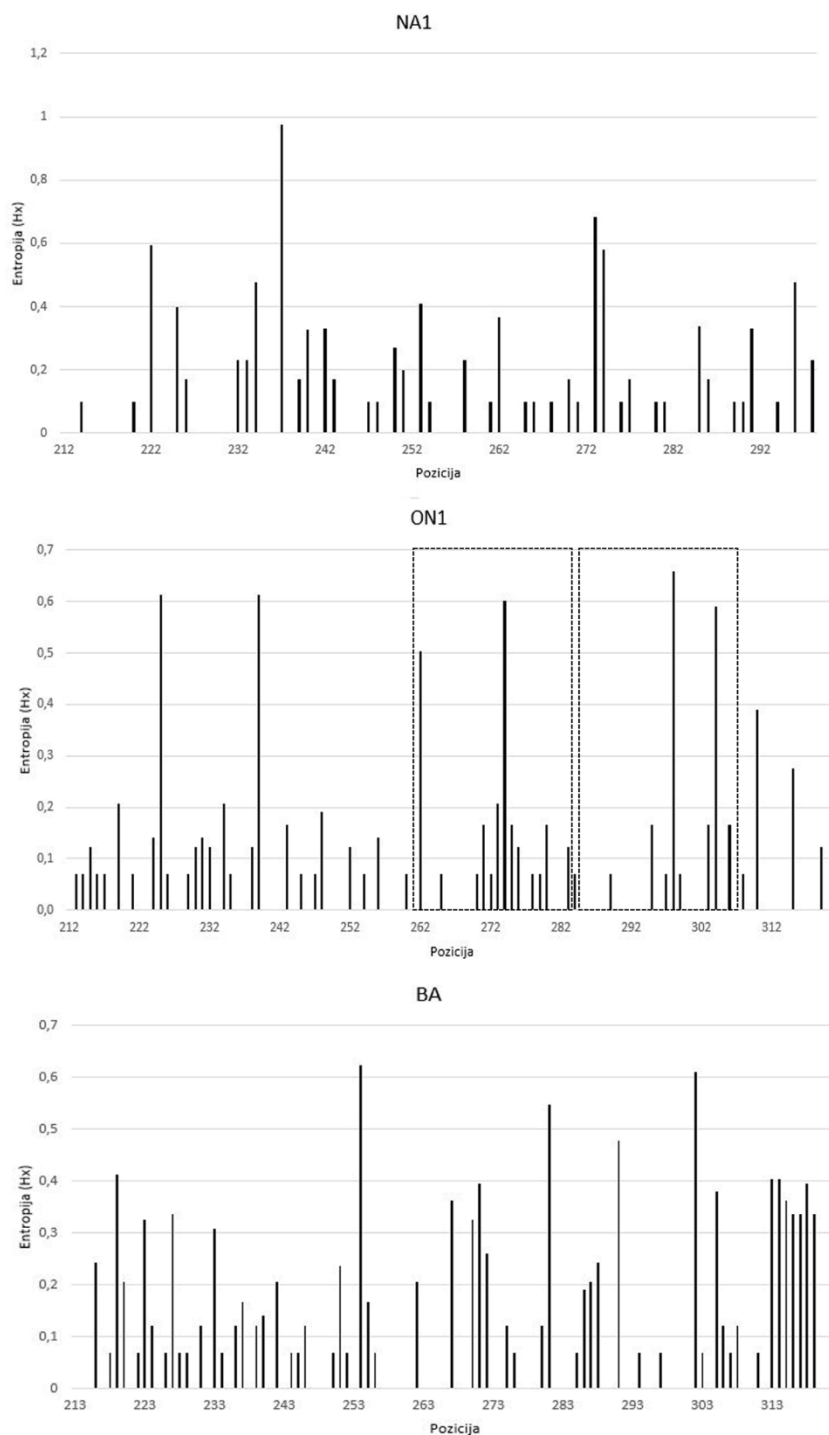


Slika 33. Aminokiselinsko sravnjenje translahiranih fragmenata HVR2 sojeva HRSV grupe B prikazanih u odnosu na soj BA4128/99B (AY333364). Naznačena je pripadnost pojedinom genotipu. Iste aminokiseline naznačene su točkicama, a zvezdica označava stop kodon. Potencijalna N-glikozilacijska mjesta su osjenčana, a O-glikozilacijska mjesta su označena točkicama iznad sravnjenja.

Varijabilnost sojeva potvrđena je izračunom Shannonove entropije, gdje se pozicije koje imaju izračunatu vrijednost entropije višu od 0,2 smatraju varijabilnim, dok su pozicije ispod te vrijednosti očuvane (Malasao i sur., 2015). Najmanje pozicija koje su imale vrijednost višu od ovog praga nalazilo se u sojevima ON1, a čak 5 varijabilnih pozicija se nalazilo u dupliciranim regijama (slika 34, srednji panel). Najviša vrijednost izračunata je za kodon 298 (slika 34, srednji panel). Više varijabilnih pozicija pronađeno je u sojevima grupe B, a najviša vrijednost izračunata je za kodon 254 (slika 34, donji panel). U sojevima NA1 prema ovoj analizi najvarijabilnija je bila pozicija 237 (slika 34, gornji panel).

Analizom selektivnog pritiska u grupi A pronađene su dvije pozicije koje su pod pozitivnim selektivnim pritiskom: 254 i 274 (odgovara poziciji 298 u dupliciranoj regiji, slika 32), potvrđene su sa tri korištene metode (FEL, IFEL i FUBAR za poziciju 254, SLAC, FEL i FUBAR za poziciju 274). Ukupni dN/dS za grupu A iznosio je 0,69. Kodon 274/298 je i analizom entropije određen kao varijabilan, potvrđujući ove rezultate, te sugerirajući česte supstitucije na ovoj poziciji. Negativna selekcija određena je za kodone na pozicijama 277 i 280 (slika 32). Za grupu B ukupni dN/dS iznosio je 0,54, a jedini pozitivno selektiran kodon koji je bio potvrđen u tri korištene metode (FEL, IFEL i FUBAR) je na poziciji 271 (slika 33).

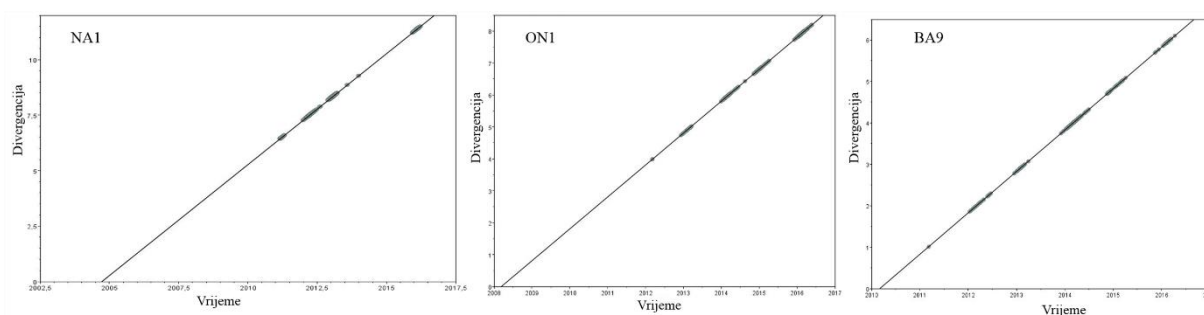
Negativno selektirani su bili kodoni na pozicijama 269 i 295, te su ovi rezultati u skladu s rezultatima izračuna entropije (slika 34, donji panel).



Slika 34. Shannonova entropija izračunata za HVR2 proteina G uzoraka HRSV grupe A i B. Isprekidanim pravokutnikom su naznačene dvije replike duplicirane regije u sojevima ON1. Prag varijabilnosti je postavljen na 0,2.

4.4.4 Dinamika populacije

U filodinamičku analizu uključeno je svih 258 uzoraka genotipa NA1, 266 uzoraka genotipa ON1 i 195 uzoraka genotipa BA9 kojima je određena sekvenca HVR2. Koalescentne analize za preostala dva genotipa nisu bile moguće zbog malog broja uzoraka. Sekvence su podvrgnute testiranju vremenskog signala, te je dobivena pozitivna korelacija između vremenskog intervala i genskih promjena (slika 35). Daljnjim analizama određena je stopa supstitucije i TMRCA koji su određeni pod pretpostavkom relaksiranog molekularnog sata, a za procjenu genske raznolikosti populacije tijekom vremena korištena je metoda Bayesian skyline plot u programu Beast verzija 1.8.2.

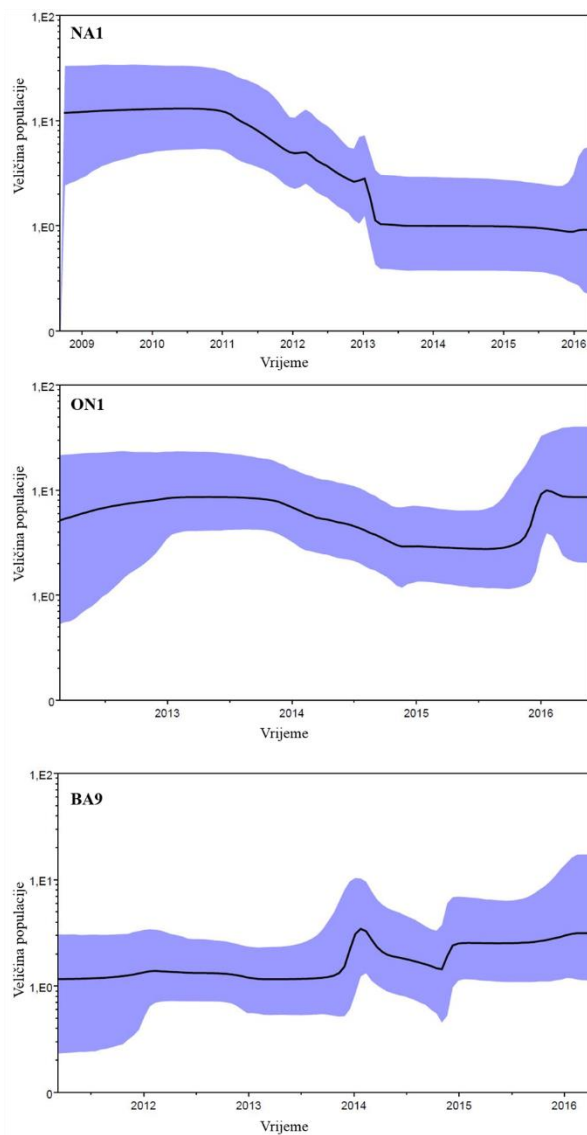


Slika 35. Regresija genskih udaljenosti (od korijena stabla do svih završetaka) u odnosu na vrijeme uzorkovanja za HVR2 genotipova NA1, ON1 i BA9.

Stopa supstitucije u genotipu NA1 iznosila je $3,006 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $1,82 \times 10^{-3}$ - $4,32 \times 10^{-3}$), dok je TMRCA ovih uzoraka procijenjen sredinom 2001. godine (95%-tni HPD 1992 - 2008). Tijekom promatranog perioda primijećene su značajne promjene u veličini virusne populacije: do 2011. godine populacija je bila konstantne veličine, nakon čega slijedi nagli pad populacije koji je potrajao sve do 2013. godine, kada je zamijećen kratkotrajni porast populacije. Nakon ovog perioda veličina virusne populacije ovog genotipa se značajno smanjila (slika 36, gornji panel).

Stopa supstitucije u genotipu ON1 iznosila je $4,969 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $3,26 \times 10^{-3}$ - $6,93 \times 10^{-3}$), dok je TMRCA ovih uzoraka procijenjen početkom 2009. godine (95%-tni HPD 2004 - 2012). Tijekom promatranog perioda primijećene su blaže promjene u veličini virusne populacije od 2011. godine do 2015. godine, nakon čega je početkom 2016. godine zamijećen porast virusne populacije genotipa ON1 (slika 36, srednji panel).

Stopa supstitucije u genotipu BA9 iznosila je $8,851 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $6,449 \times 10^{-3}$ - $1,13 \times 10^{-3}$), dok je TMRCA ovih uzoraka procijenjen krajem 2009. godine (95%-tni HPD 2007 - 2011). Tijekom promatranog perioda uočene su značajne promjene u veličini virusne populacije: do 2014. godine populacija je bila gotovo konstantne veličine, nakon čega je zamijećen nagli porast populacije, kojeg je slijedio nagli pad populacije u toj istoj godini. Ponovni porast populacije počeo je 2015. godine, nakon čega je populacija ponovno bila relativno konstantna (slika 36, donji panel).

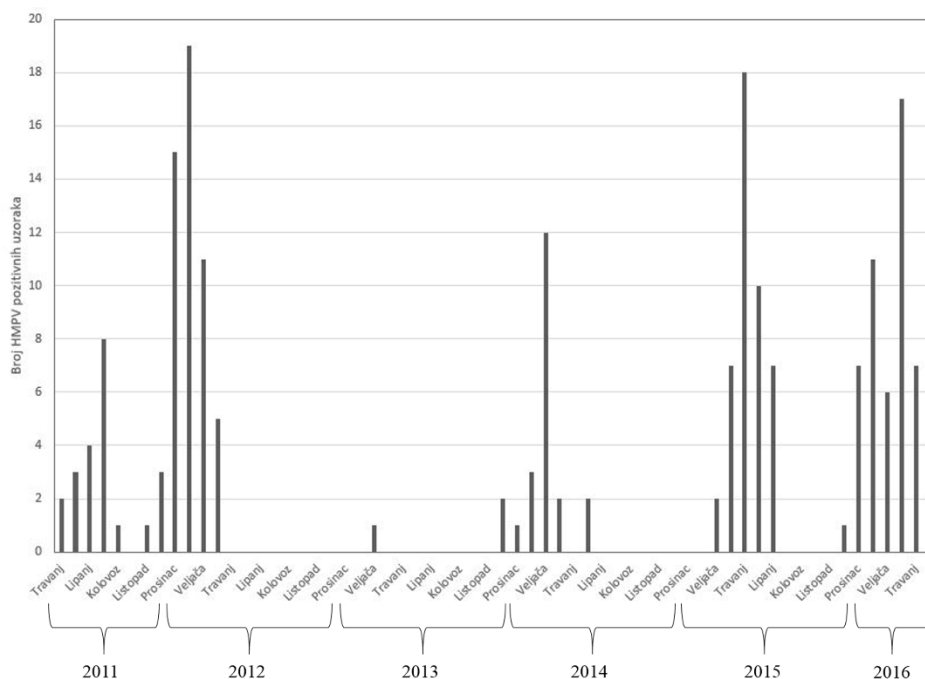


Slika 36. Demografska povijest uzoraka HRSV prikazana pomoću metode Bayesian skyline plot koji je izrađen analizom fragmenata HVR2 uzoraka genotipa NA1, ON1 i BA9. Crna crta predstavlja srednju vrijednost, a plava površina označava 95%-tni HPD. U slučaju genotipa NA1 analiza je provedena tijekom 35×10^7 MCMC koraka, za genotip ON1 20×10^8 , a za genotip BA9 30×10^7 ; u svim analizama korištena je pretpostavka relaksiranog molekularnog sata.

4.5 Molekularna epidemiologija HMPV-a

Tijekom 6 uzastopnih godina (travanj, 2011. - svibanj, 2016.) ukupno je 456 kliničkih uzoraka u testu DFA sa specifičnim monoklonskim protutijelom bilo pozitivno na HMPV. U DFA pozitivnim uzorcima je HMPV detektiran pomoću RT-PCR-a za fragment gena F, te je s

obzirom na dostupnost kliničkog materijala ispitano 238 uzoraka, od čega su ukupno 192 uzorka bila pozitivna (80,7%). U nekim pozitivnim uzorcima količina virusa nije bila dovoljna za dobivanje sekvenci zadovoljavajuće kvalitete, pa je u daljnje analize uključeno 179 sekvenci (tablica 27). Tijekom ovog perioda, potvrđena je sezonska distribucija HMPV infekcija, s epidemijama koje se javljaju jednom godišnje, te epidemiološkim vrhuncima u srpnju 2011. godine, siječnju 2012. godine, veljači 2014. godine, travnju 2015. godine i ožujku 2016. godine (slika 37). Iznimka je 2013. godina kada nisu svi HMPV pozitivni uzorci bili spremljeni za molekularnu analizu, te za tu godinu nije mogla biti ispitana sezonska pojava HMPV-a.



Slika 37. Mjesečna raspodjela analiziranih uzoraka HMPV sakupljenih od travnja 2011. godine do svibnja 2016. godine.

Najčešća klinička dijagnoza pacijenata bila je infekcija gornjih dišnih puteva (41%), zatim upala pluća sa 24% slučajeva, te bronhiolitis koji je dijagnosticiran u 20% slučajeva. Bronhitis i drugi simptomi javili su se jednakom broju slučajeva (6%), a dijagnoza je bila nepoznata za preostalih 3% uzoraka. Najveći broj uzoraka odnosi se na djecu od 2. do 5. godine starosti (27%), zatim slijedi dobna skupina od 1. do 2. godine s 25% infekcija uzrokovanih HMPV-om, a u dobnoj skupini do 6 mjeseci starosti, te od 7 mjeseci do godine dana pripadao je podjednak broj uzoraka (19% i 16%). Preostalih 10% uzoraka pripada dobnoj skupini starijih od 5 godina života, dok je u 3% slučajeva starost pacijenata bila nepoznata.

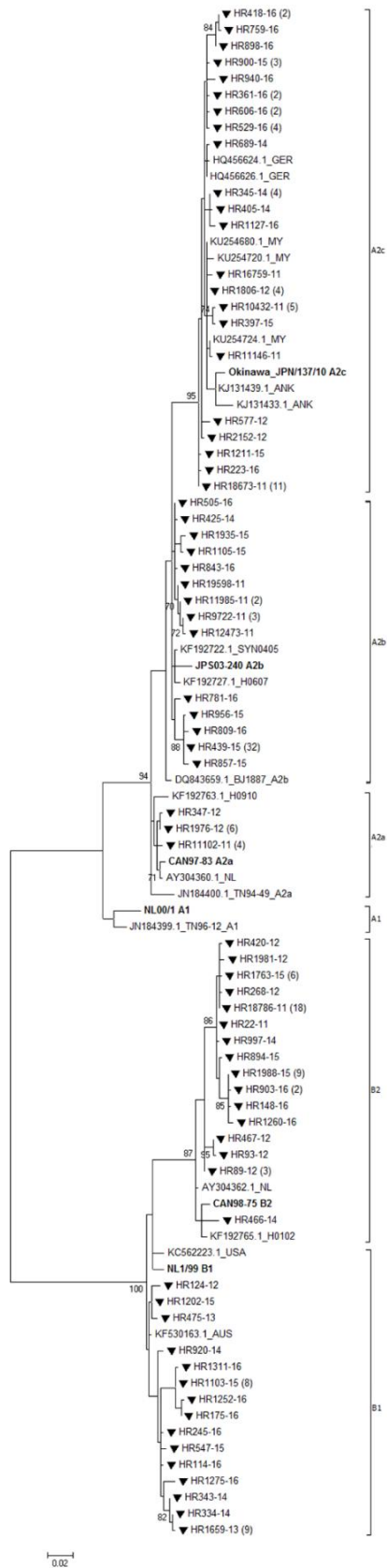
4.5.1 Filogenetska analiza sojeva HMPV

Filogenetska analiza HMPV-a temelji se na fragmentu gena F duljine 473 nukleotida (Biacchesi i sur., 2003; Boivin i sur., 2002; Huck i sur., 2006; van den Hoogen i sur., 2002) Ova regija odnosi se na pozicije 3680-4152 u soju CAN97-83 (NC_004148) koji pripada grupi A, odnosno 3677-4149 u soju CAN98-75 (AY297748), koji predstavlja prototip grupe B. Sekvence su prijavljene u bazu GenBank pod pristupnim brojevima KT371610-KT371680, KU375579-KU375588, KX497048 - KX497065, te MF104558 - MF104587.

Filogenetskom analizom potvrđena je istovremena cirkulacija obje grupe HMPV-a u Hrvatskoj (slika 38). Grupi A pripadalo je ukupno 99 (55,3%) sojeva, dok je 80 (44,7%) sojeva pripadalo u grupu B. Detektirana je cirkulacija 3 podgrupe (A2, B1, B2) te je uočena cirkulacija više podgrupa istovremeno (slika 38, tablica 28). Podgrupa A2 se na temelju topologije filogenetskog stabla dodatno dijeli u podklaster A2a, A2b i A2c (slika 38, tablica 28). Tijekom 2011. godine uočena je istovremena cirkulacija podgrupa A2 i B2, s 66,6% virusa u podgrupi A2. Sljedeće godine ove podgrupe su nastavile istovremeno cirkulirati, ali se broj virusa podgrupe A2 smanjio na 35,7%. Svi uzorci iz 2013. godine pripadali su istoj podgrupi (B1), dok je 2014. godine najviše uzoraka pripadalo podgrupi B1. Naredne godine čak 82% virusa klasificirano je u podgrupu A2, dok je zadnje godine studije ponovno zamijećena istovremena cirkulacija svih 3 podgrupa, a 60% virusa pripadalo je u grupu B (tablica 28). Iz ovih podataka vidljiva je smjena predominantnih grupa.

Tablica 27. Raspodjela HMPV pozitivnih uzoraka u podgrupe tijekom analiziranog perioda.

Podgrupe	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Ukupno
A1	0	0	0	0	0	0	0
A2a	5	6	0	0	0	0	11
A2b	7	0	0	1	36	4	48
A2c	10	4	0	6	6	14	40
B1	0	0	4	9	3	13	29
B2	11	18	0	2	6	14	51
Ukupno	33	28	4	18	51	45	179



Slika 38. Filogenetsko stablo sojeva HMPV na temelju fragmenta gena F.

Slika 38. (nastavak) Za izradu stabla korišten je fragment gena F duljine 473 nukleotida, a stablo je izrađeno metodom ML uz 1000 pseudoreplikacija i supstitucijski model TN93+G odabran na temelju kriterija BIC. Na čvorovima su prikazane samo vrijednosti više od 70%. Označena je pripadnost pojedinim podgrupama, sojevi iz ove studije naznačeni su trokutićem, a broj u zagradama označava broj uzoraka s istom sekvencom. Referentne sekvence poznatih podgrupa su masno otisnute, a pristupni brojevi su: Okinawa.JPN/137/10, AB683238; JPS03-240, AY530095; CAN97-83, AY145296; NL00/1, AF371337.2, CAN98-75, AY145289; NL1-99, AY304361. Dodatne sekvence koje su uključene u analizu su predstavljene pristupnim brojem i imenom izolata.

Sojevi HMPV podgrupe A2 iz ove studije bili su slični sojevima iz Australije (KC562224 i KC403981), Tajlanda (KM361520.1) i Kine (GQ153651.1), s čak do 99% sličnosti na nukleotidnoj razini. Sojevi podgrupe B1 bili su slični sojevima koji cirkuliraju u Južnoj Koreji (KF516922) i Australiji (KF530179 i KF530173), dok su sojevi B2 bili slični sojevima iz Perua (KJ627414 i KJ627397), s razinom sličnosti do 99% na nukleotidnoj razini.

4.5.1.1 Distribucijski obrasci podklastera grupe A

Podgrupa A2 dodatno je podijeljena u 3 podklastera na temelju topologije filogenetskog stabla. Uočena je cirkulacija novog podklastera A2c, koji je do sada detektiran samo u Japanu (Nidaira i sur., 2012) i Maleziji (Chow i sur., 2016), a ovi sojevi činili su ukupno 40% sojeva unutar grupe A (slika 38, tablica 27), što je također potvrđeno još jednom metodom konstrukcije filogenetskog stabla (slika 39). S obzirom na limitirane podatke o ovom podklasteru, te činjenici da je do sada detektiran na ograničenoj geografskoj lokaciji, ispitane su vrijednosti genskih udaljenosti za podklaster kako bi se definirao limit vrijednosti za podklaster. U tu svrhu preuzete su sve sekvence fragmenta F gena koje su pripadale podklasterima A2a i A2b, a koje su bile dostupne u banci gena GenBank do lipnja 2016. godine. Nakon eliminacije istih sekvenci, u analizu je uključeno 51 jedinstvenih A2a i 58 jedinstvenih A2b sekvenci. Genske p-vrijednosti iznosile su 0,0138 (standardna pogreška 0,0024) unutar podklastera A2a i 0,0108 (standardna pogreška 0,0021) u podklasteru A2b. Udaljenost između ova dva podklastera iznosila je 0,026 (standardna pogreška 0,006).

Isti pristup implementiran je za izračun genskih vrijednosti unutar sojeva A2 detektiranih u ovoj studiji (tablica 28), a najniža vrijednost izračunata je za podklaster A2a, dok su ostale genske udaljenosti poprimile slične vrijednosti. Genska udaljenost između sojeva A2a

i A2b iznosila je 0,030 (standardna pogreška 0,006), što je slično udaljenosti izračunatoj za sekvence iz banke gena GenBank. Ista genska udaljenost od 0,031 (standardna pogreška 0,008) izračunata je između druga dva podklastera, A2b i A2c, dok je najviša genska udaljenost u podgrupi A2 izračunata između A2a i A2c (0,043; standardna pogreška 0,006) (tablica 29).

Tablica 28. Srednje vrijednosti nekorigiranih udvojenih genskih udaljenosti (p-udaljenost) unutar podgrupa i podklastera HMPV-a na temelju sekvence fragmenta gena F duljine 473 nukleotida. x, nije dostupno.

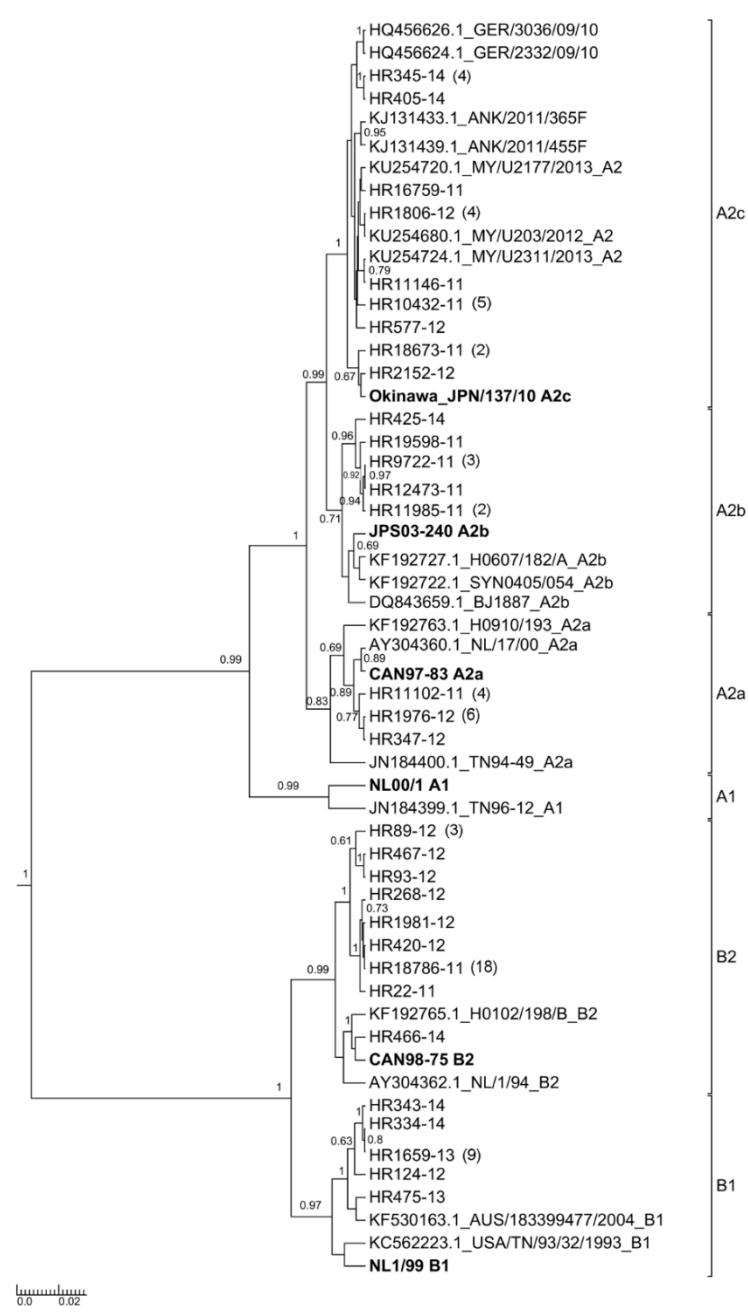
Podgrupa	p-udaljenost
A1	x
A2a	0,0042
A2b	0,0153
A2c	0,0137
B1	0,0158
B2	0,0153

Tablica 29. Srednje vrijednosti udvojenih genskih udaljenosti (p-udaljenosti) unutar podgrupa i podklastera HMPV-a na temelju sekvence fragmenta gena F duljine 473 nukleotida. U zagradama je vrijednost standardne pogreške dobivena korekcijom uz pomoć 1000 pseudoreplikata.

	Podgrupa				
	A2a	A2b	A2c	B1	B2
A2a		0,030 (0,006)	0,043 (0,006)	0,139 (0,016)	0,144 (0,015)
A2b			0,031 (0,008)	0,147 (0,016)	0,150 (0,015)
A2c				0,138 (0,016)	0,147 (0,015)
B1					0,060 (0,009)
B2					

Pomoću bioinformatičkog alata za pretraživanje BLAST (eng. *basic local alignment search tool*, BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pretražena je baza gena GenBank kako bi se otkrilo jesu li već ranije prijavljeni sojevi A2c koji cirkuliraju u Europi, a nisu

prepoznati kao zasebni podklaster. U ovu analizu uključene su sve sekvence sojeva A2c detektirane u ovoj studiji. Pronađene su samo dvije sekvence koje su izolirane u Turskoj, a čiji genotip nije bio anotiran, te dvije sekvence iz Njemačke koje su anotirane kao A2b podklaster. Ove sekvence su uključene u filogenetsku analizu i sve su se smjestile na istu granu filogenetskog stabla, uz nedavno objavljene sojeve A2c iz Japana i Malezije (slika 38 i 39).



Slika 39. Filogenetsko stablo sojeva HMPV detektiranih u ovoj studiji, te referentnih sekvenci na temelju fragmenta gena F duljine 473 nukleotida. Stablo je izrađeno metodom po Bayesu, uz supstitucijski model TN93+G, odabran na temelju kriterija BIC. Na čvorovima su prikazane samo posteriorne vrijednosti više od 0,6. Označena je pripadnost pojedinim podgrupama, sojevi iz ove studije u nazivu nose prefiks HR, a broj u zagradama označava broj uzoraka s istom sekvencom. Referentne sekvence poznatih podgrupa su masno otisnute, a pristupni brojevi su: Okinawa.JPN/137/10, AB683238; JPS03-240, AY530095; CAN97-83, AY145296; NL00/1, AF371337.2, CAN98-75, AY145289; NL1-99, AY304361. Dodatne sekvence koje su uključene u analizu su predstavljene pristupnim brojem i imenom izolata.

4.5.2 Analiza površinskih glikoproteina

Na temelju filogenetskog stabla (slika 38) odabrano je 20 uzoraka kojima su dodatno analizirani kompletni površinski glikoproteini, a uzorci su odabrani tako da predstavljaju sve uočene podklastere i podgrupe. Sekvence su prijavljene u bazu GenBank pod pristupnim brojevima KU375593-KU375624.

4.5.2.1 Analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci

Analizom varijabilnosti nukleotidnih sekvenci pokazana je viša razina očuvanosti za gen F, dok su geni G i SH bili varijabilniji (tablica 30). Za gen F je između grupe A i B vrijednost očuvanosti nukleotidne sekvence iznosila 81,3 - 82,3%. Niža vrijednost izračunata je između gena G ovih grupa, te je iznosila 47,4 - 51,6% na nukleotidnoj razini, a za sekvence gena SH izračunata je očuvanost od 65,4 - 67%.

Tablica 30. Očuvanost nukleotidne i aminokiselinske sekvence između gena F, G i SH sojeva iz ove studije.

Gen	Podgrupa	nukleotidna (aminokiselinska) očuvanost (%)				
		A2a	A2b	A2c	B1	B2
F	A2a	99,8 (99,8)				
	A2b	95,9 (99,1)	99,8 (100)			
	A2c	94,9 (99,1)	95,6 (99,8)	98,3 (99,8)		
	B1	82,0 (94,3)	81,7 (93,9)	81,3 (93,9)	96,5 (99,4)	
	B2	82,3 (93,5)	82,3 (93,1)	82,0 (93,1)	91,1 (97,2)	98,8 (99,3)
G	A2a	98,6 (98,6)				
	A2b	85,8 (77,2)	99,3 (98,6)			
	A2c	85,6 (76,3)	85,2 (75,8)	93,9 (90,9)		
	B1	50,4 (29,9)	48,0 (28,2)	47,4 (26,6)	86,8 (80,5)	
	B2	51,6 (30,9)	49,9 (30,5)	48,6 (30,5)	69,2 (56,8)	93,3 (89,3)
SH	A2a	99,4 (98,9)				
	A2b	90,4 (89,6)	99,8 (100)			
	A2c	87,3 (86,9)	93,1 (91,8)	94,8 (94,0)		
	B1	66,1 (58,9)	66,5 (59,5)	65,4 (56,8)	96,1 (96,1)	
	B2	67,0 (61,1)	66,1 (60,0)	65,4 (58,9)	84,8 (82,5)	97,9 (97,8)

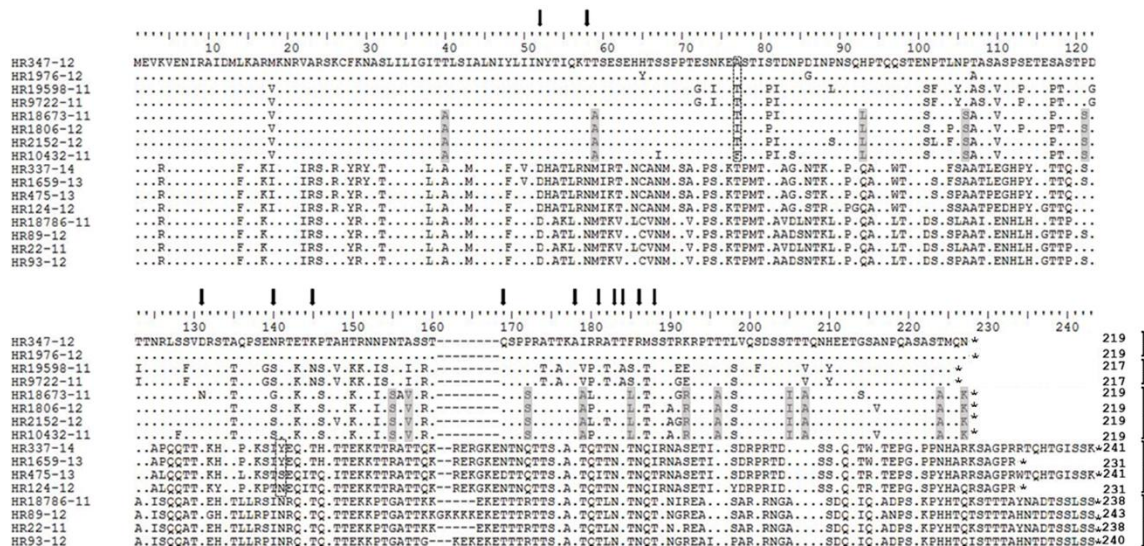
4.5.2.2 Analiza aminokiselinskih sekvenci

Za protein F je između grupe A i B vrijednost očuvanosti aminokiselinske sekvence iznosila 93,1 - 94,3%, dok je niža vrijednost izračunata između proteina G ovih grupa (26,6 - 30,5%). Analizom sekvenci proteina SH između grupa izračunata je očuvanost od 56,8-61,1% (tablica 30).

Svi analizirani proteini F bili su duljine 539 aminokiselina. Predviđena su 3 potencijalna mjesta N-glikozilacije, na pozicijama 57, 172 i 353, koja su bila očuvana u svim analiziranim uzorcima. Unutar grupe A predviđeno je samo jedno mjesto O-glikozilacije: u sojevima A2a na poziciji 364, odnosno poziciji 444 u sojevima A2c, dok je u sojevima grupe B predviđeno 1-3 potencijalnih mjesta glikozilacije (pozicije 85, 232, 364 i 521). Pronađene su ukupno 24 razlike između dviju glavnih grupa, a analizom selektivnog pritiska izračunata je srednja vrijednost dN/dS od 0,042, te su mnoga mjesta bila negativno selektirana.

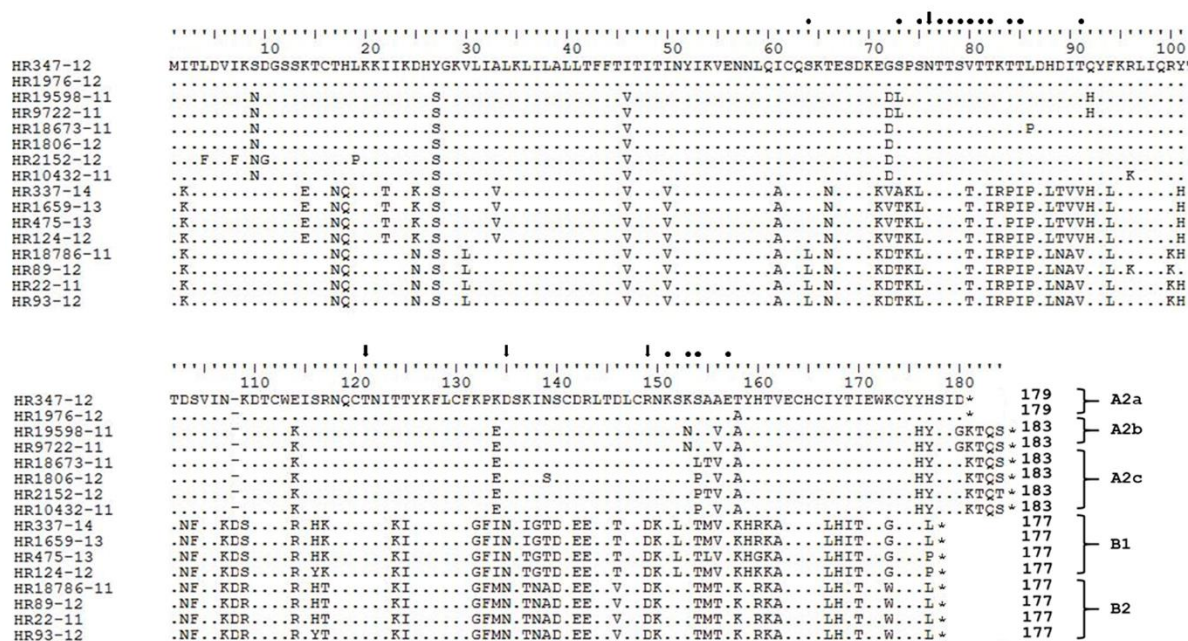
Proteini G sojeva iz ove studije bili su vrlo varijabilni, čak i unutar podgrupa, a ukupno je uočeno 7 različitih duljina G proteina uočeno (slika 40). Većina promjena koncentrirana je u izvanstaničnoj domeni proteina, dok su unutarstanična (aminokiseline 1-32) i transmembranska regija (aminokiseline 33-51) (Ishiguro i sur., 2004) bile visoko očuvane (slika 40). Zbog velikog broja serina i treonina, više od 40 pozicija je predviđeno kao O-glikozilirano, za razliku od potencijalnih N-glikoziliranih mjesta, koja su se razlikovala ovisno o podgrupi (slika 40).

Na slici 40 vidljive su aminokiselinske promjene u proteinu G koje su bile specifične za pojedine podgrupe i podklastera, a svi sojevi novodetektiranog podklastera A2c imali su 16 specifičnih supstitucija na temelju kojih su se razlikovali od sojeva A2a i A2b (slika 40). Analizom selektivnog pritiska unutar grupe A samo je jedan kodon (na poziciji 77) bio pozitivno selektiran, a ukupni dN/dS iznosio je 0,54. Za podgrupu B1 izračunat je sličan dN/dS od 0,58, te je također za jedan kodon predviđeno djelovanje pozitivne selekcije (pozicija 141, slika 40). Najviši dN/dS (0,91) izračunat je za sojeve podgrupe B2, iako niti jedno pozitivno selektirano mjesto nije predviđeno u ovoj podgrupi.



Slika 40. Aminokiselinsko sravnjenje proteina G sojeva HMPV prikazanih u odnosu na soj HR347-12. Iste aminokiseline naznačene su točkama, crtice označavaju praznine u sravnjenju nastale zbog nukleotidnih insercija, a zvjezdica označava stop kodon. Naznačena je pripadnost pojedinoj podgrupi, te duljina proteina G za svaki soj. Pozitivna selekcija naznačena je isprekidanim pravokutnikom, potencijalna N-glikozilacijska mjesta su naznačena strelicom, a aminokiseline specifične za A2c su osjenčane.

Kod proteina SH uočene su ukupno 3 različite duljine, ovisno o pripadnosti pojedinoj podgrupi: 179 aminokiselina u podklasteru A2a, 183 aminokiselina u podklasterima A2b i A2c, te 177 aminokiselina za sve sojeve grupe B (slika 41). Šest sojeva grupe A (2 iz podklastera A2b i 4 iz podklastera A2c) sadržavali su dodatni uzvodni kodon ATG, koji se nalazio 8-10 nukleotida prije start kodona proteina SH. U izvanstaničnoj domeni bila su predviđena do 4 potencijalna N-glikozilirana mjesta (pozicije 76, 121, 135 i 149) od kojih je mjesto 76 bilo očuvano u svim sojevima (slika 41). Sojevi grupe A imali su 10-13 potencijalnih mjesta O-glikozilacije, a sojevi grupe B samo 4-6 (slika 41). Ova potencijalna mjesta glikozilacije su koncentrirana unutar pozicija 64-81 za grupu B, te 73-157 za sojeve grupe A (slika 41).

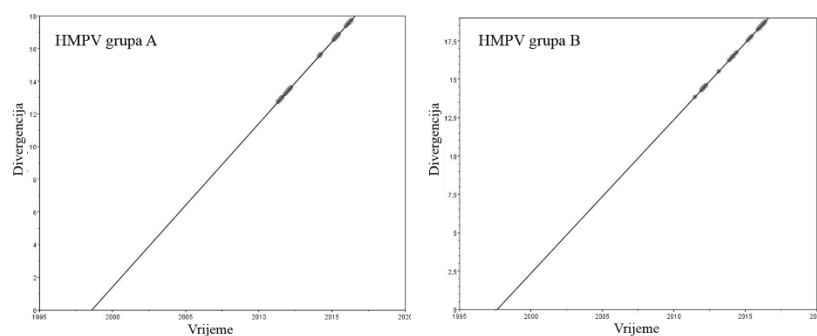


Slika 41. Aminokiselinsko sravnjenje proteina SH sojeva HMPV prikazanih u odnosu na soj HR347-12. Iste aminokiseline naznačene su točkama, crtice označavaju praznine u sravnjenju nastale zbog nukleotidnih insercija, a zvjezdica označava stop kodon. Naznačena je pripadnost pojedinoj podgrupi, te duljina proteina SH za svaki soj. Pozitivna selekcija naznačena je isprekidanim pravokutnikom, potencijalna N-glikozilacijska mjesta su naznačena strelicom, a točkicama iznad sravnjenja prikazana su potencijalna mjesta O-glikozilacije.

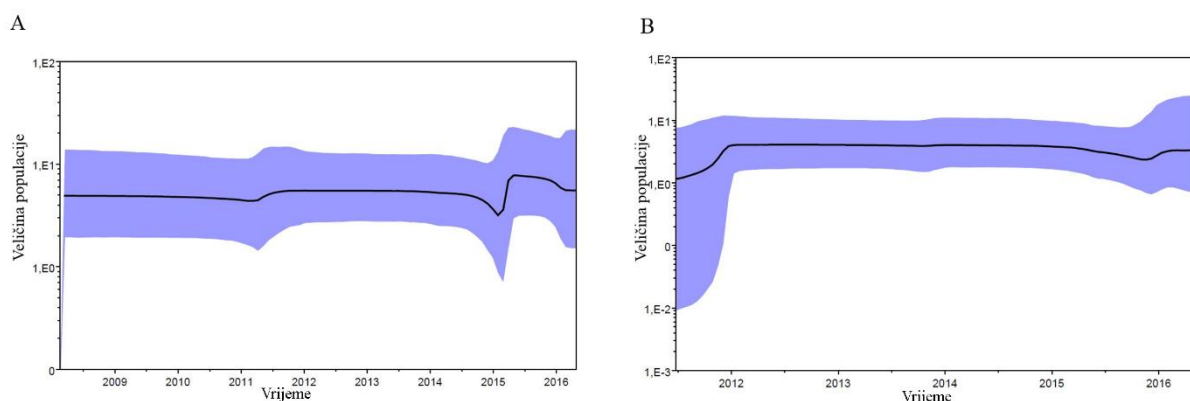
4.5.3 Dinamika populacije

U filodinamičku analizu uključeno je svih 99 uzoraka grupe A, te 80 uzoraka grupe B kojima je određena sekvenca fragmenta gena F. Sekvence su podvrgnute testiranju vremenskog signala, te je dobivena pozitivna korelacija između vremenskog intervala i genskih promjena (slika 42). Daljnjim analizama određena je stopa supstitucije i TMRCA koji su određeni pod pretpostavkom relaksiranog molekularnog sata, a za procjenu genske raznolikosti populacije tijekom vremena korištena je metoda Bayesian skyline plot u programu Beast verzija 1.8.2. Stopa supstitucije u grupi A iznosila je $2,48 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $1,41 \times 10^{-3} - 3,54 \times 10^{-3}$), dok je TMRCA ovih uzoraka izračunato u prvoj polovici 2001. godine (95%-tni HPD 1992 - 2008). Stopa supstitucije u grupi B iznosila je $4,72 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $2,35 \times 10^{-3} - 7,03 \times 10^{-3}$), a TMRCA ovih uzoraka procijenjeno je u drugoj polovici 2008. godine (95%-tni HPD 2001 - 2011). Tijekom promatranog perioda jedine promjene u veličini virusne populacije primijećene su u grupi A

(slika 43a): krajem 2014. godine zamijećen je blaži pad heterogenosti virusne populacije, nakon čega je uslijedio porast populacije. Unutar grupe B virusna populacija je bila relativno konstantne veličine tijekom cijelog promatranog perioda (slika 43b).



Slika 42. Regresija genskih udaljenosti (od korijena stabla do svih završetaka) u odnosu na vrijeme uzorkovanja za fragment gena F uzoraka HMPV grupe A (lijevo) i grupe B (desno).



Slika 43. Demografska povijest HMPV-a grupe A (a) i grupe B (b) prikazana pomoću metode Bayesian skyline plot koji je izrađen analizom fragmenta F duljine 473 nukleotida. Crna crta predstavlja srednju vrijednost, a plava površina označava 95%-tni HPD. U oba slučaja je analiza provedena tijekom 20×10^7 MCMC koraka, te relaksiranim molekularnim satom.

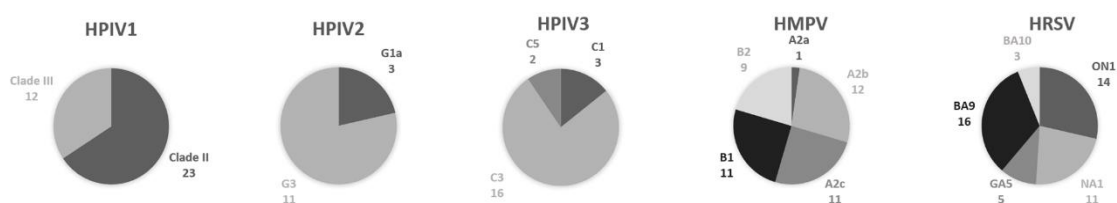
4.6 Analiza proteina M porodica *Paramyxoviridae* i *Pneumoviridae*

S obzirom na centralnu ulogu proteina M u životnom ciklusu paramiksovirusa i pneumovirusa, ispitane su molekularne karakteristike ovog proteina u virusima odabranim na temelju filogenetskih analiza provedenih u ovoj studiji, s ciljem usporedbe slijedova ovog visoko očuvanog proteina sa razlikama koje su uočene analizom drugih virusnih gena.

U ovu analizu uključeno je 35 uzoraka HPIV1, 14 uzoraka HPIV2, te 21 uzorak HPIV3, na način da odabrani uzorci predstavljaju sve genotipove i klade koje su određene prethodnim analizama gena F ili HN. Broj sojeva svakog genotipa i klade koji su uključeni prikazan je na slici 44.

Ukupno je 44 uzoraka HMPV odabrano za ovu analizu, od kojih je 24 uzorka predstavljalo grupu A, te 20 uzoraka grupu B. Za analizu gena M HRSV-a odabrano je 30 sojeva HRSV grupe A, te 19 sojeva grupe B. Za HRSV su dodatno uključeni uzorci sakupljeni tijekom 2006.–2008. godine u Hrvatskoj (Forcic i sur., 2012).

Analizirani geni M se u banci gena GenBank nalaze pod pristupnim brojevima MF166662 - MF166637 za HPIV1, MF133335 - MF133348 za HPIV2, MF166670 - MF166674 za HPIV3, MF104588 - MF104624 za HMPV te MF104625 - MF104671 za HRSV.

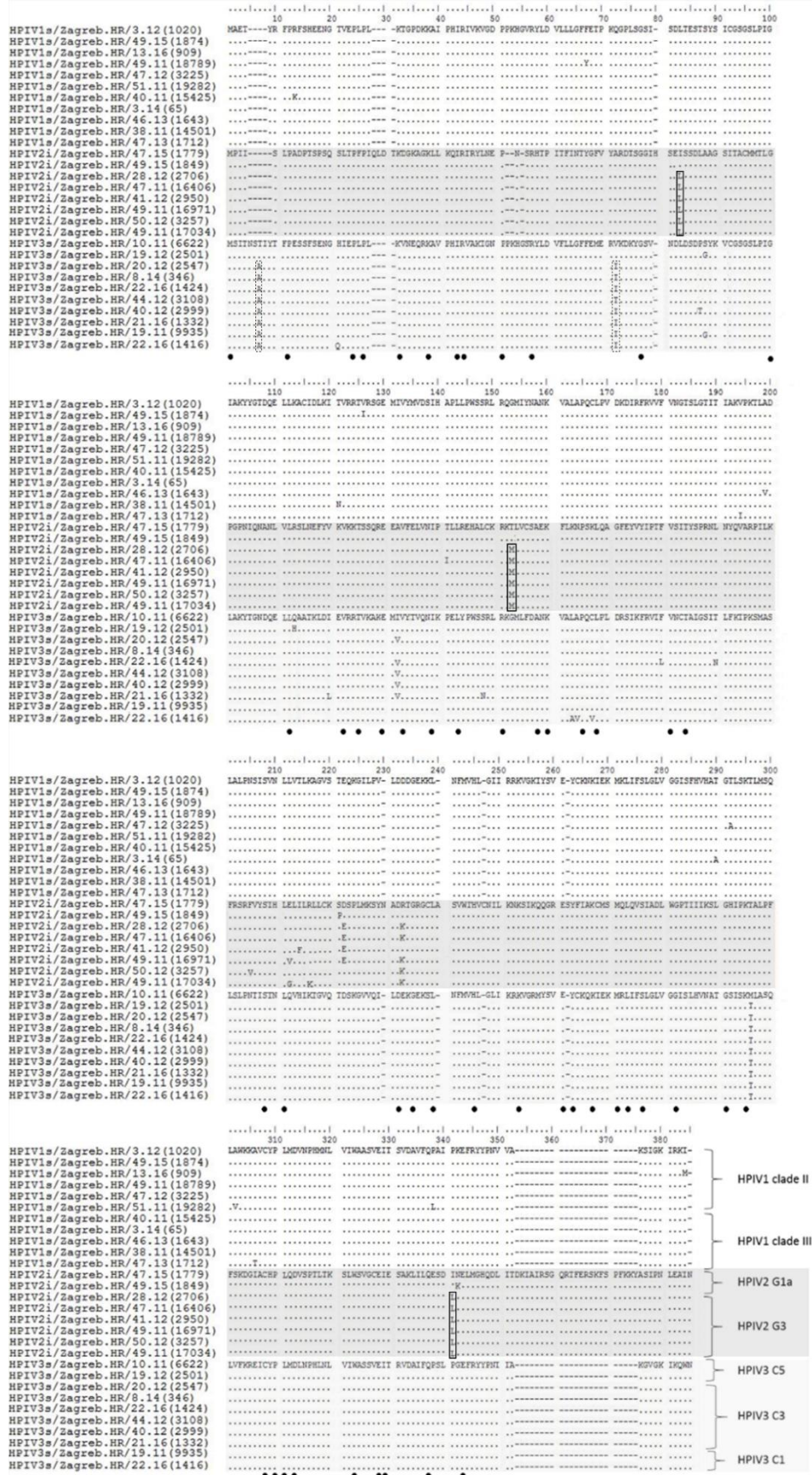


Slika 44. Broj sojeva svakog genotipa i klade uključenih za analizu gena M.

4.6.1 Varijabilnost proteina M sojeva HPIV

Od 35 uzoraka HPIV1, čak 28 gena M imalo je jedinstvenu kodirajuću sekvencu, rezultirajući s ukupno 11 različitih proteina (slika 45). Unatoč manjem broju HPIV2 uzoraka, te visokoj razini očuvanosti gena M (tablica 31), niti jedan odabrani uzorak nije imao istovjetnu nukleotidnu sekvencu, a ukupno je uočeno 8 različitih proteina M (slika 45). Za proteine M uzoraka HPIV3 izračunata je niža razina nukleotidne očuvanosti (tablica 31), te je čak 20 od 21 gena M imalo jedinstvenu sekvencu, rezultirajući s ukupno 10 različitih proteina (slika 45). Uočene amonokiselinske razlike mogle su se povezati s pripadnošću u različite podgrupe u slučaju HPIV2 i HPIV3 (slika 45), dok takav obrazac nije uočen u slučaju HPIV1. Izračunate vrijednosti dN/dS bile su niske za sva tri serotipa (tablica 31), sugerirajući da su supstitucije u ovom genu nepoželjne te se brzo uklanjaju iz populacije. Također, većina uočenih aminokiselinskih supstitucija uključivala je promjene unutar istih aminokiselinskih grupa (s obzirom na bočni ogranak). Iako su proteini M unutar svakog serotipa bili visoko očuvani, između virusa je očuvanost iznosila svega 15%: samo 52 pozicije su bile potpuno očuvane (slika

45), koje su unutar sravnjenja bile nasumično raspoređene. Najvišu razinu očuvanosti od 60% sadržavali su proteini M između HPIV1 i HPIV3, dok ta razina iznosi 22% kada se usporedi svaki od ovih serotipova s HPIV2. Virusi HPIV2 imali su najdulji protein M (377 aminokiselina), dok je duljina proteina M kod HPIV3 i HPIV1 353, odnosno 348 aminokiselina.



Slika 45. Svrnjenje proteina M HPIV-a.

Slika 45. (nastavak) Svravnjenje je prikazano u odnosu na soj HPIV1s/Zagreb.HR/3.12(1020). Sojevi HPIV2 prikazani su u odnosu na HPIV2i/Zagreb.HR/47.15(1779), te osjenčani tamnijom sivom bojom, a HPIV3 sojevi u odnosu na HPIV3s/Zagreb.HR/10.11(6622), te osjenčani svjetlijom sivom bojom. Iste aminokiseline naznačene su točkama, a crtice označavaju praznine u svrnjenju koje odgovaraju nukleotidnim insercijama. Naznačena je pripadnost pojedinoj podgrupi, a pozicije očuvane u svim sojevima su naznačene crnim točkama ispod svrnjenja.

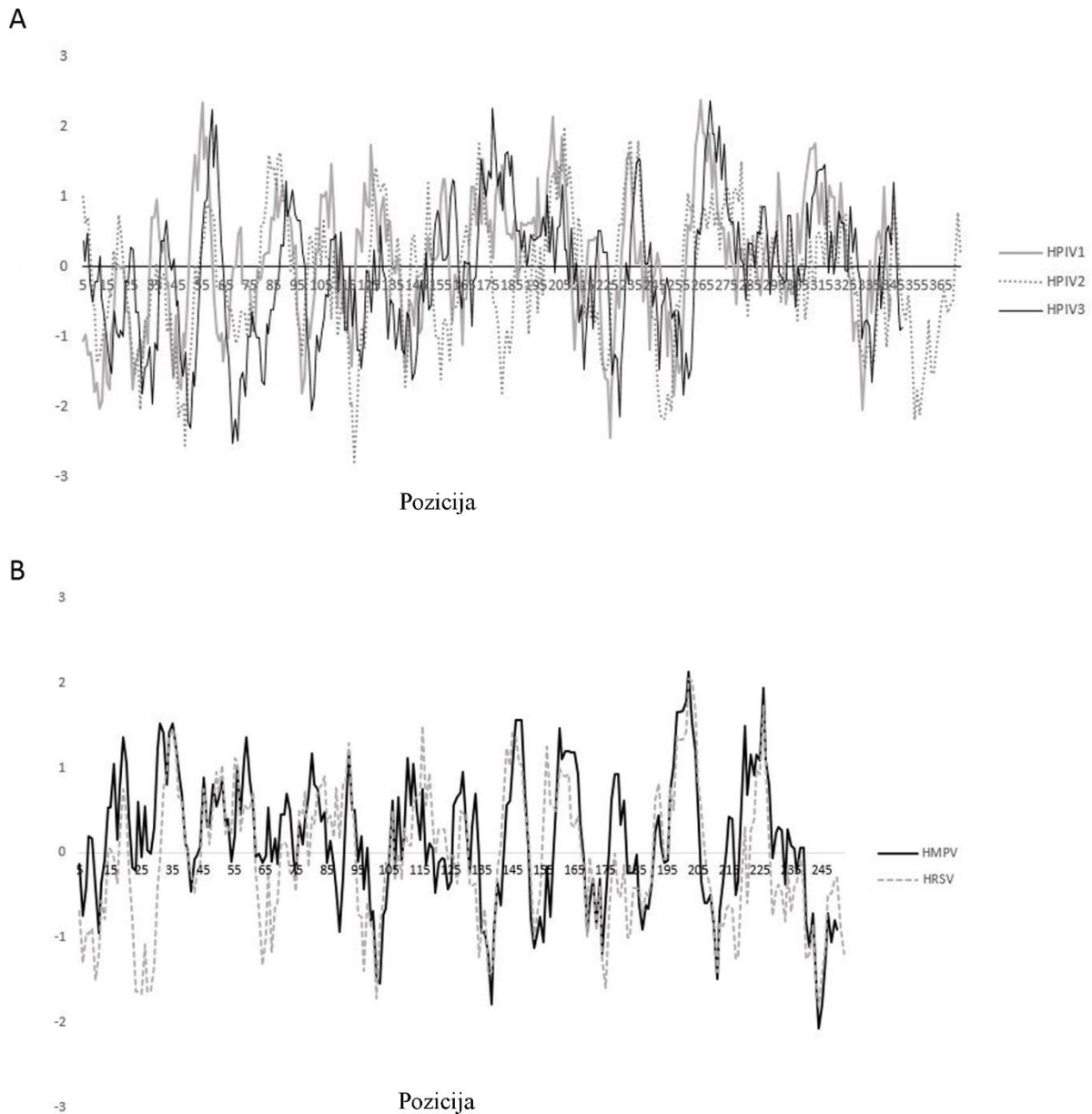
Tablica 31. Nukleotidna i aminokiselinska očuvanost gena i proteina M paramiksovirusa i pneumovirusa uključenih u ovu studiju.

Virus	Nukleotidna očuvanost, %	Aminokiselinska očuvanost, %	dN/dS
HPIV1	90,1	96,5	0,047
HPIV2	90,5	96,8	0,084
HPIV3	86,8	95,7	0,069
HMPV	73,9	96,4	0,011
HRSV	72,2	91,0	0,05

Kako bi se ispitala hidrofobna i hidrofilna svojstva proteina M izrađen je Kyte-Doolittleov profil na temelju konsenzus proteinske sekvence svakog virusa. Slična svojstva primijećena su za sva tri HPIV-a, s brojnim hidrofobnim ostacima i kontinuiranim hidrofilnim dijelovima; jedina iznimka bili su hidrofilni ostaci smješteni na C-terminalni kraj proteina M koje sadrže samo sojevi HPIV2 (slika 45, slika 46a).

Kako bi se otkrile očuvane regije proteina M sva tri HPIV-a, izračunata je vrijednost Shannonove entropije za svaku poziciju svrnjenja; iznimka su bile pozicije koje sadrže praznine u svrnjenju, s obzirom da bi se one tretirale kao dodatno stanje kojemu bi se dodijelila viša razina vrijednosti entropije. Izračunate vrijednosti entropije iznosile su od 0 -1,137, a najviša vrijednost izračunata je za poziciju 72, gdje su prisutne četiri različite aminokiseline (slika 45). U skladu s izračunatom visokom razinom varijabilnosti proteina M za HPIV, za

manjinu pozicija je izračunata niska razina varijabilnosti, dok je čak 91 od 385 pozicija imalo vrijednosti entropije višu od 1.



Slika 46. Kyte-Doolittleov profil hidrofobnosti proteina M sojeva HPIV1-3 (a); sojevi HMPV i HRSV (b). Profil je kreiran pomoću ExPASy ProtScale alata (<http://web.expasy.org/protscale>). Na osi apscise prikazana je vrijednost hidropatičnosti: hidrofilni ostaci poprimaju negativnu vrijednost, a hidrofobni ostaci pozitivnu.

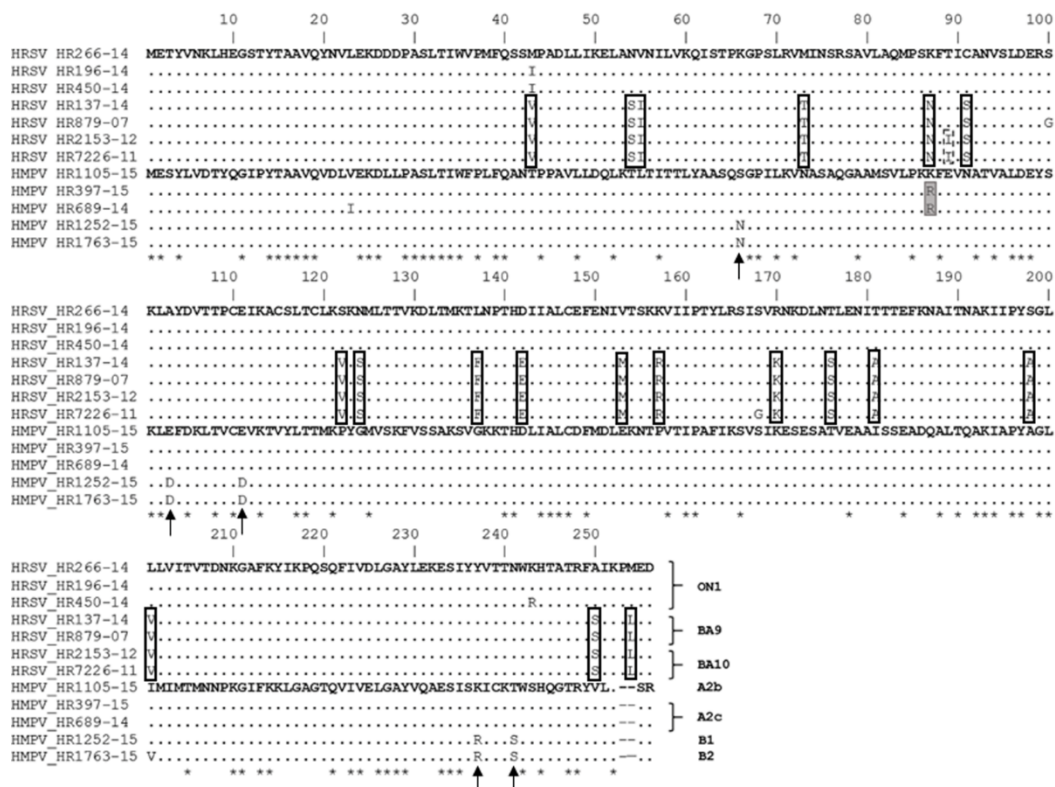
4.6.2 Varijabilnost proteina M sojeva HMPV i HRSV

U usporedbi s HPIV, kod HMPV-a je pokazana viša razina raznolikosti gena M: 37 od 44 analiziranih sekvenci bilo je jedinstvenog nukleotidnog slijeda, te je očuvanost među genima iznosila 73% (tablica 31). Kada je analizirana samo kodirajuća regija, očuvanost je porasla na 77%. Ova varijabilnost nije se reflektirala na aminokiselinskoj razini; protein M bio je visoko očuvan, rezultirajući s 5 različitih proteinskih sekvenci (slika 47), a očuvanost aminokiselina bila je usporediva s izračunima za proteine M uzoraka HPIV (tablica 31). Stoga je većina supstitucija bila sinonimnog karaktera, s vrlo niskim ukupnim dN/dS (tablica 31). Unatoč tome, supstitucije su bile specifične za grupu A i B, a jedna supstitucija razlikovala je podklaster A2c i A2b (pozicija 87, slika 47). S obzirom da je jedini uzorak koji je predstavljao podklaster A2a (HR347-12) imao sekvencu proteina M istovjetnu uzorku HR1105-15, koji predstavlja podklaster A2b, pretpostavka je da je ova supstitucija specifična za A2c.

Jedan uzorak grupe A (HR347-12, pristupni broj MF104612) imao je inserciju od 8 nukleotida u 3' netranslatiranoj regiji, sa slijedom AAAGAGGG. Ovaj uzorak je jedini uzorak podklastera A2a uključen u ovu studiju, a pretragom banke gena GenBank nije pronađena niti jedna sekvenca koja je imala ovakav insert u genu M.

Slična razina varijabilnosti izračunata je za gen M HRSV-a, iako je gen M različitih duljina u grupi A i B (963 nukleotida u grupi A i 1047 nukleotida u grupi B). Od 49 uzoraka, ukupno je 47 uzoraka imalo jedinstven nukleotidni slijed gena M s razinom očuvanosti od 72%, te više razlika prema 3' kraju gena. Unatoč tome, samo 7 uzoraka imalo je jedinstvenu aminokiselinsku sekvencu, a izračunati dN/dS iznosio je 0,05 (tablica 31). Uočene promjene razlikovale su grupe A i B, a pozicija 89 razlikovala je dva genotipa grupe B (slika 47).

Unutar ove porodice ukupno je 91 pozicija bila očuvana u svim analiziranim sojevima (35,8%, slika 47). Visoka varijabilnost između proteina M ovih blisko srodnih virusa pokazana je i izračunom Shannonove entropije: 15 od 256 pozicija imalo je vrijednost entropije višu od 1. Izračunate vrijednosti entropije iznosile su od 0 - 1,24, a najviša vrijednost izračunata je za poziciju 43, gdje su prisutne četiri različite aminokiseline (slika 47). Ova pozicija nalazi se između β -ploče i α -uzvojnice (Leyrat i sur., 2014). Slična svojstva proteina M pokazana su pomoću Kyte-Doolittleovog profila na temelju konsenzus proteinske sekvence oba virusa (slika 46b).



Slika 47. Svravnjenje proteina M pneumovirusa, prikazano u odnosu na soj HRSV HR266-14. Sojevi HMPV prikazani su u odnosu na HMPV HR1105-15. Iste aminokiseline naznačene su točkama, crtice označavaju praznine u svrnjenju koje odgovaraju nukleotidnim insercijama, a pozicije očuvane u svim sojevima su naznačene zvjezdicama ispod svrnjenja. Pripadnost genotipu naznačena je na kraju svrnjenja, aminokiselinske supstitucije specifične za HRSV grupu B su naznačene pravokutnikom, dok su supstitucije koje razlikuju HMPV grupe A i B naznačene strelicama ispod svrnjenja. Aminokiselina jedinstvena za podklaster A2c je osjenčana, a isprekidanim pravokutnikom su naznačene supstitucije karakteristične za genotip BA9.

5. DISKUSIJA

Za uspješnu kontrolu infektivnih bolesti važan je konstantni nadzor i analiza odgovarajućih epidemioloških svojstava, poput dinamike populacije, genetike i molekularne evolucije patogena, u čemu uvelike pomažu nove filodinamičke metode koje omogućavaju ispitivanje ovih svojstava (Shiino, 2012). Molekularno-epidemiološke analize važne su za praćenje širenja virusa u populaciji i određivanje značaja infekcija uzrokovanih tim virusom, čime je poboljšán nadzor epidemija i prevencija virusnih oboljenja (Wohl i sur., 2016). Ove metode uključuju karakterizaciju sojeva ili tipova virusa koji cirkuliraju u populaciji, uslijed spoznaje da na razvoj i širenje bolesti utječu kompleksni odnosi između genotipa patogena i karakteristika domaćina (Metcalf i sur., 2015).

U ovoj studiji istražena je molekularna evolucija virusa iz porodica *Paramyxoviridae* i *Pneumoviridae* na području Zagreba tijekom nekoliko uzastopnih godina (2011.-2016.), koji su odgovorni za akutne respiratorne bolesti u pedijatrijskoj populaciji. Za ove viruse ne postoji odobreno cjepivo niti antivirusni tretman, te se zaštita temelji na predviđanju epidemija u svrhu preventivnog djelovanja. Epidemiologija HRSV-a i HMPV-a u Hrvatskoj prati se već dugi niz godina (Forcic i sur., 2012; Ljubin-Sternak i sur., 2014; Ljubin-Sternak i sur., 2008; Mlinaric-Galinovic i sur., 2008), tijekom kojih su definirani obrasci cirkulacije virusa na ovim prostorima. Međutim u prethodnim istraživanjima manja je važnost pridana detaljnim molekularno-epidemiološkim analizama, te je značaj ove studije u implementaciji novih bioinformatičkih metoda koje povezuju klasičnu epidemiologiju s uočenom genskom raznolikošću. Za razliku od pneumovirusa, molekularna epidemiologija HPIV1-3 u Hrvatskoj nije poznata, te su analize provedene u ovoj studiji temelj praćenja širenja HPIV-a u Hrvatskoj. Također, uslijed manjeg broja infekcija uzrokovanih ovim virusima, molekularno-epidemiološke studije ovih virusa su izuzetno rijetke ne samo za europsko područje, već i na globalnoj razini. Stoga rezultati ove studije doprinose poznavanju obrazaca cirkulacije virusa kao i boljem razumijevanju molekularne epidemiologije, s krajnjim ciljem razvoja efektivnih terapijskih ili preventivnih metoda. S obzirom da su u ovoj studiji analizirani samo virusi koji su uzrokovali simptomatska oboljenja, odnosno klinički uzorci uzeti od pacijenta hospitaliziranih uslijed respiratornih bolesti, u ovom kontekstu rezultati predstavljaju epidemiologiju ovih virusa u oboljeloj populaciji.

5.1 Molekularna epidemiologija HPIV1

U ovoj studiji molekularno je analizirano 55 kliničkih uzoraka sakupljenih od siječnja 2011. godine do ožujka 2016. godine. Iako su neki od uzoraka dali jaki signal u testiranju DFA produkt PCR nije bilo moguće dobiti, vjerojatno uslijed neadekvatnog čuvanja uzoraka čime se uništava virusna čestica te degradira virusna RNA (Relova i sur., 2018). Uočena je sezonska pojavnost infekcija s HPIV1, a epidemiološki vrhunac uključivao je period od rujna do veljače. Iako uzorci uključeni u ovu studiju pokrivaju relativno kratak vremenski period, uočeno je da se epidemije događaju svake druge godine, s početkom tijekom jesenskih mjeseci neparnih godina. Ovaj epidemiološki obrazac istovjetan je obrascima koji su već definirani za HPIV1 epidemije temeljem praćenja duži niz godina u Sjedinjenim Američkim Državama (Fry i sur., 2006), Tajlandu (Morgan i sur., 2013), Južnoj Americi (Villaran i sur., 2014) i Kini (Wang i sur., 2015).

Genotipizacija HPIV1 nije standardizirana, odnosno ne zasniva se na određivanju te usporedbi sekvenci točno određenog dijela genoma, kao što je to definirano za neke druge paramiksovirus, poput virusa ospica (WHO, 2012) i virusa zaušnjaka (Jin i sur., 2015). U dosadašnjim molekularno-epidemiološkim studijama korišten je kompletni gen HN za genotipizaciju (Beck i sur., 2012; Henrickson i Savatski, 1997; Mizuta i sur., 2011), a također se i većina sekvenci HPIV1 dostupnih u banci gena GenBank odnosi na sekvence gena HN, što je bio dodatni razlog odabira ovog gena za analizu. Međutim, s obzirom na uobičajeno male volumene kliničkih uzoraka te ograničenjima predstavljenim metodama klasičnog sekvenciranja, nametnuta je potreba arbitrarnog određivanja regije pogodne za genotipizaciju. Za molekularnu detekciju je odabran fragment gena HN koji kodira za izvanstanični dio proteina HN (Beck i sur., 2012; Henrickson i Savatski, 1997), analogno korištenju izvanstaničnih domena površinskih glikoproteina za genotipizaciju HMPV-a (Boivin i sur., 2002; van den Hoogen i sur., 2002) i HRSV-a (Johnson i sur., 1987b; Peret i sur., 1998).

Na temelju topologije filogenetskih stabala sojevi iz ove studije jasno su raspoređeni u dvije glavne grane filogenetskog stabla, koje predstavljaju kladu II i kladu III određene na temelju kompletnih gena HN (Beck i sur., 2012). Uočena topologija provjerena je i konstrukcijom filogenetskog stabla pomoću kompletnog gena HN, čime su potvrđeni rezultati dobiveni na temelju manjeg fragmenta gena HN. Na temelju filogenetske analize pokazana je neovisnost ciklirajućih sojeva o geografskoj lokaciji, a također je uočena različita raspodjela predominantnih klada ovisno o sezoni epidemije, što u dosadašnjim studijama HPIV1 nije

uočeno (Beck i sur., 2012; Mizuta i sur., 2011). Međutim za potvrdu smjene dominantnih klada trebalo bi obuhvatiti barem još jednu epidemiološku sezonu. Vremenski ovisna smjena dominantnih grupa poznata je za virus HRSV-a, gdje glavne grupe čine dvije antigenski različite skupine, te se njihova smjena djelomično objašnjava razvojem specifičnog imunološkog odgovora na grupu prevladavajućih virusa (Cane i sur., 1999; Rebuffo-Scheer i sur., 2011).

Filodinamičkim analizama nisu uočene značajnije fluktuacije u veličini virusne populacije, a procijenjena stopa supstitucije iznosila je $2,39 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $1,27 \times 10^{-3}$ - $3,61 \times 10^{-3}$), što je više nego stopa procijenjena u prijašnjim studijama na temelju cijelog gena HN, koja iznosi $7,68 \times 10^{-4}$ supstitucija/mjesto/godina (Katsumi Mizuta i sur., 2011). Osim što su za procjenu ovih stopa korištene dvije različite metode, izračunata stopa supstitucije u ovoj studiji je procijenjena na temelju manjeg dijela gena HN, te je u rangu stopa supstitucije drugih RNA virusa (Sanjuan i sur., 2010).

Iz literature je poznato da zamjena jedne aminokiseline u HPIV1 proteinima može značajno utjecati na biološke značajke ovih virusa, poput mutacije A242L u proteinu HN koja uzrokuje povećanu fuziju sa ciljnim stanicama (Bousse i sur., 1995), te mutacija E170G u proteinu F koja utječe na povećano formiranje sincicija (Takaguchi i sur., 2011). Očuvani citoplazmatski dio proteina HN uključuje slijed 10-SYWST-14, te je pokazano da je ovaj slijed nužan za pakiranje proteina HN u virione Sendai virusa (Takimoto i sur., 1998). U jednom uzorku (HR/3.12(1022), KT336342) pronađena je promjena u ovom slijedu, gdje je serin na prvom mjestu zamijenjen prolinom. Utjecaj ove promjene na sklapanje virusnih čestica trebalo bi ispitati daljnjim funkcionalnim analizama. Također je poznata regija 538-TYTLE-542 koja je prisutna u citoplazmatskom dijelu proteina F u HPIV1 i Sendai virusu (Stone i Takimoto, 2013); kod svih uzoraka iz ove studije je treonin na prvom mjestu zamijenjen alaninom. Analizom proteina F uzoraka iz ove studije otkrivene su dvije aminokiselinske promjene unutar citoplazmatske regije (na poziciji 526 i 546) koje su bile specifične za uzorke klade III. Utjecaj ovih promjena na akumulaciju virusnih komponenti nužnih za sklapanje virusnih čestica predmet je daljnjih istraživanja.

Glikozilacija površinskih proteina dovodi se u vezu s mehanizmima izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina (Palomo i sur., 1991; Sommerstein i sur., 2015). U ovoj studiji je pokazano da proteini HN HPIV1 posjeduju specifične obrasce glikozilacije ovisno o tome kojoj kladi pripadaju uzorci. S obzirom da varijacija u glikozilaciji može utjecati na

modulaciju virusnih epitopa, te posljedično na prepoznavanje tih mjesta pomoću protutijela (Tate i sur., 2014), ovi podaci mogli bi se koristiti u kontekstu predviđanja utjecaja promjene glikozilacije na virulenciju i imunološki odgovor, što je od posebne važnosti prilikom dizajna cjepiva.

Prethodnim studijama pokazana je važnost duljine 5' nekodirajuće regije F gena u regulaciji transkripcije gena M i F (Bousse i sur., 2002), te je pokazano da skraćivanje ove regije rezultiralo efikasnijom terminacijom transkripcije gena M (Bousse i sur., 2002). U dva uzorka iz ove studije pronađena je insercija unutar ove regije, koja je također prisutna i u dva uzorka prijavljena u banku gena GenBank; svi uzorci pripadaju kladi III. U skladu s literaturnim podacima razina terminacije transkripcije kod ovih uzoraka je potencijalno smanjena, producirajući više vezanih transkripata koji se sastoje od gena M i F, nego u slučaju virusa s uobičajenom duljinom 5' nekodirajuće regije gena F. Ova pretpostavka trebala bi se razjasniti dodatnim studijama.

5.2 Molekularna epidemiologija HPIV2

Većina infekcija HPIV2 uzrokuje bolesti čiji su simptomi blaži nego u slučaju HPIV1 i HPIV3, stoga se liječi izvan bolničkog okruženja. Uslijed toga, manji je broj HPIV2 uzoraka koji je analiziran u ovoj studiji, odnosno u periodu od 2011. - 2015. godine molekularno je analizirano 18 uzoraka porijeklom iz pacijenata hospitaliziranih zbog respiratornih bolesti. Iako je analiziran mali broj uzoraka iz čega je teško zaključivati o genskoj varijaciji i evoluciji HPIV2 na razini cijele populacije, podaci dobiveni u ovoj studiji su od vrijednosti s obzirom na činjenicu da su studije evolucije i epidemiologije HPIV2 izuzetno rijetke.

Tijekom ovog perioda nije uočen jasan obrazac pojave epidemija HPIV2, međutim razlog može ležati u činjenici da je analiziran mali broj uzoraka, ali i činjenici da su uključeni samo hospitalizirani pacijenti. Većina uzoraka prikupljena je tijekom listopada i studenog, a ovaj obrazac već je primijećen u nekim studijama (Hall, 2001; Mizuta i sur., 2012), iako se u drugim studijama navode kolovoz i rujna kao mjeseci s najviše infekcija (Liu i sur., 2013; Yano i sur., 2014). Razlog oprečnih rezultata može biti zbog razlika u klimatskim uvjetima između regija gdje su studije provedene.

U prethodnim filogenetskim studijama koje su se zasnivale na kodirajućoj regiji gena HN identificirana su četiri klastera (G1-G4), s dodatnim podklasterima (Almajhdi i sur., 2012;

Terrier i sur., 2008). Rezultati ove studije u skladu su s tim literaturnim podacima, te dodatno pokazuju da je i gen F prikladan za filogenetske analize, te da su dulje sekvence prikladnije za dobivanje bolje rezolucije filogenetskog stabla u slučaju kada su sojevi vremenski i geografsko blisko vezani. Taj slučaj uočen je kod uzoraka koji su imali istovjetnu sekvencu u genu HN (izolati 2995 i 3257), ali su se razlikovali u sekvenci gena F. Zbog ove činjenice ne postoji fragment manje duljine koji bi se mogao koristiti za brzu klasifikaciju uzoraka HPIV2. Samo su dva izolata (16967 i 17034) imala istovjetnu sekvencu u oba analizirana gena, a s obzirom da su sakupljeni iz blizanaca s razmakom od 3 dana, vjerojatno predstavljaju identičan virus.

Općenito je niska razina varijabilnosti primijećena analizom oba gena, a najveća varijabilnost bila je između uzoraka klastera G3 i G1a. U klaster G1a pripadalo je samo 3 uzorka, te je prvi put detektiran 2014. godine. Nije poznato jesu li oba klastera cirkulirala neko vrijeme zajedno u populaciji bez detekcije klastera G1a, jer ne postoje podaci koji bi ukazivali na to da su sojevi koji pripadaju u dominantni klaster G3 više patogeni i češće uzrokuju hospitalizaciju te su iz tog su razloga češće detektirani kroz cijelu studiju. S obzirom na gensku udaljenost ova dva klastera (na temelju izračuna p-udaljenosti), te činjenicu da su oba uzorka iz 2015. godine pripadala u G1a klaster, vjerojatnije je da su ovi sojevi uneseni u populaciju. Daljnjim praćenjem epidemiologije HPIV2 u Hrvatskoj moći će se zaključivati o evoluciji novog klastera, odnosno hoće li oba klastera cirkulirati istovremeno u populaciji ili će klaster G1a smijeniti sojeve starog klastera.

Analizom glikozilacije pokazano je da je evolucija proteina F neovisna o mehanizmu izbjegavanja imunološkog odgovora pomoću mijenjanja obrazaca glikozilacije, s obzirom da su sva mjesta bila očuvana. U skladu s višom razinom očuvanosti proteina F nije predviđeno niti jedno mjesto kao pozitivno selektirano, za razliku od proteina HN kod kojega je pozicija 316 bila predviđena kao pozitivno selektiran kodon. Posebno je zanimljivo da je ta pozicija predviđena kao N-glikozilirana pozicija kod sojeva grupe G1a, što je još jedna potvrda različitosti ovih sojeva, ali i da je evolucija proteina HN ovisna o mehanizmima glikozilacije.

Važna regija u proteinu F uključuje aminokiseline od 103. do 108. pozicije koje su bitne za cijepanje i aktivaciju proteina F. U uzorcima klastera G1a je došlo do supstitucije Q104R, a u prijašnjim studijama pokazano je da supstitucija pozitivno nabijene aminokiseline (arginin) s nenabijenom polarnom aminokiselinom (glutamin) uzrokuje stvaranje više sincicija (Terrier i sur., 2008). Daljnjim studijama potrebno je ispitati utjecaj ove supstitucije na svojstva fuzije virusa. Također na svojstvo fuzije utječe supstitucija K105E, gdje virusi koji na ovoj poziciji

imaju glutamin zahtijevaju dodatak tripsina za indukciju citopatogenog efekta prilikom rasta u kulturi (Bando i sur., 1991), stoga su svi uzorci u ovoj studiji izolirani dodatkom tripsina.

U ovoj studiji je procijenjena slična stopa supstitucije za oba gena: za gen HN stopa je iznosila $1,55 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $8,27 \times 10^{-4}$ - $2,26 \times 10^{-3}$), te $1,42 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $7,82 \times 10^{-4}$ - $2,22 \times 10^{-3}$) za gen F. Ova stopa supstitucije niža je od procijenjenih stopa supstitucije izračunatih za ostale viruse u ovoj studiji, te je najbližnja stopi supstitucije izračunatoj za uzorke HPIV3 u ovom istraživanju. Na temelju analize genske raznolikosti oba gena veličina populacije bila je konstantna do početka 2010. godine kada je zamijećen pad veličine populacije, nakon čega je u 2011. godini slijedio ponovni porast veličine populacije. S obzirom da je početak sakupljanja uzoraka tek 2011. godine, zamijećene fluktuacije na početku ovog perioda mogu se objasniti pogreškom metode, jer se u ovim intervalima veličina populacije procjenjuje iz manjeg broja sojeva (Ho i Shapiro, 2011). Nakon tog vremena rezultati su pokazali konstantan porast populacije, te veće fluktuacije nisu primijećene što je u skladu s rezultatima prethodnih analiza koje su sve pokazale visoku razinu očuvanosti gena F i HN ovih virusa.

5.3 Molekularna epidemiologija HPIV3

Ovom studijom molekularno je ispitano 166 uzoraka HPIV3 sakupljenih od 2011. do 2015. godine. Unatoč tome što je HPIV3 važan uzročnik respiratornih bolesti u pedijatrijskoj populaciji, malo je informacija o molekularnoj epidemiologiji ovog patogena u Europi, a dosadašnje studije odnose se na epidemiologiju u Španjolskoj (Godoy i sur., 2016). Većina uzoraka odnosila se na populaciju do 2 godine starosti što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Fry i sur., 2006; Godoy i sur., 2016; Goya i sur., 2016b; Villaran i sur., 2014). U većini slučajeva dijagnosticirana je infekcija gornjeg dijela dišnog sustava, u skladu sa studijom koju su proveli Mizuta i sur. (2014), međutim u drugim studijama se kao najčešći uzrok hospitalizacije pacijenata navodi upala pluća (Counihan i sur., 2001; Mao i sur., 2012).

Pozitivni uzorci detektirani su tijekom cijelog perioda, a u 2012., 2014. i 2015. godini uočene su dvije epidemije unutar jedne kalendarske godine, u proljeće i jesen. Svibanj i listopad određeni su kao epidemiološki vrhunci. U preostalim godinama analiziranog perioda uočena je samo jedna epidemija po godini. Rezultati ove studije nisu potpuno u skladu sa dosadašnjim istraživanjima u kojima je definirano da se epidemije HPIV3 događaju jednom godišnje, od svibnja do kolovoza (Fry i sur., 2006; Goya i sur., 2016b; Palermo i sur., 2007), međutim u

epidemiološkoj studiji HPIV3 virusa u Južnoj Americi je također primijećeno više od jednog epidemiološkog vrhunca u jednoj godini (Villaran i sur., 2014).

U prethodnim filogenetskim studijama koje su se bazirale na kodirajućoj regiji gena HN određene su genske udaljenosti pomoću kojih je definirana klasifikacija uzoraka HPIV3 (Almajhdi, 2015; Goya i sur., 2016b; Mao i sur., 2012), dok su filogenetske studije koje se zasnivaju na genu F rjeđe (Godoy i sur., 2016; Prinoski i sur., 1991). Koristeći pravila definirana za klasifikaciju na temelju gena HN, u ovoj studiji je za analizu korišten kraći fragment gena HN od 582 nukleotida prema istoj ideji provedenoj za uzorke HPIV1. Pokazano je da su topologija stabla i izračunate genske udaljenosti bili u skladu sa referentnom očekivanom topologijom. Ovi rezultati dodatno su provjereni i izradom filogenetskog stabla na temelju kompletnog gena HN, te je uočena samo jedna promjena. Uzorak HR/20.12(2547) na temelju cijelog gena HN svrstan je u podklaster C3a, a na temelju fragmenta gena HN u podklaster C5. S obzirom da je rekombinacija kod paramiksovirusa izuzetno rijedak slučaj (Lamb i Parks, 2013), pretpostavka je da je u slučaju ovog uzorka došlo do kontaminacije prilikom laboratorijskog rada. S obzirom da uzorak nije bio dostupan za ponovnu izolaciju, nedosljednost rezultata nije mogla biti provjerena. Prema ovim rezultatima odabrani fragment gena HN pogodan je za brze epidemiološke analize, s obzirom da se fragment može umnožiti u samo jednoj reakciji PCR, što je iznimno korisno u slučaju ograničene količine kliničkog uzorka.

Svi uzorci ove studije pripadali su klasteru C koji je najčešće detektiran klaster u nedavnim molekularnim studijama u Španjolskoj (Godoy i sur., 2016), Argentini (Goya i sur., 2016b) i Kini (Mao i sur., 2012). Tijekom analiziranog perioda podklaster C3 postao je dominantan, što je također u skladu s recentnim rezultatima u Španjolskoj (Godoy i sur., 2016) i Argentini (Goya i sur., 2016b).

Iako su nukleotidne razlike u genima F i HN bile raspodijeljene jednoliko kroz cijele gene, pokazano je da su aminokiselinske supstitucije bile ograničene na citoplazmatsku i transmembransku regiju. Promjene u domeni drška i globularnoj glavi proteina HN bile su rijetke te su pronađene u samo nekoliko uzoraka. U suprotnosti s rezultatima prema Godoy i sur. (2016), u ovoj studiji aminokiselinske promjene nisu jednoznačno razlikovale filogenetske podgrupe; specifične razlike u sekvenci proteina HN uočene su za podklastere C3b (promjena A13V), C2 (promjena H24N) i C5 (promjena F73L). Opsežnim analizama molekularnih karakteristika glikoproteina F i HN uzoraka iz ove studije i glikoproteina referentnih uzoraka HPIV3 pokazano je da su funkcionalna mjesta očuvana, unatoč vremenskoj i geografskoj

udaljenosti uzoraka. Ovi rezultati pokazuju vrlo očuvanu prirodu glikoproteina HPIV3. Aminokiselinske supstitucije koje bi potencijalno mogle utjecati na funkciju F i HN proteina su uočene u samo pet analiziranih uzoraka (KX467891, KX467893, KX467904, KX467905 i KX467896), te su predmet daljnjeg istraživanja.

Procijenjena stopa supstitucije na temelju fragmenta gena HN iznosila je $1,62 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (95%-tni HPD $1,13 \times 10^{-3}$ - $2,13 \times 10^{-3}$), što je u skladu sa izračunatom stopom od $1,10 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina prema rezultatima na temelju analize kompletnog gena HN (Mizuta i sur., 2014). Analizom genske raznolikosti tijekom promatranog perioda uočene su značajne fluktuacije u veličini virusne populacije: primijećen je nagli pad populacije 2011. godine, te ponovni porast koji je počeo 2012. godine, nakon čega su zamijećene promjene u veličini populacije, sve do druge polovice 2013. godine kada je virusna populacija počela rasti. Ove fluktuacije mogu se povezati sa smjenom dominacije sojeva detektiranih podklastera: sojevi podklastera C3 počeli su dominirati 2012. godine, dok se broj sojeva podklastera C1 smanjivao, što je također potvrđeno u nedavnom istraživanju dinamike sojeva HPIV3 u Japanu (Takahashi i sur., 2018).

5.4 Molekularna epidemiologija HRSV-a

Godišnje epidemije HRSV-om prisutne su globalno, a infekcije ovim virusom slijede sezonsku pojavnost. Tijekom analiziranog perioda primijećena je smjena jesenske i proljetne epidemije: u godinama 2012., 2014. i 2016. epidemiološki vrhunac uključivao je ožujak, dok je za godine 2012./2013., 2014./2015. najviše infekcija detektirano tijekom kasnih jesenskih i ranih zimskih mjeseci. Ovaj epidemiološki obrazac već je opisan u literaturi kao smjena malih (proljetnih) i velikih epidemija (zimskih) (Forcic i sur., 2012; Mlinaric-Galinovic i sur., 2008; Waris, 1991), te je hipoteza da početak školskih praznika prekida daljnje širenje HRSV-a nakon manje epidemije koja je prisutna u proljeće (Waris, 1991). Također je pokazano da su klimatski faktori (temperatura i vlažnost zraka) u korelaciji s brojem infekcija HRSV samo tijekom velikih zimskih epidemija, dok takva korelacija nije uočena tijekom proljetnih epidemija, što sugerira da je ciklus HRSV neovisan o meteorološkim uvjetima (Mlinaric-Galinovic i sur., 2008).

U ovoj studiji molekularno je ispitano 904 uzoraka, od čega je ukupno 767 uzoraka bilo pozitivno (84,8%). Negativni PCR rezultati mogu biti posljedica neadekvatnog čuvanja, s obzirom da je za HRSV poznato da je izuzetno termolabilan virus (Nunes i Moura, 2006).

Filogenetskom analizom pokazano je da sojevi HRSV koji cirkuliraju u Hrvatskoj pripadaju u ukupno 5 genotipova, te je pokazano da više genotipova može cirkulirati istovremeno tijekom jedne sezone. Također je uočena smjena dominantnih grupa HRSV; tijekom prve 3 godine najviše uzoraka pripadalo je grupi A, nakon čega je 2014. najviše uzoraka pripadalo grupi B. U zadnje dvije godine studije ponovno je primijećena dominacija sojeva grupe A. Ciklička smjena prevladavajućih HRSV grupa poznato je svojstvo ovog virusa, bilo kao dvogodišnja smjena grupa (Forcic i sur., 2012; Waris, 1991) ili smjena tijekom uzastopnih godina (Peret i sur., 1998), iako sojevi grupe A obično prevladavaju (Collins i Pollard, 2002; Tan i sur., 2013). Ova smjena potaknuta je antigenskim promjenama u proteinu G te omogućava izbjegavanje postojećih protutijela (Johnson i sur., 1987a; Sullender, 2000).

Na temelju filogenetske analize pokazano je da je u grupi A prevladavajući genotip tijekom prve tri godine studije bio NA1, koji je potpuno zamijenjen novim genotipom ON1 u narednoj godini kada niti jedan uzorak NA1 nije detektiran. Novi virusi ili nove antigenske varijante istog virusa mogu se brzo proširiti u populaciji te nadvladati postojeće sojeve, te uzrokovati veće epidemije zbog nedostatka imunološkog odgovora (Malasao i sur., 2015). Sličan epidemiološki obrazac slijedili su sojevi NA1 nakon prve detekcije, koji su se vrlo brzo globalno proširili (Cui i sur., 2013; Ohno i sur., 2013; Shobugawa i sur., 2009), kao i sojevi BA koji su smijenili druge genotipove grupe B unutar 4 godine nakon detekcije (Trento i sur., 2010). Trenutni epidemiološki podaci pokazuju da su sojevi ON1 još uspješniji u smjenjivanju sojeva NA1 (Kim i sur., 2014; Pierangeli i sur., 2014; Tabatabai i sur., 2014). S obzirom da ne postoje indikacije da ovaj genotip uzrokuje jaču bolest (Ivancic-Jelecki i sur., 2015; Panayiotou i sur., 2014), razlog epidemiološke dominacije ovog genotipa nije poznat.

Treći genotip grupe A, GA5 je tijekom epidemiološke studije u Hrvatskoj u 2007. godini činio gotovo 50% ukupnih sojeva HRSV (Forcic i sur., 2012). U ovoj studiji je GA5 detektiran tijekom samo dvije godine (2014. - 2015.), a 8 od 9 uzoraka imalo je identičnu sekvencu, te je vjerojatnije da je ovaj genotip unesen u populaciju samo jednom, čime se objašnjava sporadična detekcija i niska varijabilnost među sojevima, s obzirom da je poznato da višestruko uvođenje virusa u ciljnu populaciju rezultira višom raznolikošću virusnih grupa (Shiino, 2012). U uzorcima grupe B većina uzoraka pripadala je genotipu BA9, što je u skladu sa studijom provedenom tijekom sličnog perioda u Italiji (Esposito i sur., 2015).

Viša razina varijabilnosti izračunata je na aminokiselinskoj razini što sugerira da su proteini G pod djelovanjem selektivnog pritiska (Johnson i sur., 1987b), a najvišu razinu

varijabilnosti sadržavali su sojevi genotipa BA9. Za pozicije 254 i 274 (odgovara poziciji 298 u dupliciranoj regiji) grupe A određeno je djelovanje pozitivne selekcije, dok je u grupi B pozitivna selekcija izračunata za kodon na poziciji 271. Pozicija 274 u grupi A povezana je s izbjegavanjem imunološkog odgovora (Rueda i sur., 1991). Viši dN/dS izračunat je za grupu A, a viša genska varijabilnost ovih sojeva može biti odgovorna za veću globalnu rasprostranjenost ovih virusa (Coggins i sur., 1998). S obzirom da je u obje grupe ukupni omjer stopa supstitucija ispod vrijednosti 1, većina supstitucija je neutralnog karaktera što sugerira da visoka razina varijabilnosti gena G nije potaknuta samo izbjegavanjem imunološkog odgovora domaćina (Tan i sur., 2013).

Visoka varijabilnost aminokiselina regije HVR2 potvrđena je i izračunom entropije i na temelju aminokiselinskog sravnjenja ove regije. U tri soja genotipa NA1 (HR7483-11, HR7640-11 and HR8934-11) pronađena je supstitucija na 232. poziciji (E232G), koja se do sada smatrala specifičnom za sojeve ON1 (Eshaghi i sur., 2012). Ova aminokiselina dio je antigenskog mjesta te je u prijašnjim studijama navedena kao pozitivno selektirana (Cane, 1997; Eshaghi i sur., 2012). Tri soja koja posjeduju glicin na 232. poziciji bila su jasno odvojena na filogenetskom stablu, čineći zasebnu granu.

U istraživanju epidemiološke prevlasti genotipa BA Hotard i sur. (2015) predlažu da su dodatni glikani vezani unutar duplicirane regije možda odgovorni za bolje vezanje na stanicu domaćina. Isti princip nije vjerojatan za sojeve ON1 ove studije, s obzirom da su dodatna mjesta O-glikozilacije unutar duplicirane regije pronađena u svega 4 soja. Predviđeno mjesto N-glikozilacije koje je bilo očuvano u svim sojevima ON1 nalazi se izvan duplicirane regije, a to mjesto bilo je predviđeno i za neke sojeve NA1, u skladu s literaturnim podacima (Esposito i sur., 2015).

Evolucija regije HVR2 analizirana je za tri najčešća genotipa, a izračunate visoke stope supstitucije potvrđuju ulogu proteina G u izbjegavanju imunološkog odgovora. Poznato je da brza evolucija ovog gena doprinosi sposobnosti ponovnih infekcija (Botosso i sur., 2009). Izračunata stopa supstitucije za genotip NA1 iznosila je $3,006 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina, što je u skladu sa nedavnim istraživanjem svih globalno prisutnih sojeva NA1 gdje je ta stopa procijenjena na $3,56 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (Haider i sur., 2018). Stopa supstitucije genotipa ON1 procijenjena je na $4,969 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina, u skladu sa istraživanjem stope supstitucije globalno prisutnih sojeva ON1 koja je procijenjena na $4,10 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (Duvvuri i sur., 2015). Na temelju ovih rezultata može se

zaključiti da širenje i evolucija genotipa ON1 unutar lokalne populacije slijedi sličnu evolucijsku i epidemiološku dinamiku prisutnu na globalnoj razini. Najviša stopa supstitucije izračunata je za genotip BA9 ($8,851 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina), u skladu s višim stopama evolucije koje su procijenjene za grupu B (Malasao i sur., 2015; Tan i sur., 2013).

Ekspanzija veličine populacije genotipa ON1 koja se događala istovremeno s divergencijom sojeva primijećena je od trenutka unosa ovog genotipa u populaciju, popraćena istovremenim smanjenjem veličine populacije NA1. Ovaj epidemiološki trend prethodno je uočen i u grupi B nakon pojave sojeva BA: unatoč brzom širenju novih sojeva potrebne su dodatne promjene u ovim sojevima kako bi zamijenili prethodno cirkulirajuće genotipove (Trento i sur., 2010). Konstantna veličina populacije genotipa BA9 primijećena je tijekom prve dvije godine studije, nakon čega je populacija naglo porasla u drugoj polovici 2013. godine, demonstrirajući da unos novog genotipa u populaciju ne utječe na cikličke promjene dominantnih grupa HRSV (Mlinaric-Galinovic i sur., 2012; Trento i sur., 2010).

5.5 Molekularna epidemiologija HMPV-a

U ovom istraživanju molekularno je analizirano 238 pozitivnih uzoraka HMPV tijekom 6 uzastopnih godina, na temelju kojih je uočen trend smjene visoke i niske incidencije u naizmjeničnim godinama te je u skladu s prethodnim definiranjem dvogodišnjeg ciklusa HMPV-a (Falsey i sur., 2003; Huck i sur., 2006; Ljubin-Sternak i sur., 2014; Velez Rueda i sur., 2013). Ciklus HMPV-a obrnuto je proporcionalan ciklusu HRSV-a u Hrvatskoj: nakon veće zimske epidemije HRSV-a slijedi manja proljetna epidemija HMPV-a (i obrnuto), što je već pokazano u prethodnim istraživanjima (Ljubin-Sternak i sur., 2014). Većina infekcija HMPV-om javlja se tijekom hladnog perioda godine, slično kao što je primijećeno u drugim državama umjerene klime (Freymuth i sur., 2003; Osterhaus i Fouchier, 2003; Reiche i sur., 2014). Zimsko-proljetna sezonska pojavnost HMPV-a tipična je za infekcije u područjima umjerene klime, međutim epidemiološki vrhunci od svibnja do srpnja 2011. godine, te travnja do srpnja 2015. godine uobičajeni su za tropske krajeve (Agrawal i sur., 2011). Slični epidemiološki uzorci primijećeni su i u Austriji demonstrirajući da se epidemiološki vrhunac u kasnijim proljetno-ljetnim mjesecima događa svake druge godine (Aberle i sur., 2010). Nažalost, pozitivni uzorci tijekom 2013. godine nisu bili dostupni za molekularnu analizu, ali prema ovom uočenom obrascu, ta epidemija bi također vjerojatno dostigla svoj vrhunac tijekom kasnih proljetno-ljetnih mjeseci.

Na temelju filogenetske analize uočena je istovremena cirkulacija 3 podgrupe, osim tijekom 2013. godine, iz čega se može zaključiti da vrlo različiti virusi tijekom jedne sezone uzrokuju infekcije. Istovremeno kruženje nekoliko podgrupa HMPV na istom geografskom području nije neuobičajeno za HMPV te je uočeno i u drugim studijama (Ljubin-Sternak i sur., 2008; Reiche i sur., 2014; Velez Rueda i sur., 2013; Yang i sur., 2009). Iz podataka o broju sojeva koji pripadaju pojedinim grupama vidljiva je smjena predominantnih grupa u dvogodišnjim razmacima. Međutim nedostatak ovog istraživanja, kao što je već navedeno, je nedostupnost uzoraka iz 2013. godine za analizu, što je moglo utjecati na distribuciju genotipova HMPV-a.

Niti jedan uzorak nije pripadao u podgrupu A1, što je u skladu s drugim istraživanjima (Aberle i sur., 2010; Neemuchwala i sur., 2015; Velez Rueda i sur., 2013), sukladno zaključku da novi genotipovi smjenjuju stare (Aberle i sur., 2010; Huck i sur., 2006). U ovom istraživanju detektirana je pojava novog podklastera A2c u Hrvatskoj, koji tijekom zadnje epidemiološke studije provedene tijekom 2005. i 2006. godine nije detektiran (Ljubin-Sternak i sur., 2008). Ovaj podklaster detektiran je tijekom cijelog analiziranog perioda, osim u 2013. godini što je vjerojatno posljedica ograničenog broja uzoraka za analizu, naglašavajući važnost ovog podklastera u epidemiologiji HMPV. Do sada je ovaj podklaster detektiran samo u epidemiološkoj studiji iz Japana provedenoj tijekom 2010. i 2011. godine (Nidaira i sur., 2012), te u studiji iz Malezije koja je obuhvatila sezone od 2012. do 2014. godine (Chow i sur., 2016). Pretraživanjem baze GenBank otkriveno je nekoliko sekvenci porijeklom iz Njemačke i Turske koje su se svrstavale u podklaster A2c uz sojeve iz ove studije; ovi sojevi prethodno nisu imali dodijeljen genotip ili je njihov genotip bio anotiran kao A2b, a vjerojatno zbog premalog broja tih uzoraka nije uočeno jasno odvajanje od podklastera A2b. Razlike u kliničkim simptomima između A2c i ostalih podklastera nisu uočene.

Visoka razina očuvanosti uočena je na nukleotidnoj i aminokiselinskoj razini proteina F, sukladno drugim istraživanjima (Ishiguro i sur., 2004; van den Hoogen i sur., 2004; Yang i sur., 2009), vjerojatno uslijed potrebe da se očuvaju funkcionalne karakteristike potrebne za fuziju čime su drastične aminokiselinske supstitucije onemogućene (Yang i sur., 2009). Također nije uočena pozitivna selekcija u ovom proteinu, kao ni u prethodnim radovima (Tsukagoshi i sur., 2013; Velez Rueda i sur., 2013), ali je za mnoga mjesta pokazano djelovanje negativne selekcije. Za virus gripe (Suzuki, 2006) i poliovirus (Suzuki, 2004) je pokazano da

cjepiva koja su usmjerena na negativno selektirana mjesta unutar epitopa pridonose boljoj zaštiti od cjepiva usmjerenih na pozitivno selektirana mjesta.

Suprotno analizi proteina F, kod proteina G je primijećena viša razina očuvanosti na nukleotidnoj razini nego na aminokiselinskoj, te je većina promjena pronađena u izvanstaničnoj domeni. Ukupno je 7 različitih duljina proteina G uočeno koji su većinom rezultat supstitucija, dok je kod nekih uzoraka došlo do promjene u okviru čitanja uslijed delecije ili insercije nukleotida. Uočene varijacije vjerojatno su posljedica imunološkog pritiska na sličan način kao što je definirano za protein G HRSV-a (Cane i Pringle, 1995). Nadalje, nedavno su pronađeni sojevi HMPV grupe A koji nose duplikaciju u genu G od 180 nukleotida (Saikusa i sur., 2017a) i 111 nukleotida (Saikusa i sur., 2017b) unutar kodirajuće regije, što je još jedna sličnost s proteinom G HRSV-a koji može tolerirati ovako velike duplikacije. Suprotno je pokazano za ptičji metapneumovirus tipa C koji je više genetski srodan HMPV-u nego drugim ptičjim metapneumovirusima, gdje je pronađeno da protein G ovih virusa može biti skraćen za više od 300 aminokiselina (Yu i sur., 2010). Mnogobrojna mjesta glikozilacije predviđena su u izvanstaničnoj domeni G proteina, a analizom selektivnog pritiska pronađeno je samo jedno pozitivno selektirano mjesto, te do četiri mjesta pod djelovanjem negativne selekcije što je suprotno istraživanjima drugih autora koji su uočili mnogobrojna negativno selektirana mjesta (de Graaf i sur., 2008; Velez Rueda i sur., 2013).

Za proteine SH uočeno je slično: ukupno su tri različite duljine ovog proteina identificirane, te je također razina očuvanosti aminokiselinske sekvence bila niža od nukleotidne očuvanosti. Za razliku od broja potencijalnih N-glikoziliranih mjesta koja su u skladu s drugim istraživanjima (Biacchesi i sur., 2003; Ishiguro i sur., 2004), primijećena je razlika u O-glikozilaciji između grupa A i B. Ovaj rezultat predmet je dodatnog istraživanja, posebno u svjetlu obećavajućih rezultata korištenja proteina SH kao antigena u razvoju cjepiva protiv HRSV-a (Schepens, 2015; Schepens i sur., 2014).

Viša stopa supstitucije procijenjena je za uzorke grupe B te je iznosila $4,72 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina, dok je za grupu A stopa supstitucije iznosila $2,48 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina. Obje stope više su od stope koje je izračunata za cijeli gen F, te iznosi $7,12 \times 10^{-4}$ supstitucija/mjesto/godina (Yang i sur., 2009), međutim u drugim studijama je ta stopa procijenjena na vrijednost od $1,96 \times 10^{-3}$ supstitucija/mjesto/godina (Owor i sur., 2016). Razlog odstupanja ovih rezultata može se objasniti činjenicom da je stopa supstitucije računata odvojeno za glavne grupe u ovom istraživanju, te da je za izračun korišten samo

varijabilni dio gena F koji se koristi za genotipizaciju. Promjene u veličini virusne populacije primijećene su u grupi A kao blaži pad heterogenosti populacije krajem 2014. godine, nakon čega je uslijedio porast populacije, što je u skladu s generalnim trendom A2 podgrupe (Li i sur., 2012). Unutar grupe B virusna populacija je bila relativno konstantne veličine tijekom cijelog promatranog perioda.

5.6 Analiza proteina M porodica *Paramyxoviridae* i *Pneumoviridae*

Unatoč centralnoj ulozi proteina M u životnom ciklusu paramiksovirusa i pneumovirusa, često je zanemareno istraživanje ovog gena jer su glikoproteini primarni fokus studija ovih virusa. Posebno je zanimljivo kako proteini M različitih virusa u ovim porodicama obnašaju sličnu funkciju, unatoč velikim razlikama u duljini i slijedu aminokiselina (Ghildyal i sur., 2006; Latiff i sur., 2004), te kako je terciarna struktura ovog proteina očuvana (Battisti i sur., 2012). Međutim, interakcije i mehanizmi kojima protein M regulira sklapanje virusne čestice i dalje nisu potpuno jasni (Harrison i sur., 2010). U skladu s ovim spoznajama istražene su molekularne karakteristike proteina M iz visoko varijabilnih sojeva HPIV1-3, HMPV i HRSV detektiranih u ovoj studiji, za koje su prethodnim analizama pokazane važne evolucijske promjene.

Visoka varijabilnost pokazana je za proteine M između HPIV-ova, iako su proteini M unutar pojedinog virusa bili iznimno očuvani. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima aminokiselinske očuvanosti između ovih virusa izračunate za glikoproteine F i HN koja iznosi manje od 50% očuvanih pozicija (Karron i Collins, 2013). Slično ovim rezultatima, proteini M HPIV1 i HPIV3 su bili srodniji sa 60% aminokiselinske očuvanosti između ovih virusa, što odgovara razini očuvanosti između proteina L ova dva serotipa (Karron i Collins, 2013). Međutim, većina supstitucija bila je sinonimnog karaktera, što je potvrđeno vrlo niskim dN/dS za svaki virus, naglašavajući da funkcija ovog proteina ovisi o stabilnosti proteinske strukture. Unatoč niskoj aminokiselinskoj očuvanosti između proteina M, sličnosti su uočene na temelju ukupnog profila hidrofobnosti, što se podudara s rezultatima prema Latiff i sur. (2004).

Protein M HPIV1 i HPIV3 dostatan je za izlazak virusa iz stanice i nastanak čestica nalik virusu (Coronel i sur., 1999; Zhang i sur., 2014), što ukazuje da je protein M ovih virusa dovoljan za poticanje deformacije membrane kojom se omogućava izlazak virusa (El Najjar i sur., 2014). Ključna pozicija za formiranje čestica nalik virusu kod HPIV3 uključuje leucin u C-terminalnoj regiji proteina (L302); ova aminokiselina neophodna je i za proces ubikvitinacije

(Zhang i sur., 2014), te je bila očuvana u svim uzorcima ove studije. Slične regije nužne za nastanak čestica nalik virusu identificirane su i u Sendai virusu (49-YLDD-52) (Irie i sur., 2007), dok su kod HPIV1 nepoznate. U proteinima M HPIV1 ove studije postoji motiv 50-YLDV-53 koji je očuvan u svim sekvencama, a koji bi mogao biti uključen u pupanje HPIV1 prema analogiji sa sekvencom antigenski srodnog Sendai virusa (Fouillot-Coriou i Roux, 2000).

U sravnjenju proteina M HPIV2 i HPIV3 uočene su neke aminokiselinske razlike koje su bile povezane s pripadnošću različitim genskim grupama, dok takve razlike nisu uočene kod virusa HPIV1, što može značiti da su grupe HPIV1 manje međusobno divergentne. Ova spoznaja je od posebnog značaja s obzirom da ovakve promjene nisu uočene analizom proteina F i HN HPIV3. Također, većina aminokiselinskih promjena u glikoproteinima HPIV3 obuhvaćala je citoplazmatsku i transmembransku regiju, za koje se vjeruje da su važne za interakciju s proteinima M (Stone i Takimoto, 2013).

Više razina varijabilnosti uočena je analizom nukleotidnih sekvenci proteina M pneumovirusa, što je očekivano s obzirom da su glikoproteini analiziranih virusa u ovom istraživanju bili više raznoliki. Glavne grupe HRSV-a razlikovale su se na temelju različite duljine M proteina. Međutim, većina uočenih razlika bila je sinonimnog karaktera, te su proteini M ovih virusa bili visoko očuvani. Iako su HRSV i HMPV blisko srodni, proteini M imali su manji broj potpuno očuvanih mjesta u usporedbi s proteinima M između HPIV1 i HPIV3. Unatoč tome općenita svojstva proteina bila su očuvana, što je u skladu s očuvanom funkcijom i strukturom koju dijele proteini M, bez obzira na primarnu sekvencu (Watkinson i Lee, 2016).

Regije važne za pupanje HMPV-a uključuju 197-YAGL-200 motiv, koji je visoko očuvan u pneumovirusima (Sabo i sur., 2011). Analizom sekvenci u ovom istraživanju pronađena je promjena u tri uzorka HMPV-a (HR266-14, HR196-14 i HR468-14) koji imaju supstituciju A198S. Utjecaj ove supstitucije nije ispitan u ovom istraživanju. Usprkos očuvanosti proteina M, neke supstitucije bile su karakteristične za pojedine genotipove, a jedna supstitucija bila je karakteristična za novodetektirani podklaster A2c. Ovaj rezultat nije bio očekivan s obzirom da su karakteristične supstitucije pronađene samo analizom proteina G, koji je pod djelovanjem imunološkog pritiska, ukazujući na potrebu istraživanja dodatnih gena u ovakvim slučajevima.

U jednom uzorku HMPV-a (HR347-12, podgrupa A2a) pronađena je insercija od 8 nukleotida u 3' netranslatiranoj regiji; u banci gena GenBank nisu otkriveni uzorci koji sadrže

ovakvu inserciju. Najbliži srodnik ovom uzorku bio je uzorak HMPV-a izoliran u Australiji 2003. godine (KC403981), koji također pripada u istu podgrupu (A2a). Poznato je da su sekvence na krajevima gena kod paramiksovirusa i pneumovirusa ključne za uspješan završetak transkripcije (Cartee i sur., 2003; Moudy i sur., 2004; Noton i Fearn, 2015), a s obzirom da su nekodirajuće sekvence HMPV-a većinom očuvane (Piyaratna i sur., 2011) ovaj rezultat je bio neočekivan. Pokazano je da su transkripcijski signali na krajevima gena M, N i P kod HPIV3 identični, osim što gen M na kraju sadrži dodatnih 8 nukleotida (Lingemann i sur., 2015). Ovaj insert bio je povezan s povećanom sintezom transkripata mRNA koji su sadržavali gen M i F, dok je deletiranje ovih nukleotida potaknulo transkripciju monocistronske F mRNA (Lingemann i sur., 2015). U skladu s ovim spoznajama, insercija pronađena u ovom istraživanju je od interesa za daljnja istraživanja kojima bi se otkrio utjecaj ove insercije na transkripcijsku razinu mRNA proteina F.

6. ZAKLJUČCI

- Molekularna epidemiologija HPIV1-3 nije do sada bila poznata u Hrvatskoj, te rezultati ove studije predstavljaju temelj praćenja rasprostranjivanja HPIV-a u Hrvatskoj.
- Genotipizacija HPIV1 nije standardizirana, te je u ovoj studiji pokazano da je za filogenetsku analizu pogodno koristiti kraći fragment gena HN koji kodira za izvanstanični dio proteina HN. Molekularnom analizom glikoproteina HN i F HPIV1 pokazano je da je u određenim sojevima došlo do supstitucija unutar visoko očuvanih citoplazmatskih regija oba glikoproteina.
- Analizom sojeva HPIV2 pokazano je da su geni HN i F pogodni za filogenetske analize, te da su dulje sekvence prikladnije za dobivanje bolje rezolucije filogenetskog stabla. U 2014. godini detektiran je novi klaster G1a, koji je najvjerojatnije unesen u populaciju. Daljnjim praćenjem epidemiologije HPIV2 moći će se zaključivati o evoluciji novog klastera u populaciji.
- Na temelju topologije stabala H uzoraka HPIV3 i izračuna genskih udaljenosti pokazano je da je kraći fragment gena HN pogodan za brze epidemiološke analize. Opsežnim analizama molekularnih karakteristika glikoproteina F i HN uzoraka HPIV3 pokazano je da su funkcionalna mjesta očuvana, unatoč vremenskoj i geografskoj udaljenosti uzoraka, što ukazuje na vrlo očuvanu prirodu glikoproteina HPIV3.
- Analizom sojeva HRSV detektirana je istovremena cirkulacija 5 genotipova, te je uočena smjena dominantnih grupa HRSV. Pokazano je da je u grupi A prevladavajući genotip tijekom prve tri godine studije bio NA1, koji je potpuno zamijenjen novim genotipom ON1 u narednoj godini. Međutim, pokazano je da unos novog genotipa u populaciju nije utjecao na cikličku smjenu dominantnih grupa HRSV.
- Na temelju filogenetske analize sojeva HMPV uočena je istovremena cirkulacija 3 podgrupe, iz čega se može zaključiti da vrlo različiti virusi tijekom jedne sezone uzrokuju infekcije. U ovom istraživanju detektirana je pojava novog podklastera A2c u

Hrvatskoj, a cirkulacija ovog podklastera do sada je objavljena samo u epidemiološkim studijama iz Japana i Malezije.

- Pokazano je da su proteini M bili očuvani unutar pojedinih virusa. Međutim, u sravnjenju proteina M HPIV3 uočene su aminokiselinske promjene koje su definirale različite genske grupe, a ovakve promjene nisu uočene analizom glikoproteina. Također, jedna supstitucija bila je karakteristična za novodetektirani podklaster A2c, što ukazuje na potrebu istraživanja dodatnih gena u ovakvim slučajevima.

7. LITERATURA

- Aberle JH, Aberle SW, Redlberger-Fritz M, Sandhofer MJ, Popow-Kraupp T (2010) Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics. *Pediatric infectious disease journal* 29(11): 1016–1018.
- Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya AE, Davison AJ (2017) Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology* 162(8): 2505–2538.
- Afonso CL, Amarasinghe GK, Banyai K, Bao Y, Basler CF, Bavari S, Bejerman N, Blasdel KR, Briand FX, Briese T, Bukreyev A, Calisher CH, Chandran K, Chéng J, Clawson AN, Collins PL, Dietzgen RG, Dolnik O, Domier LL, Dürrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Farkas SL, Freitas-Astúa J, Formenty P, Fouchier RA, Fù Y, Ghedin E, Goodin MM, Hewson R, Horie M, Hyndman TH, Jiāng D, Kitajima EW, Kobinger GP, Kondo H, Kurath G, Lamb RA, Lenardon S, Leroy EM, Li CX, Lin XD, Liú L, Longdon B, Marton S, Maisner A, Mühlberger E, Netesov SV, Nowotny N, Patterson JL, Payne SL, Paweska JT, Randall RE, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Schwemmler M, Shi M, Smither SJ, Stenglein MD, Stone DM, Takada A, Terregino C, Tesh RB, Tian JH, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Vasilakis N, Verbeek M, Volchkov VE, Wahl-Jensen V, Walsh JA, Walker PJ, Wang D, Wang LF, Wetzell T, Whitfield AE, Xiè JT, Yuen KY, Zhang YZ, Kuhn JH (2016) Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Archives of Virology* 161(8): 2351–2360.
- Agrawal AS, Roy T, Ghosh S, Chawla-Sarkar M (2011) Genetic variability of attachment (G) and fusion (F) protein genes of human metapneumovirus strains circulating during 2006-2009 in Kolkata, Eastern India. *Virology Journal*, 8: 67.
- Ahmadian G, Randhawa JS, Easton AJ (2000) Expression of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. *The EMBO Journal* 19(11): 2681–2689.
- Akerlind-Stopner B, Hu A, Mufson MA, Utter G, Norrby E (1993) Antibody responses of children to the C-terminal peptide of the SH protein of respiratory syncytial virus and the immunological characterization of this protein. *Journal of Medical Virology* 40(2): 112–120.
- Almajhdi FN (2015) Hemagglutinin-neuraminidase gene sequence-based reclassification of human parainfluenza virus 3 variants. *Intervirology* 58(1): 35–40.
- Almajhdi FN, Alshaman MS, Amer HM (2012) Human parainfluenza virus type 2 hemagglutinin-neuraminidase gene: Sequence and phylogenetic analysis of the Saudi strain Riyadh 105/2009. *Virology Journal* 9:316.

- Amarasinghe GK, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Beer M, Bejerman N, Blasdel KR, Bochnowski A, Briese T, Bukreyev A, Calisher CH, Chandran K, Collins PL, Dietzgen RG, Dolnik O, Dürrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Fang Q, Formenty P, Fouchier RAM, Ghedin E, Harding RM, Hewson R, Higgins CM, Hong J, Horie M, James AP, Jiāng D, Kobinger GP, Kondo H, Kurath G, Lamb RA, Lee B, Leroy EM, Li M, Maisner A, Mühlberger E, Netesov SV, Nowotny N, Patterson JL, Payne SL, Paweska JT, Pearson MN, Randall RE, Revill PA, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Schwemmler M, Smither SJ, Song Q, Stone DM, Takada A, Terregino C, Tesh RB, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Vasilakis N, Volchkov VE, Wahl-Jensen V, Walker PJ, Wang B, Wang D, Wang F, Wang LF, Werren JH, Whitfield AE, Yan Z, Ye G, Kuhn JH (2017) Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2017. *Archives of Virology* 162(8): 2493–2504.
- Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K (1991) Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *The Journal of Infectious Diseases* 163(4): 687–692.
- Bando H, Kawano M, Kondo K, Tsurudome M, Komada H, Nishio M, Ito Y (1991) Growth properties and F protein cleavage site sequences of naturally occurring human parainfluenza type 2 viruses. *Virology* 184(1): 87–92.
- Bartlett EJ, Cruz AM, Esker J, Castaño A, Schomacker H, Surman SR, Hennessey M, Boonyaratanakornkit J, Pickles RJ, Collins PL, Murphy BR, Schmidt AC (2008) Human parainfluenza virus type 1 C proteins are nonessential proteins that inhibit the host interferon and apoptotic responses and are required for efficient replication in nonhuman primates. *Journal of Virology* 82(18): 8965–8977.
- Battisti AJ, Meng G, Winkler DC, McGinnes LW, Plevka P, Steven AC, Morrison TG, Rossmann MG (2012) Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(35): 13996–4000.
- Beck ET, HeJ, Nelson MI, Bose ME, Fan J, Kumar S, Henrickson KJ (2012) Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of 39 Human Parainfluenza Virus Type 1 Strains Isolated from 1997–2010. *PLoS ONE* 7(9): e46048.
- Belshe RB, Richardson LS, London WT, Sly DL, Lorfeld JH, Camargo E, Prevar DA, Chanock RM (1977) Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of primates. *Journal of Medical Virology* 1(3): 157–162.
- Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ (2003) Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315(1): 1–9.
- Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, Peret TC, Erdman DD, Anderson LJ (2002) Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *The Journal of Infectious Diseases* 186(9): 1330–1334.

- Botosso VF, Zanotto PM, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, Stewien KE, Peret TC, Jamal LF, Pardini MI, Pinho JR, Massad E, Sant'anna OA, Holmes EC, Durigon EL (2009) Positive Selection Results in Frequent Reversible Amino Acid Replacements in the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus. *PLoS Pathogens* 5(1): e1000254.
- Bousse T, Matrosovich T, Portner A, Kato A, Nagai Y, Takimoto T (2002) The long noncoding region of the human parainfluenza virus type 1 f gene contributes to the read-through transcription at the m-f gene junction. *Journal of Virology* 76(16): 8244–8251.
- Bousse T, Takimoto T, Portner A (1995) A single amino acid changes enhances the fusion promotion activity of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Virology* 209(2): 654–657.
- Buchholz UJ, Biacchesi S, Pham QN, Tran KC, Yang L, Luongo CL, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL (2005) Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *Journal of Virology* 79(11): 6588–6597.
- Bukreyev A, Whitehead SS, Murphy BR, Collins PL (1997) Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *Journal of Virology* 71(12): 8973–8982.
- Cane PA, Weber M, Sanneh M, Dackour R, Pringle CR, Whittle H (1999) Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in The Gambia. *Epidemiology and Infection* 122(1): 155–160.
- Cane PA (1997) Analysis of linear epitopes recognised by the primary human antibody response to a variable region of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus. *Journal of Medical Virology* 51(4): 297–304.
- Cane PA, Pringle CR (1995) Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *Journal of Virology* 69(5): 2918–2925.
- Cartee TL, Megaw AG, Oomens AGP, Wertz GW (2003) Identification of a single amino acid change in the human respiratory syncytial virus L protein that affects transcriptional termination. *Journal of Virology* 77(13): 7352–7360.
- Carter SD, Dent KC, Atkins E, Foster TL, Verow M, Gorny P, Harris M, Hiscox JA, Ranson NA, Griffin S, Barr JN (2010) Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability. *FEBS Letters* 584(13): 2786–2790.
- Cathomen T, Mrkic B, Spehner D, Drillien R, Naef R, Pavlovic J, Aguzzi A, Billeter MA, Cattaneo R (1998) A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: Consequences for propagation in the brain. *EMBO Journal* 17(14): 3899–3908.

- Chomczynski P, Mackey K (1998) Single-step method of total RNA isolated by acid guanidine phenol extraction. U: Celis J (ed.) *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. New York, Academic Press, 221–224.
- Chow WZ, Chan YF, Oong XY, Ng LJ, Nor'E SS, Ng KT, Chan KG, Hanafi NS, Pang YK, Kamarulzaman A, Tee KK (2016) Genetic diversity, seasonality and transmission network of human metapneumovirus: identification of a unique sub-lineage of the fusion and attachment genes. *Scientific Reports* 6: 27730.
- Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM (1998) Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 36(12): 3552–3557.
- Collins CL, Pollard AJ (2002) Respiratory syncytial virus infections in children and adults. *Journal of Infection* 45(1): 10-17.
- Collins PL, Karron RA (2013) Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. U: Knipe DM i Howley PM (ed.) *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1086–1123.
- Coronel EC, Takimoto T, Murti KG, Varich N, Portner A (2001) Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein. *Journal of Virology* 75(3): 1117–1123.
- Coronel EC, Murti KG, Takimoto T, Portner A (1999) Human parainfluenza virus type 1 matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of virus- like particles containing nucleocapsid-like structures. *Journal of Virology* 73(8): 7035–7038.
- Counihan ME, Shay DK, Holman RC, Lowther SA, Anderson LJ (2001) Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 20(7): 646–653.
- Crowe JE, Modlin JF, Crowe JE (2001) Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. *Clinical Infectious Diseases* 33(10): 1720–1727.
- Crowe JE (1998) Immune responses of infants to infection with respiratory viruses and live attenuated respiratory virus candidate vaccines. *Vaccine* 16: 1423–1432.
- Cseke G, Wright DW, Tollefson SJ, Johnson JE, Crowe JE, Williams JV (2007) Human Metapneumovirus Fusion Protein Vaccines That Are Immunogenic and Protective in Cotton Rats. *Journal of Virology* 81(2): 698–707.
- Cui G, Zhu R, Qian Y, Deng J, Zhao L, Sun Y, Wang F (2013) Genetic Variation in Attachment Glycoprotein Genes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B in Children in Recent Five Consecutive Years. *PLoS ONE* 8(9): e75020.

- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- de Graaf M, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Holmes EC (2008) Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *Journal of General Virology* 89(12): 2933–2942.
- Delport W, Poon AFY, Frost SDW, Kosakovsky Pond SL (2010) Datamonkey 2010: A suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26(19): 2455–2457.
- Deng Q, Weng Y, Lu W, Demers A, Song M, Wang D, Qingzhong Yu, Li F (2011) Topology and cellular localization of the small hydrophobic protein of avian metapneumovirus. *Virus Research* 160(1–2): 102–107.
- Domachowske JB, Rosenberg HF (1999) Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clinical Microbiology Reviews* 12(2): 298–309.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148(4): 1667–1686.
- Drake JW (1993) Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(9): 4171–5.
- Drummond AJ, Bouckaert RR (2015) *Bayesian evolutionary analysis with BEAST*. 1st edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8): 1969–1973.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22(5): 1185–1192.
- Drummond AJ, Pybus OG, Rambaut A, Forsberg R, Rodrigo AG (2003) Measurably evolving populations. *Trends in Ecology and Evolution* 18(9): 481–488.
- du Plessis L, Stadler T (2015) Getting to the root of epidemic spread with phylodynamic analysis of genomic data. *Trends in Microbiology* 23(7): 383–386.
- Duvvuri VR, Granados A, Rosenfeld P, Bahl J, Eshaghi A, Gubbay JB (2015) Genetic diversity and evolutionary insights of respiratory syncytial virus A ON1 genotype: Global and local transmission dynamics. *Scientific Reports* 5: 14268.
- Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, Staat MA, Iwane M, Prill MM, Williams JV (2013) Burden of Human Metapneumovirus Infection in Young Children. *New England Journal of Medicine* 368(7): 633–643.

- El Najjar F, Schmitt AP, Dutch RE (2014) Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: A three way dance for infectious particle production. *Viruses* 6(8): 3019–54.
- Eshaghi AR, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, Low DE, Gubbay JB (2012) Genetic variability of human respiratory syncytial virus a strains circulating in Ontario: A novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS ONE* 7(3): e32807.
- Esposito S, Piralla A, Zampiero A, Bianchini S, Di Pietro G, Scala A, Pinzani R, Fossali E, Baldanti F, Principi N (2015) Characteristics and their clinical relevance of respiratory syncytial virus types and genotypes circulating in Northern Italy in five consecutive winter seasons. *PLoS ONE* 10(6): e0129369.
- Eybpoosh S, Haghdoost AA, Mostafavi E, Bahrampour A, Azadmanesh K, Zolala F (2017) Molecular epidemiology of infectious diseases. *Electronic Physician* 9(8): 5149–5158.
- Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh E (2003) Human Metapneumovirus Infections in Young and Elderly Adults. *The Journal of Infectious Diseases* 187(5): 785–790.
- Feltes TF, Sondheimer HM, Tulloh RMR, Harris BS, Jensen KM, Losonsky GA, Griffin MP (2011) A randomized controlled trial of motavizumab versus palivizumab for the prophylaxis of serious respiratory syncytial virus disease in children with hemodynamically significant congenital heart disease. *Pediatric Research* 70(2): 186–191.
- Forcic D, Ivancic-Jelecki J, Mlinaric-Galinovic G, Vojnovic G, Babic-Erceg A, Tabain I (2012) A study of the genetic variability of human respiratory syncytial virus in Croatia, 2006–2008. *Journal of Medical Virology* 84(12): 1985–1992.
- Fouillot-Coriou N, Roux L (2000) Structure-function analysis of the Sendai virus F and HN cytoplasmic domain: Different role for the two proteins in the production of virus particle. *Virology* 270(2): 464–475.
- Freytmuth F, Vabret A, Legrand L, Eterradosi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guillois B (2003) Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatric Infectious Disease Journal* 22(1): 92–94.
- Freytmuth F, Petitjean J, Pothier P, Brouard J, Norrby E (1991) Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups A and B in France from 1982 to 1990. *Journal of Clinical Microbiology* 29(3): 653–655.
- Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ (2006) Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990–2004. *Clinical Infectious Diseases* 43(8): 1016–1022.
- Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B (2007) Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *Journal of Virology* 81(15): 8361–8366.

- Fukushima K, Takahashi T, Ueyama H, Takaguchi M, Ito S, Oishi K, Minami A, Ishitsubo E, Tokiwa H, Takimoto T, Suzuki T (2015) Amino acid substitutions contributing to α 2,6-sialic acid linkage binding specificity of human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase. *FEBS Letters* 589(11): 1278–1282.
- Gan SW, Tan E, Lin X, Yu D, Wang J, Tan GMY, Vararattanavech A, Yeo CY, Soon CH, Soong TW, Pervushin K, Torres J (2012) The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *Journal of Biological Chemistry* 287(29): 24671–24689.
- Ghildyal R, Ho A, Jans DA (2006) Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiology Reviews* 30(5): 692-705.
- Ghildyal R, Li D, Peroulis I, Shields B, Bardin P G, Teng MN, Collins PL, Meanger J, Mills J (2005) Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. *Journal of General Virology* 86(7): 1879–1884.
- Glezen WP, Frank AL, Taber LH, Kasel JA (1984) Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *The Journal of Infectious Diseases* 150(6): 851–857.
- Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL (1981) Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *The Journal of Pediatrics* 98(5): 708–715.
- Godoy C, Peremiquel-Trillas P, Andrés C, Gimferrer L, Uriona SM, Codina MG, Armadans L, Martín Mdel C, Fuentes F, Esperalba J, Campins M, Pumarola T, Antón A (2016) A molecular epidemiological study of human parainfluenza virus type 3 at a tertiary university hospital during 2013–2015 in Catalonia, Spain. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 86(2): 153–159.
- Gould PS, Easton AJ (2005) Coupled translation of the respiratory syncytial virus M2 open reading frames requires upstream sequences. *Journal of Biological Chemistry* 280(23): 21972–21980.
- Goya S, Mistchenko AS, Viegas M (2016a) Phylogenetic and molecular analyses of human parainfluenza type 3 virus in Buenos Aires, Argentina, between 2009 and 2013: The emergence of new genetic lineages. *Infection, Genetics and Evolution* 39: 85–91.
- Goya S, Mistchenko AS, Viegas M (2016b) Phylogenetic and molecular analyses of human parainfluenza type 3 virus in Buenos Aires, Argentina, between 2009 and 2013: The emergence of new genetic lineages. *Infection, Genetics and Evolution* 39: 85–91.
- Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JLN, Daly JM, Mumford JA, Holmes EC (2004) Unifying the Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Pathogens. *Science* 303(5656): 327-332.

- Haider MSH, Deeba F, Khan WH, Naqvi IH, Ali S, Ahmed A, Broor S, Alsenaidy HA, Alsenaidy AM, Dohare R, Parveen S (2018) Global distribution of NA1 genotype of respiratory syncytial virus and its evolutionary dynamics assessed from the past 11 years. *Infection, Genetics and Evolution* 60: 140-150.
- Hall CB (2001) Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *The New England journal of medicine* 344(25): 1917-1928.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hallak LK, Collins PL, Knudson W, Peeples ME (2000) Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. *Virology* 271(2): 264–275.
- Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP (2010) Paramyxovirus assembly and budding: Building particles that transmit infections. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42(9): 1416-1429.
- Hasan MK, Kato A, Muranaka M, Yamaguchi R, Sakai Y, Hatano I, Tashiro M, Nagai Y (2000) Versatility of the accessory C proteins of Sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role. *Journal of Virology* 74(12): 5619–5628.
- Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Denny FW (1979) Respiratory-Syncytial-Virus Infections, Reinfections and Immunity. *New England Journal of Medicine* 300(10): 530–534.
- Hendry RM, Burns JC, Walsh EE, Graham BS, Wright PF, Hemming VG, Rodriguez WJ, Kim HW, Prince GA, McIntosh K, Chanock RM, Murphy BR (1988) Strain-Specific Serum Antibody Responses in Infants Undergoing Primary Infection with Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Infectious Diseases* 157(4): 640–647.
- Henrickson KJ (2003) Parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 16(2): 242-264.
- Henrickson KJ, Savatski LL (1997) Antigenic Structure, Function, and Evolution of the Hemagglutinin- Neuraminidase Protein of Human Parainfluenza Virus Type 1. *The Journal of Infectious Diseases* 176(4): 867-875.
- Henrickson KJ (1991) Monoclonal antibodies to human parainfluenza virus type 1 detect major antigenic changes in clinical isolates. *Journal of Infectious Diseases* 164(6): 1128–1134.
- Ho SYW, Shapiro B (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources* 11(3): 423-434.
- Holmes EC (2013) Virus Evolution. U: Knipe DM i Howley PM (eds.) *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 286-313.
- Holmes EC, Grenfell BT (2009) Discovering the phylodynamics of RNA viruses. *PLoS Computational Biology* 5(10): e1000505.

- Hotard AL, Laikhter E, Brooks K, Hartert TV, Moore ML (2015) Functional Analysis of the 60-Nucleotide Duplication in the Respiratory Syncytial Virus Buenos Aires Strain Attachment Glycoprotein. *Journal of Virology* 89(16): 8258–8266.
- Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V (2006) Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerging Infectious Diseases* 12(1): 147–150.
- Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Kanaya T, Shirakura M, Tokusumi T, Hirata T, Nagai Y, Iida A, Hasegawa M (2003) A new Sendai virus vector deficient in the matrix gene does not form virus particles and shows extensive cell-to-cell spreading. *Journal of Virology* 77(11): 6419–6429.
- Iorio RM, Syddall RJ, Sheehan JP, Bratt MA, Glickman RL, Riel AM (1991) Neutralization map of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus: domains recognized by monoclonal antibodies that prevent receptor recognition. *Journal of Virology* 65(9): 4999–5006.
- Iorio RM, Syddall RJ, Glickman RL, Kiel AM, Sheehan JP, Bratt MA (1989) Identification of amino acid residues important to the neuraminidase activity of the HN glycoprotein of newcastle disease virus. *Virology* 173(1): 196–204.
- Irie T, Shimazu Y, Yoshida T, Sakaguchi T (2007) The YLDL sequence within Sendai virus M protein is critical for budding of virus-like particles and interacts with Alix/AIP1 independently of C protein. *Journal of Virology* 81(5): 2263–2273.
- Ishiguro N, Ebihara T, Endo R, Ma X, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K (2004) High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 42(8): 3406–3414.
- Ivancic-Jelecki J, Forcic D, Mlinaric-Galinovic G, Tesovic G, Hecer AN (2015) Early evolution of human respiratory syncytial virus ON1 strains: Analysis of the diversity in the C-terminal hypervariable region of glycoprotein gene within the first 3.5 years since their detection. *Intervirology* 58(3): 172–180.
- Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y (2009) The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *Journal of Virology* 83(20): 10374–10383.
- Jin L, Örvell C, Myers R, Rota P A, Nakayama T, Forcic D, Hiebert J, Brown KE (2015) Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Reviews in Medical Virology* 25(2): 85-101.
- Johnson PR, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, Collins PL (1987a) Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *Journal of Virology* 61(10): 3163–3166.

- Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL (1987b) The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: Extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Biochemistry* 84: 5625–5629.
- Jorgensen ED, Collins PL, Lomedico PT (1987) Cloning and nucleotide sequence of newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase mRNA: Identification of a putative sialic acid binding site. *Virology* 156(1): 12–24.
- Kahn JS, Schnell MJ, Buonocore L, Rose JK (1999) Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (HRSV) glycoproteins: HRSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* 254(1): 81–91.
- Karron RA, Collins PL (2013) Parainfluenza Viruses. U: Knipe PM, Howley DM (eds.) *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 996-1023.
- Karron RA, Belshe RB, Wright PF, Thumar B, Burns B, Newman F, Cannon JC, Thompson J, Tsai T, Paschalis M, Wu SL, Mitcho Y, Hackell J, Murphy BR, Tatem JM (2003) A live human parainfluenza type 3 virus vaccine is attenuated and immunogenic in young infants. *Pediatric Infectious Disease Journal* 22(5): 394–405.
- Karron RA, O'Brien KL, Froehlich JL, Brown VA (1993) Molecular Epidemiology of a Parainfluenza Type 3 Virus Outbreak on a Pediatric Ward. *Journal of Infectious Diseases* 167(6): 1441–1445.
- Kasel JA, Frank AL, Keitel WA, Taber LH, Glezen WP (1984) Acquisition of serum antibodies to specific viral glycoproteins of parainfluenza virus 3 in children. *Journal of Virology* 52(3): 828–32.
- Kilbourne ED (1973) The molecular epidemiology of influenza. *Journal of Infectious Diseases* 127(4): 478-487.
- Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrott RH (1969) Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology* 89(4): 422–434.
- Kim YJ, Kim DW, Lee WJ, Yun MR, Lee HY, Lee HS, Jung HD, Kim K (2014) Rapid replacement of human respiratory syncytial virus A with the ON1 genotype having 72 nucleotide duplication in G gene. *Infection, Genetics and Evolution* 26: 103–112.
- Kingman J (1982) The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications* 13: 235–248.
- Kosakovsky Pond SL, Frost SDW (2005a) Datamonkey: Rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21(10): 2531–2533.
- Kosakovsky Pond SL, Frost SDW (2005b) Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution* 22(5): 1208–1222.
- Kosakovsky Pond SL, Frost SDW, Muse SV (2005c) HyPhy: Hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21(5): 676–679.

- Lam TTY, Hon CC, Tang JW (2010) Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 47(1): 5-49.
- Lamb RA, Parks GD (2013) *Paramyxoviridae* U: Knipe PM, Howley DM (eds.) *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 957-995.
- Latiff K, Meanger J, Mills J, Ghildyal R (2004) Sequence and structure relatedness of matrix protein of human respiratory syncytial virus with matrix proteins of other negative-sense RNA viruses. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10(10): 945–948.
- Lawrence MC, Borg NA, Streltsov VA, Pilling PA, Epa VC, Varghese JN, McKimm-Breschkin JL, Colman PM (2004) Structure of the Haemagglutinin-neuraminidase from Human Parainfluenza Virus Type III. *Journal of Molecular Biology* 335(5): 1343–1357.
- Le Bayon JC, Terrier O, Cartet G, Lina B, Rosa-Calatrava M (2013) Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein. *Virus Genes* 47(2): 365-369.
- Leyrat C, Renner M, Harlos K, Huiskonen JT, Grimes JM (2014) Structure and self-assembly of the calcium binding matrix protein of human metapneumovirus. *Structure* 22(1): 136–148.
- Li J, Ren L, Guo L, Xiang Z, Paranhos-Baccalà G, Vernet G, Wang J (2012) Evolutionary dynamics analysis of human metapneumovirus subtype A2: Genetic evidence for its dominant epidemic. *PLoS ONE* 7(3): e34544.
- Li J, Zhang Y (2012) Messenger RNA Cap Methylation in Vesicular Stomatitis Virus, a Prototype of Non-Segmented Negative-Sense RNA Virus. U: Dricu A (ed.) *Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*. InTech, 237-269.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11): 1451–1452.
- Lingemann M, Surman S, Amaro-Carambot E, Schaap-Nutt A, Collins PL, Munir S (2015) The aberrant gene-end transcription signal of the matrix M gene of human parainfluenza virus type 3 downregulates fusion F protein expression and the F-specific antibody response in vivo. *Journal of Virology* 89(6): 3318–31.
- Liu WK, Liu Q, Chen DH, Liang HX, Chen XK, Huang WB, Qin S, Yang ZF, Zhou R (2013) Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infectious Diseases* 13(1): 28.
- Ljubin-Sternak S, Mlinaric-Galinovic G, Buntic AM, Tabain I, Vilibic-Cavlek T, Cepin-Bogovic J, Tesovic G (2014) Seasonal occurrence of human metapneumovirus infections in Croatia. *Pediatric Infectious Disease Journal* 33(2): 165–167.

- Ljubin-Sternak S, Šantak M, Čepin-Bogović J, Baće A, Vojnović G, Mlinarić-Galinović G, Forčić D, Drazenović V, Falsey AR (2008) Detection of genetic lineages of human metapneumovirus in Croatia during the winter season 2005/2006. *Journal of Medical Virology* 80(7): 1282–1287.
- Makeyev EV, Bamford DH (2004) Evolutionary potential of an RNA virus. *Journal of Virology* 78(4): 2114–2120.
- Malasao R, Okamoto M, Chaimongkol N, Imamura T, Tohma K, Dapat I, Dapat C, Suzuki A, Saito M, Saito M, Tamaki R, Pedrera-Rico GA, Aniceto R, Quicho RF, Segubre-Mercado E, Lupisan S, Oshitani H (2015) Molecular characterization of human respiratory syncytial virus in the Philippines, 2012-2013. *PLoS ONE* 10(11): e0142192.
- Mao N, Ji Y, Xie Z, Wang H, Wang H, An J, Zhang X, Zhang Y, Zhu Z, Cui A, Xu S, Shen K, Liu C, Yang W, Xu W (2012) Human Parainfluenza Virus-Associated Respiratory Tract Infection among Children and Genetic Analysis of HPIV-3 Strains in Beijing, China. *PLoS ONE*, 7(8): e43893.
- Metcalf CJE, Birger RB, Funk S, Kouyos RD, Lloyd-Smith JO, Jansen VAA (2015) Five challenges in evolution and infectious diseases. *Epidemics* 10: 40–44.
- Mizuta K, Tsukagoshi H, Ikeda T, Aoki Y, Abiko C, Itagaki T, Nagano M, Noda M, Kimura H (2014) Molecular evolution of the haemagglutinin-neuraminidase gene in human parainfluenza virus type 3 isolates from children with acute respiratory illness in Yamagata prefecture, Japan. *Journal of Medical Microbiology* 63: 570–577.
- Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T (2012) Epidemiology of parainfluenza virus types 1, 2 and 3 infections based on virus isolation between 2002 and 2011 in Yamagata, Japan. *Microbiology and Immunology* 56(12): 855–858.
- Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Katsushima N, Itagaki T, Noda M, Kozawa K, Ahiko T, Kimura H (2011) Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology Journal* 8: 533.
- Mlinaric-Galinovic G, Forcic D, Ivancic-Jelecki J, Vojnovic G, Bozиков J, Welliver RC (2012) Do Circulating HRSV-Genotypes Affect Established Biennial Epidemic Periodicity in Zagreb Region? *Open Journal of Respiratory Diseases* 2: 91-94.
- Mlinaric-Galinovic G, Welliver RC, Vilibic-Cavlek T, Ljubin-Sternak S, Drazenovic V, Galinovic I, Tomic V (2008) The biennial cycle of respiratory syncytial virus outbreaks in Croatia. *Virology Journal* 5: 18.

- Morgan OW, Chittaganpitch M, Clague B, Chantra S, Sanasuttipun W, Prapasiri P, Naorat S, Laosirithavorn Y, Peret TC, Erdman DD, Baggett HC, Olsen SJ, Fry AM (2013) Hospitalization due to human parainfluenza virus-associated lower respiratory tract illness in rural Thailand. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7(3): 280–285.
- Moudy RM, Sullender WM, Wertz GW (2004) Variations in intergenic region sequences of Human respiratory syncytial virus clinical isolates: Analysis of effects on transcriptional regulation. *Virology* 327(1): 121–133.
- Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E (1985) Two Distinct Subtypes of Human Respiratory Syncytial Virus. *Journal of General Virology* 66: 2111-2124.
- Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL, Scheffler K (2013) FUBAR: A fast, unconstrained bayesian AppRoximation for inferring selection. *Molecular Biology and Evolution* 30(5): 1196–1205.
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL (2010) Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 376(9746): 1074–1084.
- Neemuchwala A, Duvvuri VR, Marchand-Austin A, Li A, Gubbay JB (2015) Human metapneumovirus prevalence and molecular epidemiology in respiratory outbreaks in Ontario, Canada. *Journal of Medical Virology* 87(2): 269–274.
- Nei M, Miller JC (1990) A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* 125(4): 873–879.
- Nidaira M, Taira K, Hamabata H, Kawaki T, Gushi K, Mahoe Y, Maeshiro N, Azama Y, Okano S, Kyan H, Kudaka J, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H (2012) Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2009 to 2011 in Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 65(4): 337–340.
- Nishio M, Ohtsuka J, Tsurudome M, Nosaka T, Kolakofsky D (2008) Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits genome replication by binding to the L protein: possible role in promoting viral fitness. *Journal of Virology* 82(13): 6130–6138.
- Noton SL, Fearn R (2015) Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology* 479-480: 545-554.
- Nunes IFS, Moura FEA (2006) Isolation of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates stored at -20°C from one to fifteen months after collection. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 101(4): 451–453.
- Ohno A, Suzuki A, Lupisan S, Galang H, Sombrero L, Aniceto R, Okamoto M, Saito M, Fuji N, Otomaru H, Roy CN, Yamamoto D, Tamaki R, Olveda R, Oshitani H (2013) Genetic characterization of human respiratory syncytial virus detected in hospitalized children in the Philippines from 2008 to 2012. *Journal of Clinical Virology* 57(1): 59–65.

- Osterhaus A, Fouchier R (2003) Human metapneumovirus in the community. *Lancet* 361(9361): 890-891.
- Owor BE, Masankwa GN, Mwangi LC, Njeru RW, Agoti CN, Nokes DJ (2016) Human metapneumovirus epidemiological and evolutionary patterns in Coastal Kenya, 2007-11. *BMC Infectious Diseases* 16: 301.
- Palermo LM, Porotto M, Greengard O, Moscona A (2007) Fusion promotion by a paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase protein: pH modulation of receptor avidity of binding sites I and II. *Journal of Virology* 81(17): 9152-9161.
- Palomo C, Garcia-Barreno B, Penas C, Melero JA (1991) The G protein of human respiratory syncytial virus: Significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *Journal of General Virology* 72(3): 669-675.
- Panayiotou C, Richter J, Koliou M, Kalogirou N, Georgiou E, Christodoulou C (2014) Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010-2013): Age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity. *Epidemiology and Infection* 142(11): 2406-2411.
- Parrott RH, Kim HW, Arrobio JO, Hodes DS, Murphy BR, Brandt CD, Camargo E, Chanock RM (1973) Epidemiology of respiratory syncytial virus in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *American Journal of Epidemiology* 98(4): 289-300.
- Patterson JB, Cornu TI, Redwine J, Dales S, Lewicki H, Holz A, Thomas D, Billeter MA, Oldstone MB (2001) Evidence that the hypermutated M protein of a subacute sclerosing panencephalitis measles virus actively contributes to the chronic progressive CNS disease. *Virology* 291(2): 215-225.
- Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ (2000) Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *The Journal of Infectious Diseases* 181(6): 1891-1896.
- Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ (1998) Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *Journal of General Virology* 79: 2221-2229.
- Pierangeli A, Trotta D, Scagnolari C, Ferreri ML, Nicolai A, Midulla F, Marinelli K, Antonelli G, Bagnarelli P (2014) Rapid spread of the novel respiratory syncytial virus a ON1 genotype, central Italy, 2011 to 2013. *Eurosurveillance* 9(26): 20843.
- Piyaratna R, Tollefson SJ, Williams JV (2011) Genomic analysis of four human metapneumovirus prototypes. *Virus Research* 160: 200-205.

- Porotto M, Fornabaio M, Kellogg GE, Moscona A (2007) A second receptor binding site on human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase contributes to activation of the fusion mechanism. *Journal of Virology* 81(7): 3216–3228.
- Porotto M, Murrell M, Greengard O, Moscona A (2003) Triggering of human parainfluenza virus 3 fusion protein (F) by the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein: an HN mutation diminishes the rate of F activation and fusion. *Journal of Virology* 77(6): 3647–3654.
- Prinoski K, Cote MJ, Kang CY, Dimock K (1991) Evolution of the Fusion Protein Gene of Human Parainfluenza Virus 3. *Virus Research* 22(1): 55–69.
- Pybus OG, Rambaut A, Harvey PH (2000) An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. *Genetics* 155(3): 1429–1437.
- Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG (2016) Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution* 2(1): vew007.
- Ray G, Schmitt T, Schmitt P (2016) Nucleocapsid Proteins Determine Matrix Protein Compatibility and. *Journal of Virology* 90(7): 3650–3660.
- Ray R, Duncan J, Quinn R, Matsuoka Y (1992) Distinct hemagglutinin and neuraminidase epitopes involved in antigenic variation of recent human parainfluenza virus type 2 isolates. *Virus Research* 24(1): 107–113.
- Rebuffo-Scheer C, Bose M, He J, Khaja S, Ulatowski M, Beck ET, Fan J, Kumar S, Nelson MI, Henrickson KJ (2011) Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human respiratory syncytial virus A and B from Milwaukee, WI 1998-2010. *PLoS ONE* 6(10): e25468.
- Reiche J, Jacobsen S, Neubauer K, Hafemann S, Nitsche A, Milde J, Wolff T, Schweiger B (2014) Human metapneumovirus: Insights from a ten-year molecular and epidemiological analysis in Germany. *PLoS ONE* 9(2): e88342.
- Relova D, Rios L, Acevedo A, Coronado L, Perera C, Pérez L (2018) Impact of RNA Degradation on Viral Diagnosis: An Understated but Essential Step for the Successful Establishment of a Diagnosis Network. *Veterinary Sciences* 5(1): 19.
- Ren J, Liu G, Go J, Kolli D, Zhang G, Bao X (2014) Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate immune response in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE* 9(3): e91865.
- Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb RA, Lee B, Maisner A, Rota P, Wang L (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *Journal of General Virology* 98(12): 2912–2913.

- Rixon HWML, Brown G, Aitken J, McDonald T, Graham S, Sugrue RJ (2004) The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *Journal of General Virology* 85(5): 1153–1165.
- Rueda P, Delgado T, Portela A, Melero JA, García-Barreno B (1991) Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *Journal of Virology* 65(6): 3374–3378.
- Runkler N, Pohl C, Schneider-Schaulies S, Klenk HD, Maisner A (2007) Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cellular Microbiology* 9(5): 1203–1214.
- Sabo Y, Ehrlich M, Bacharach E (2011) The conserved YAGL motif in human metapneumovirus is required for higher-order cellular assemblies of the matrix protein and for virion production. *Journal of Virology* 85(13): 6594–6609.
- Saikusa M, Kawakami C, Nao N, Takeda M, Usuku S, Sasao T, Nishimoto K, Toyozawa T (2017a) 180-nucleotide duplication in the G Gene of Human metapneumovirus A2b subgroup strains circulating in Yokohama City, Japan, since 2014. *Frontiers in Microbiology* 8: 402.
- Saikusa M, Nao N, Kawakami C, Usuku S, Sasao T, Toyozawa T, Takeda M, Okubo I (2017b) A novel 111-nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus. *Microbiology and Immunology* 61(11): 507–512.
- Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R (2010) Viral Mutation Rates. *Journal of Virology* 84(19): 9733–9748.
- Schepens B (2015) Small hydrophobic protein of respiratory syncytial virus as a novel vaccine antigen. *Immunotherapy* 7: 203–206.
- Schepens B, Sedeyn K, Ginste L Vande, De Baets S, Schotsaert M, Roose K, Houspie L, Van Ranst M, Gilbert B, van Rooijen N, Fiers W, Piedra P, Saelens X (2014) Protection and mechanism of action of a novel human respiratory syncytial virus vaccine candidate based on the extracellular domain of small hydrophobic protein. *EMBO Molecular Medicine* 6: 1436–1454.
- Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, Tripp RA, Alvarez R, Manoha C, Williams J, Schildgen O (2011) Human metapneumovirus: Lessons learned over the first decade. *Clinical Microbiology Reviews* 24(4): 734-754.
- Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE (2006) Characterization of Human Metapneumovirus F Protein-Promoted Membrane Fusion: Critical Roles for Proteolytic Processing and Low pH. *Journal of Virology* 80(22): 10931–10941.

- Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, ... Nair H (2017) Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 390(10098): 946-958.
- Shiino T (2012) Phylodynamic analysis of a viral infection network. *Frontiers in Microbiology* 3: 278.
- Shinoff JJ, O'Brien KL, Thumar B, Shaw JB, Reid R, Hua W, Santosham M, Karron RA (2008) Young Infants Can Develop Protective Levels of Neutralizing Antibody after Infection with Respiratory Syncytial Virus. *The Journal of Infectious Diseases* 198(7): 1007–1015.
- Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, Dapat I, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H (2009) Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 47(8): 2475–2482.
- Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Amaro-Carambot E, Surman SR, Collins PL, Murphy BR (2006) Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology* 345(2): 492–501.
- Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E, McAuliffe JM, Elkins WR, St Claire M, Collins PL, Murphy BR (2004) The Two Major Human Metapneumovirus Genetic Lineages Are Highly Related Antigenically, and the Fusion (F) Protein Is a Major Contributor to This Antigenic Relatedness. *Journal of Virology* 78(13): 6927–6937.
- Sommerstein R, Flatz L, Remy MM, Malinge P, Magistrelli G, Fischer N, Sahin M, Bergthaler A, Igonet S, Ter Meulen J, Rigo D, Meda P, Rabah N, Coutard B, Bowden TA, Lambert PH, Siegrist CA, Pinschewer DD (2015) Arenavirus Glycan Shield Promotes Neutralizing Antibody Evasion and Protracted Infection. *PLoS Pathogens* 11(11): e1005276.
- Spann KM, Tran K-C, Chi B, Rabin RL, Collins PL (2004) Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *Journal of Virology* 78(8): 4363–4369.
- Spriggs MK, Murphy BR, Prince GA, Olmsted RA, Collins PL (1987) Expression of the F and HN glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by recombinant vaccinia viruses: contributions of the individual proteins to host immunity. *Journal of Virology* 61(11): 3416–3423.
- Stone R, Takimoto T (2013) Critical Role of the Fusion Protein Cytoplasmic Tail Sequence in Parainfluenza Virus Assembly. *PLoS ONE* 8(4): e61281.

- Streltsov VA, Pilling P, Barrett S, McKimm-Breschkin JL (2015) Catalytic mechanism and novel receptor binding sites of human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase (hPIV3 HN). *Antiviral Research* 123: 216–223.
- Sullender WM (2000) Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. *Clinical Microbiology Reviews* 13(1): 1–15.
- Sun Y, Sriramajayam K, Luo D, Liao DJ (2012) A Quick, cost-free method of purification of DNA fragments from agarose gel. *Journal of Cancer* 3(1): 93–95.
- Suzuki Y (2006) Natural selection on the influenza virus genome. *Molecular Biology and Evolution* 23(10): 1902–1911.
- Suzuki Y (2004) Negative selection on neutralization epitopes of poliovirus surface proteins: Implications for prediction of candidate epitopes for immunization. *Gene* 328(1–2): 127–133.
- Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P (2014) Novel respiratory syncytial virus (HRSV) genotype ON1 predominates in germany during winter season 2012-13. *PLoS ONE* 9(10): e109191.
- Takaguchi M, Takahashi T, Hosokawa C, Ueyama H, Fukushima K, Hayakawa T, Itoh K, Ikeda K, Suzuki T (2011) A single amino acid mutation at position 170 of human parainfluenza virus type 1 fusion glycoprotein induces obvious syncytium formation and caspase-3-dependent cell death. *Journal of Biochemistry* 149(2): 191–202.
- Takahashi M, Nagasawa K, Saito K, Maisawa SI, Fujita K, Murakami K, Kuroda M, Ryo A, Kimura H (2018) Detailed genetic analyses of the HN gene in human respirovirus 3 detected in children with acute respiratory illness in the Iwate Prefecture, Japan. *Infection, Genetics and Evolution* 59: 155–162.
- Takimoto T, Bousse T, Coronel EC, Scroggs RA, Portner A (1998) Cytoplasmic domain of Sendai virus HN protein contains a specific sequence required for its incorporation into virions. *Journal of Virology* 72(12): 9747–9754.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729.
- Tan L, Coenjaerts FE, Houspie L, Viveen MC, van Bleek GM, Wiertz EJ, Martin DP, Lemey P (2013) The comparative genomics of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: genetic variability and molecular evolutionary dynamics. *Journal of Virology* 87(14): 8213–8226.
- Tate MD, Job ER, Deng YM, Gunalan V, Maurer-Stroh S, Reading PC (2014) Playing hide and seek: How glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses* 6(3): 1294–1316.

- Taylor G (2017) Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine* 35(3): 469–480.
- Teng MN, Collins PL (1999) Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *Journal of Virology* 73(1): 466–473.
- Terrier O, Cartet G, Ferraris O, Morfin F, Thouvenot D, Hong SS, Lina B (2008) Characterization of naturally occurring parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) variants. *Journal of Clinical Virology* 43(1): 86–92.
- Tran KC, Collins PL, Teng MN (2004) Effects of altering the transcription termination signals of respiratory syncytial virus on viral gene expression and growth in vitro and in vivo. *Journal of Virology* 78(2): 692–699.
- Trento A, Casas I, Calderón A, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Breña P, Melero JA (2010) Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60-nucleotide duplication in the G protein gene. *Journal of Virology* 84(15): 7500–7512.
- Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C (2003) Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *Journal of General Virology* 84: 3115–3120.
- Tsukagoshi H, Nakamura M, Hirano E, Ishiguro F, Mizuta K, Noda M, Tsukagoshi H, Kimura H (2013) Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2005 to 2011 in Fukui, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 66(1): 56–59.
- Tsurudome M, Nishio M, Komada H, Bando H, Ito Y (1989) Extensive antigenic diversity among human parainfluenza type 2 virus isolates and immunological relationships among paramyxoviruses revealed by monoclonal antibodies. *Virology* 171(1): 38–48.
- van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, De Swart RL, Osterhaus AD, Fouchier R A M (2004) Antigenic and Genetic Variability of Human Metapneumoviruses. *Emerging Infectious Diseases* 10(4): 658–666.
- van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM (2002) Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 295(1): 119–132.
- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RAM, Osterhaus ADME (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Medicine* 7(6): 719–724.
- van Wyke Coelingh KL, Tierney EL (1989) Antigenic and functional organization of human parainfluenza virus type 3 fusion glycoprotein. *Journal of Virology* 63(1): 375–382.

- van Wyke Coelingh KL, Winter CC, Jorgensen ED, Murphy BR (1987) Antigenic and Structural Properties of the Hemagglutinin- Neuraminidase Glycoprotein of Human Parainfluenza Virus Type 3: Sequence Analysis of Variants Selected with Monoclonal Antibodies Which Inhibit Infectivity, Hemagglutination, and Neuraminidase Acti. *Journal of Virology* 61(5): 1473–1477.
- Velez Rueda AJ, Mistchenko AS, Viegas M (2013) Phylogenetic and Phylodynamic Analyses of Human Metapneumovirus in Buenos Aires (Argentina) for a Three-Year Period (2009-2011). *PLoS ONE* 8(4): e63070.
- Villaran MV, García J, Gomez J, Arango AE, Gonzales M, Chicaiza W, Alemán W, Lorenzana de Rivera I, Sanchez F, Aguayo N, Kochel TJ, Halsey ES (2014) Human parainfluenza virus in patients with influenza-like illness from Central and South America during 2006-2010. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 8(2): 217–227.
- Volz EM, Koelle K, Bedford T (2013) Viral Phylodynamics. *PLoS Computational Biology* 9(3): e1002947.
- Wang F, Zhao LQ, Zhu RN, Deng J, Sun Y, Ding YX, Tian R, Qian Y (2015) Parainfluenza Virus Types 1, 2, and 3 in Pediatric Patients with Acute Respiratory Infections in Beijing During 2004 to 2012. *Chinese Medical Journal* 128(20): 2726–2730.
- Waning DL, Schmitt AP, Leser GP, Lamb RA (2002) Roles for the cytoplasmic tails of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in budding of the paramyxovirus simian virus 5. *Journal of Virology* 76(18): 9284–9297.
- Waris M (1991) Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: Two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. *Journal of Infectious Diseases* 163(3): 464–469.
- Watkinson RE, Lee B (2016) Nipah virus matrix protein: expert hacker of cellular machines. *FEBS Letters* 590(15): 2494-2511.
- Weinberg GA, Hall CB, Iwane MK, Poehling KA, Edwards KM, Griffin MR, Staat MA, Curns AT, Erdman DD, Szilagyi PG (2009) Parainfluenza Virus Infection of Young Children: Estimates of the Population-Based Burden of Hospitalization. *Journal of Pediatrics* 154(5): 694-699.
- Welliver RC (2007) Temperature, humidity, and ultraviolet B radiation predict community respiratory syncytial virus activity. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 26: S29–S35.
- Whitehead SS, Bukreyev A, Teng MN, Firestone CY, St Claire M, Elkins WR, Collins PL, Murphy BR (1999) Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *Journal of Virology* 73(4): 3438–3442.
- Wohl S, Schaffner SF, Sabeti PC (2016) Genomic Analysis of Viral Outbreaks. *Annual Review of Virology* 3(1): 173–195.

- World Health Organisation (2017) WHO strategy to pilot global respiratory syncytial virus surveillance based on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). Geneva, World Health Organization 1-31.
- World Health Organisation (2012) Measles virus nomenclature Update: 2012. *Weekly Epidemiological Record* 87(9): 73–80.
- Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA (2007) Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. *Journal of Molecular Biology* 368(3): 652–665.
- Yanagihara R, McIntosh K (1980) Secretory immunological response in infants and children to parainfluenza virus types 1 and 2. *Infection and Immunity* 30(1): 23–28.
- Yang C-F, Wang CK, Tollefson SJ, Piyaratna R, Lintao LD, Chu M, Liem A, Mark M, Spaete RR, Crowe JE Jr, Williams JV (2009) Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virology Journal* 6(1): 138.
- Yang Z, Bielawski JR (2000) Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends in Ecology and Evolution* 15(12): 496-503.
- Yano T, Fukuta M, Maeda C, Akachi S, Matsuno Y, Yamadera M, Kobayashi A, Nagai Y, Kusuhara H, Kobayashi T, Amano H, Nishinaka T, Ochiai H, Watanabe M, Nakamura H, Suga S, Ihara T (2014) Epidemiological investigation and seroprevalence of human parainfluenza virus in Mie prefecture in Japan during 2009-2013. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 67(6): 506–508.
- Yao Q, Compans RW (2000) Filamentous particle formation by human parainfluenza virus type 2. *Journal of General Virology* 81: 1305–1312.
- Yu Q, Estevez C, Song M, Kapczynski D, Zsak L (2010) Generation and biological assessment of recombinant avian metapneumovirus subgroup C (aMPV-C) viruses containing different length of the G gene. *Virus Research* 147(2): 182–188.
- Yuasa T, Kawano M, Tabata N, Nishio M, Kusagawa S, Komada H, Matsumura H, Ito Y, Tsurudome M (1995) A Cell Fusion-Inhibiting Monoclonal Antibody Binds to the Presumed Stalk Domain of the Human Parainfluenza Type 2 Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein. *Virology* 206(2): 1117–1125.
- Zhang G, Zhang S, Ding B, Yang X, Chen L, Yan Q, Jiang Y, Zhong Y, Chen M (2014) A leucine residue in the C terminus of human parainfluenza virus type 3 matrix protein is essential for efficient virus-like particle and virion release. *Journal of Virology* 88(22): 13173–13188.
- Zlateva KT, Lemey P, Moes E, Vandamme AM, Van Ranst M (2005) Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *Journal of Virology* 79(14): 9157–9167.

Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M (2004) Molecular Evolution and Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A: Positively Selected Sites in the Attachment G Glycoprotein. *Journal of Virology* 78(9), 4675–4683.

8. ŽIVOTOPIS

Anamarija Slović rođena je 06. travnja 1989. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Preddiplomski studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku PMF-a upisala je 2008. godine, a završila ga je 2011. godine, nakon čega upisuje diplomski studij Molekularne biologije. Diplomski studij završava 2014. godine s radom „Raznolikost gena za molekularni šaperonin GroEL u genomima bakterija roda ‘Candidatus Phytoplasma’“ pod vodstvom dr. sc. Martine Šeruge Musić. Doktorski studij biologije na PMF-u upisala je 2014. godine. Od siječnja 2015. godine zaposlenik je Sveučilišta u Zagrebu, u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji gdje radi kao stručni suradnik na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Genomika i molekularna epidemiologija humanih paramiksovirusa u Hrvatskoj – ParamyxovCro“ pod vodstvom dr. sc. Dubravka Forčića. Koautor je 7 izvornih znanstvenih članaka indeksiranim u bazi Web of Science. Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova, te je članica Hrvatskog mikrobiološkog društva.

PUBLIKACIJE

1. **Slović A**, Kosutic-Gulija T, Santak M, Ivancic-Jelecki J, Jagusic M, Ljubin-Sternak S, Mlinarić-Galinović G, Vilibić-Čavlek T, Tabain I, Forcic D (2018) Genetic variability and sequence relatedness of matrix protein in viruses of the families *Paramyxoviridae* and *Pneumoviridae*. *Intervirology* doi: 10.1159/000487049.
2. Jagušić M, **Slović A**, Ljubin-Sternak S, Mlinarić-Galinović G, Forčić D (2017) Genetic diversity of human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory infections in Croatia. *Journal of Medical Virology* 89(11): 1885-1893. doi: 10.1002/jmv.24884.
3. Košutić-Gulija T, **Slović A**, Ljubin-Sternak S, Mlinarić-Galinović G, Forčić D (2017) Genetic analysis of human parainfluenza virus type 3 obtained in Croatia, 2011-2015. *Journal of Medical Microbiology* 66(4): 502-510. doi: 10.1099/jmm.0.000459.
4. Ivancic-Jelecki J, **Slović A**, Šantak M, Tešović G, Forcic D (2016) Common position of indels that cause deviations from canonical genome organization in different measles virus strains. *Virology Journal* 13: 134. doi: 10.1186/s12985-016-0587-2.
5. **Slović A**, Ivancic-Jelecki J, Ljubin-Sternak S, Galinović GM, Forcic D (2016) A molecular epidemiological study of human respiratory syncytial virus in Croatia, 2011-2014. *Infection, Genetics and Evolution* 44: 76-84. doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.036.
6. Košutić-Gulija T, **Slović A**, Ljubin-Sternak S, Mlinarić-Galinović G, Forčić D (2016) A study of genetic variability of human parainfluenza virus type 1 in Croatia, 2011-2014. *Journal of Medical Microbiology* 65(8): 793-803. doi: 10.1099/jmm.0.000297.

7. Šantak M, **Slović A**, Ljubin-Sternak M, Mlinarić-Galinović M, Forčić D (2016) Genetic diversity among human parainfluenza virus type 2 isolated in Croatia between 2011 and 2014. *Journal of Medical Virology* 88(10): 1733-1741. doi: 10.1002/jmv.24532.