

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja ZIDARIČ

**UGOTAVLJANJE NOVIH VRST HANTAVIRUSOV V  
ROVKAH V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja ZIDARIČ

**UGOTAVLJANJE NOVIH VRST HANTAVIRUSOV V ROVKAH V  
SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF HANTAVIRUSES IN SHREWS, AS NATURAL  
HOSTS, IN SLOVENIA**

GRADUATE THESIS  
University study

Ljubljana, 2012

Zidarič T. Ugotavljanje novih vrst hantavirusov v rovkah v Sloveniji.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2012

---

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in laboratoriju WHO na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Tatjana Avšič- Županc in za recenzenta prof. dr. Mario Poljak.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič- Županc, univ. dipl. biol.

Recenzent: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tatjana Avšič- Županc, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Zidarič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

**ŠD** Dn  
**DK** UDK 578.2.083:599.363(043)=163.6  
**KG** virusi/ *Hantavirus*/ hantavirusi v žužkojedih/ gozdna rovka/ *Sorex araneus*/ Slovenija/ molekularne tehnike/ verižna reakcija s polimerazo/ PCR/ PCR z reverznim prepisom/ vgnezden PCR  
**AV** ZIDARIČ, Tanja  
**SA** AVŠIČ- ŽUPANC, Tatjana (mentorica)/ POLJAK, Mario (recenzent)  
**KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
**ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
**LI** 2012  
**IN** UGOTAVLJANJE NOVIH VRST HANTAVIRUSOV V ROVKAH V SLOVENIJI  
**TD** Diplomska delo (univerzitetni študij)  
**OP** XII, 72 str., 1 pregl., 11 sl., 4 pril., 79 vir.  
**IJ** SI  
**JI** sl/en  
**AI** Hantavirusi v naravi krožijo med trajno okuženimi malimi sesalci, ki virus izločajo v okolico. Pri naravnih gostiteljih okužba s hantavirusi poteka brez kliničnih znakov, medtem ko pri ljudeh virus povzroči hemoragično mrzlico. Dolgo je veljalo, da so hantavirusi tesno povezani samo s posamezno vrsto glodavca, vendar so leta 2006 odkrili prve hantaviruse, ki v naravi krožijo med žužkojedimi sesalci. Danes poznamo že več kot 10 žužkojedih gostiteljev, med katere spadajo tako rovke kot tudi krki. V Evropi je najbolj razširjen virus Seewis, ki so ga odkrili v tkivih gozdne rovke, *Sorex araneus*, v Švici in dokazali njegovo prisotnost tudi na Finskem, Madžarskem in v Srbiji. Prav zato, smo želeli ugotoviti ali tudi v Sloveniji hantavirusi krožijo v žužkojedih sesalcih. V raziskavo smo vključili 68 tkriv rovk, ujetih na različnih lokacijah po Sloveniji. Z molekularnimi metodami smo dokazali hantavirusni genom v 6 vzorcih (11,3 %) gozdne rovke. S filogenetsko analizo smo ugotovili, da v Sloveniji krožita dve genetski liniji virusa Seewis. Prva genetska linija je omejena na področje Ilirske Bistrice, medtem ko druga genetska linija kroži po širšem področju Slovenije: od Goriške do Notranjsko-Kraške in Podravske regije. Podobno, kot pri drugih hantavirusih, smo tudi pri virusu Seewis dokazali zemljepisno raznolikost virusnih izolatov in potrdili, da so slovenske različice virusa najbolj sorodne virusu Seewis odkritem na Madžarskem.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 578.2.083:599.363(043)=163.6  
CX viruses/ *Hantavirus*/ shrewborne hantaviruses/ Eurasian common shrew/ *Sorex araneus*/ Slovenia/ molecular techniques/ polymerase chain reaction/ PCR/ PCR with reverse transcription/ nested PCR  
AU ZIDARIČ, Tanja  
AA AVŠIČ- ŽUPANC, Tatjana (supervisor)/ POLJAK, Mario (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartemental Programme in Microbiology  
PY 2012  
TI IDENTIFICATION OF HANTAVIRUSES IN SHREWS, AS NATURAL HOSTS, IN SLOVENIA  
DT Graduation Thesis (University study)  
NO XII, 72 p., 1 tab., 11 fig., 4 app., 79 ref.  
LA SI  
AL sl/en  
AB Hantaviruses are in nature carried by persistently infected hosts. In general, it is accepted that infection of natural host is in apparent and does not produce a disease. Humans do not belong to the natural host range of hantaviruses, and infection is usually followed by the disease. Originally, it was accepted that each hantavirus is associated with a single or few closely related rodent species. For a long time hantaviruses were believed to be rodent-borne pathogens, but since 2006 several new shrew- and mole-borne hantaviruses were discovered. The most spread shrew-borne hantavirus in Europe is Seewis virus, first isolated from *Sorex araneus* in Switzerland. The detection of Seewis virus in different European countries, especially Hungary and Serbia, has been a motive for screening shrews in Slovenia. Therefore, 68 tissues samples of shrews, trapped at different locations in Slovenia, were screened with molecular methods for the presence of hantavirus RNA. In 6 samples of Eurasian common shrew (11,3 %) Seewis virus was detected. Phylogenetic analyses showed that the isolates from Slovenia form two genetic lineages. The first genetic lineage is circulating only in one region (Ilirska Bistrica), but the second genetic lineage is spread throughout the country: from Goriška to Notranjsko-Kraška and Podravska region. Moreover, phylogenetic comparison revealed that Slovenian isolates are closely related with isolates from Hungary.

**KAZALO VSEBINE**

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>X</b>
<b>SLOVARČEK</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED.....	3
2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI .....	6
<b>2.2.1 Taksonomija.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2 Zgradba, ureditev genoma in pomnoževanja virusa .....</b>	<b>8</b>
2.3 EVOLUCIJSKA POVEZAVA MED HANTAVIRUSI IN NARAVNIMI GOSTITELJI.....	10
<b>2.3.1 Koevolucija med hantavirusi in naravnim rezervoarjem.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3.2 Filogenetske analize hantavirusov in naravnih rezervoarjev .....</b>	<b>11</b>
2.4 KROŽENJE HANTAVIRUSOV V NARAVI .....	11
<b>2.4.1 Načini prenosa hantavirusov med malimi sesalci .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.2 Imunski odziv naravnih gostiteljev na hantaviruse .....</b>	<b>13</b>
2.5 HANTAVIRUSI V ŽUŽKOJEDIH SESALCIH.....	14
<b>2.5.1 Virus Thottapalayam (TPM) .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.2 Virus Seewis (SWS).....</b>	<b>16</b>
<b>2.5.3 Virus Asama (ASA).....</b>	<b>16</b>
<b>2.5.4 Virus Oxbow (OXB).....</b>	<b>16</b>
<b>2.5.5 Virus Nova (NVA) .....</b>	<b>16</b>

<b>2.5.6</b>	<b>Virus Kenkeme.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5.7</b>	<b>Virus Rockport (RKP).....</b>	<b>17</b>
<b>2.5.8</b>	<b>Virus Azagny (AZG) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6</b>	<b>NARAVNI GOSTITELJI ŽUŽKOJEDIH HANTAVIRUSOV.....</b>	<b>17</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Rdečezobe gozdne rovke (rod <i>Sorex</i>).....</b>	<b>18</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Gozdna rovka (<i>Sorex araneus</i>) .....</b>	<b>19</b>
<b>2.7</b>	<b>HANTAVIRUSI V SLOVENIJI .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>VZORCI.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>METODE DELA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Osamitev RNK iz tkiv rovki.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Pomnoževanje hantavirusne RNK .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Agarozna elektroforeza PCR pridelkov .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Določanje nukleotidnega zaporedja .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Analiza nukleotidnega zaporedja .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>REZULTATI POMNOŽEVANJA Z RT-PCR IN VGNEZDENIM PCR .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>REZULTATI DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Filogenetska analiza slovenskih izolatov .....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>36</b>
<b>5.2</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>41</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

**KAZALO PREGLEDNIC**

str.

**Preglednica 1:** Pregled pozitivnih vzorcev glede na naravnega gostitelja in časovno obdobje.

..... 33

## KAZALO SLIK

str.

<b>Slika 1:</b> Svetovna razporeditev hantavirusov (Iskalnik Bio agensi, 2012) .....	6
<b>Slika 2:</b> Filogenetsko drevo evolucijskih skupin hantavirusov glede na analize segmenta S virusnega genoma (Charrel in sod., 2011: 109) .....	8
<b>Slika 3:</b> Zgradba hantavirusnega viriona (Saksida, 2011: 170) .....	9
<b>Slika 4:</b> Kroženje hantavirusov v naravi med naravnimi gostiteljem in človekom (Saksida, 2011: 172).....	12
<b>Slika 5:</b> Horizontalen prenos hantavirusov med malimi sesalci (ZZJZ, 2012: 3).....	13
<b>Slika 6:</b> Gozdna rovka ( <i>Sorex araneus</i> ) (Musser, 2012: 1) .....	20
<b>Slika 7:</b> Primeri bolezni HMRS v Sloveniji do leta 2012 (Korva, 2011: 15) .....	21
<b>Slika 8:</b> Vezava začetnih oligonukleotidov HAN-L-F1 in HAN-L-R1 ter HAN-L-F2 in HAN-L-R2 na tarčna odseka segmenta L virusnega genoma (Klempa, 2006: 7).....	26
<b>Slika 9:</b> Dokaz pridelka PCR po vgnezdeni reakciji PCR .....	32
<b>Slika 10:</b> Zemljepisna razporeditev hantavirus pomnoženih iz tkiv gozdne rovke ( <i>S. araneus</i> ) .....	33
<b>Slika 11:</b> Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij segmenta L hantavirusov dolžine 390 bp .....	35

## KAZALO PRILOG

	str.
<b>Priloga A:</b> Seznam vseh vzorcev rovk, ki smo jih preiskovali z metodama RT-PCR in vgnezden PCR.....	64
<b>Priloga B:</b> Slika gelov agarozne elektrofore s pozitivnim rezultati .....	67
<b>Priloga C:</b> Distančna matrika s podanimi vrednostmi v raznolikosti nukleotidnih zaporedij segmenta L hantavirusov .....	69
<b>Priloga D:</b> Distančna matrika s podanimi vrednostmi v raznolikosti aminokislinskih zaporedij segmenta L hantavirusov .....	71

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AND	virus Andes
ASA	virus Asama
AZG	virus Azagny
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni par
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ddNTP	dideoksiribonukleozidtrifosfati ali dideoksiribonukleotide
dNTP	deoksiribonukleozidtrifosfati ali deoksiribonukleotide
DOB	virus Dobrava
HMRS	hemoragična mrzlica z renalnim sindromom
HCPS	hantavirusni kardio-pljučni sindrom
HTN	virus Hantaan
ICTV	International Committee of Virus Taxonomy
Ig	imunoglobulin
KHM	korejska hemoragična mrzlica
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analyses
MJN	virus Imjin
ML	Maximum Likelihood
NE	nephropathia epidemica
NVA	virus Nova
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PUU	virus Puumala
RKP	virus Rockport
RT- PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo
OXB	virus Oxbow
SAA	virus Saaremmaa
SANG	virus Sangassou
SN	virus Sin Nombre
SWS	virus Seewis
TGN	virus Tanganya
TPM	virus Thottapalayam
TUL	virus Tula

## SLOVARČEK

asimptomatičen	brez bolezenskih znakov
divergenten razvoj	razvoj z razhajanjem iz skupnega prednika
endemija	pojavljanje bolezni, ki je z nizko pojavnostjo stalno navzoča na določenem področju in jo klinično prepoznamo le pri posameznikih
endotelij	notranja plast obtočil iz enoskladnega ploščatega epitelija
epidemija	sporadičen pojav bolezni z visoko pojavnostjo pri ljudeh na določenem zemljepisnem področju
hibernacija	zimsko spanje
infiltrat	celice, tekočine, tuje snovi, s katerimi je prepojeno tkivo
koevolucija	sprememba genetske sestave enega organizma ali organske vrste, ki nastane kot odgovor na spremembe drugega organizma ali organske vrste; na koevolucijske spremembe striktno vplivajo le biotski dejavniki, abiotitski vplivi (spremembe okolja ali podnebja) ne vzpodbujujo koevolucijskih sprememb
kospeciacija	dogodek, ki se pojavi, kadar simbiotsko razmerje med dvema organizmoma vodi k nastanku nove vrste med skupnim razvojem
kotranslacija	sinteza hibridne molekule z željeno beljakovino, ki je kovalentno povezana z normalno beljakovino, preko prevajanja hibridne molekule mRNK, ki je bila ustvarjena iz rekombinantne DNK
letalen	smrten
nefritis	vnetje ledvic
prekurzor	predstopnja aktivnega encima
viremija	prisotnost virusov v krvi
zoonoza	bolezen živali, ki se lahko prenesejo tudi na človeka

## 1 UVOD

Hantavirusi so porajajoči se virusi (ang. emerging viruses) zaradi vedno večje pomembnosti kot humani patogeni, čeprav so prvi hantavirus odkrili leta 1977 (Lee in sod., 1978; Klempa, 2009). Okužba s hantavirusi lahko pri ljudeh povzroči dva klinična sindroma. V Aziji in Evropi povzročajo hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS), medtem ko hantavirusi v Ameriki povzročajo hantavirusni srčno-pljučni sindrom (HCPS) (Clement, 2003).

Hantavirusi so izjema v družini *Bunyaviridae* (Schmaljohn in sod., 1985), saj jih ne prenašajo členonožci, ampak se v naravi ohranjajo s kronično okuženimi malimi sesalci, zato jih imenujemo robovirusi (iz ang. rodent-borne). Zaradi zemljepisne porazdelitve njihovih naravnih rezervoarjev veljajo za edine viruse hemoragične mrzlice, ki so razširjene povsod po svetu (Clement, 2003). Glede na njihovo zemljepisno porazdelitev jih ločimo na dve veliki skupini, in sicer hantaviruse »Starega sveta«, kamor spadajo vsi širje patogeni, ki krožijo v Evropi (virus Dobrava, Puumala, Saaremaa in Tula), ter na hantaviruse »Novega sveta«, kot je virus Sin Nombre, prvi odkriti virus na tem področju (Nichol in sod., 1993; Clement, 2003). Hantaviruse delimo tudi glede na naravne gostitelje, s katerimi so tesno povezani, kar je posledica dolgotrajne koevolucije. Tako ločimo hantaviruse v voluharicah, *Arvicolinae*, hantaviruse v miših, *Murinae*, ter hantaviruse v miših »Novega sveta«, *Sigmodontinae* (Elliot in sod., 2000).

V zadnjem času so odkrili hantaviruse tudi v žužkojedih gostiteljih. Te nove vrste virusov so tako prvič odkrili tudi na področjih, kot sta Švica in Gvineja na afriški celini (Song in sod., 2007b; Klempa in sod., 2006; Klempa in sod., 2007).

### 1.1 NAMEN DELA

Slovenija je majhna, a biotopsko zelo raznolika država, kar omogoča idealne pogoje za sobivanje različnih vrst gostiteljev in virusov. Velja za hantavirusno endemično področje, saj pri nas krožijo širje hantavirusni tipi: virus Dobrava, Puumala, Saaremaa in Tula. V Sloveniji so hantavirusni gostitelji glodavci iz družin *Murinae* (miši) in *Arvicolinae*

(voluharice) (Avsic-Zupanc in sod., 1995; Avsic-Zupanc in sod., 2000; Avšič-Županc in sod., 2007; Korva in sod., 2009).

V zadnjem času je vse več poročil o hantavirusih, ki so jih izolirali iz rovk in krtov tako v Evropi kot tudi Aziji. Hkrati najnovejše objave namigujejo, da številne vrste rovk iz medsebojno oddaljenih predelov sveta lahko predstavljajo naravni rezervoar hantavirusov (Yadav in sod., 2007; Song in sod., 2008; Kang in sod., 2009a; Kang in sod. 2009b). Hantavirusi izolirani iz rovk in krtov so genetsko bolj raznoliki kot hantavirusi izolirani iz glodavcev, kar nakazuje na pradavno evolucijsko povezavo in /ali prilagoditev virusa na gostitelja (Kang in sod., 2010).

Namen diplomske naloge je ugotoviti ali so tudi v Sloveniji rovke naravni rezervoar hantavirusom. Celokupno RNK smo osamili iz tkiv rovk, ki so jih ujeli na različnih lokacijah po Sloveniji. Z molekularnimi metodami smo pomnožili hantavirusno RNK in s filogenetskimi analizami smo želeli opredeliti morebitne nove slovenske izolate virusa.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Prve opise o bolezni, ki jo danes imenujemo HMRS, najdemo v kitajskih zapisih, datiranih pred več kot 900 leti (McCaughey in sod., 2000), ter v angleških zapisih iz srednjega veka (Bridson, 2001). Med ameriško državljanjsko vojno se je v letih od 1862 do 1863 pojavila epidemija t.i. rovnega nefritisa (ang. trench nephritis) in po mnenju zgodovinskih virov, naj bi jo povzročili hantavirusi (Heyman in sod., 2009).

Po poročilih okrajne bolnišnice v Vladivostoku je prišlo do prvih okužb s hantavirusi na ozemlju Koreje, Mandžurije in daljnovezhodne ruske regije med leti 1913 in 1914, vendar so se primeri okužb na teh predelih Evrazije pojavljali že stoletje prej. V evropskem delu Rusije, natančneje regiji Tula, je bilo leta 1930 HMRS-u podobno obolenje poimenovano kot Tula mrzlica, kar je pravzaprav okužba z virusom Tula (TUL) (Simpson, 1984). Švedski avtorji so štiri leta kasneje prvič poročali o t.i. nephropathii epidemici (NE), ki je blažja oblika HMRS in se običajno pojavlja na območju Skandinavije (Heyman in sod., 2009).

Med korejsko vojno (1951-1953) so se zdravniki ameriške vojske soočili z akutnim obolenjem, za katerega je bila značilna odpoved ledvic, krvavitve in včasih tudi šok. Bolezen so poimenovali korejska hemoragična mrzlica (KHM). V tem obdobju je za KHM zbolelo več kot 3000 ameriških in korejskih vojakov, stopnja smrtnosti je bila med 5 % in 10 % (Clement, 2003; Heyman in sod., 2009). Vseeno je povzročitelj ostal neznan še dve desetletji, dokler ni korejski virolog H. W. Lee leta 1976 v pljučnem tkivu dimaste miši (*Apodemus agrarius*) odkril specifičen antigen, ki je reagiral z vzorcem seruma bolnika s HMRS. Leto kasneje so virus osamili in opisali njegove lastnosti. Prototip virusa so poimenovali Haantan (HTN) po reki Haantan, kjer so ujeli miš, iz katere so izolirali virus (Lee in sod., 1978).

Z reakcijo specifičnega antiga iz okuženega glodavca z bolnikovim serumom, so v gozdni voluharici (*Myodes glareolus*) v Puumali na Finskem odkrili povzročitelja NE, virus Puumala (PUU) (Brummer-Korvenkontio in sod., 1980). Leta 1991 so v Sloveniji iz pljuč rumenogrle miši (*Apodemus flaviculus*) osamili nov hantavirus, virus Dobrava (DOB), ki je dobil ime po vasi Dobrava na Dolenjskem. Razširjena antigenska in genetska raziskava sta pokazali, da gre za edinstven tip virusa (Avsic-Zupanc in sod., 1992; Avsic-Zupanc in sod., 1995). Kasneje so na estonskem otoku Saaremaa iz *A. agrarius* izolirali četrti hantavirus, ki kroži v Evropi, virus SAA, pri katerem so dokazali sorodnost z virusom DOB (Nemirov in sod., 1999; Sjölander in sod., 2002; Sironen in sod., 2005).

Na ameriški celini do leta 1993 hantavirusnih okužb pri ljudeh niso zabeležili. Maja tega leta je prišlo do izbruha akutnega respiratornega sindroma z visoko stopnjo smrtnosti (do 50 %) (Nichol in sod., 1993). Okužba se je prvotno pojavila v štirih zveznih državah (Arizoni, Koloradu, Novi Mehiki in Utah-u) in je znana kot hantavirusni kardio-pljučni sindrom (HCPS), povzroča jo virus Sin Nombre (SN) (Nichol in sod., 1993; Duchin in sod., 1994). Pojavili so se tudi dokazi, po katerih naj bi virus SN krožil v naravi že pred letom 1959. Po letu 1993 so v Severni in Latinski Ameriki odkrili številne viruse »Novega sveta«, ki podobno kot virus SN povzročajo HCPS. V to skupino hantavirusov spada tudi virus Andes (AND), ki je do sedaj edini znani predstavnik rodu *Hantavirus* z možnim prenosom s človeka na človeka (Padula in sod., 1998).

Pred kratkim sta se na področju raziskovanja hantavirusov pojavili novi prelomnici, in sicer odkritje hantavirusov na afriški celini ter odkritje filogenetsko oddaljenih hantavirusov, ki se ne ohranjajo v glodavcih. O sumu na hantavirusne okužbe pri ljudeh so poročali z različnih koncev Afrike. Večina poročil se je nanašala na seroepidemiološke raziskave afriške populacije, katerih protitelesa so navzkrižno reagirala z evrazijskimi hantavirusi. Kljub temu je končni dokaz, torej prisotnost avtohtonega hantavirusa v glodavcih, manjkal. Tako je Afrika z vidika zemljepisne porazdelitve hantavirusov še vedno veljala za neznan svet (lat. *terra incognita*). To se je spremenilo leta 2006, ko so v Gvineji odkrili prvi genetski dokaz za prisotnost hantavirusa. Naravni gostitelj prvega afriškega hantavirusa, virus Sangassou (SANG), je afriška gozdna miš (*Hylomys*

cussimus), kar ga uvršča v skupino *Murinae*-povezanih hantavirusov (Klempa in sod., 2006).

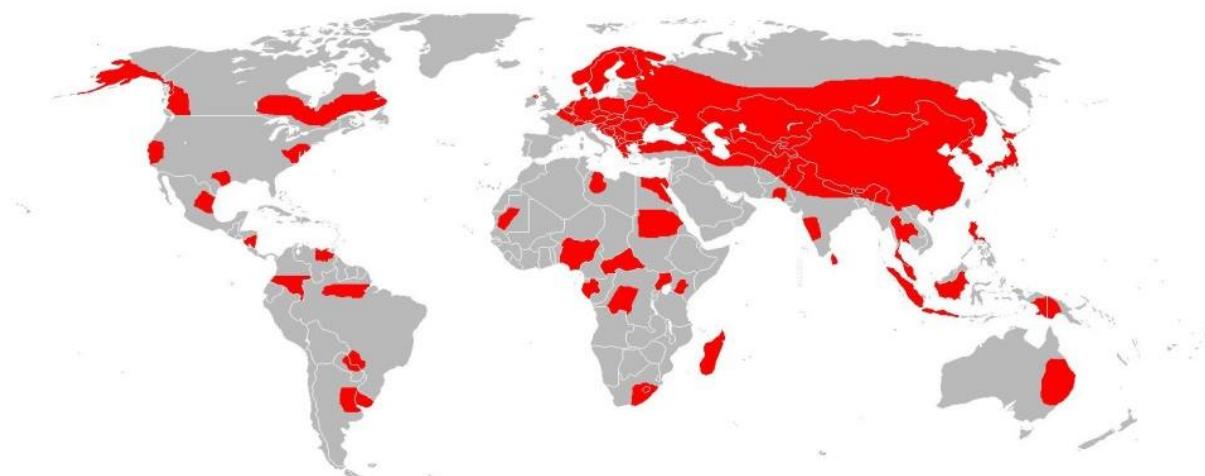
Kmalu za tem so prav tako v Gvineji odkrili virus Tanganya (TGN). To odkritje je predstavljalo še večje presenečenje od prvega, saj so raznoliko hantavirusno zaporedje osamili iz Teresine rovke (*Crocidura theresae*). Filogenetska analiza je pokazala, da je virus TGN genetsko oddaljen od ostalih hantavirusov, in sicer se razlikuje od virusa AND za 67,7 %, od virusa PUU pa do 72,3 % (Klempa in sod., 2007). Ali so hantavirusi iz rovk in krtov patogeni tudi za ljudi, ni znano, saj primerov bolezni podobnih HMRS ali HCPS še niso zabeležili. Vendar je možno, da zaradi slabših zdravstvenih razmer v Afriki prihaja do zamenjave hantavirusnih okužb z drugimi resnimi obolenji. V raziskavi so Klempa in sodelavci pri gvinejskem prebivalstvu odkrili znatno pogostnost hantavirusno specifičnih protiteles, kar predstavlja prvi dokaz o hantavirusnih okužbah pri ljudeh na afriški celini (Klempa in sod., 2010).

Prvi hantavirus nasploh so odkrili leta 1964 v Indiji. Iz tkiv azijske hišne rovke (*Suncus murinus*) so osamili virus Thottapalayam (TPM), ki je več kot 30 let veljal za izjemo med hantavirusi (Carey in sod., 1971). V tem obdobju je bil edini znani hantavirus, ki je krožil v naravi preko rovke. Kmalu po odkritju afriškega hantavirusa v tkivih rovk, virusa TGN, so virologi po svetu poročali tudi o drugih novih hantavirusnih izolatih iz tkiv različnih rovk: virus Camp Ripley iz severne kratkorepe rovke (*Blarina brevicauda*) (Arai in sod., 2007), virus Ash River iz maskirane rovke (*Sorex cinereus*) (Arai in sod., 2008a), virus Jemez Springs iz temne rovke (*Sorex monticolus*) (Arai in sod., 2008a), virus Cao Bang iz kitajske krtne rovke (*Anourosorex squamipes*) (Song in sod., 2007c), virus Seewis (SWS) iz gozdne rovke (*Sorex araneus*) (Song in sod., 2007b), virus Imjin (MJN) iz belozobe rovke (*Crocidura lasiura*) (Song in sod., 2009), virus Asama (ASA) iz japonske krtne rovke (*Urotrichus talpoides*) (Arai in sod., 2008b) in virus Oxbow (OXB) iz ameriške krtne rovke (*Neurotrichus gibbsii*) (Kang in sod., 2009a).

## 2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI

## 2.2.1 Taksonomija

Hantavirusi sodijo v virusno družino *Bunyaviridae*, ki vključuje še 4 virusne robove (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* in *Tospovirus*) (Nichol in sod., 2005). Z ekološkega pogleda so edinstveni, saj za prenos ne potrebujejo členonožcev, ampak so njihovi prenašalci glodavci (Schmaljohn in sod., 1985).



**Slika 1:** Svetovna razporeditev hantavirusov (Iskalnik Bio agensi, 2012)

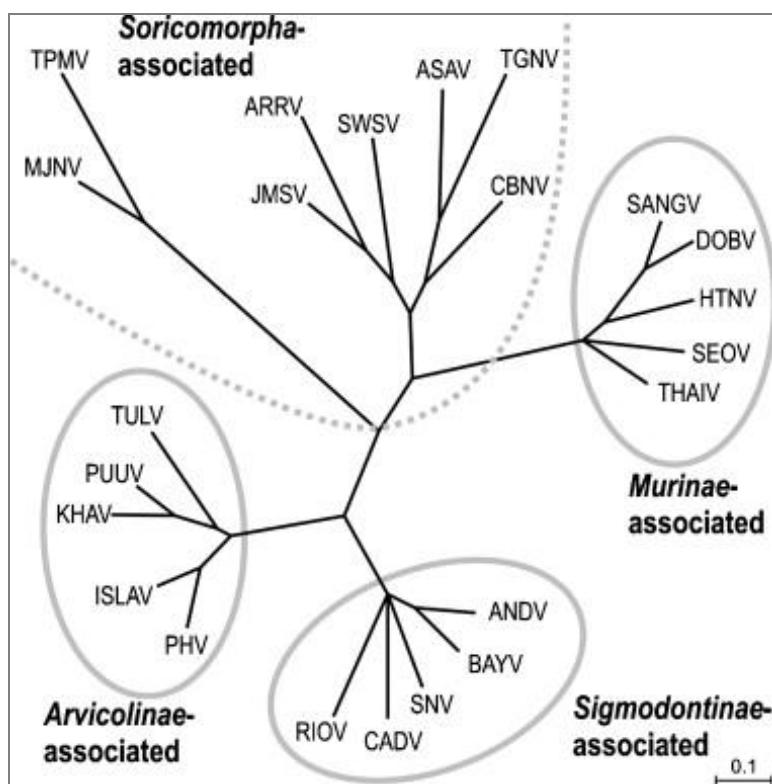
Mednarodno združenje za taksonomijo virusov, ICTV (ang. International Committee of Virus Taxonomy), trenutno priznava 23 vrst hantavirus (Elliot in sod., 2000), od katerih je 21 povezanih z glodavci (Schönrich in sod., 2008). Na račun na novo odkritih hantavirusov, predvsem tistih, ki so povezani z žužkojedi, naj bi se število vrst povečalo. Po drugi strani pa nekateri menijo, da bi zaradi novega strožjega kriterija prišlo do zmanjšanja njihovega števila (Schönrich in sod., 2008; Charrel in sod., 2011). Sedma izdaja ICTV navaja 4 uradne kriterije za določitev novih vrst hantavirusov. Po teh kriterijih veljajo za nove vrste vsi tisti hantavirusi, ki so:

1. odkriti v edinstvenih ekoloških nišah, in sicer v različnih vrstah ali podvrstah naravnega gostitelja,

2. kažejo vsaj 7 % razliko v identičnosti aminokislinskih zaporedij glede na primerjavo celotnega zaporedja glikoproteinskega prekurzorja in nukleokapsidne beljakovine,
3. vidna je vsaj štirikratna razlika v titrih pri dvosmernem navzkrižno nevtralizacijskem testu,
4. naravno ne oblikujejo preuređitve genoma z drugimi vrstami hantavirusov (Elliot in sod., 2000).

Filogenetska drevesa se pri klasifikaciji hantavirusov uporablajo le za slikovni prikaz evolucijskih razmerij med virusi, ki so bili predhodno določeni z zgoraj omenjenimi kriteriji. Filogenetsko drevo, ki temelji na analizi nukleotidnega zaporedja celotnega segmenta S virusnega genoma, razvršča hantaviruse, katerih prvotni gostitelji so glodavci, v tri glavne skupine. Virusi DOB, HTN in SEO sodijo v skupino HTN-podobnim hantavirusom, ki se ohranjajo v glodavcih iz poddružine *Murinae* (miši). Voluharice so naravni rezervoarji skupini PUU-podobnim hantavirusom, skupino SN-podobnih hantavirusov pa tvorijo hantavirusi, ki se zadržujejo v tkivih glodavcev poddružine *Sigmodontinae* (miši »Novega sveta«) (Plyusnin in sod., 1996; Plyusnin, 2002).

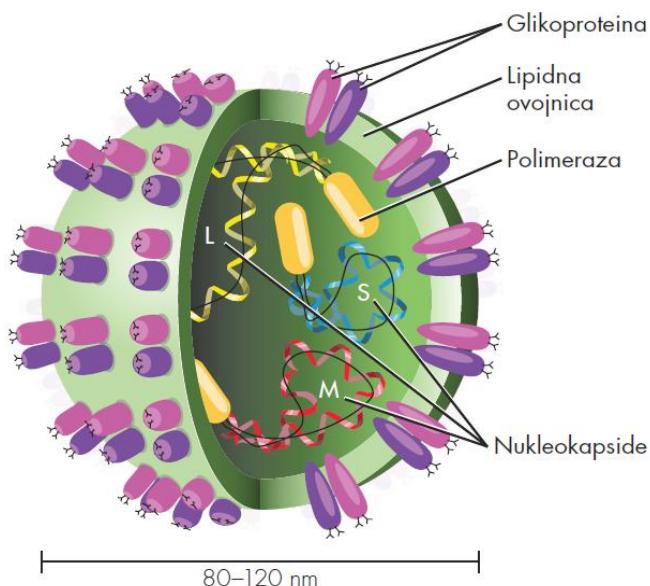
Z upoštevanjem delnih aminokislinskih zaporedij nukleokapsidne beljakovine so tem glavnim skupinam dodali še četrto, kamor sodijo do sedaj vsi znani hantavirusi, ki se nahajajo v naravnih gostiteljih iz reda *Soricomorpha* (krti in rovke). Dosedanji dostopni podatki nukleotidnih zaporedij nakazujejo na to, da ne tvorijo enotne filogenetske skupine. Kljub omejenosti podatkov raziskovalci sklepajo, da naj bi se hantavirusi v rovkah in krtih uvrščali v vsaj dve glavni skupini, vendar brez jasne povezave z njihovimi pripadajočimi gostitelji (Charrel in sod., 2011) (Slika 2).



**Slika 2:** Filogenetsko drevo evolucijskih skupin hantavirusov glede na analize segmenta S virusnega genoma (Charrel in sod., 2011: 109)

### 2.2.2 Zgradba, ureditev genoma in pomnoževanja virusa

Hantavirusi so ovalne oblike s premerom med 80 in 120 nm. Virus je obdan z dvoslojno lipidno ovojnicico, ki ima na površini glikoproteine, ki tvorijo heksamerno strukturo (Schönrich in sod., 2008) (Slika 3). Hantavirusi imajo segmentiran genom iz enojnovijačne ribonukleinske kisline (RNK): segment S (ang. small), segment M (ang. medium) in segment L (ang. large), vsak od njih nosi zapis za različne virusne beljakovine. Pri vseh treh segmentih lahko na 5'- in 3'-koncu najdemo ohranljeno zaporedje, ki je komplementarno in omogoča tvorbo zank, tako da ima vsak segment krožno obliko. Tvorba zank je značilnost za celotno virusno družino *Bunyaviridae*, vendar je 14 od 17 baz specifičnih le za posamezen rod. Tipi hantavirusov se med seboj razlikujejo glede na dolžino 5'- in 3'-nekodirajoče regije (NCR), ki, odvisno od hantavirusnega tipa, obsega okoli 40 do 50 nukleotidov pa vse do približno 300 do 700 nukleotidov (Plyusnin, 2002).



**Slika 3:** Zgradba hantavirusnega viriona (Saksida, 2011: 170)

Zapis za nukleokapsidno beljakovino (N) nosi segment S, ki je velik od 1700 do 2000 baznih parov. Na segmentu M je zapis za dve beljakovini lipidne ovojnice, in sicer za glikoproteina G1 in G2, ki se kotranslacijsko odcepita od skupnega glikoproteinskega prekursorja (GCP). Njuna vloga je, da prepoznata receptorje za hantaviruse na tarčnih celicah. Najdaljši segment je segment L, ki nosi zapis za od RNK odvisno RNK polimerazo. Ta ima trojno vlogo, saj deluje kot replikaza, transkriptaza in endonukleaza. Po mnenju nekaterih strokovnjakov lahko deluje tudi kot RNK helikaza (Plyusnin in sod., 1996; Khaiboullina in sod., 2005).

Genetska raznolikost je običajno posledica genskega zdrsa, pri čemer pride do kopiranja točkastih mutacij in insercij oziroma delecij enega ali več nukleotidov. Do genetskega premika, zaradi preurejanja RNK genoma in rekombinacije, prihaja le med sevi istega tipa hantavirusov (Plyusnin in sod., 1996; Plyusnin, 2002).

Hantavirusi se po vstopu v celico razmožujejo v citoplazmi. Večina hantavirusov brsti iz Golgijskega aparata, za nekatere, kot je virus SN, so pokazali, da brstijo na plazemski membrani. Nukleokapsida in glikoproteina sprožita gostiteljev protitelesni odziv, kar privede do vzpostavitve zaščitne imunosti (Vapalahti in sod., 2003).

## 2.3 EVOLUCIJSKA POVEZAVA MED HANTAVIRUSI IN NARAVNIMI GOSTITELJI

### 2.3.1 Koevolucija med hantavirusi in naravnim rezervoarjem

Ponavadi je določen hantavirus tesno povezan s specifično vrsto malih sesalcev, ki jim služijo kot naravni rezervoar. Zaradi odkritij novih hantavirusov se med znanstveniki pojavlja domneva, da so hantavirusi lahko povezani tudi z nekaj bližnje sorodnih vrst malih sesalcev. Večinoma so to vrste glodavcev, med njimi pa so tudi predstavniki žužkojedov, kot so krti in rovke (red *Soricomorpha*). Njihova tesna povezava se odseva tudi v filogeniji (Charrel in sod., 2011).

Očitna podobnost med hantavirusi in glodavci je bila osnova za zamisel o koevoluciji in kospeciaciji med virusom in glodavcem. Zaradi nedavnih filogenetskih analiz, stopnje evolucije in na novo odkritih hantavirusov, predvsem v žužkojedih, je potrebno to mišljenje ponovno oceniti. Povrh se je zaradi velike raznolikosti in razširjenosti novih hantavirusov predpostavljal, da bomo v bližnji prihodnosti priča odkritjem hantavirusov v drugih skupinah sesalcev. To predpostavko, ki jo podpira tudi dejstvo, da so, z evolucijskega vidika, glodavci in žužkojedi med seboj divergentni (Charrel in sod., 2011), je letos uspelo potrditi dvema raziskovalnima skupinama. V Afriki, in sicer v Sierri Leone in na Slonokoščeni obali, so na molekularni ravni dokazali prisotnost novega hantavirusa v netopirju (Weiss in sod., 2012; Sumibcay in sod., 2012).

Prej dobro sprejeto znanje o koevoluciji med virusom in gostiteljem je bilo zavrnjeno v prid prednostnega preskoka iz gostitelja in lokalne prilagoditve virusa na določen naravni rezervoar (Kang in sod., 2009a). Filogenetsko oddaljeni hantavirusi, kot je virus OXB, postavljajo temelje za nov koncept, po katerem je prvotni sesalski gostitelj predniški žužkojed. Nadalje, navzkrižni medvrstni prenosi med žužkojedi na ločenih celinah so najverjetneje vplivali na evolucijo pripadajočih virusnih zajedalcev (Kang in sod., 2009a; Kang in sod., 2009b).

Med razvojem hantavirusov je zagotovo prihajalo tudi do naključnih gostiteljev (ang. spillover), pri katerih je okužba prehodne narave. Prav tako je prihajalo do preskokov

virusa med gostitelji, saj se isti hantavirus lahko ohranja med mnogimi vrstami glodavcev (Kang in sod., 2009b). Pri malih sesalcih se smatrajo preskoki virusa med gostitelji različnih taksonomskih družin ali poddružin večinoma za neobičajne dogodke, vendar obstajajo tudi redki primer le-teh (Kang in sod., 2009b). Tako je v primeru virusov ASA in OXB prišlo do prenosa hantavirusa z gostitelja z družine *Soricidae* (rovke) na družino *Talpidae* (krti) in poznejšo prilagoditvijo virusa, kar se je s precejšnjo verjetnostjo zgodilo ob različnem časovnem obdobju na različnih celinah. Navzkrižen prenos med vrstami malih sesalcev ni običajen in naključen dogodek, ki je določen le s fizično bližino, kot je v primeru deljenja z virusom okuženega materiala za gnezditve ali preko kapljičnih izločkov sline. Najverjetnejše je posledica specifičnega obnašanja naravnega gostitelja v njegovem habitatu in/ali dolgotrajne prilagoditve med rezervoarjem in virusom (Kang in sod., 2009b). Hkrati to opažanje kaže tudi na širši razpon v izbiri gostitelja prвotnih ozira predniskih hantavirusov, kot ga imajo današnji robovirusi, ki so znani po svoji specifičnosti za rezervoar (Kang in sod., 2009a; Kang in sod., 2009b).

### 2.3.2 Filogenetske analize hantavirusov in naravnih rezervoarjev

Filogenetska analiza hantavirusov in naravnih gostiteljev je pokazala skladno topologijo dreves. Tako je razviden vzporeden razvoj hantavirusov ter gostiteljev iz družin miši in rovk, poleg tega pa še obstoj bioloških mej, ki omejujejo preskok med naravnimi gostitelji. Kljub temu lahko opazimo neujemanja v filogenetskih razmerjih med hantavirusi in njihovimi naravnimi rezervoarji na določenem nivoju. To omogoča naključno gostiteljstvo in posledično prenos na novega gostitelja (Schönrich in sod., 2008).

## 2.4 KROŽENJE HANTAVIRUSOV V NARAVI

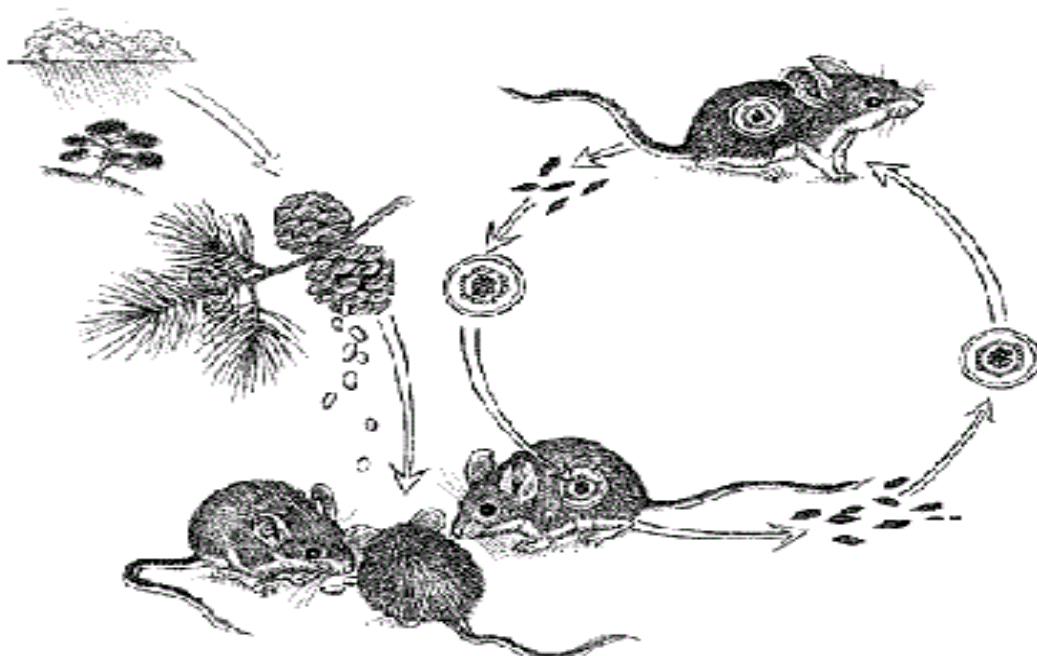
Hantavirusi v naravi krožijo preko kronično okuženega glodavca, ki izloča viruse s slino, urinom in fecesom. Glavni prenos virusa na človeka, ki je naključni gostitelj, poteka preko vdihavanja z virusom okuženih aerosolov (Slika 4). Hantavirusi so v izločkih okuženih glodavcev zelo stabilni, saj lahko preživijo tudi 2 tedna (Schönrich in sod. 2008; Vapalahti in sod., 2003). Redko se lahko okužimo tudi z ugrizom okuženega malega sesalca. Edini primer prenosa okužbe s hantavirusi neposredno s človeka na človeka so opisali za virus AND, kjer se je okužil zdravnik med zdravljenja bolnika (Padula in sod., 1998).



**Slika 4:** Kroženje hantavirusov v naravi med naravnimi gostiteljem in človekom (Saksida, 2011: 172)

#### 2.4.1 Načini prenosa hantavirusov med malimi sesalci

Prenos virusa med malimi sesalci poteka na dva načina, preko vdihavanja aerosoliziranega virusa iz izločkov ali z agresivnim obnašanjem (Slika 5). Manj učinkovit je prenos virusa z vdihavanjem ali z zaužitjem okuženega izločka. V naravi lahko imunosupresija, stres in menjavanje letnega časa pomembno vplivajo na povečanje razmnoževanja in izločanja hantavirusov ter posledično na njihov prenos. Kopičenje aerosolov urina med agresivnim vedenjem glodavcev je ena od verjetnih razlag za povezavo med ranjenjem in hantavirusno okužbo naravnega rezervoarja. Kljub odkritjem virusnega antiga v gonadah nekaterih okuženih glodavcev, do spolnega prenosa hantavirusov med malimi sesalci ne prihaja. (Schönrich in sod., 2008).



**Slika 5:** Horizontalen prenos hantavirusov med malimi sesalci (ZZJZ, 2012: 3)

#### 2.4.2 Imunski odziv naravnih gostiteljev na hantaviruse

Pri okuženih gostiteljih se pojavlja t.i. imunski paradoks. Med časovno omejeno viremijo se razvijejo protitelesa, kljub temu pa gostitelj doživljenjsko izloča viruse (Clement, 2003). Materinska protitelesa razreda IgA in IgG proti hantavirusom lahko prehajajo preko placente ali preko materinega mleka in nudijo potomcu zaščito pred okužbo. Kljub temu, pa le-ta s časom izzveni (Schönrich in sod., 2008).

Zmožnost osamitve ali dokaza virusne RNK v ulovljenih glodavcih, tudi ob prisotnosti protiteles v serumu, je razlog za mišljenje, da poteka okužba asimptomasko ter nima vpliva na preživetje ali rodnost naravnega rezervoarja. Nekatere študije in terenski podatki ne podpirajo teh domnev ter kažejo, da imajo hantavirusi kljub temu negativni vpliv na počutje in razmnoževanje svojih gostiteljev. Obstajajo poročila o komaj zaznavnih histopatoloških lezijah v tkivih nekaterih naravnih gostiteljev hantavirusov »Novega sveta«. Tako so pri ameriški belonogi miši (*Peromyscus leucopus*), ki je bila okužena z virusom SN, odkrili virusne antigene v pljučnem endoteliju in imunske infiltrate v jetrni veni (Netski in sod., 1999). Na osnovi terenskih nadzorov so opisali tudi sezonski vpliv virusa PUU na naravnega gostitelja, pri čemer je virusna okužba naravnega gostitelja

negativno vplivala na njegovo preživetje v naravnem okolju skozi zimo (Kallio in sod., 2007).

Okužbo malih sesalcev s hantavirusi na splošno opisujemo s pojmom persistentna ali doživljenjsko trajajoča. Virus je prisoten v gostiteljski celici, ponavadi v majhnih količinah, pri čemer se neprestano razmnožuje in izloča (Meyer in sod., 2000). Laboratorijske okužbe dimaste miši (*A. agrarius*) z virusom HTN in gozdne voluharice (*M. glareolus*) z virusom PUU so pokazale kratkotrajno viremijo, ki se je pojavila nekaj dni ali od 2 do 3 tedne po okužbi (Lee in sod., 1981; Yanagihara in sod., 1985). Akutna faza je trajala 2 do 3 tedne, ko so kužni titri ali izražanje virusnega antiga na nivo virusne RNK dosegli vrh in pričeli upadati. Hkrati so kmalu po okužbi lahko osamili virus iz različnih tkiv, ki lahko služijo kot mesta za virusno razmnoževanje ali ohranjanje (Yanagihara in sod., 1985). V tej fazi lahko virus dokažemo tudi v fecesu, seču in slini okuženih malih sesalcev. V zadnji fazi postokužbe (več kot po 1 letu) so znanstveniki odkrili znake okužbe le v možganih, pljučih, srcu ali ledvicah. Tako so prišli do zaključka, da so nekatera tkiva, ki so bila pozitivna na virusni označevalec med akutno fazo, postala negativna med dolgotrajno okužbo. Na splošno, dramatičen upad titra virusnega antiga, nakazuje na nekatere stopnje v virusnem življenjskem krogu, pri katerih so ravni izražanja znižane oziroma negativno regulirane. To se sklada z doživljenjsko prisotnostjo visokega titra krožečih hantavirusno specifičnih protiteles v naravnem rezervoarju (Lee in sod., 1981; Yanagihara in sod., 1985). Do izločanja virusa v fecesu, seču in slini prihaja pri naravnih gostiteljih zaradi cikličnih izbruhov podvojevanja virusa med dolgotrajno okužbo. To se lahko dogaja zaradi sprememb v samem virusu in/ali gostiteljevem imunskem odzivu (Schönrich in sod., 2008).

## 2.5 HANTAVIRUSI V ŽUŽKOJEDIH SESALCIH

Prilagajanje virusa na gostitelja je skozi dolga stoletja privedlo do tega, da je večina genetskih in antigenskih značilnosti določena z naravo njihovega gostitelja (Plyusnin, 2002). Evolucijska oddaljenost med glodavci in žužkojedi sovpada z evolucijskim razhodom med že znanimi hantavirusi in novejšimi, ki se ohranjajo v žužkojedih rezervoarjih. Slednji imajo majhno podobnost v aminokislinskem zaporedjem s »starimi« hantavirusi v glodavcih, zaradi česar najverjetneje med njimi ne prihaja do seroloških

navzkrižnih reakcij. Razširjeni so povsod po svetu, tudi v deželah, ki ne veljajo za endemična področja kot sta Švica in Gvineja. V Gvineji so iz tkiv Teresine rovke (*C. theresae*) osamili virus TGN (Klempa in sod., 2007), v Švici so v tkivih gozdne rovke (*S. araneus*) dokazali virus SWS (Song in sod., 2007b). Na Madžarskem so v tkivih evropskega navadnega krta (*Talpa europaea*) odkril virus Nova (NVA) (Kang in sod., 2009b). Hantaviruse, ki se ohranjajo v krtih, so odkrili tudi na Japonskem in v Severni Ameriki: virus ASA iz japonske krtne rovke (*U. talpoides*) (Arai in sod., 2008b), ter OXB iz ameriške krtne rovke (*N. gibbsii*) iz Združenih držav Amerike (Kang in sod., 2009a). Poleg virusa OXB so v ZDA odkrili še virus Camp Ripley iz severne kratkorepe rovke (*B. brevicauda*) (Arai in sod., 2007), virus Ash River iz maskirane rovke (*S. cinereus*) (Arai in sod., 2008a) in virus Jemez Springs iz temne rovke (*S. monticolus*) (Arai in sod., 2008a). Virus Cao Bang iz kitajske krtne rovke (*A. squamipes*) so določili v Koreji (Song in sod., 2007c), v Vietnamu pa so dokazali virus MJN iz belozobe rovke (*C. lasiura*) (Song in sod., 2009). Leta 1964 so v Indiji iz tkiv azijske hišne rovke (*S. murinus*) osamili virus TPM, prvi hantavirus v žužkojedem gostitelju (Carey in sod., 1971). Zaradi divergence v razvoju med glodavci in žužkojedi se predpostavlja, da so lahko tudi ostali višji sesalci kot naravn rezervoar še neodkritim hantavirusom (Klempa, 2009), kar se je potrdilo v letošnjem letu: v netopirju so dokazali hantavirusno breme virusa Mouyassué (Sumibcay in sod., 2012) in virusa Magboi (Weiss in sod., 2012).

### 2.5.1 Virus Thottapalayam (TPM)

Virus Thottapalayam (TPM) je prvi hantavirus, ki so ga osamili iz tkiv azijske hišne rovke (Carey in sod., 1971; Song in sod., 2007a). Med hantaviruse so ga uvrstili zaradi morfoloških značilnosti in genetske podobnosti z ostalimi hantavirusi, ki jih prenašajo glodavci. Še vedno se postavlja vprašanje, ali se je virus TPM naravno razvijal v žužkojedu ali je prišlo do preskoka virusa iz glodavskega gostitelja. Velja za genetsko najbolj raznolik hantavirus, saj imata celokupna dolžina nukleotidov segmenta S in izpeljano aminokislinsko zaporedje skoraj enako izračunano razdaljo od vseh ostalih hantavirusov v glodavcih, kar kaže na zgodnji razhod v evoluciji. O vplivu virusa TPM na zdravje človeka še niso poročali (Song in sod., 2007a).

### 2.5.2 Virus Seewis (SWS)

Leta 2007 so v Švici v v gozdni rovki (*S. araneus*) odkrili nov hantavirus (Song in sod., 2007b). To odkritje podpirajo desetletja stara poročila o prisotnosti hantavirusnega antiga na v *S. araneus* v Rusiji in na področju bivše Jugoslavije. Podobno kot pri hantavirusih v glodavcih, velja tudi pri virusu SWS zemljepisna genetska raznovrstnost, kar pomeni, da je med virusom in gostiteljem potekala dolgotrajna koevolucija (Song in sod., 2007b; Kang in sod., 2009). Virus SWS je sorodnejši s hantavirusi »Starega sveta« (55 do 72%), kot ostalimi hantavirusi, ki se ohranajo v žužkojedih gostiteljih. To nakazuje na preskok virusa med naravnimi gostitelji v preteklosti. Tako kot pri vseh na novo odkritih hantavirusih tudi za virus SWS ni znana patogenost za ljudi (Song in sod., 2007b).

### 2.5.3 Virus Asama (ASA)

Odkritje hantavirusov v krtih je pripomoglo k boljšemu razumevanju o večplastnosti evolucije teh virusov. Arai in sodelavci so iz pljučnih tkiv japonskih krtnih rovk (*U. talpoides*), ki so jih ulovili na Japonskem med februarjem in aprilom 2008, osamili nov hantavirus, poimenovan virus Asama (ASA). Primerjava vseh treh segmentov RNK genoma in aminokislinskih zaporedij kaže, da je virus ASA genetsko sorodnejši hantavirusom iz rovk kot pa tistim iz glodavcev (Arai in sod., 2008b).

### 2.5.4 Virus Oxbow (OXB)

V tkivih ameriške krtne rovke (*N. gibbsii*) so septembra leta 2003 na področju Oregona v ZDA dokazali nov hantavirus, virus Oxbow (OXB). S filogenetsko analizo so dokazali sorodnost z ostalimi hantavirusi iz žužkojedov iz severne Amerike in Evrazije. S tem so še dodatno podkrepili nov koncept o skupnem predniku ter predpostavili vzporedno evolucijo, ki je posledica medvrstnega prenosa hantavirusov med rovkami in krti (Kang in sod., 2009a).

### 2.5.5 Virus Nova (NVA)

Na Madžarskem so poleg virusa SWS v gozdni rovki (*S. araneus*) odkrili tudi nov hantavirus, virus Nova (NVA), in sicer v tkivih navadnega evropskega krta (*Talpa europaea*). Velja za prvi hantavirus, ki se v naravi ohranja v krtih. Glede na ostale

hantaviruse iz glodavcev in žužkojedov je NVA genetsko precej raznolik (46 do 63% na nivoju aminokislin) (Kang in sod., 2009b).

### 2.5.6 Virus Kenkeme

Leta 2006 so v tkivih ploščatoglave rovke (*Sorex roboratus*) na področju Republike Saha (Jakutija) v Sibiriji odkrili nov hantavirus. Analiza nukleotidnega zaporedja segmenta S ter delnih zaporedij segmentov M in L virusa Kenkeme, je pokazala, da se genetsko in filogenetsko razlikuje od virusa SWS iz gozdne rovke (*S. araneus*). Hkrati je genetsko in filogenetsko raznolik tudi od ostalih hantavirusov iz vrst glodavcev, rovk in žužkojedov, kar še dodatno potrjuje o možnem širšem razponu naravnih gostiteljev (Kang in sod., 2010).

### 2.5.7 Virus Rockport (RKP)

V arhivskih tkivih vzhodnega krta (*Scalopus aquaticus*), zajetim leta 1986 v Rockportu v Teksasu, so odkrili nov hantavirus. Virus RKP je po filogenetskih analizah sorodnejši s hantavirusi, ki krožijo med hrčki (družina *Cricetidae*) kot s hantavirusi, ki so jih dokazali v krtih in rovkah (Kang in sod., 2011a).

### 2.5.8 Virus Azagny (AZG)

Leta 2009 so v pljučnih tkivih rovk rodu *Crocidura*, in sicer 39 Buettikoferjevim rovkam (*Crocidura buettikoferi*), 5 Jouvenetevim rovkam (*Crocidura jouvenetae*), 9 zahodnoafriškim pritlikavim rovkam (*Crocidura obscurior*) in 21 afriškim velikim rovkam (*Crocidura olivieri*) ujetih na Slonokoščeni obali z molekularnimi metodami dokazali nov hantavirus, virus Azagny (AZG). S filogenetsko analizo so dokazali najvišjo sorodnost z virusom TGN. Glede na-to predpostavlja, da se je najverjetnejši skupni hantavirusni prednik v naravi ohranjal v žužkojedih in ne v glodavcih (56 % ), ki je pravladoval v Evraziji (87 % ) (Kang in sod., 2011b).

## 2.6 NARAVNI GOSTITELJI ŽUŽKOJEDIH HANTAVIRUSOV

Žužkojedi so najštevilčnejši in najbolj razširjeni mali sesalci v Evraziji. Zaradi številčnosti, raznolikosti in vloge glavnih malih plenilcev v naravi so predmet velikega števila terenskih študij. Kljub temu se še vedno pojavljajo nejasnosti glede uvrščanja v taksonomske razrede (Stone, 1995).

Družino *Soricidae* (rovke) sestavlja 23 rodov in okoli 314 vrst, od katerih se 12 rodov in 126 vrst nahaja na ozemlju Evrope. Družina se je od ostalih žužkojedov odcepila že pred eocenskim obdobjem, pri čemer se je prva sodobna vrsta pojavila v obdobju miocena. Družina rovk izvira iz Evrope, z migracijo so kasneje poselile območje Afrike in Severne Amerike (Stone, 1995).

Rovke so najmanjši žužkojedi sesalci, vrsta *Suncus etruscus* (etrusčanska rovka) iz južne Evrope in Azije je najmanjši znani sesalec. Za rovke so značilne kratke tačke, 5 kremljastih prstov, relativno dolg rep (pri večini rodov), kratek gost kožuh, majhna zunanja ušesca in podolgovat gobček ter majhne oči. Prehranjujejo se z žuželkami, prebivajo na tleh v odpadlem listju ali v travi. Rovke so požrešne živali z majhnim uporom za stradanjem. Posledično so zaradi tega večinoma aktivne kratko časovno obdobje čez dan in noč. Kadar njihovi življenjski pogoji niso ugodni, lahko nekatere vrste celo hibernirajo. Družina *Soricidae* je razdeljena na dve poddružini: *Crocidurinae* (belozobe rovke) in *Soricinae* (rdečezobe rovke). Slednje so tako poimenovane zaradi rdečkastega videza zobovja, ki je obarvano zaradi izločanja železa v zunanjih plasti sklenine, kar lahko poveča odpornost na vodo. Kljub veliki pozornosti, ki ga rdečezobe rovke uživajo, je njihov taksonomski status še vedno dokaj nejasen, predvsem zaradi nekaterih rodov. Za mnogo vrst še vedno ni na voljo natančnih podatkov o njihovih ekoloških potrebah. Večina le-teh temelji na posameznih znanih lokacij in na malem številu objav (Stone, 1995).

### **2.6.1 Rdečezobe gozdne rovke (rod *Sorex*)**

Severno poloblo, od polarnega kroga na severu, do osrednje Amerike, Izraela, Male Azije in Burme na jugu, poseljuje 74 vrst tega rodu (Kryštufek, 1991; Rzebik-Kowalska, 2005). Najpogostejše so v hladnih in vlažnih habitatih, in sicer v gozdovih in tundri. Vse so majhne in tehtajo največ 16 gramov. Konice zob so rdečerjave, kar je posledica v zgornji plasti zobne sklenine naloženih železovih spojin. Pri starih živalih z obrabljenimi zobmi je lahko ta pigmentacija že povsem izbrisana. V sistematskem pogledu je rod zelo težaven, kajti raziskave kromosomov so pokazale, da so posamezne vrste pravzaprav kompleksi morfološko zelo podobnih vrst. V Evropi živi 12 vrst rdečezobih gozdnih rovk in mnoge

od njih je po zunanjih znakih ter lobanji težko prepoznati (Kryštufek, 1991; Rzebik-Kowalska, 2005). Za evropsko področje so endemične vrste *Sorex alpinus* (Schnitz, 1837), *Sorex antinorii* (Bonaparte, 1840), *Sorex arunchi* (Lapini in Testore, 1998), *Sorex coronatus* (Millet, 1828), *Sorex granarius* (Miller, 1910) in *Sorex samniticus* (Altobello, 1926). Preostalih 6 vrst, prav tako značilnih za Evropo, najdemo tudi v Aziji: *Sorex araneus* (Linnaeus, 1758), *Sorex caecutiens* (Laxmann, 1788), *Sorex isodon* (Turov, 1924), *Sorex minutissimus* (Zimmermann, 1780), *Sorex minutus* (Linnaeus, 1766) in *Sorex rolnuchini* (Ognev, 1922).

### 2.6.2 Gozdna rovka (*Sorex araneus*)

Gozdna rovka (lat. *Sorex araneus*) (Slika 6) prebiva v gozdovih, na travnikih, barjih in vrtovih po vsej severni Evropi, vključno s Skandinavijo in Veliko Britanijo (razen Irske), vse do Rusije (Song in sod., 2007b; Eisenreich in sod., 2005). Njen širok razpon v zemljepisni porazdelitvi jo uvršča med najbolj razširjene male sesalce v Evraziji (Eisenreich in sod., 2005). Z izjemo submediteranskega območja, je v Sloveniji splošno razširjena od nižin do nadmorske višine najmanj 1900 m. Zlasti je pogosta v nižinskih gozdovih prekmurske regije, v iglastih gozdovih alpskega območja ter v dinarskem bukovo jelovem gozdu. V kontinentalni Sloveniji je najpogostejsa rovka (Kryštufek, 1991). Njen kožuh je zgoraj temno- do črnorjav, ob bokih je svetlorjav, trebuh pa je sive barve, pogosto s svetlorjavim oprhom (Eisenreich in sod., 2005). Običajno si napravi gnezdo pod zemljo ali pod gostim rastlinjem, vendar občasno zavzame tudi mišja gnezda, krtine ali gnezda voluharic (Song in sod., 2007b). Aktivna je pretežno ponoči, vendar se jo lahko vidi tudi čez dan. Prehranjuje se z deževniki, žuželkami in njihovimi ličinkami ter polži. Oглаša se z rezkim cviljenjem (Eisenreich in sod., 2005). Razmnožuje se 2 leti po skotitvi. Parjenje se prične zgodaj spomladvi (v osrednji Sloveniji v drugi polovici marca), brejost pa traja 13 do 19 dni. Na slovenskem območju je v leglu od 2 do 9 mladičev. Gozdne rovke praviloma preživijo največ eno zimo, tako da v njihovi populaciji ni živali, starejših od 18 mesecev. Glavni naravni plenilci gozdne rovke so verjetno sove. Največje gozdne rovke živijo v Dinarskem območju, najmanjše pa v subpanonski severovzhodni Sloveniji. Živali iz osrednje Slovenije in Alp so po velikosti nekje vmes (Kryštufek, 1991). Večinoma velja za miroljubno žival, čeprav je opazno tudi agresivno teritorialno vedenje (Eisenreich in sod., 2005).



Slika 6: Gozdna rovka (*Sorex araneus*) (Musser, 2012: 1)

## 2.7 HANTAVIRUSI V SLOVENIJI

V Sloveniji sočasno krožijo štiri vrste hantavirusov: virusi DOB, SAA, PUU in TUL (Avsic-Zupanc in sod., 1992; Avsic-Zupanc in sod., 1995; Avsic-Zupanc in sod., 2000; Avšič-Županc in sod., 2007; Korva in sod., 2009). Vendar pa zoonozo HMRS v Sloveniji povzročata le hantavirusa DOB in PUU (Avsic-Zupanc in sod., 1995; Avšič-Županc in sod., 2007) (Slika 7). Prvi zabeležen primer HMRS v Sloveniji je bil leta 1954 (Radosevic in Mohacek, 1954), do danes je prijavljenih več kot 300 primerov, ki se pojavljajo sporadično ali v manjših epidemijah. Čeprav primere HMRS beležimo po celotni državi, večina bolnikov prihaja iz 3 endemičnih žarišč: Ljubljana z okolico, Dolenjska in Prekmurje.



Slika 7: Primeri bolezni HMRS v Sloveniji do leta 2012 (Korva, 2011: 15)

Virus DOB so leta 1991 osamili iz tkiv rumogrle miši (*A. flavicollis*), ki so jo ujeli v vasi Dobrava na Dolenjskem, kjer so poročali o velikem številu primerov bolezni HMRS (Avsic-Zupanc in sod., 1992; Avsic-Zupanc in sod., 1995; Avšič-Županc in sod., 1999). Proučevanja genetskih in antigenskih značilnosti so pokazala, da gre za edinstveno vrsto hantavirusa (Avsic-Zupanc in sod., 1995; Avšič-Županc in sod., 1999). Hkrati ta študija ni predstavila nobenega dokaza o neposrednem izvoru virusa DOB iz virusov HTN in SEO, ki prav tako povzročata HMRS, vendar so ugotovili, da je med njimi prišlo do razhoda v enakem evolucijskem obdobju od teoretičnega prednika (Avsic-Zupanc in sod., 1995). Prvotno je bilo mišljeno, da sta v Sloveniji zastopana dva različna genetska podtipa virusa DOB. Obe genetski liniji odsevata genetsko oddaljenost njunih naravnih gostiteljev iz mišjega rodu *Apodemus*, in sicer *A. flavicollis* in *A. agrarius* (dimasta miš). Prva genetska linija ali klasičen tip virusa DOB se ohranja v *A. flavicollis* in je razširjena po celotnem slovenskem področju. Po njegovem odkritju se je kasneje izkazalo, da je bil etiološki dejavnik za resno obliko HMRS, ki se pojavlja v naši državi kot tudi na preostalem Balkanskem polotoku (Avšič-Županc in sod., 1999; Avsic-Zupanc in sod., 2000). Genetske in filogenetske raziskave so pokazale tesno povezanost med različnimi sevi (ang. strains) z neposredno soodvisnostjo v podobnostih glede na njihove zemljepisne porazdelitve. Na

splošno se genetska raznolikost med njimi povečuje z zemljepisno ločitvijo bivališč rumenogrle miši (*A. flavicollis*) (Avsic-Zupanc in sod., 2000).

Virus SAA, ki v naravi kroži preko dimaste miši *A. agrarius*, se v Sloveniji redkeje pojavlja. Razlog je v omejeni razširjenosti dimaste miši na našem področju, saj naseljuje le severovzhodno območje, ki poteka ob meji z Madžarsko in Hrvaško, ter nižine ob Jadranski obali. Pred kratkim je veljal za drugo genetsko linijo virusa DOB, ki je od ostalih sevov virusa DOB iz *A. flavicollis* genetsko in filogenetsko različna. Virus SAA, ki z virusom DOB sočasno kroži na istem zemljepisnem področju, je bližnje soroden virusom SAA s področij Slovaške, Estonije in Rusije (Avsic-Zupanc in sod., 2000). Tako kot njegov bližnji sorodnik virus DOB tudi virus SAA pri ljudeh povzroča okužbe. Za HMRS, povzročenim z virusom SAA, še niso poročali o smrtnih primerih, kar kaže tudi na razlike v njuni patogenosti (Plyusnin, 2002; Avšič-Županc in sod., 2007).

Virus PUU, povzročitelj blažje oblike HMRS ali NE, ki spominja na okužbo z virusom SAA, je tretji hantavirus, ki sobiva na ozemlju Slovenije. Naravni rezervoar virusa PUU je gozdna voluharica (*M. glareolus*), ki je ena izmed bolje zastopanih glodavcev v osrednji Evropi. Z analizo nukleotidnega zaporedja segmentov S in M, pridobljenih iz kliničnih vzorcev bolnikov in tkiv gozdnih voluharic, so prikazali prisotnost genotipa virusa PUU. Glede na prikaz filogenetskega drevesa, ki temelji na celotnem nukleotidnem zaporedju segmenta S virusnega genoma, tvorijo slovenski sevi virusa PUU različno genetsko linijo, v katero so vključena tudi predhodno objavljena nukleotidna zaporedja virusa PUU iz sosednje Avstrije (Avšič-Županc in sod., 2007; Bowen in sod., 1997; Pyusnina in sod., 2006). V Sloveniji nekateri sevi virusa PUU predstavljajo prvi primer »navidezne vrste« (ang. quasispecies) med hantavirusi, pri čemer gre za mutante z delecijo kodona (ang. codon-deletant) (Avšič-Županc in sod., 2007).

Zaradi širokega razpona naravnih gostiteljev, ki so občutljivi na virus TUL (Schimdt-Chanasit in sod., 2010), in biotske raznovrstnosti v Sloveniji, so tudi pri nas zaznali z virusom TUL pozitivne glodavce (Korva in sod., 2009). Prvotno so virus TUL odkrili v poljski voluharici *Microtus arvalis* in ruski voluharici *Microtus rossiaemeridionalis* v regiji Tula v Rusiji (Plyusnin in sod., 1994). Z uporabo molekularnih metod na vzorcih

tkiv različnih vrst voluharic so dokazali prisotnost virusa TUL tudi v Sloveniji, in sicer pri *M. arvalis*, vrtni voluharici (*Pitymys (Microtus) subterraneus*) in travniški voluharici (*Microtus agrestis*). Glede na filogenijo segmenta S spada v isto genetsko linijo, ki jo tvorijo sevi z območja Avstrije in Hrvaške (Korva in sod., 2009). Pogostnost okužb z virusom TUL pri ljudeh je nizka, kar najverjetneje pojasnjuje nizko patogenost samega virusa. Pojavlja se tudi možnost, da so te okužbe pri ljudeh spregledane, saj lahko pride do napačne diferencialne diagnoze NE, ki jo povzroča virus PUU (Ulrich in sod., 2004).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORCI

V diplomski nalogi smo preiskovali tkiva malih sesalcev iz reda *Soricomorpha* (krti in rovke), ki bi po znanstvenih objavah lahko bili naravnii gostitelji hantavirusov. Žužkojede, vključene v diplomsko nalogu, so ujeli na različnih lokacijah po Sloveniji od leta 1990 do 2006, v sodelovanju Laboratorija za diagnostiko zoonoz, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo in Prirodoslovnim muzejem Slovenije.

V diplomski nalogi smo pregledali tkiva rovk, ki so jih sterilno odstranili in do uporabe shranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pregledali smo 68 vzorcev ledvic, pljuč in vranic različnih vrst rovk, in sicer: 8 vodnih rovk (*Neomys fodiens*), 13 močvirskih rovk (*Neomys anomalus*), 38 gozdnih rovk (*S. araneus*), 1 alpsko rovko (*Sorex alpinus*), 5 poljskih rovk (*Crocidura leucodon*) in 3 vrtnih rovk (*Crocidura suaveolens*).

#### 3.2 METODE DELA

##### 3.2.1 Osamitev RNK iz tkiv rovk

Iz tkiv rovk smo osamili celokupno RNK z reagentom TRIZOL® Reagent proizvajalca Invitrogen Life Technologies™ (Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki med homogenizacijo vzorca ohranja neokrnjenost virusne nukleinske kisline. Izolirana RNK ne vsebuje nečistoč, kot so beljakovine in DNK, in je primerna za nadaljne korake v molekularni diagnostiki.

Postopek osamitve RNK iz tkiv je potekal v varnostni komori II. varnostne stopnje po načelu varnega dela v laboratoriju. Pri delu smo uporabljali avtoklavirane pripomočke (sterilne pincete, jeklene kroglice, pipetne nastavke, tubice), potrebno je bilo tudi pogosto menjavanje rokavic. Predhodno smo vso delovno površino v varnostni komori in pripomočke obrisali z raztopino natrijevega hipoklorita, s čimer smo odstranili ostanke predhodnih izolacij. Za odstranitev encimov RNAze, ki razgrajujejo RNK in so tako

večinoma glavni razlog za neuspelo osamitev, smo uporabili raztopino RNase Free Solution (Qbiogene Inc., Kalifornija, ZDA).

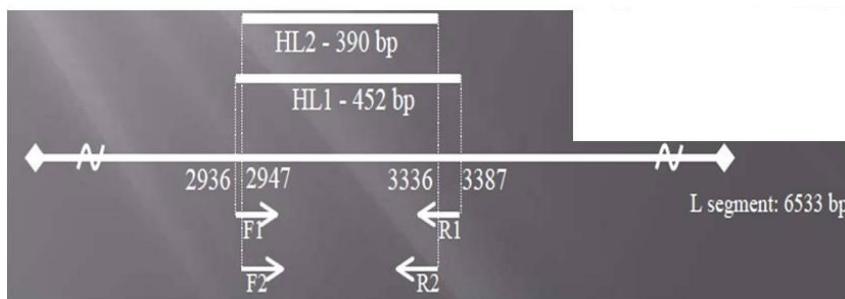
Najprej smo v 200 µl filtriranega fosfatnega pufra (PBS, ang. Phosphate Buffer Saline) homogenizirali košček tkiva (približno 25 mg) s sterilnimi jeklenimi kroglicami s homogenizatorjem Tissue Lyser (Qiagen, Kalifornija, ZDA). Nato smo odstranili jekleno kroglico, vzorce na kratko centrifugirali in pričeli s postopkom osamitve virusne RNK. Homogeniziranemu vzorcu smo dodali 600 µl hladnega (4 °C) TRIZOL® Reagent, ki je raztopina gvanidin izotiocianata in fenola. S sunkovitim obračanjem in kratkim vorteksiranjem smo vzorce premešali ter inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Med inkubacijo je reagent razgradil celice in nukleoproteinske komplekse. Dodali smo 120 µl kloroforma ter tubice zopet premešali s sunkovitim obračanjem in vorteksiranjem, tako da je nastala motna raztopina. Vzorec smo inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi ter nato centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 14000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo v tubici dobili 3 plasti: vodno (zgornjo) plast z raztopljenou RNK, vmesni bel obroč med vodno in organsko plastjo, v katerem se nahajajo beljakovine, in organsko (spodnjo) plast, ki vsebuje mešanico DNK in kloroform-fenola. Vodno plast z raztopljenou RNK, smo prenesli v nove tubice, ne da bi pri tem prišlo do stikov pipetnih nastavkov z beljakovinskim obročem ali stenami tubice. Dodali smo 300 µl ledeno hladnega izopropanola (-20 °C). Vzorce smo premešali in centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 14000 obratov/minuto. Po centrifugiranju je na dnu in po stenah tubice nastal precipitat RNK, zato smo odstranili supernatant ter RNK sprali s 600 µl ledeno hladnega 75 % etanola (-20 °C). Vzorec smo vorteksirali 1 minuto in nato centrifugirali 7 minut pri 4 °C in 12000 obratih/minuto. Nato smo odstranili supernatant in sušili RNK 15 do 30 minut na zraku v aseptični komori. Pri tem je pomembno, da je izhlapelo čimveč etanola, ne da bi se RNK presušila. Usedljivo smo raztopili v 30 do 60 µl ohlajeni vodi MBG (ang., molecular biology grade) (Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija), raztopljenou RNK smo shranili pri -20 °C do nadaljne uporabe.

### 3.2.2 Pomnoževanje hantavirusne RNK

Hantavirusi spadajo med viruse z RNK, zato smo za pomnoževanje virusnega genoma uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR). V tem

postopku reverzna transkriptaza prepiše celokupno RNK v komplementarno DNK (cDNK), nato sledi pomnoževanje z metodo PCR.

Pri iskanju novih hantavirusov smo uporabili metodo, ki so jo razvili Klempa in sodelavci (Klempa in sod., 2006). Postopek za dokazovanje novih vrst hantavirusov je potekal v dveh stopnjah: najprej smo z enostopenjskim RT-PCR pomnožili virusno RNK, nato smo z vgneznjenim PCR še povečali občutljivost metode. Začetni oligonukleotidi nalegajo na ohranjenem delu segmenta L in so degenerirani, zato lahko z njimi pomnožimo vse do sedaj znane hantaviruse (Slika 8).



**Slika 8:** Vezava začetnih oligonukleotidov HAN-L-F1 in HAN-L-R1 ter HAN-L-F2 in HAN-L-R2 na tarčna odseka segmenta L virusnega genoma (Klempa, 2006: 7)

### 3.2.2.1 Enostopenjski RT-PCR za hantavirusni segment L

S prvim parom začetnih oligonukleotidov **HAN-L-F1** (nukleotidno zaporedje: 5'-ATGTAYGTBAGTGCWGATGC-3') in **HAN-L-R1** (nukleotidno zaporedje: 5'-AACCADTCWGTYCCRTCATC-3') smo pomnožili 452 nukleotidov dolg tarčni odsek segmenta L virusnega genoma.

Uporabili smo komplet reagentov QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Reakcija RT-PCR je potekala v napravi Cycler Eppendorf Mastercycler epgradientS *in pro* (Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija).

Končni volumen reakcijske mešanice je znašal 50 µl in je vseboval:

- 10 µl 5-krat koncentriranega pufra QIAGEN OneStep RT-PCR,

- 2 µl deoksiribonukleotidov dNTP Mix (10 mM),
- 10 µl 5-krat koncentrirane raztopine Q- Solution,
- 0,6 µl začetnega oligonukleotida HAN-L-F1 (50 µM),
- 0,6 µl začetnega oligonukleotida HAN-L-R1 (50 µM),
- 2 µl encima QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix
- 19,8 µl sterilne vode
- 5 µl RNK.

Reverzni prepis RNK v cDNK je potekal 30 minut pri 50 °C. Sledili sta inaktivacija encima reverzne transkriptaze in aktivacija polimeraze 15 minut pri 94 °C. Nato je sledilo 40 ciklov reakcije PCR:

- denaturacija cDNK: 30 sekund pri 94 °C,
- pripajanje začetnih oligonukleotidov: 45 sekund pri 48 °C,
- podaljševanje tarčnega odseka: 1 minuta pri 72 °C.

Po zadnjem ciklu reakcije PCR je sledilo zaključno podaljševanje pri 72 °C, ki je trajalo 10 minut, in ohlajevanje reakcijske mešanice pri 4 °C. Pridelke PCR smo do nadaljne uporabe shranili pri 4 °C.

### 3.2.2.2 Vgnezden PCR za dokaz hantavirusnega segmenta L

Vgnezden PCR (angl. nested PCR) poveča občutljivost reakcije PCR, saj lahko pomnožimo zelo majhne količine tarčne RNK. Po končani prvi reakciji PCR uporabimo naslednji par začetnih oligonukleotidov, ki se specifično vežejo na notranje nukleotidno zaporedje pridelka PCR iz prve reakcije. Glavna pomanjkljivost vgnezdenje PCR je visoka verjetnost kontaminacije med prenosom pridelka PCR iz prve reakcije v drugo reakcijo PCR (Tang in sod., 1997).

Pridelek (452 baznih parov) prve reakcije PCR smo pomnoževali z začetnima oligonukleotida **HAN-L-F2** (nukleotidno zaporedje: 5'-TGCWGATGCHACIAARTGGTC-3') in **HAN-L-R2** (nukleotidno zaporedje: 5'-

GCRTCRTCWGARTGRTGDGCAA-3'), ki nalegata na 390 nukleotidov dolg odsek tarčnega zaporedja.

Uporabili smo reagente iz reakcijskega kompleta Platinum PCR SuperMix (1.1x) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Za vsak vzorec smo potrebovali 25 µl reakcijske mešanice, sestavljene iz:

- 22 µl 1,1-krat koncentrirane mešanice PCR SuperMix,
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida HAN-L-F2 (50 µM),
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida HAN-L-R2 (50 µM),
- 2 µl pridelka PCR

Reakcija je potekala v napravi Primus 96 plus (MWG AG Biotech, Ebersberg, Nemčija), in sicer v 35-ih temperturnih ciklih:

- denaturacija PCR pridelka: 15 sekund pri 94 °C,
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: 20 sekund pri 53 °C,
- podaljševanje tarčnega zaporedja: 35 sekund pri 72 °C.

Po končani reakciji smo dobili 390 nukleotidov dolge pridelke PCR, ki smo jih shranili pri 4 °C.

### 3.2.3 Agarozna elektroforeza PCR pridelkov

Za dokazovanje pridelkov PCR in določanje njihove velikosti se uporablja elektroforeza v agaroznem gelu. Metoda temelji na potovanju negativno nabitih nukleinskih kislin v električnem polju proti anodi. Hitrost potovanja je odvisna od dolžine nukleotidnega zaporedja in od koncentracije agaroznega gela.

Pridelke PCR smo dokazovali na 2 % agaroznem gelu (NuSieve GTG, Combrex, Boston, Massachusetts, ZDA), ki smo ga pripravili v 50 ml TAE pufra (Tris-Aacetat-EDTA vsebuje tris bazo, natrijev acetat in natrijev klorid ter EDTA; pH je uravnан na 8,3). Raztopino agaroze in pufra smo segreli do vrelišča v mikrovalovni pečici. Raztopljeni gel smo nato ohladili na približno 50 °C ter dodali 8 µl etidijevega bromida (500 µg/ml, Sigma-Aldrich

Corporation, St. Louis, Montana, ZDA), ki obarva gel tako, da so pridelki vidni pod UV svetlobo. Gel smo razlili v pripravljen plastičen nosilec in počakali, da se strdi. Strjen gel smo z nosilcem vred prenesli v elektroforezno kadičko z dodanim pufrom TAE. Pufer TAE omogoča tok elektronom s katode na anodo in s tem potovanje pridelkov PCR.

V vdolbinice gela smo nanesli 10 µl pridelka PCR, pomešanega z 2 µl 2-krat koncentriranim brom-fenol modrilom Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija). V prvo vdolbico smo nanesli 5 µl lestvice DNK - 100 bazni parov (1 µg/µl, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija), ki deluje kot molekularni označevalec. Elektroforeza je potekala pri napetosti 80V pri sobni temperaturi, in sicer od 30 do 45 minut. Rezultate elektroforeze smo preverili v napravi GelDoc (Biocompare, San Francisco, Kalifornija, ZDA).

### **3.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja**

Pred sekvenčno reakcijo smo iz pridelkov PCR odstranili ostanke polimeraze, začetne oligonukleotide in deoksiribonukleotide. Za čiščenje pridelkov PCR smo uporabili komercialni komplet reagentov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA), in sicer smo ga izvajali po navodilih proizvajalca. Čiščenje pridelkov PCR temelji na vezavi DNK na delce silicijevega dioksida na membrani kolone, in večkratnemu spiranju s pufri.

Po čiščenju smo pridelku PCR določili koncentracijo očiščene DNK, tako da smo kvalitativno določili jakost fragmenta na agaroznem gelu. Višja kot je bila jakost fragmenta, večja koncentracija DNK je bila prisotna v vzorcu. Jakost smo ocenili z levcico od 1 do 5, pri čemer je pomenilo, da je 5 zelo visoka koncentracija, zato smo nadalje v sekvenčni reakciji uporabili le 1 µl pridelka PCR.

Nukleotidno zaporedje segmenta L hantavirusnega genoma smo določili s Sangerjevo metodo. Metoda temelji na verižni reakciji s polimerazo, le da tu uporabimo različno flourescentno označene ddNTP-je (vsaka od štirih baz ima svojo barvo), ki jih potem prepozna laserki sistem na genetskem analizatorju. V reakcijski mešanici so poleg očiščenega pridelka PCR, ki služi kot matrica za pripenjane kratkih fragmentov začetnih oligonukleotidov, prisotni še dNTP-ji, s flourescentnimi barvami označeni ddNTP-ji, Taq

polimeraza in pufer. Sekvenčno reakcijo smo pripravili v mikrotitrski ploščico (MicroAmp® 96 Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), v katero smo dodali reagente kompleta BigDye® Terminator™ (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) po naslednjem vrstnem redu:

- voda MBG (Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija) do skupnega volumna 20 µl,
- 2 µl začetnih oligonukleotidov (50 µM): HAN-L-F2 in HAN-L-R2,
- 3 µl 5-krat koncentriranega pufra BigDye Terminator v3.1 5x Sequencing Buffer,
- 1-5 µl očiščenega pridelka PCR,
- 2 µl sekvenčno mešanico BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100, ki je občutljiva na svetlobo in jo je potrebno shranjevati v temi pri -20 °C.

Sekvenčna reakcija je potekala v aparatu Primus 96 plus (MWG AG Biotech, Ebersberg, Nemčija).

Po končani sekvenčni reakciji smo pridelke še enkrat očistili, zato da smo odstranili neporabljene ddNTP-je, začetne oligonukleotide in preostanek soli pufra. Za čiščenje smo uporabili komercialni komplet BigDye® XTerminator™ (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) po navodilih proizvajalca. Čiščenje temelji na vezavi odvečnih snovi na delce silika gela. Komplet vsebuje 2 reagenta: Xterminator Solution, z delci silica gela, ki zajame neporabljene ddNTP-je in proste soli, ter SAM Solution, ki izboljšuje dejavnost reagentov BigDye® XTerminator™ in stabilizira vzorec po čiščenju.

Ustrezno prečiščene pridelke sekvenčne reakcije smo analizirali z avtomatskim sekvenatorjem ABI-3500 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

### **3.2.5 Analiza nukleotidnega zaporedja**

Dobljeno nukleotidno zaporedje virusov smo računalniško obdelali s programskim paketom CLC Main Workbench, verzija 6.1 (CLC Bio, Aarhus, Danska). Zaporedja posameznih začetnih oligonukleotidov smo sestavili v soglasno zaporedje, odrezali začetke

in konci zaporedij ter preverili mesta morebitnih neujemanj. Zato, da smo zagotovili natančne rezultate, smo določevali nukleotidno zaporedje pridelkov v dveh ponovitvah. Urejena nukleotidna zaporedja smo nato primerjali s podatki v genski banki z algoritmom BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA) preko medmrežja. V programskem paketu MEGA 5.05 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, The Biodesign Institute, Tempe, Arizona, ZDA) smo z algoritmom Muscle poravnali nukleotidna zaporedja naših virusov in referenčnih skupin, ki smo jih pridobili v genski banki (Tamura in sod., 2011). Za izračun razdalj med nukleotidnimi zaporedij virusov smo uporabili model GTR+G+I (angl., general time-reversible model with gamma-distributed rate variation and a proportion of invariable sites), ki je najbolj ustrezal našemu setu podatkov. Filogenetsko sorodnost smo izračunali z Bayesianovo metodo v programskem okolju MrBayes 3.2 (MCMC Bayes, GTR+G+I, 3 chains,  $10^6$  generacij) (Huelsenbeck in Ronquist, 2001). Drevo smo koreninili in oblikovali v programu FigTree, verzija 1.3.1 (Drummond in Rambaut, 2007).

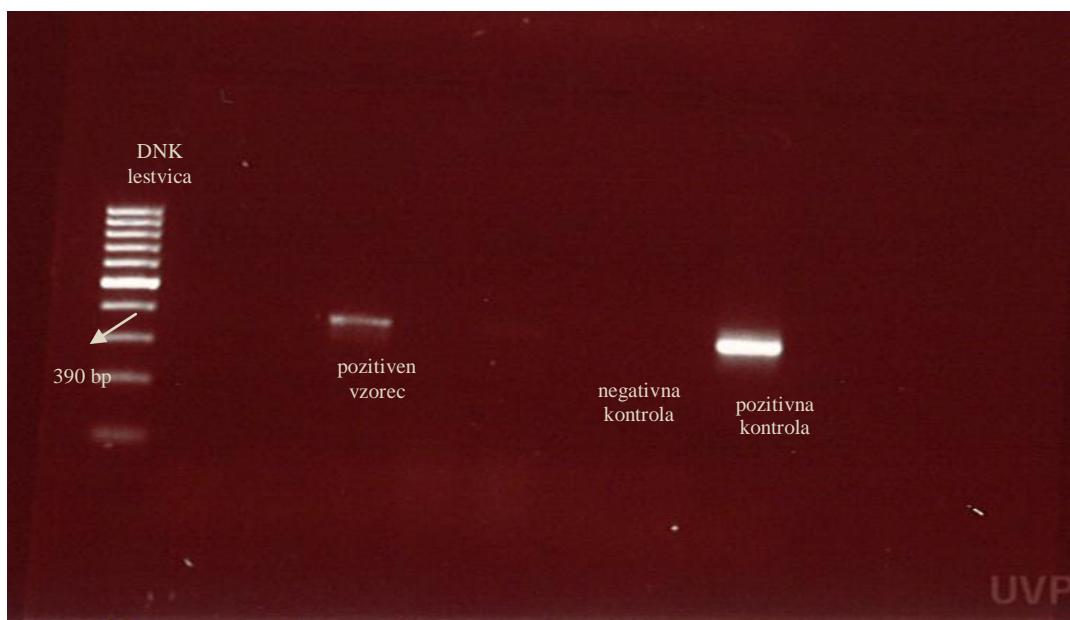
## 4 REZULTATI

V diplomsko nalogu smo vključili 68 vzorcev tkiv različnih vrst rovk, ki so bile ujete na različnih lokacijah po Sloveniji (Priloga A):

- 8 vodnih rovk (*Neomys fodiens*)
- 13 močvirskih rovk (*Neomys anomalus*)
- 38 gozdnih rovk (*Sorex araneus*)
- 1 alpska rovka (*Sorex alpinus*)
- 5 poljskih rovk (*Crocidura leucodon*)
- in 3 vrtnih rovk (*Crocidura suaveolens*)

### 4.1 REZULTATI POMNOŽEVANJA Z RT-PCR IN VGNEZDENIM PCR

Iz tkiv rovk (ledvice, pljuča ali vranica) smo najprej osamili celokupno RNK, ki smo jo nato pomnožili z metodo RT- PCR, ter nato z vgnezdenim PCR, da bi povečali občutljivost dokazovanja. Za dokaz hantavirusov smo pomnoževali tarčni odsek na segmentu L (390 baznih parov) (Slika 9).



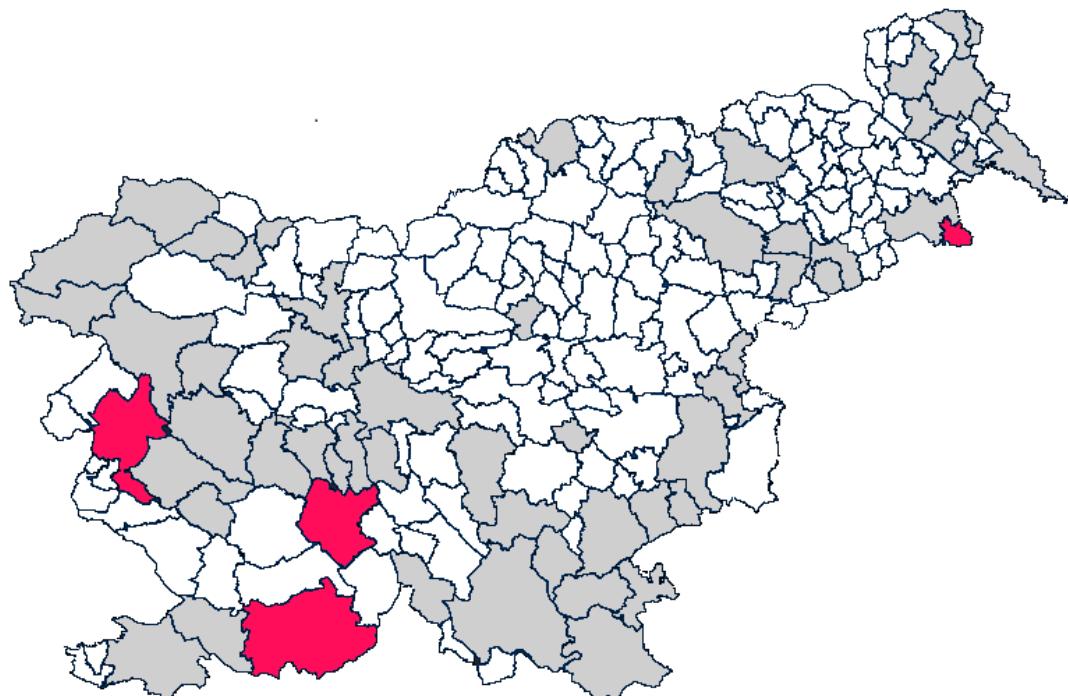
**Slika 9:** Dokaz pridelka PCR po vgnezdeni reakciji PCR

Med 68 preiskovanimi vzorci smo v 6 (11,3 %) vzorcih dokazali hantavirusni segment L (Priloga B). Vseh 6 pozitivnih vzorcev smo izolirali iz tkiv gozdnih rovk, *S. araneus*, ki so bile ujete v letih 1990, 1993, 1997 in 2006 (Preglednica 1).

**Preglednica 1:** Pregled pozitivnih vzorcev glede na naravnega gostitelja in časovno obdobje.

Vzorec	Naravni gostitelj	Leto	Kraj ulova	RNK oznaka
TT 362/90	<i>Sorex araneus</i>	1990	Ilirska Bistrica	R2402
TT 395/90	<i>Sorex araneus</i>	1990	Ilirska Bistrica	R2428
TT 398/90	<i>Sorex araneus</i>	1990	Ilirska Bistrica	R2429
TT 61/93	<i>Sorex araneus</i>	1993	Kobarid	R2395
TT 87/97	<i>Sorex araneus</i>	1997	Središče ob Dravi	11654
TT 17/06	<i>Sorex araneus</i>	2006	Cerknica (Gorenje jezero)	11362

Hantavirusni genom smo dokazali v tkivih gozdnih rovk ulovjenih na 4 različnih lokacijah po Sloveniji (Slika 10) ter kar treh regijah: na Notranjsko-Kraškem (4 vzorci), Goriškem (1 vzorec) in v Podravju (1 vzorec).



**Slika 10:** Zemljepisna razporeditev hantavirus pomnoženih iz tkiv gozdne rovke (*S. araneus*)

## 4.2 REZULTATI DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

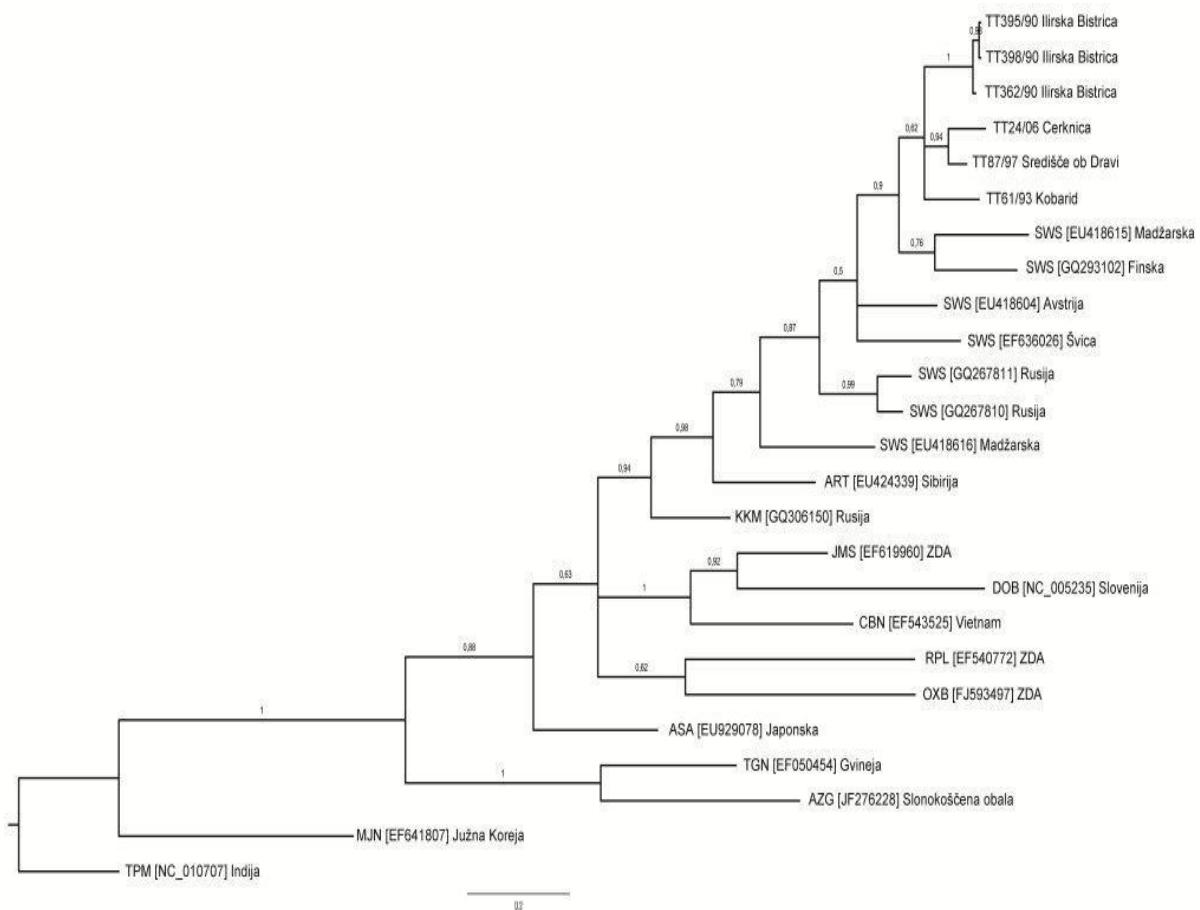
Nukleotidno zaporedje smo določili vsem 6 vzorcem, pri katerih smo pomnožili 390 baznih parov dolg odsek na hantavirusnem segmentu L.

Pri določanju nukleotidnega zaporedja smo odstranili zaporedja začetnih oligonukleotidov in poravnana zaporedja nato primerjali z zapisi v genski banki preko medmrežnega sistema BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA). Rezultati primerjave so pokazali (Priloga C in Priloga D), da so vsa dobljena zaporedja skladna nukleotidnemu zaporedju segmenta L virusa SWS. Pri slovenskih vzorcih so se nukleotidna zaporedja med seboj razlikovala 0-14,6 %, razlike v aminokislinskem zaporedju pa niso presegle 3 %. Razdaljo med sekvencami smo izračunali z metodo p-vrednost v programskega okolja MEGA 5.

### 4.2.1 Filogenetska analiza slovenskih izolatov

Nukleotidna zaporedja naših vzorcev smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji ostalih hantavirusov izoliranih iz žužkojedov. Za primerjavo smo uporabili nukleotidna zaporedja hantavirusov, ki se v naravi ohranjajo v žužkojedih gostiteljih (Slika 11).

Nukleotidna zaporedja virusa SWS iz Slovenije ne tvorijo monofiletske skupine. V Sloveniji sta prisotni dve genetski liniji, ki združujeta vzorce glede na regijo, kjer so ujeli gostitelja. Prva genetska linija združuje vzorce iz Ilirske Bistrike, ki se v aminokislinskem zaporedju popolnoma ujemajo, razlike v nukleotidnih zaporedjih pa ne presegajo 1,0 %. Drugo genetsko linijo predstavljajo vzorci z Goriške, Notranjsko-Kraške in Podravske regije, kljub temu, da so zemljepisno med seboj precej ločeni. Znotraj druge genetske linije so virusne različice med seboj genetsko bolj oddaljene, na nivoju nukleotidov od 7,8 do 14,6 % (razlika v zaporedju aminokislin znaša 1 %). Naše vzorce virusa SWS smo primerjali tudi z ostalimi evropskimi različicami virusa SWS ter s preostalimi hantavirusi, ki se ohranjajo v žužkojedih. Slovenskim različicam virusa SWS je genetsko najbolj soroden virus SWS iz Madžarske, pri čemer je druga genetska linija, ki kroži tudi po vzhodnem delu Slovenije (Središče ob Dravi), sorodnejša (na nukleotidnem nivoju so razlike od 15,6 do 17,2 % in na aminokislinskem nivoju od 1 do 3 %).



**Slika 11:** Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij segmenta L hantavirusov dolžine 390 bp

**Obrazložitev:** zraven nukleotidnih zaporedij segmenta L hantavirusov, ki smo jih izolirali za namen diplomske naloge, smo v dendrogram vključili še nukleotidna zaporedja za hantaviruse, izoliranih iz rovk, ki so shranjena v genski banki: MADŽARSKA: Ocsa5 (EU418615), Lipot (EU418616); FINSKA: DGR18226 (GQ293102); AVSTRIJA: Murau (EU418604); RUSIJA: Krasn-Sa5 (GQ267811), Parnaya-Sa1220 (GQ267810); Artybash virus (EU424339), Kenkeme virus (GQ306150); ZDA: Camp Ripley virus (EF540772), Jemez Springs virus (EF619960), Oxbow virus (FJ593497); JAPONSKA: Asama virus (EU929078); GVINEJA: Tanganya virus (EF050454); SLONOKOŠČENA OBALA: Azagny virus (JF276228); VIETNAM: Cao Bang virus (EF543525); JUŽNA KOREJA: Imjin virus (EF641807); INDIJA: Thottapalayam virus (EU001330); TIPSKA SKUPINA: Seewis virus (EF636026); ZUNANJA SKUPINA: Dobrava virus (NC\_005235).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Od osamitve povzročitelja korejske hemoragične mrzlice (KHM), so hantaviruse večinoma povezovali z endemičnimi zoonozami, ki jih prenašajo glodavci, HMRS in HCPS (Heyman in sod., 2009). Virus TPM je bil do odkritja novih hantavirusov v žužkojedih gostiteljih edini hantavirus, katerega naravni gostitelj ni glodavec. Potrebnih je bilo več kot 30 let, da so na podlagi določanja celotnega nukleotidnega zaporedja potrdili to dejstvo (Carey in sod., 1971; Song in sod., 2007a). Odkritja hantavirusov v žužkojedih gostiteljih so prevetrlila dogme o glodavcih kot edinim naravnim rezervoarjih in skupni evoluciji virusa in gostitelja. Predvsem odkritja genetsko oddaljenih hantavirusov v rovkah in krtih iz različnih zemljepisnih regij postavljajo pod vprašaj domnevo, da so bili glodavci prvotni rezervoar hantavirusov (Kang in sod., 2009b). Nenazadnje, nedavno so dokazali hantavirusno RNK tudi v netopirjih, kar še dodatno kaže na kompleksno evolucijo hantavirusov (Sumibcay in sod., 2012; Weiss in sod., 2012).

V Evropi krožijo štiri vrste hantavirusov (virusi DOB, PUU, SAA in TUL), ki povzročajo HMRS s težjim ali blažjim kliničnim potekom (Vapalahti in sod., 2003; Heyman in sod., 2009). V Franciji, so v tkivih domače podgane, *R. norvegicus*, dokazali azijski hantavirus SEO (Heyman in sod., 2004). Čeprav je v Aziji virus SEO pomemben povzročitelj HMRS, so v Evropi, v Franciji, objavili le en primer okužbe (Heyman in sod., 2009). Pred 5 leti so v Švici odkrili v gozdni rovki hantavirus SWS. To odkritje je bilo presenetljivo iz dveh razlogov, saj do takrat Švica ni bila na hantavirusnem zemljevidu, hkrati pa so nov tip virusa izolirali iz tkiv gozdne rovke, *S. araneus* (Song in sod., 2007b). Kasneje so virus SWS odkrili tudi na Madžarskem, Finskem in v Rusiji, in s tem dokazali široko razširjenost virusa v Evropi in na dalnjem vzhodu Rusije. S filogenetsko analizo različic virusa SWS v Evropi so pokazali, da je virus genetsko zelo raznolik in sledi filogeografski porazdelitvi naravnega gostitelja in dolgi virusni evoluciji na osamljeni lokalni populaciji gozdnih rovk (Schlegel in sod., 2012).

Slovenija, navkljub svoji majhnosti, ponuja ugodne pogoje za kroženje hantavirusov v naravi. V Sloveniji so dokazali več hantavirusov: virus DOB (Avsic-Zupanc in sod., 1992), virus PUU (Avšič-Županc in sod., 2007), virus SAA (Avsic-Zupanc in sod., 2000) in virus TUL (Korva in sod., 2009). Vendar pa v Sloveniji HMRS povzročata le virus DOB in PUU. V naravi kroži virus DOB v rumenogrli miši, *A. flavicollis*, (Avsic-Zupanc in sod., 1992; Avsic-Zupanc in sod., 1995), virus PUU prenaša gozdna voluharica, *M. glareolus*, (Avšič-Županc in sod., 2007), dimasta miš, *A. agrarius*, je naravni rezervoar virusa SAA (Avsic-Zupanc in sod., 2000). Virus TUL pa so odkrili v kar treh vrstah voluharic: *M. arvalis*, *M. agrestis* in *M. subterraneus* (Korva in sod., 2009).

Zaradi odkritja virusa SWS v Švici, na Finskem in Madžarskem ter tudi v Srbiji (Kang in sod., 2007) smo domnevali, da tudi v Sloveniji hantavirusi krožijo med žužkojedimi gostitelji.

Z diplomsko nalogo smo žeeli ugotoviti ali v Sloveniji krožijo hantavirusi tudi med žužkojedimi rezervoarji (red *Soricomorpha*). Raziskave, v katerih so v Evropi odkrili virus SWS, so se nanašale na desetletja stara poročila o hantavirusnih antigenih v gozdni rovki (*S. araneus*) na ozemlju Rusije in bivše Jugoslavije ter v Švici (Song in sod., 2007b; Kang in sod., 2009). Iz zbirke vzorcev tkiv živali ujetih na hantavirusnih endemičnih območjih po Sloveniji, smo pri diplomskem delu vključili tkiva rovk iz 16-letnega obdobja (od 1990 do 2006).

Hantavirusni genom smo dokazali v 6 od 68 (11,3 %) testiranih rovkah, vsi pa so bili pomnoženi iz vzorcev gozdne rovke. Pozitivne rovke so ujeli na 4 različnih območjih v obdobju od 1990 do 2006. Ta področja zajemajo tri različne slovenske regije: Goriško, Notranjsko-Kraško in Podravsko regijo. Hantavirusni genom smo dokazali s pomnoževanjem 390 bazni parov dolgim zaporedjem segmenta L, ki kodira od RNK odvisno RNK polimerazo, in je najbolj ohranjen del genoma (Klempa in sod., 2009). Ugotovili smo, da so vsi vzorci, izolirani iz gozdne rovke, različica hantavirusa SWS, ki so ga odkrili v Švici. Od prototipnega izolata virusa SWS iz Švice (mp70) se slovenske različice virusa SWS na nukleotidnem nivoju razlikujejo od 19,6 do 21 % in na aminokislinskem nivoju 2-4 %. Hkrati smo ugotovili, da v Sloveniji krožita dve genetski

liniji virusa SWS, ki sta zemljepisno ločeni. Prvo genetsko linijo predstavljajo vzorci pomnoženi iz tkiv gozdnih rovk, ki so jih ujeli leta 1990 v Ilirske Bistrici. Virusne različice znotraj prve genetske linije so si med seboj zelo podobne, kar je lahko posledica daljše koevolucije. Druga genetska skupina združuje virusne različice pomnožene iz vzorcev rovk, ki so jih ujeli v kar treh različnih regijah: Notranjsko-Kraška, Goriška in Podravska. Zanimivo je, da v Notranjsko-Kraški regiji krožita obe genetski liniji. Prisotnost virusnih različic obeh genetskih linij virusa SWS lahko pojasnimo s preseljevanjem različnih populacij rovk, ki so se naknadno med seboj ločile zaradi določenih naravnih ovir. Te zemljepisne ovire so tako omogočile osamitev populacije naravnega gostitelja, kar je lahko privedlo do neodvisnega dolgotrajnega razvoja virusa (Schlegel in sod., 2012). Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da se je del populacije rovk iz Ilirske Bistrice odcepil od prvotne populacije, ki poseljuje ostale predele Slovenije ter tudi sosednje države, in je zaradi zemljepisne osamitve naravnega gostitelja prišlo do razhoda v razvoju virusa.

Slovenskim različicam virusa SWS je genetsko najbolj soroden virus SWS iz Madžarske, kar je v skladu s pričakovanji, saj hantavirusi kažejo zelo močno povezavo med zemljepisno razporeditvijo njihovih gostiteljev in filogenetsko sorodnostjo virusov. S tega vidika je tudi razumljivo, da je druga genetska linija sorodnejša virusu SWS iz Madžarske, saj je zemljepisno razširjena tudi proti vzhodu države, torej bližje Madžarski. V filogenetsko analizo smo, kot oddaljena virusa vključili virus DOB, ki je v Sloveniji endemičen, in virus TPM, ki je prvi hantavirus odkrit v žužkojedem gostitelju. S tem smo potrdili, da so slovenske različice virusa SWS sorodnejše virusu DOB (29,5-32,5 % na nukleotidnem nivoju in 24-26 % na aminokislinskem nivoju) kot virusu TPM (35,6-39 % na nukleotidnem nivoju in 37-39 % na aminokislinskem nivoju).

Raznovrstnost slovenskih različic virusa SWS potrjuje predhodno objavljeno raziskavo o visoki genetski raznolikosti virusa SWS v Evropi (Schlegel in sod., 2012). To ne preseneča, saj imajo hantavirusi segmentiran genom RNK, ki je podvržen pogostim genskim mutacijam. Prav tako so genetsko raznolikost in več genetskih linij v Sloveniji že opisali pri virusu DOB in PUU (Avsic-Zupanc in sod., 2000; Avšič-Županc in sod., 2007). Dognanje, da je naravno okolje ključen dejavnik za nastanek različnih genetskih linij,

lahko projeciramo tudi na slovenske različice virusa SWS. Potrdili smo domnevo, da v Sloveniji hantavirusi krožijo v naravi tudi v rovkah.

## 5.2 SKLEPI

- Metoda vgnezdenega PCR je ustrezna metoda za odkrivanje novih hantavirusnih vrst in različic, saj zazna že majhne količine tarčnega odseka.
- V Sloveniji hantavirusi krožijo v naravi tudi med rovkami, in sicer smo dokazali virus SWS v gozdni rovki, *S. araneus*.
- V Sloveniji sta prisotni dve genetski liniji virusa SWS: prva genetska linija združuje virusne različice iz Ilirske Bistrice, druga genetska linija, ki je bolj razširjena po Sloveniji, obsega virusne različice iz Goriške, Notranjsko-Kraške in Podravske regije.
- Slovenske različice virusa SWS so najbolj sorodne z virusom SWS iz Madžarske, kar potrjuje, da tudi tu velja, za hantaviruse sicer značilna filogeografija.
- Poleg do sedaj opisanim 4 hantavirusom v Sloveniji, ki krožijo v glodavcih, smo z diplomsko nalogo opisali še hantavirus SWS, ki se v naravi ohranja s kroženjem med gozdnimi rovkami in tako opisali v Sloveniji prvi hantavirus v žužkojedih gostiteljih.

## 6 POVZETEK

Hantavirusi krožijo v naravi že mnogo stoletij, saj datirajo prvi zapisi o morebitnih hantavirusnih okužbah iz 10. in 11. stoletje našega štetja (Vapalahti in sod., 2003; Heyman in sod., 2009). Po osamitvi prototipnega hantavirusa Hantaan (HTN) iz tkiva rumenogrle miši, so predvidevali, da so naravni gostitelji virusa miši iz družine *Murinae*. Danes vemo, da je bil pravzaprav prvi izolirani hantavirus, virus Thottapalayam (TPM), ki so ga osamili iz azijske hišne rovke (*S. murinus*), vendar je ostal dolgo zunaj rodu *Hantavirus* (Carey in sod., 1971). V zadnjem času so odkrili veliko novih hantavirusov v rovkah in krtih, zato se je pojavila hipoteza, da morda glodavci niso prvotni gostitelji hantavirusov (Kang in sod., 2009b). Po tem, ko so v švicarskem kantonu odkrili virus Seewis (SWS) in ko so dokazali hantavirusni antigen v gozdni rovki (*S. araneus*) v Rusiji in v deželah bivše Jugoslavije, so sledile raziskave v večih evropskih državah (Kang in sod., 2009; Song in sod., 2007a). Tako so Schlegel in sodelavci pokazali, da je virus SWS razširjen v mnogih evropskih državah vse do daljnega vzhoda Rusije in da je zanj značilna visoka genetska raznovrstnost (Schlegel in sod., 2012).

Z diplomskim delom smo želeli ugotoviti ali poleg že znanih hantavirusov DOB, PUU, SAA in TUL, v Sloveniji krožijo tudi hantavirusi v gostiteljih iz reda krtov in rovk, *Soricomorpha*. V diplomski nalogi smo pregledali 68 vzorcev tkiv žužkojedov, ki so jih ujeli na različnih lokacijah po Sloveniji od leta 1990 do 2006. Po osamitvi celokupne RNK iz tkivnih vzorcev smo z molekularnimi metodami in uporabo univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov dokazovali hantavirusni genom. Hantavirusni genom smo dokazali v 6 vzorcih (11,3 %) iz treh različnih lokacij. Vse pozitivne vzorce smo dokazali v tkivih gozdne rovke (*S. araneus*) in z ugotavljanjem nukelotidnega zaporedja dokazali virus SWS. S filogenetsko analizo smo pokazali, da smo odkrili več različic virusa SWS, ki so najbolj sorodne virusu SWS iz Madžarske. Poleg tega smo dokazali tudi, da v Sloveniji krožita dve genetski liniji virusa SWS, ki se ločita glede na zemljepisno porazdelitev naravnega gostitelja.

## 7 VIRI

- Arai S., Bennett S.N., Sumibcay L., Cook J.A., Song J.W., Hope A., Parmenter C., Nerurkar V.R., Yates T.L., Yanagihara R. 2008a. Phylogenetically distinct hantaviruses in the masked shrew (*Sorex cinereus*) and dusky shrew (*Sorex monticolus*) in the United States. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 78: 348-351
- Arai S., Ohdachi S.D., Asakawa M., Kang H.J., Mocz G., Arikawa J., Okabe N., Yanagihara R. 2008b. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105: 16296-16301
- Arai S., Song J.W., Sumibcay L., Bennett S.N., Nerurkar V.R., Parmenter C., Cook J.A., Yates T.L., Yanagihara R. 2007. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. Emerging Infectious Diseases, 13: 1420-1423
- Avsic-Zupanc T., Nemirov K., Petrovec M., Trilar T., Poljak M., Vaheri A., Plyusnin A. 2000. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. Journal of General Virology, 81: 1747-1755
- Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Furlan P., Kaps R., Elgh F., Lundkvist Å. 1999. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia: a 10-year survey. Clinical Infectious Diseases, 28: 860-865
- Avsic-Zupanc T., Toney A., Anderson K., Chu Y.K., Schmaljohn C. 1995. Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the *Hantavirus* genus, family *Bunyaviridae*. Journal of General Virology, 76: 2801-2808

Avsic-Zupanc T., Xiao S.Y., Stojanovic R., Gligic A., van der Groen G., LeDuc J.W.  
1992. Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia.  
Journal of Medical Virology, 38: 132-137

Avšič-Županc T., Petrovec M., Duh D., Plyusnina A., Lundkvist Å., Plyusnin A. 2007.  
Puumala hantavirus in Slovenia: analyses of S and M segment sequences  
recovered from patients and rodents. Virus Research, 123: 204-210

Bowen M.D., Gelbmann W., Ksiaziek T.G., Nichol S.T., Nowotny N. 1997. Puumala  
virus and two genetic variants of Tula virus are present in Austrian rodents.  
Journal of Medical Virology, 53: 174-181

Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 288-290

Bridson E. 2001. The English 'sweate' (*Sudor anglicus*) and *Hantavirus* pulmonary  
syndrome. British Journal of Biomedical Science, 58: 1-6

Brummer-Korvenkontio M., Henttonen H., Vaheri A. 1982. Hemorrhagic fever with  
renal syndrome in Finland: ecology and virology of nephropathia epidemica.  
Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 36: 88-91

Brunstein J. 2008. DNA sequencing. V: Lewin's genes X. Krebs J.E., Goldstein E.S.,  
Kilpatrick S.T. (eds.). 10<sup>th</sup> ed. Sudbury, Jones and Bartlett Publishers: 58-59

Carey D.E., Reuben R., Panicker K.N., Shope R.E., Myers R.M. 1971. Thottapalayam  
virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. Indian Journal of  
Medical Research, 59: 1758-1760

Charrel R.N., Coutard B., Baronti C., Canard B., Nougairede A., Frangeul A., Morin B.,  
Jamal S., Schmidt C.L., Hilgenfeld R., Klempa B., de Lamballerie X. 2011.  
Arenaviruses and hantaviruses: from epidemiology and genomics to antivirals.  
Antiviral Research, 90: 102-114

Clement J.P. 2003. Hantavirus. Antiviral Research, 57: 121-127

Duchin J.S., Koster F.T., Peters C.J., Simpson G.I., Tempest B., Zaki S.R., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Nichol S.T., Umland E.T., Moolenaar R.I., Reef S.E., Nolte K.B., Gallaher M.M., Butler J.C., Breiman R.F., The Hantavirus Study Group. 1994. Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. New England Journal of Medicine, 330: 949-955

Drummond A.J., Raumbaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology, 7: 214, doi: 10.1186/1471-2148-7-214: 8 str.

Eisenreich W., Handel A., Zimmer U.E. 2005. Slikovni vodnik rastline in živali z vami na sprehodu. Ljubljana, Modrijan založba: 504 str.

Elliott R.M., Bouloy M., Calisher C.H., Goldbach R., Mayer J.T., Nichol S.T., Pettersson E.R., Plyusnin A., Schmaljohn C.S. 2000. *Bunyaviridae*. V: Virus taxonomy. VIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. von Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carsten E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Winckner R.B. (eds.). 7<sup>th</sup> ed. San Diego, Academic Press: 599-621

Heyman P., Baert K., Plyusnina A., Cochez C., Lundkvist Å., van Esbroeck M., Goossens E., Vandervelde C., Plyusnin A., Stuyck J. 2009. Serological and genetic evidence for the presence of Seoul hantavirus in *Rattus norvegicus* in Flanders, Belgium. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 41: 51-56

Heyman P., van Mele R., Smajlovic L., Dobly A., Cochez C., Vandervelde C. 2009. Association between habitat and prevalence of *Hantavirus* infection in bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*). Vector-borne and Zoonotic Diseases, 9: 141-146

Heyman P., Plyusnina A., Berny P., Cochez C., Artois M., Zizi M., Pirnay J.P.,  
Plyusnin A. 2004 Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus  
genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. European Journal of  
Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23: 711-717

Heyman P., Vaheri A., Lundkvist Å., Avsic-Zupanc T. 2009. Hantavirus infections in  
Europe: from virus carriers to a major public-health problem. Expert Reviews of  
Anti-Infective Therapy, 7: 205-217

Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic  
trees. Bioinformatics, 7: 754-755

Iskalnik Bio agensi. 2012. Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (Haemorrhagic  
fever with renal syndrome A96.5): 1 str.

<http://nevsnov.sos112.si/bio/biozapis.aspx?id=13> (8. maj 2011)

Kallio E.R., Voutilainen L., Vapalahti O., Vaheri A., Henttonen H., Koskela E., Mappes  
T. 2007. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent  
host. Ecology, 88: 1911-1916

Kang H.J., Arai S., Hope A.G., Song J.W., Cook J.A., Yanagihara R. 2009c. Genetic  
diversity and phylogeography of Seewis virus in the Eurasian common shrew in  
Finland and Hungary. Virology Journal, 6: 208-213

Kang H.J., Arai S., Hope A.G., Cook J.A., Yanagihara R. 2010. Novel hantavirus in the  
flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*). Vector Borne Zoonotic Diseases, 10: 593-  
597

Kang H.J., Bennett S.N., Dizney L., Sumibcay L., Arai S., Ruedas L.A., Song J.W.,  
Yanagihara R. 2009a. Host switch during evolution of a genetically distinct  
hantavirus in the American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*). Virology, 388: 8-  
14

Kang H.J., Bennett S.N., Hope A.G., Cook J.A., Yanagihara R. 2011a. Shared ancestry between a newfound mole-borne hantavirus and hantaviruses harbored by cricetid rodents. *Journal of Virology*, 85: 7496-7503

Kang H.J., Bennett S.N., Sumibcay L., Arai S., Hope A.G., Mocz G., Song J.W., Cook J.A., Yanagihara R. 2009b. Evolutionary insights from a genetically divergent hantavirus harbored by the European common mole (*Talpa europaea*). *Plos One*, 4: e 6149, doi: 10.1371/journal.pone.0006149: 12 str.

Kang H.J., Kadjo B., Dubey S., Jacquet F., Yanagihara R. 2011b. Molecular evolution of Azagny virus, a newfound hantavirus harbored by West African pygmy shrew (*Crocidura obscurior*) in Côte d'Ivoire. *Virology Journal*, 8: 373-379

Khaiboullina S.F., Morzunov S.P., St. Jeor S.C. 2005. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Current Molecular Medicine*, 5: 773-790

Klempa B. 2006. Detection of novel hantaviruses in Africa. Bratislava, Slovak Academy of Sciences: 23 str.  
<http://www.zoonosis.ac.uk:8080/download/attachments/22020125/Klempa.pdf> (8. maj 2011)

Klempa B. 2009. Hantaviruses and climate change. *Clinical Microbiology and Infection*, 15: 518-523

Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Barrière P., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D.H. 2007. Novel hantavirus sequences in shrew, Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 520-522

Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., Denys C., Koivogui L., ter Meulen J., Krüger D.H. 2006. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 838-840

Klempa B., Koivogui L., Sylla O., Koulemou K., Auste B., Krüger D.H., ter Meulen J. 2010. Serological evidence of human hantavirus infections in Guinea, West Africa. *Journal of Infectious Diseases*, 201: 1031-1034

Korva M. 2011. Vpliv genetske variabilnosti v HLA lokusu in hantavirusnega tipa na patogenezo hemoragične mrzlice z renalnim sindromom. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 15 str.

Korva M., Duh D., Puterle A., Trilar T., Avsic-Zupanc T. 2009. First molecular evidence of Tula hantavirus in *Microtus* voles in Slovenia. *Virus Research*, 144: 318-322

Kryštufek B. 1991. Sesalci Slovenije. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 36-40

Langdon- Brown W. 1916. Trench nephritis. *Lancet*, 187: i391-i395

Lee H.W., Lee P.W., Johnson K.M. 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 137: 298-308

Lee H.W., Lee P.W., Baek L.J., Song C.K., Seong I.W. 1981. Intraspecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30: 1106-1112

McCaughay C., Hart C.A. 2000. Hantaviruses. *Journal of Medical Microbiology*, 47: 587-599

Meyer B.J., Schmaljohn C.S. 2000. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends of Microbiology*, 8: 61-67

Musser G. 2012. Shrew. V: Encyclopædia Britannica. Online academic edition.  
Chicago, Encyclopædia Britannica, Inc: 1 str.  
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/542010/shrew> (17. marec 2012)

Nemirov K., Vapalahti O., Lundkvist Å., Vasilenko V., Golovljova I., Plyusnina A., Niemimaa J., Lakkonen J., Vaheri A., Plyusnin A. 1999. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. Journal of General Virology, 80: 371-379

Nichol S.T., Spiropoulou C.F., Morzunov S., Rollin P.E., Ksizaek T.G., Feldmann H., Sanchez A., Childs J., Zaki S., Peters C.J. 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science, 262: 914-917

Padula P.J., Edelstein A., Miguel S.D., López N.M., Rossi C.M., Rabinovich R.D. 1998. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. Virology, 241: 323-330

Plyusnin A. 2002. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. Archives of Virology, 147: 665-682

Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. 1996. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. Journal of General Virology, 77: 2677-2687

Radosevic Z., Mohacek I. 1954. The problem of nephrophatia epidemica Myhrman-Zetterholm in relation to acute interstitial nephritis. Acta Medica Scandinavica, 149: 221-228

Ramsden C., Holmes E.C., Charleston M.A. 2009. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for co-divergence. Molecular Biology and Evolution, 26: 143-153

Rzebik-Kowalska B. 2005. Paleontological relationships of european *Sorex*. V: Advances in the biology of shrews II. Merrit J.F., Churchfield S., Hutterer R., Sheftel B.I. (eds.). New York, International Society of Shrew Biologists: 1-5

Saksida A. 2011. Bunjavirusi. V: Medicinska virologija. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 169-181

Schlegel M., Radosa L., Rosenfeld U.M., Schmidt S., Triebenbacher C., Löhr P.-W., Fuchs D., Heroldová M., Jánová E., Stanko M., Mošanský L., Fričová J., Pejčoch M., Suchomel J., Purchart L., Groschup M.H., Krüger D.H., Klempa B., Ulrich R.G. 2012. Broad geographical distribution and high genetic diversity of shrew-borne Seewis hantavirus in Central Europe. *Virus Genes*, 45: 48-55

Schmaljohn C.S., Hasty S.E., Dalrymple J.M., LeDuc J.W., Lee H.W., von Bonsdorff C.H., Brummer- Korvenkontio M., Vaheri A., Tsai T.F., Regnery H.L., Goldgaber D., Lee P.-W. 1985. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science*, 227: 1041-1044

Schmidt-Chanasit J., Essbauer S., Petraityte R., Yoshimatsu K., Tackmann K., Conraths F.J., Sasnauskas K., Arikawa J., Thomas A., Pfeffer M., Scharninghausen J.J., Splgettstoesser W., Wenk M., Heckel G., Ulrich R.G. 2010. Extensive host sharing of central european Tula virus. *Journal of Virology*, 84: 459-474

Schönrich G., Rang A., Lütteke N., Raftery M.J., Charbonnel N., Ulrich R.G. 2008. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunological Reviews*, 225: 163-189

Simpson S. 1984. Hantaan virus. *Journal of the Royal Society of Health*, 104: 210-211

Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. 2005. Phylogenetic evidence for the distinction of Saaremaa and Dobrava hantaviruses. *Virology Journal*, 2: 90-95

Sjölander K.B., Golovljova I., Vasilenko A., Plyusnin A., Lundkvist Å. 2002. Serological divergence of Saaremaa an Dobrava hantaviruses: evidence for two distinct serotypes. *Epidemiology and Infection*, 128: 99-103

Song J.W., Baek L.J., Schmaljohn C.S., Yanagihara R. 2007a. Thottapalayam virus, a prototype shrewborne hantavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 980- 985

Song J.W., Gligic A., Yanagihara R. 2002. Identification of Tula hantavirus in *Pitymys subterraneus* captured in the Cacak region of Serbia-Yugoslavia. *International Journal of Infectious Diseases*, 6: 31- 36

Song J.W., Gu S.H., Bennett S.N., Arai S., Puorger M., Hilbe M., Yanagihara R. 2007b. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virology Journal*, 4: 114-118

Song J.W., Kang H.J., Gu S.H., Moon S.S., Bennett S.N., Song K.J., Baek L.J., Kim H.C., O'Guinn M.L., Chong S.T., Klein T.A., Yanagihara R. 2009. Characterization of Imjin virus, a newly isolated hantavirus from Ussuri white-toothed shrew (*Crocidura lasiura*). *Journal of Virology*, 83: 6184-6191

Song J.W., Kang H.J., Song K.J., Truong T.T., Bennett S.N., Arai S., Truong N.U., Yanagihara R. 2007c. Newfound hantavirus in Chinese mole shrew, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1784-1787

Stone R.D. 1995. Eurasian insectivores and tree shrews: status survey and conservation action plan. Gland, IUCN: 7-7, 17-17

Sumibcay L., Kadjo B., Gu S.H., Kang H.J., Lim B.K., Cook J.A., Song J.W., Yanagihara R. 2012. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Côte d'Ivoire. *Virology Journal*, 9: 1-7

Weiss S., Witkowski P.T., Auste B., Nowak K., Weber N., Fahr J., Mombouli J.V., Wolfe N.D., Drexler J.F., Drosten C., Klempa B., Leendertz F.H., Kruger D.H. 2012. Hantavirus in bat, Sierra Leone. Emerging Infectious Diseases, 18: 159-161

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739

Tang Y.W., Procop G.W., Persing D.H. 1997. Molecular diagnostics of infectious diseases. Clinical Chemistry, 43: 2021-2038

Ulrich R., Meisel H., Schütt M., Schmidt J., Kunz A., Klempa B., Niedrig M., Kimmig P., Pauli G., Krüger D.H., Koch J. 2004. Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 47: 661-670

Vapalahti O., Mustonen J., Lundkvist Å., Henttonen H., Plyusnin A., Vaheri A. 2003. Hantavirus infections in Europe. Lancet Infectious Diseases, 3: 653-661

Yadav P.D., Vincent M.J., Nichol S.T. 2007. Thottapalayam virus is genetically distant to the rodent-borne hantaviruses, consistent with its isolation from the Asian house shrew (*Suncus murinus*). Virology Journal, 4: 80-84

Yanagihara R. Amyx H.L., Gajdusek D.C. 1985. Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). Journal of Virology, 55: 34-38

ZZJZ. 2012. Mišja groznica - kako se zaštiti. Čakovec, Zavod za javno zdravstvo Međimurske županije. Liječničke Djelatnosti za Epidemiologiju: 3str.  
<http://www.zzjz-ck.hr/?task=group&gid=16&aid=189> (18. marec 2012)

## **ZAHVALA**

V tem delu diplomske naloge bi se zahvalila mnogim, brez katerih ta izdelek ne bi nastal.

Najprej dolgujem zahvalo mentorici diplomskega dela prof. dr. Tatjani Avšič- Županc, univ. dipl. biol., ker mi je omogočila opravljanje diplomske naloge v svojem laboratoriju in spoznavanje resničnega laboratorijskega dela.

Mladi raziskovalki dr. Miši Korva, univ. dipl. mikr., ki me je vpeljala v svet laboratorijskih tehnik, dolgujem največjo zahvalo. Iskreno sem ji hvaležna za ogromno vloženega truda in časa, ki ga je namenila moji diplomski nalogi, tako pri samem praktičnem delu kot tudi pisanju končnega izdelka.

Zahvalila bi se tudi ostalem osebju v Laboratoriju za diagnostiko zoonoz in WHO laboratoriju Nataši Knap, Luki Fajsu, Urški Glinšek Biškup, Ani Saksidi, Mateji Jelovšek in Katji Strašek Smrdel, ki so mi pomagali pri reševanju zapletov in mi privoščili veselje ob pozitivnih rezultatih. Ob tem bi se še zahvalila tudi Katarini Resman, ki mi je s svojimi predlogi pomagala pri končnem oblikovanju vsebine diplomskega dela.

Nenazadnje pa gre zahvala tudi moji družini, ki mi že od vekomaj stoji ob strani. Brez njihove spodbude v dobrih in slabih trenutkih, ne bi doseгла to, kar sem.

Še enkrat hvala vsem za vse

## PRILOGE

**Priloga A:** Seznam vseh vzorcev rovk, ki smo jih preiskovali z metodama RT-PCR in vgnezden PCR

VZOREC	NARAVNI GOSTITELJ	ŠT. RNK	ORGAN	RT-PCR	VGNEZDEN RT-PCR	LOKACIJA	OBČINA	REGIJA
TT 226/90	<i>Neomys anomalus</i>	11743	vranica	-	-	ŽUŽEMBERK	Žužemberk	Jugovzhodna
TT 229/90	<i>Crocidura suaveolens</i>	11742	vranica	-	-	ŽUŽEMBERK	Žužemberk	Jugovzhodna
TT 354/90	<i>Sorex araneus</i>	R2420	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 357/90	<i>Sorex araneus</i>	R2408	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 358/90	<i>Sorex araneus</i>	R2421	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 359/90	<i>Sorex araneus</i>	R2409	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 361/90	<i>Sorex araneus</i>	R2410	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 362/90	<i>Sorex araneus</i>	R2402	pljuča	-	+	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 364/90	<i>Sorex araneus</i>	R2411	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 368/90	<i>Sorex araneus</i>	R2422	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 377/90	<i>Sorex araneus</i>	R2412	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 379/90	<i>Sorex araneus</i>	R2413	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 382/90	<i>Sorex araneus</i>	R2423	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 383/90	<i>Sorex araneus</i>	R2414	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 385/90	<i>Sorex araneus</i>	R2424	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 386/90	<i>Sorex araneus</i>	R2415	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 387/90	<i>Sorex araneus</i>	R2425	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 388/90	<i>Sorex araneus</i>	R2426	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 390/90	<i>Sorex araneus</i>	R2416	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 393/90	<i>Sorex araneus</i>	R2417	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 394/90	<i>Sorex araneus</i>	R2418	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 395/90	<i>Sorex araneus</i>	R2428	pljuča	-	+	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 396/90	<i>Sorex araneus</i>	R2419	pljuča	-	-	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 398/90	<i>Sorex araneus</i>	R2429	pljuča	-	+	Snežnik, SVIŠČAKI	Ilirska Bistrica	Notranjsko-Kraška
TT 11/91	<i>Mus musculus</i>	R2406	pljuča	-	-	Ljubljana, TOMAČEVO	Ljubljana	Osrednjeslovenska
TT 78/92	<i>Neomys anomalus</i>	11745	vranica	-	-	Raka, GMAJNA	Krško	Spodnjeposavska

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

**Priloga A:** Seznam vseh vzorcev rovk, ki smo jih preiskovali z metodama RT-PCR in vgnezden PCR

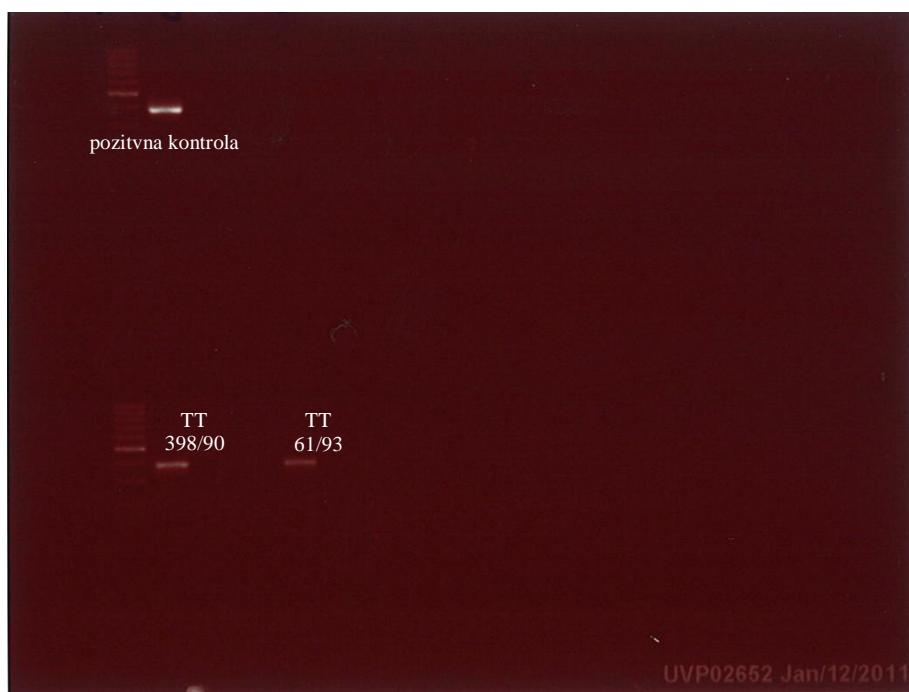
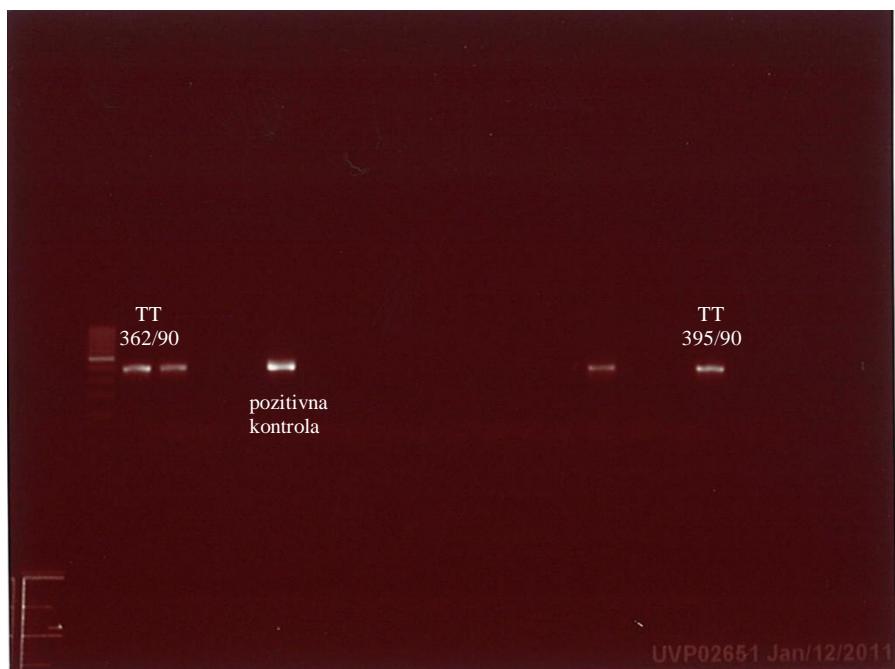
VZOREC	NARAVNI GOSTITELJ	ŠT. RNK	ORGAN	RT-PCR	VGNEZDEN RT-PCR	LOKACIJA	OBČINA	REGIJA
TT 61/93	Sorex araneus	R2395	pljuča	-	+	Krn, PLANINA LESKOVCA	Kobarid	Goriška
TT 67/93	Sorex araneus	R2397	pljuča	-	-	Mangrt, MANGRTSKA KOČA	Bovec	Goriška
TT 72/95	Sorex araneus	4	ledvica	-	-	Gorjanci, TRDINOV VRH	Novo mesto	Jugovzhodna
TT 88/95	Neomys anomalus	11741	ledvica	-	-	Šmarje, PLETTRJE, VRTLJANSKI POTOK	Šentjernej	Jugovzhodna
TT 102/95	Neomys anomalus	R2091	ledvica	-	-	Trenta, GORNJA TRENTA	Bovec	Goriška
TT 121/95	Neomys fodiens	11740	ledvica	-	-	Cerov log, potok PENDIRJEVKA	Šentjernej	Jugovzhodna
TT 132/95	Neomys fodiens	11739	ledvica	-	-	Cerov log, potok PENDIRJEVKA	Šentjernej	Jugovzhodna
TT 133/95	Neomys fodiens	11738	ledvica	-	-	Cerov log, potok PENDIRJEVKA	Šentjernej	Jugovzhodna
TT 139/95	Neomys anomalus	11737	ledvica	-	-	Gorenje Vrhopolje, potok KOBILA	Šentjernej	Jugovzhodna
TT 140/95	Neomys fodiens	11736	ledvica	-	-	Gorenje Vrhopolje, potok KOBILA	Šentjernej	Jugovzhodna
TT 158/95	Sorex araneus	11735	ledvica	-	-	Podgora, ZALOG	Novo mesto	Jugovzhodna
TT 216/95	Neomys anomalus	11663	ledvica	-	-	Ig, MOSTIŠČE	Ig	Osrednjeslovenska
TT 226/95	Neomys anomalus	11662	ledvica	-	-	Črna vas, KOZLERJEVA GOŠČA	Ig	Osrednjeslovenska
TT 227/95	Neomys anomalus	11661	ledvica	-	-	Črna vas, KOZLERJEVA GOŠČA	Ig	Osrednjeslovenska
TT 260/95	Crocidura leucodon	11660	ledvica	-	-	Sodna vas, VONARJE	Podčetrtek	Savinjska
TT 285/95	Neomys anomalus	11659	ledvica	-	-	Kozje, BISTRI GRABEN	Kozje	Savinjska
TT 287/95	Neomys fodiens	11658	ledvica	-	-	Kozje, BISTRI GRABEN	Kozje	Savinjska
TT 289/95	Neomys fodiens	11567	ledvica	-	-	Kozje, BISTRI GRABEN	Kozje	Savinjska
TT 309/95	Crocidura leucodon	11656	ledvica	-	-	Kozje, GLUHA PEČ	Kozje	Savinjska
TT 312/95	Crocidura leucodon	11655	ledvica	-	-	Kozje, GLUHA PEČ	Kozje	Savinjska
TT 370/95	Crocidura leucodon	R2405	ledvica	-	-	Gorjanci, RAVNA GORA	Šentjernej	Jugovzhodna
TT 70/96	Neomys fodiens	11601	ledvica	-	-	Žižki, DOLNJI KRAJ	Črenšovci	Pomurska
TT 86/96	Neomys anomalus	11602	ledvica	-	-	Sebeborci, MUZGA	Moravske toplice	Pomurska
TT 05/97	Myoxus glis	R2080	ledvica	-	-			
TT 11/97	Sorex araneus	R2081	ledvica	-	-	Sv. Duh, DOBRAVA	Škofja Loka	Gorenjska
TT 23/97	Crocidura suaveolens	11746	ledvica	-	-	Kodreti, KOVAČI, p. BRANICA	Vipava	Goriška
TT 29/97	Neomys anomalus	11747	ledvica	-	-	GOČE, p. BRANICA	Vipava	Goriška
TT 83/97	Sorex araneus	11653	ledvica	-	-	OBREŽ, 2km južno	Središče ob Dravi	Podravska
TT 87/97	Sorex araneus	11654	ledvica	-	+	OBREŽ, 2km južno	Središče ob Dravi	Podravska

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

**Priloga A:** Seznam vseh vzorcev rovk, ki smo jih preiskovali z metodama RT-PCR in vgnezden PCR

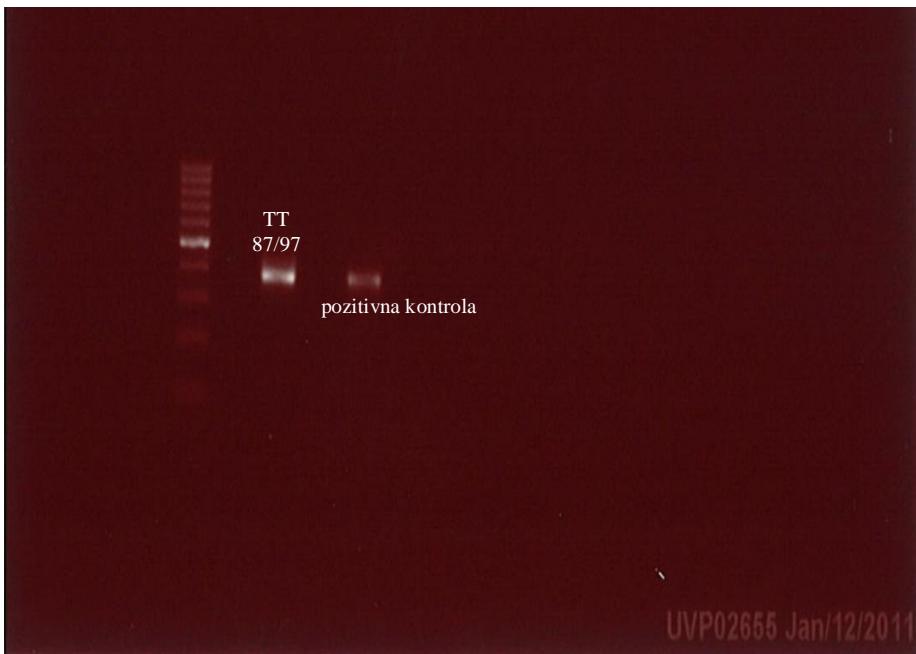
VZOREC	NARAVNI GOSTITELJ	ŠT. RNK	ORGAN	RT-PCR	VGNEZDEN RT-PCR	LOKACIJA	OBČINA	REGIJA
TT 155/97	Crocidura suaveolens	11748	ledvica	-	-	Sora, RAKOVNIK	Medvode	Osrednjeslovenska
1/11	Sorex araneus	2781	ledvica	-	-	Mali Bakovci	Murska Sobota	Pomurska
5/39	Mus musculus	2908	ledvica	-	-	Mali Bakovci	Murska Sobota	Pomurska
6/53	Mus musculus	2931	ledvica	-	-	Bodonci	Puconci	Pomurska
6/54	Sorex araneus	2932	ledvica	-	-	Bodonci	Puconci	Pomurska
8/63	Sorex araneus	2944	ledvica	-	-	Bodonci	Puconci	Pomurska
TT 17/01	Arvicola terrestris	11605	ledvica	-	-	Podezemelj, MLAKE	Metlika	Jugovzhodna
TT 45/01	Crocidura leucodon	11606	ledvica	-	-	GRIBLJE, 700m SZ, visoko barje	Črnomelj	Jugovzhodna
TT 71/02	Sorex araneus	11607	ledvica	-	-	Vareja, POLANC	Videm	Podravska
TT 99/02	Neomys anomalus	11608	ledvica	-	-	Sestrže, BRINJE	Majšperk	Podravska
TT 03/03	Neomys anomalus	11609	ledvica	-	-	Žirovnica, ZAVRŠNICA	Žirovnica	Gorenjska
TT 10/03	Sorex alpinus	11652	ledvica	-	-	Žirovnica, ZAVRŠNICA	Žirovnica	Gorenjska
TT 05/05	Neomys fodiens	11895	vranica	-	-	PUŠČAVA	Lovrenc na Pohorju	Podravska
TT 02/06	Sorex araneus	11333	vranica	-	-	Martinjak, Marof, Retje	Cerknica	Notranjsko-Kraška
TT 17/06	Sorex araneus	11362	vranica	-	+	Gorenje jezero, nad izvirom Cemun	Cerknica	Notranjsko-Kraška
TT 21/06	Sorex araneus	11365	vranica	-	-	Begunje, Brezje, Velika dolina	Cerknica	Notranjsko-Kraška
TT 24/06	Sorex araneus	11367	vranica	-	-	Begunje, Brezje, Velika dolina	Cerknica	Notranjsko-Kraška
TT 64/06	Sorex araneus	8793	ledvica	-	-	Sora, RAKOVNIK	Medvode	Osrednjeslovenska



**Priloga B:** Slika gelov agarozne elektrofore s pozitivnim rezultati

Se nadaljuje

Nadaljevanje



**Priloga B:** Slika gelov agarozne elektrofore s pozitivnim rezultati

**Priloga C:** Distančna matrika s podanimi vrednostmi v raznolikosti nukleotidnih zaporedij segmenta L hantavirusov

	E041	9038	8038	7038	6038	5038	4038	3038	0038	E042	9039	8039	7039	6039	5039	4039	3039	0039	E043	9040	8040	7040	6040	5040	4040	3040	0040	E044	9041	8041	7041	6041	5041	4041	3041	0041	E045	9042	8042	7042	6042	5042	4042	3042	0042	E046	9043	8043	7043	6043	5043	4043	3043	0043	E047	9044	8044	7044	6044	5044	4044	3044	0044	E048	9045	8045	7045	6045	5045	4045	3045	0045	E049	9046	8046	7046	6046	5046	4046	3046	0046	E050	9047	8047	7047	6047	5047	4047	3047	0047	E051	9048	8048	7048	6048	5048	4048	3048	0048	E052	9049	8049	7049	6049	5049	4049	3049	0049	E053	9050	8050	7050	6050	5050	4050	3050	0050	E054	9051	8051	7051	6051	5051	4051	3051	0051	E055	9052	8052	7052	6052	5052	4052	3052	0052	E056	9053	8053	7053	6053	5053	4053	3053	0053	E057	9054	8054	7054	6054	5054	4054	3054	0054	E058	9055	8055	7055	6055	5055	4055	3055	0055	E059	9056	8056	7056	6056	5056	4056	3056	0056	E060	9057	8057	7057	6057	5057	4057	3057	0057	E061	9058	8058	7058	6058	5058	4058	3058	0058	E062	9059	8059	7059	6059	5059	4059	3059	0059	E063	9060	8060	7060	6060	5060	4060	3060	0060	E064	9061	8061	7061	6061	5061	4061	3061	0061	E065	9062	8062	7062	6062	5062	4062	3062	0062	E066	9063	8063	7063	6063	5063	4063	3063	0063	E067	9064	8064	7064	6064	5064	4064	3064	0064	E068	9065	8065	7065	6065	5065	4065	3065	0065	E069	9066	8066	7066	6066	5066	4066	3066	0066	E070	9067	8067	7067	6067	5067	4067	3067	0067	E071	9068	8068	7068	6068	5068	4068	3068	0068	E072	9069	8069	7069	6069	5069	4069	3069	0069	E073	9070	8070	7070	6070	5070	4070	3070	0070	E074	9071	8071	7071	6071	5071	4071	3071	0071	E075	9072	8072	7072	6072	5072	4072	3072	0072	E076	9073	8073	7073	6073	5073	4073	3073	0073	E077	9074	8074	7074	6074	5074	4074	3074	0074	E078	9075	8075	7075	6075	5075	4075	3075	0075	E079	9076	8076	7076	6076	5076	4076	3076	0076	E080	9077	8077	7077	6077	5077	4077	3077	0077	E081	9078	8078	7078	6078	5078	4078	3078	0078	E082	9079	8079	7079	6079	5079	4079	3079	0079	E083	9080	8080	7080	6080	5080	4080	3080	0080	E084	9081	8081	7081	6081	5081	4081	3081	0081	E085	9082	8082	7082	6082	5082	4082	3082	0082	E086	9083	8083	7083	6083	5083	4083	3083	0083	E087	9084	8084	7084	6084	5084	4084	3084	0084	E088	9085	8085	7085	6085	5085	4085	3085	0085	E089	9086	8086	7086	6086	5086	4086	3086	0086	E090	9087	8087	7087	6087	5087	4087	3087	0087	E091	9088	8088	7088	6088	5088	4088	3088	0088	E092	9089	8089	7089	6089	5089	4089	3089	0089	E093	9090	8090	7090	6090	5090	4090	3090	0090	E094	9091	8091	7091	6091	5091	4091	3091	0091	E095	9092	8092	7092	6092	5092	4092	3092	0092	E096	9093	8093	7093	6093	5093	4093	3093	0093	E097	9094	8094	7094	6094	5094	4094	3094	0094	E098	9095	8095	7095	6095	5095	4095	3095	0095	E099	9096	8096	7096	6096	5096	4096	3096	0096	E100	9097	8097	7097	6097	5097	4097	3097	0097	E101	9098	8098	7098	6098	5098	4098	3098	0098	E102	9099	8099	7099	6099	5099	4099	3099	0099	E103	9100	8100	7100	6100	5100	4100	3100	0100	E104	9101	8101	7101	6101	5101	4101	3101	0101	E105	9102	8102	7102	6102	5102	4102	3102	0102	E106	9103	8103	7103	6103	5103	4103	3103	0103	E107	9104	8104	7104	6104	5104	4104	3104	0104	E108	9105	8105	7105	6105	5105	4105	3105	0105	E109	9106	8106	7106	6106	5106	4106	3106	0106	E110	9107	8107	7107	6107	5107	4107	3107	0107	E111	9108	8108	7108	6108	5108	4108	3108	0108	E112	9109	8109	7109	6109	5109	4109	3109	0109	E113	9110	8110	7110	6110	5110	4110	3110	0110	E114	9111	8111	7111	6111	5111	4111	3111	0111	E115	9112	8112	7112	6112	5112	4112	3112	0112	E116	9113	8113	7113	6113	5113	4113	3113	0113	E117	9114	8114	7114	6114	5114	4114	3114	0114	E118	9115	8115	7115	6115	5115	4115	3115	0115	E119	9116	8116	7116	6116	5116	4116	3116	0116	E120	9117	8117	7117	6117	5117	4117	3117	0117	E121	9118	8118	7118	6118	5118	4118	3118	0118	E122	9119	8119	7119	6119	5119	4119	3119	0119	E123	9120	8120	7120	6120	5120	4120	3120	0120	E124	9121	8121	7121	6121	5121	4121	3121	0121	E125	9122	8122	7122	6122	5122	4122	3122	0122	E126	9123	8123	7123	6123	5123	4123	3123	0123	E127	9124	8124	7124	6124	5124	4124	3124	0124	E128	9125	8125	7125	6125	5125	4125	3125	0125	E129	9126	8126	7126	6126	5126	4126	3126	0126	E130	9127	8127	7127	6127	5127	4127	3127	0127	E131	9128	8128	7128	6128	5128	4128	3128	0128	E132	9129	8129	7129	6129	5129	4129	3129	0129	E133	9130	8130	7130	6130	5130	4130	3130	0130	E134	9131	8131	7131	6131	5131	4131	3131	0131	E135	9132	8132	7132	6132	5132	4132	3132	0132	E136	9133	8133	7133	6133	5133	4133	3133	0133	E137	9134	8134	7134	6134	5134	4134	3134	0134	E138	9135	8135	7135	6135	5135	4135	3135	0135	E139	9136	8136	7136	6136	5136	4136	3136	0136	E140	9137	8137	7137	6137	5137	4137	3137	0137	E141	9138	8138	7138	6138	5138	4138	3138	0138	E142	9139	8139	7139	6139	5139	4139	3139	0139	E143	9140	8140	7140	6140	5140	4140	3140	0140	E144	9141	8141	7141	6141	5141	4141	3141	0141	E145	9142	8142	7142	6142	5142	4142	3142	0142	E146	9143	8143	7143	6143	5143	4143	3143	0143	E147	9144	8144	7144	6144	5144	4144	3144	0144	E148	9145	8145	7145	6145	5145	4145	3145	0145	E149	9146	8146	7146	6146	5146	4146	3146	0146	E150	9147	8147	7147	6147	5147	4147	3147	0147	E151	9148	8148	7148	6148	5148	4148	3148	0148	E152	9149	8149	7149	6149	5149	4149	3149	0149	E153	9150	8150	7150	6150	5150	4150	3150	0150	E154	9151	8151	7151	6151	5151	4151	3151	0151	E155	9152	8152	7152	6152	5152	4152	3152	0152	E156	9153	8153	7153	6153	5153	4153	3153	0153	E157	9154	8154	7154	6154	5154	4154	3154	0154	E158	9155	8155	7155	6155	5155	4155	3155	0155	E159	9156	8156	7156	6156	5156	4156	3156	0156	E160	9157	8157	7157	6157	5157	4157	3157	0157	E161	9158	8158	7158	6158	5158	4158	3158	0158	E162	9159	8159	7159	6159	5159	4159	3159	0159	E163	9160	8160	7160	6160	5160	4160	3160	0160	E164	9161	8161	7161	6161	5161	4161	3161	0161	E165	9162	8162	7162	6162	5162	4162	3162	0162	E166	9163	8163	7163	6163	5163	4163	3163	0163	E167	9164	8164	7164	6164	5164	4164	3164	0164	E168	9165	8165	7165	6165	5165	4165	3165	0165	E169	9166	8166	7166	6166	5166	4166	3166	0166	E170	9167	8167	7167	6167	5167	4167	3167	0167	E171	9168	8168	7168	6168	5168	4168	3168	0168	E172	9169	8169	7169	6169	5169	4169	3169	0169	E173	9170	8170	7170	6170	5170	4170	3170	0170	E174	9171	8171	7171	6171	5171	4171	3171	0171	E175	9172	8172	7172	6172	5172	4172	3172	0172	E176	9173	8173	7173	6173	5173	4173	3173	0173	E177	9174	8174	7174	6174	5174	4174	3174	0174	E178	9175	8175	7175	6175	5175	4175	3175	0175	E179	9176	81

Legenda oznak:

- EU418615: *Sorex araneus* hantavirus strain Ocsa 5(Madžarska),
- EU418616: *Sorex araneus* hantavirus strain Lipot (Madžarska),
- EU418604: *Neomys anomalus* hantavirus strain Murau (Avstrija),
- GQ293102: DGR18226 (Finska),
- GQ267811: Seewis virus isolate Krasn-Sa5 (Rusija),
- GQ267810: Parnaya-Sa1220 (Rusija),
- EU424339: Artybash virus (Rusija),
- GQ306150: Kenkeme Virus (Rusija),
- EF636026: Seewis virus- mp70 (Švica),
- EF540772: Camp Ripley virus (ZDA),
- EF619960: Jemez Springs virus (ZDA),
- FJ593497: Oxbow virus (ZDA),
- EU929078: Asama virus (Japonska),
- EF050454: Tanganya virus (Gvineja),
- JF276228: Azagny virus (Slonokoščena obala),
- EF543525: Cao Bang virus (Vietnam),
- EF641807: Imjin virus (Južna Koreja),
- EU001330: Thottapalayam virus (Indija),
- NC\_005235: Dobrava virus (Slovenija)

**Priloga D:** Distančna matrika s podanimi vrednostmi v raznolikosti aminokislinskih zaporedij segmenta L hantavirusov

Legenda oznak:

- EU418615: *Sorex araneus* hantavirus strain Ocsa 5(Madžarska),
- EU418616: *Sorex araneus* hantavirus strain Lipot (Madžarska),
- EU418604: *Neomys anomalus* hantavirus strain Murau (Avstrija),
- GQ293102: DGR18226 (Finska),
- GQ267811: Seewis virus isolate Krasn-Sa5 (Rusija),
- GQ267810: Parnaya-Sa1220 (Rusija),
- EU424339: Artybash virus (Rusija),
- GQ306150: Kenkeme Virus (Rusija),
- EF636026: Seewis virus- mp70 (Švica),
- EF540772: Camp Ripley virus (ZDA),
- EF619960: Jemez Springs virus (ZDA),
- FJ593497: Oxbow virus (ZDA),
- EU929078: Asama virus (Japonska),
- EF050454: Tanganya virus (Gvineja),
- JF276228: Azagny virus (Slonokoščena obala),
- EF543525: Cao Bang virus (Vietnam),
- EF641807: Imjin virus (Južna Koreja),
- EU001330: Thottapalayam virus (Indija),
- NC\_005235: Dobrava virus (Slovenija)