

Molekularna epidemiologija hantavirusa

Lidija CVETKO KRAJINOVIĆ, dipl. ing.
mol. biol., znanstveni novak

Klinika za infektivne bolesti »Dr. Fran
Mihaljević«, Zagreb

Ključne riječi

hantavirusi
molekularna epidemiologija
genetska različitost
evolucija hantavirusa
filogenija

Key words

hantaviruses
molecular epidemiology
genetic diversity
hantavirus evolution
phylogeny

Primljeno: 2007-08-02

Received: 2007-08-02

Prihvaćeno: 2007-09-20

Accepted: 2007-09-20

Genom hantavirusa

Hantavirusi, članovi roda *Hantavirus*, porodice *Bunyaviridae* skupina su serološki i filogenetski srodnih virusa koji uzrokuju dvije klinički različite manifestacije u ljudi – hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS) i hantavirusni plućni sindrom (HPS). Kao i u drugih bunyavirusa genom hantavirusa je trodijelni, a čine ga tri različita jednolančana RNK-segmenta negativnog polariteta. Veliki (L, od eng. *large* 6,5 – 6,6 kb) RNK-segment kodira L-protein, virusnu RNK-ovisnu RNK-polimerazu za koju se vjeruje da sudjeluje u svim koracima transkripcije i replikacije virusnog genoma. Srednji (M, od eng. *medium* 3,7 – 3,8 kb) segment kodira sintezu glikoproteinskog

Pregledni članak

Hantavirusi (rod *Hantavirus*, porodica *Bunyaviridae*) predstavljaju pravi primjer emergentnih virusa koji u ljudi uzrokuju dva različita sindroma: hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom i hantavirusni plućni sindrom. Od kada je izoliran prototip virusa ovoga roda, virus Hantaan, do danas, opisano je više od 20 novih vrsta hantavirusa, a čiji broj se rapidno povećava. Hantavirusi su negativni RNK-virusi od kojih se svaki održava u specifičnoj vrsti glodavaca. Zajedno sa svojim domaćinima rasprostranjeni su širom svijeta. Filogenetska analiza hantavirusa i njihovih domaćina glodavaca pokazuje da se njihova evolucijska stabla preklapaju što upućuje na to da su ovi virusi koevoluirali sa svojim domaćinima glodavcima preko 20 do 30 miliona godina. Razumijevanje ovog fenomena može poboljšati našu sposobnost da predvidimo gdje bi novi hantavirusi mogli biti pronađeni, jesu li oni patogeni za ljude, koji bi hantavirusi bili najbolji kandidati za razvoj cjepiva, te za poboljšavanje postojećih dijagnostičkih metoda za ljude ili praćenje glodavaca na različitim geografskim područjima.

Molecular epidemiology of hantaviruses

Review article

Hantaviruses (genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae*) represent a prime example of emerging viruses causing two distinct syndromes in humans: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Since the isolation of *Hantaan virus*, a prototype of this genus, more than 20 new species have been described and the number of new ones is rapidly increasing. Hantaviruses are negative-stranded RNA viruses each carried by a specific rodent species. Along with its rodent hosts they are distributed throughout the world. Phylogenetic relationships of hantaviruses mirror those of their hosts showing a classical example of a virus-host co-evolution over 20 to 30 million years. Understanding this phenomena can improve our ability to predict where new hantaviruses may be found, whether they are pathogenic for humans, which are the best candidates for vaccine development or to improve existing methods in human diagnostics and rodent surveillance in different geographic areas.

prekursora (GCP, od eng. glycoprotein precursor). On se kotranslacijski procesira u dva odvojena površinska glikoproteina ovojnice, G₁ i G₂, koji prepoznaju stanični(e) receptor(e) na ciljnim stanicama. Na kraju, mali (S, od eng. *small* 1,8 – 2,1 kb) segment kodira nukleokapsidni (N) protein važan pri inkapsidaciji genomske RNK [1, 2, 3, 4]. Ostali članovi porodice *Bunyaviridae* kodiraju i tzv. nestrukturane proteine (NS_s, od eng. *nonstructural proteins*) no oni za sada nisu opisani kod hantavirusa [5]. Kod sva tri segmenta hantavirusnog RNK genoma 3' i 5' krajevi su visoko konzervirani i komplementarni te mogu formirati stabilne strukture slične ukosnici tvoreći tako kružne RNK molekule. Visoka konzerviranost terminalnih nukleotidnih sekvenci značajka je pojedinog roda unu-

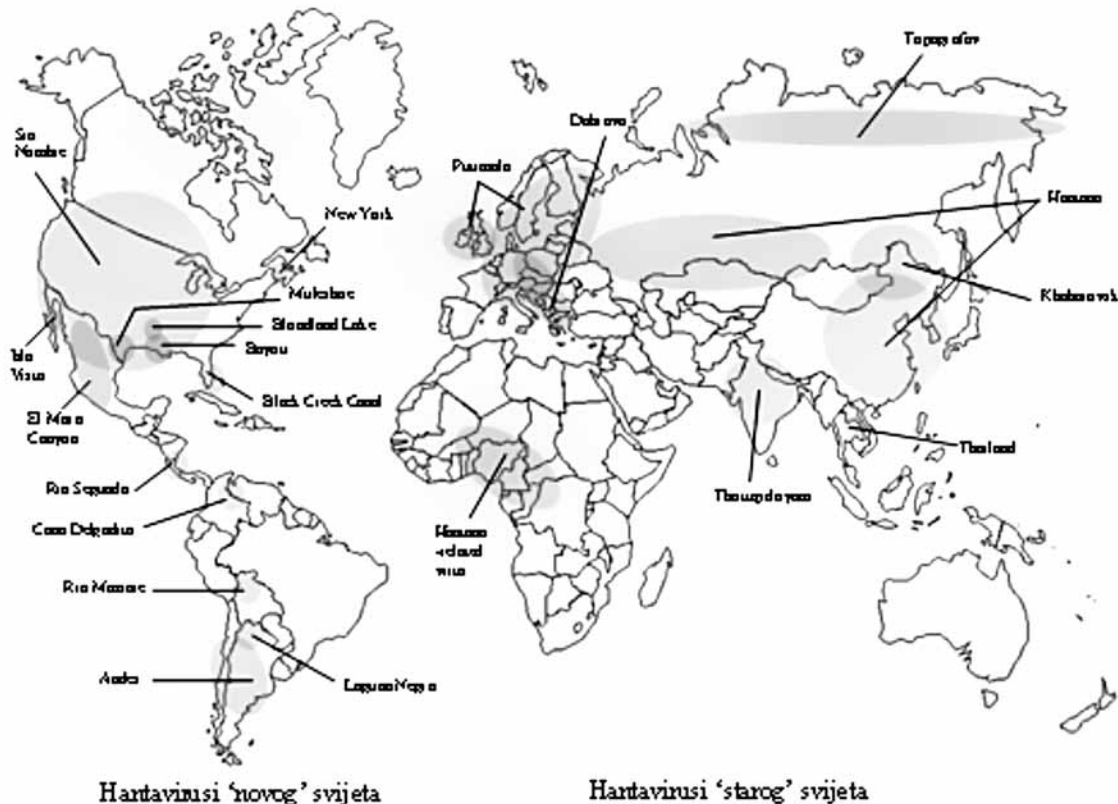
tar porodice *Bunyaviridae* i razlikuje pripadnike jednog roda od pripadnika drugih rodova [1, 2, 3, 5, 6]. Ovakav segmentirani genom upakiran je u lipidnu ovojnici tvoreći sferičnu virusnu česticu promjera 80–120 nm s čije površine strše glikoproteinski dimeri dugi oko 7 nm [1, 2, 5].

Epidemiologija i geografska distribucija

Za razliku od ostalih bunyavirusa koje prenose člankonošci, prvenstveno insekti (komarci, krpelji i dr.), u životnom ciklusu hantavirusa nema artropodnih vektora. U prirodi se hantavirusi isključivo održavaju u populacijama specifičnih domaćina malih glodavaca. Upravo zbog toga hantavirusi su klasificirani kao robovirusi (od eng. *rodent-borne viruses*), a ne arbovirusi (od eng. *arthropod-borne viruses*) kao ostali rodovi porodice *Bunyaviridae*. Svaka hantavirusna vrsta dominantno je vezana uz jednu (ili nekoliko usko srodnih) specifičnu vrstu glodavaca u kojoj uspostavlja asimptomatsku, perzistentnu infekciju. Mehanizam prijenosa s glodavaca na ljude ne zahtjeva direktan kontakt čovjeka i životinje. Prema dosadašnjim spoznajama odvija se putem inhalacije virusom kontaminiranog aerosola ili direktnim kontaktom s izlučevina-

ma (mokraća, feces, slina) kronično inficiranih životinja [7, 8]. Do sada nije dokazan mehanizam horizontalnog prijenosa s čovjeka na čovjeka, ali postoji molekularni dokaz takvog prijenosa za virus Anda (ANDV) (s visokom stopom smrtnosti) tijekom epidemije HPS-a u Argentini [9]. Također postoji opis mogućeg prijenosa HVBS-a putem zaražene krvi [10].

Opće je prihvaćeno da je jedan hantavirus povezan s jednim rezervoarom domaćinom. Geografska rasprostranjenost hantavirusa kao i epidemiološki obrasci HVBS-a i HPS-a (slika 1) reflektiraju zapravo distribuciju domaćina glodavaca tih virusa te komplicirane povijesne događaje koje su oni prolazili [11]. HVBS se pojavljuje na području Euroazije i uzrokuju ga tzv. »hantavirusi staroga svijeta«. Većina teških hantavirusnih infekcija na dalekom istoku Azije (Kina, Koreja, Japan) i Rusije uzrokovana je virusom Hantaan (HTNV) čija stopa smrtnosti raste i do 10 %. Procjenjuje se da je godišnji broj oboljelih 100 000 – 150 000 od čega većina otpada na Kinu [12]. HTNV, prototip roda *Hantavirus*, izoliran je iz tkiva pluća prugastog poljskog miša (*Apodemus agrarius*) u Južnoj Koreji [13]. Pokazano je da poljski miševi s područja Dalekog Istoka i Europe pripadaju dvjema različitim podvrstama [14], a HTNV nalazimo samo u dalekoistočnoj podvrsti *A. agr-*



Slika 1. Geografska rasprostranjenost hantavirusa »starog« i »novog« svijeta
 Figure 1. Geographic distribution of the »old« and the »new« world hantaviruses
 (prema Zeier M, i sur. *Virus Genes* 2005;30:157–80.)

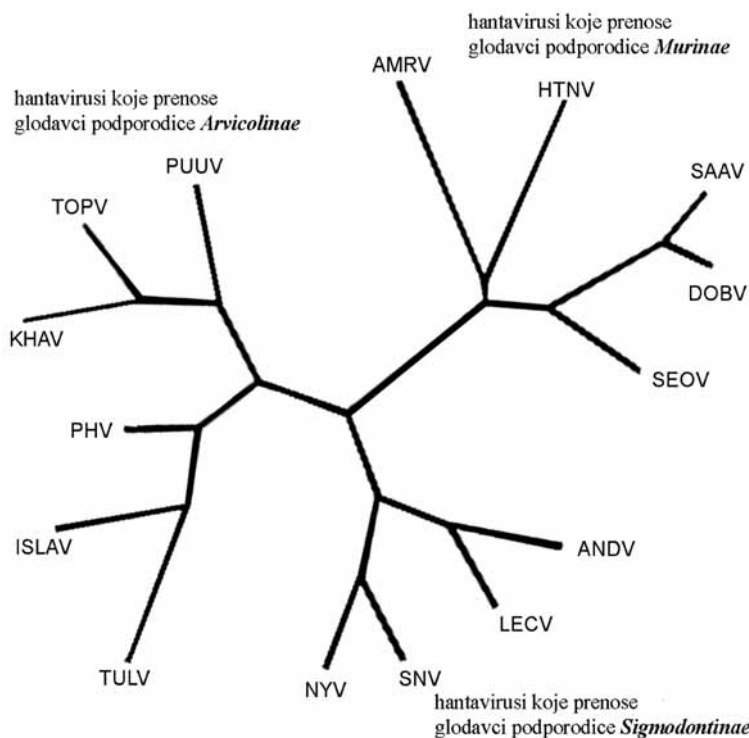
rius. Virus Seoul (SEOV) je rasprostranjen širom svijeta i jedini je hantavirus za kojeg se zna da uzrokuje bolest i u urbanim zonama. Prirodni domaćini ovog virusa, crni i smeđi štakor (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*), puno su mobilniji od domaćina ostalih hantavirusa. Putujući uz pomoć velikih, prekoceanskih brodova rasprostranjeni su širom svijeta. Tako je SEOV za sada jedini poznati »kozmpolitski« hantavirus i njegova distribucija najvjerojatnije reflektira čovjekove trgovačke i migracijske rute preko mora i oceana. Slučajevi infekcije SEOV registrirani su u Koreji, Kini, Rusiji i Japanu, ali općenito u blažem obliku nego oni povezani s HTNV iako stopa smrtnosti seže od 1 – 5 % [11, 14]. Na području Europe nađen je SEOV u štakorima, kao i specifična antitijela u ljudima no još uvijek nema jasne potvrde za HVBS uzrokovan SEOV u Europi [15]. Za teže oblike HVBS-a na području Balkana i jugoistočne Europe, slične onima koji se mogu vidjeti kod infekcije HTNV, odgovoran je virus Dobrava (DOBV). Virus je otkriven u Sloveniji i izoliran iz žutoglog šumskog miša (*Apodemus flavicollis*) [16]. Iako učestalost infekcije nije velika, karakteriziran je visokom stopom smrtnosti od 9 – 12 % [17]. Na području Europe isto tako nalazimo i DOBV vrlo sličan virus Saaremaa (SAAV). Distribucija njegovog domaćina prugastog poljskog miša (*A. agrarius*) gotovo se cijelom Europom preklapa s *A. flavicollisom* rezervoarom DOBV, osim najzapadnijih dijelova Europe gdje *A. agrarius* nije viđen [15]. Interesantno je da se u područjima gdje SAAV dominira (Estonija, Rusija) primjećuje blaži klinički ishod hantavirusne infekcije nego kod slučajeva vezanih za DOBV kao npr. na području Balkana [18]. Definitivno najčešći uzročnik HVBS-a na području Europe je virus Puumala (PUUV). Infekcija PUUV rezultira blagom formom HVBS-a (poznatog i kao *nephropathia epidemica*, NE) sa stopom smrtnosti od 0,1 % [19]. Virus prenosi riđa voluharica (*Clethrionomys glareolus*) koju nalazimo gotovo u cijeloj Europi izuzev mediteranske obale i samog sjevera Europe. PUUV-infekcije su prisutne u europskom dijelu Rusije [20], Finskoj [19], Švedskoj [21], Norveškoj [22], Belgiji [23], Njemačkoj [24], Francuskoj [25], Nizozemskoj [26], Austriji [27], Sloveniji [17, 28], Hrvatskoj [29, 30], Bosni i Hercegovini [31], Češkoj [32], Slovačkoj [33]. Posljednjih godina PUUV je prepoznat i u drugim europskim zemljama (Estonija [34], Latvija [35], Grčka [36], Danska [37]) kao važan patogen. Budući da velik broj PUUV-infekcija prođe nezapaženo zbog vrlo blagih ili atipičnih simptoma teško je procijeniti incidenciju. Još jedan hantavirus Tula (TULV) je rasprostranjen širom centralne i istočne Europe u svojem domaćinu poljskoj voluharici (*Microtus arvalis*). Dosada je u najmanje dva slučaja TULV bio povezan s infekcijom u ljudi, no nije pokazana veza s bolešću u ljudi [38, 39]. Jedan novoizolirani hantavirus, virus Topografov (TOPV), prenose leminzi (*Lemmus sibiricus*) i zasada je detektiran samo na području sjevernog Sibira [40].

HPS je rasprostranjen na oba američka kontinenta, ali ne na području starog kontinenta. Može ga uzrokovati veći broj patogenih hantavirusa, tzv. »hantavirusi novoga svijeta«, no većina slučajeva posljedica je infekcije virusom Sin Nombre (SNV) u Sjevernoj i ANDV u Južnoj Americi. Oko 300 slučajeva HPS-a registrirano je u SAD-u, a oko 30 u Kanadi. U Južnoj i Centralnoj Americi zemlje sa najvećom stopom incidencije su Argentina, Čile, Brazil, Paragvaj, Bolivija, Urugvaj i Panama [41, 42].

Genetska različitost i evolucija hantavirusa

Analiza dosada poznatih genomskih sekvenci hantavirusa pokazuje da je genetska različitost među hantavirusima primarno rezultat jednog evolucijskog mehanizma koji nazivamo genski »drift«. To podrazumijeva postupnu akumulaciju malih promjena na genomu poput točkastih mutacija i insercija/delecija jednog ili nekoliko nukleotida. S druge strane, postoje također dokazi za genski »shift« u hantavirusima, evolucijski mehanizam koji se događa bilo kroz preslagivanje genomskih RNK-segmenta, bilo kroz događaje homologne rekombinacije. U prirodi su pronađeni rearanžirani sojevi (od eng. *reassortant strains*) SNV [43], a u uvjetima *in vitro* dobiveni su rearanžirani između SNV i virus Black Creek Canal (BCCV) [44]. Također je pokazano postojanje homologne rekombinacije kod hantavirusa na primjeru TULV [45]. Budući da ovi potonji događaji mogu prilično komplicirati proces klasifikacije »novih« hantavirusa mora se imati na umu da nepotpune genske informacije (npr. parcijalne sekvence jednog ili više genomskih segmenta ili pak potpune sekvence samo jednog segmenta) trebaju biti interpretirane s oprezom.

Zbog odsutnosti artropodnih vektora u životnom ciklusu hantavirusa, koji bi omogućili brže širenje virusa kroz velika geografska prostranstva kao i njihov prijenos na moguće druge vrste domaćina, hantavirusi su razvili vrlo uzak raspon domaćina. Svaki hantavirus se adaptirao na samo jednu ili nekoliko usko srodnih vrsta glodavaca u čijim populacijama se održava uspostavljajući perzistentnu infekciju. Obično su to vrste glodavaca koje su najbrojnije, odnosno dominantne vrste unutar određenog teritorija ili ekološke niše što nedvojbeno povećava šanse virusa za preživljenjem. Čini se, također, da se u prirodnim okolnostima horizontalni prijenos hantavirusa s jedne na drugu vrstu glodavaca (eng. *hantavirus spillover*) događa sa znatno smanjenom frekvencijom nego prijenos unutar vrste što uvelike doprinosi činjenici da je evolucija samog virusa efikasno ograničena na lokalne populacije domaćina glodavaca. Kao posljedica toga proizlazi da su specifične značajke (genska i antigenska svojstva, patogeničnost za ljude itd.) koje jedan tip hantavirusa razlikuju od svih ostalih uvelike određene prirodom njihovih domaćina glodavaca. Evolucijski gledano, ljudi kao domaćini predstavljaju gotovo slijepu ulicu za hantaviruse (ne-



Slika 2. Tri glavne filogenetske grupe hantavirusa koje prenose glodavci iz podporodica *Murinae*, *Arvicolinae* i *Sigmodontinae*. AMRV, virus Amur; HTNV, virus Hantaan; SAAV, virus Saarema; DOBV, virus Dobrava; SEOV, virus Seoul; PUUV, virus Puumala; TOPV, virus Topografov; KHAV, virus Khabarovsk; PHV, virus Prospect Hill; ISLAV, virus Isla Vista; TULV, virus Tula; ANDV, virus Andes; LECV, virus Lechiguanas; SNV, virus Sin Nombre; NYV, virus New York.

Figure 2. Three major groups of hantaviruses, *Murinae*-, *Arvicolinae*- and *Sigmodontinae*-borne. AMRV, Amur virus; HTNV, Hantaan virus; SAAV, Saarema virus; DOBV, Dobrava virus; SEOV, Seoul virus; PUUV, Puumala virus; TOPV, Topografov virus; KHAV, Khabarovsk virus; PHV, Prospect Hill virus; ISLAV, Isla Vista virus; TULV, Tula virus; ANDV, Andes virus; LECV, Lechiguanas virus; SNV, Sin Nombre virus; NYV, New York virus.

(prema Khaiboullina SF, i sur. *Curr Mol Med* 2005;5:773–90.)

ma horizontalnog prijenosa) tako da epidemije u ljudi ne pridonose evolutivnom procesu virusa [3, 14]. Kao rezultat svega navedenog čini se da je postojao dugotrajan proces ko-evolucije svakog hantavirusa s njegovim specifičnim prirodnim domaćinom, a kao posljedicu tog zajedničkog evolutivnog procesa vidimo da filogenetska slika hantavirusa, njihova genetska raznolikost i geografska rasprostranjenost odražavaju onu njihovih prirodnih rezervoara [2, 14]. Na filogenetskom stablu jasno se odvajaju tri glavne grupe hantavirusa u tri zasebna filogenetska kladija obzirom na glodavce unutar porodice *Muridae* koji ih prenose. Razlikujemo hantaviruse koje prenose glodavci podporodice *Murinae* gdje spadaju: HTNV, SEOV, DOBV, SAAV, i dr., zatim oni koje prenose glodavci podporodice *Arvicolinae* i tu nalazimo: PUUV, TULV, TOPV, virus Prospect Hill (PHV), virus Bloodland Lake (BLLV), i dr., te hantavirusi kao što su: SNV, ANDV, BCCV, virus

New York (NYV), i dr. koje prenose glodavci podporodice *Sigmodontinae* (slika 2).

Iako je generalno točna, dogma »jedan domaćin glodavac-jedan hantavirus« dakako pojednostavljuje stvarnu sliku i kada se filogenija detaljnije uspoređuje pojavljuju se određene iznimke od ovog pravila. S jedne strane, čini se da jedna vrsta glodavaca može prenositi više od jedne vrste hantavirusa. Ovakve iznimke su najvjerojatnije rezultat tzv. događaja promjene domaćina (od eng. *host-switching*) koji se dogodio nekad tijekom evolucije hantavirusa [28, 40, 46]. Do sada su poznata i opisana tri takva slučaja kod hantavirusa: SNV i NYV [47], PUUV, TOPV i virus Khabarovsk (KHAV) [40], DOBV i SAAV [46]. Ovi primjeri dokazuju da hantavirusi ponekad mogu prijeći vrsno-specifičnu barijeru domaćina i uspostaviti nove sustave virus-domaćinu novom domaćinu, no ovakvi događaji nisu česta pojava kod hantavirusa.

Molekularna karakterizacija hantavirusa

Hantavirusi koje nose glodavci iz podporodice *Murinae* – Sekvencije HTNV izolirane su s područja Koreje, Kine i dalekog istoka Rusije u bolesnika s HVBS-om i iz *A. agrarius-a* [12, 14]. Usporedba cijelih ili parcijalnih M-nukleotidnih sekvenci ili G1/G2 aminokiselinskih sljedova iz Kine i Koreje pokazala je puno veću raznolikost među kineskim nego korejskim sekvencijama. Filogenetskom analizom, korejske sekvencije su formirale jednu gensku liniju, a monofilija svih sojeva iz Koreje sugerira njihovo zajedničko porijeklo. Filogenetska srodnost kineskih sojeva manje je uočljiva što se može objasniti činjenicom da su prikupljene s vrlo širokog geografskog područja. Ti se sojevi grupiraju u osam zasebnih linija slijedeći njihovo zajedničko geografsko porijeklo. Svi sojevi porijeklom iz Rusije formiraju zasebnu skupinu jasno odvojenu od HTNV-sojeva iz Koreje [12, 13]. DOBV prenosi glodavac *A. flavicollis* i predstavljen je sojevima s područja Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Grčke, Albanije i Slovačke [15]. Sekvence su dobivene ili direktno iz *A. flavicollis-a* ili iz kliničkog materijala HVBS pacijenata. Filogenetskom analizom na osnovi parcijalnih sekvenci S segmenta, koja je uključila većinu poznatih sojeva DOBV, formirale su se tri genske linije. Jednu čine sekvence iz Slovenije, Hrvatske i Bosne i Hercegovine, drugu čine sekvence iz Grčke, a treću sekvence dobivene iz *Apodemus sylvaticus-a* iz Rusije [17, 18, 29, 31, 36, 46]. Usporedba različitih sojeva DOBV pokazala je da najveća genska različitost među linijama ovog virusa iznosi 12,2 % za S segment i 11,2 % za M segment. Sekvence M segmenta pokazale su malo veću varijabilnost nego sekvence S segmenta DOBV, što se općenito uočava i kod drugih hantavirusa [46]. SEOV koji je povezan s dvjema vrstama štakora *R. norvegicus* i *R. rattus* pokazuje veliku rasprostranjenost širom svijeta upravo zbog široke rasprostranjenosti svojih domaćina. Do sada su izolirane sekvencije iz Azije, Afrike, Amerike i Europe koje na filogenetskom stablu daju pet genetskih linija. Četiri od njih formiraju sojevi samo porijeklom iz Kine, a posljednja uključuje sojeve iz Kine, Japana i SAD-a. Takvo grupiranje nije uobičajeno za hantaviruse, koji u najvećem broju slučajeva pokazuju geografsko nakupljanje genskih varijanti. Moguće objašnjenje za ovakvu filogenetsku srodnost različitih sojeva SEOV, vjerojatno je posljedica interkontinentalnog širenja njihovih domaćina (preko brodova i luka) koje tako oslikava putove migracije štakora [48].

Hantavirusi koje nose glodavci iz podporodice *Arvicolinae* – *C. glareolus*, koji je raširen gotovo u cijeloj Europi, a može se naći i u dijelovima Rusije, nosilac je PUUV. Genska analiza sojeva PUUV porijeklom iz različitih dijelova Europe i Rusije pokazala je najveći stupanj varijabilnosti PUUV među svim hantavirusnim vrstama: genska različitost na razini nukleotida doseže do 20 % i 17 % za kodirajuće sekvence M i S segmenta uzastopno, a za nekodirajuće regije čak i više. Filogenetskom analizom

kompletne sekvencije S-segmenta 42 PUUV soja iz Euroazije dobiveno je sedam genskih linija porijeklom iz Finske, Rusije, sjeverne Skandinavije, južne Skandinavije, Estonije, Danske i Belgije. Iako se gensko grupiranje geografskih varijanti vidi jasno unutar pojedinih linija, cjelokupna filogenija čini se zvjezdolikog tipa (»star like«) što upućuje na rano odvajanje i neovisnu evoluciju pojedinih genskih linija. Slika geografske rasprostranjenosti PUUV u Europi kompleksna je i vjerojatno reflektira povijest post-glacijalnog naseljavanja Europe različitim vrstama glodavaca [49].

Hantavirusi koje nose glodavci iz podporodice *Sigmodontinae* – Hantavirusi koji cirkuliraju u Sjevernoj Americi formiraju tri filogenetski različite grupe. Dvije su povezane s dva različita roda glodavaca (*Peromyscus* i *Reithrodontomys*) porodice *Sigmodontinae*, dok treća grupa uključuje viruse koje nose glodavci rodova *Sigmodon* i *Oryzomys*. Virusi koji pripadaju različitim grupama razdvajaju najmanje 27 % razlika u sekvenciji M-segmenta. Hantavirusi na južnoameričkom kontinentu povezani su s tri glavne grupe iz porodice *Sigmodontinae*: Phyllotini, Acodontini i Oryzomyini. Svi trenutno poznati južnoamerički genotipovi su monofiletski i pokazuju 75 – 90 % homologije u nt-sekvenci S- i M-genomskog segmenta [41, 42].

Hantavirusi u Hrvatskoj

Prvi opis HVBS-a u Hrvatskoj dali su Radošević i Mohaček [50], koji su opisali četiri slučaja *nephropathia epidemica Myhrman-Zetterholm*, a prva registrirana epidemija zbila se u proljeće 1967. godine na Plitvicama. U to vrijeme je etiologija bolesti 14-ero oboljelih bila nepoznata, no naknadnim serološkim testiranjima pokazano je da su uzročnici bili PUUV- ili HTNV-slični virusi [51]. Nova epidemija je zabilježena tijekom 1989. među vojnicima u okrugu zračne luke Pleso pokraj Velike Gorice s 14 oboljelih [29], a tijekom 1992. u blizini Novske, otkrivajući do tada nepoznato endemsko žarište HVBS-a u Hrvatskoj [52]. Do 1990. zabilježeni su sporadični slučajevi na različitim područjima Hrvatske. Tijekom domovinskog rata u Hrvatskoj, 1995. godine, zabilježena je do tada najveća epidemija HVBS-a sa 125 prijavljenih slučajeva. Istodobno se bolest pojavila na nekoliko od ranije poznatih prirodnih žarišta (Mala Kapela, zapadna Slavonija) i prvi puta na Dinari. Genetskom analizom po prvi puta je potvrđeno da PUUV i DOBV ko-egzistiraju i uzrokuju HVBS u Hrvatskoj. Virusne sekvence izolirane su iz uzoraka seruma HVBS pozitivnih bolesnika. Na filogenetskom stablu sekvence PUUV grupirale su se zajedno s austrijskim PUUV, dok je DOBV pokazao visoku homologiju sa sekvencama DOBV iz Slovenije i Grčke. Svakako treba uzeti u obzir i mogućnost postojanja drugih hantavirusa kao potencijalnih uzročnika HVBS-a na prostorima Hrvatske [29]. Slijedilo je uobičajeno međuepidemijsko razdoblje sa registriranim sporadičnim slučaje-

vima, da bi se 2002. godine dogodila do sada najveća epidemija HVBS-a u Hrvatskoj. Epidemija je zahvatila gotovo cijelu Hrvatsku izuzev priobalno područje i otoke. Rezultirala je s više od 400 bolesnika i PUUV kao dominantnim uzročnikom bolesti [30, 53, 54, 55].

Do sada u Hrvatskoj nisu sustavno rađena epidemiološka i virusološka istraživanja prirodnih žarišta HVBS-a. Također su vrlo slabo praćeni i istraživani glodavci – prirodni domaćini hantavirusa. U nekoliko istraživanja Borčić i sur. pokazali su da su najčešći prirodni rezervoari virusa riđa voluharica (*C. glareolus*) i žutogrli šumski miš (*A. flavicollis*), te rjeđe prugasti poljski (*A. agrarius*) i šumski miš (*A. sylvaticus*) [52, 56]. Seroprevalencija se kretala u rasponu između 5 – 12 % što je utvrđeno direktnom imunofluorescencijom na organima ulovljenih glodavaca [56, 57]. Dominantni patogen koji uzrokuje bolest u Hrvatskoj je PUUV, a uz njega još cirkulira i DOBV [29, 30, 56, 57]. Cvetko i sur. po prvi puta su genetski analizirali hantaviruse u divljih glodavaca u Hrvatskoj i pokazali da se divlji sojevi PUUV iz Hrvatske grupiraju na filogenetskom stablu zajedno sa austrijskim i slovenskim sojevima formirajući tako zasebnu genetsku liniju, za koju je predložen naziv linija Alpe-Adrija (od eng. *Alpe-Adrian lineage*) [30]. Ovi rezultati filogenetskih odnosa divljih tipova PUUV koji potječu iz glodavaca sukladni su s ranije pokazanom genetskom analizom [29] sojeva PUUV dobivenih iz humanih uzoraka. Osim ovih patogenih hantavirusa, genetskom analizom potvrđeno je i prisustvo nepatogenog TULV u populacijama poljske voluharice (*M. arvalis*) i livadne voluharice (*Microtus agrestis*) [58]. Hrvatska je definitivno područje koje obiluje velikom različitosti vrsta malih glodavaca koje zajedno žive na relativno malom prostoru stoga možda možemo i očekivati prisutnost novih vrsta hantavirusa na ovim prostorima. I s evolucijskog stajališta hantavirusa Hrvatska je vrlo interesantno područje za istraživati jer se čini da bi PUUV iz jugo-istočnih dijelova Evrope mogao pripadati jednoj od najstarijih linija ovoga virusa.

Zaključak

Molekularna epidemiologija se bavi potencijalnim genetskim i okolišnim rizičnim faktorima, identificiranim na molekularnoj razini, i njihovom doprinosu etiologiji, distribuciji i kontroli bolesti u nekoj populaciji. Faktori koji određuju i utječu na patogeničnost hantavirusa još su uvijek jako slabo razumljivi i istraženi. Svakako bi se priroda samog domaćina glodavca trebala uzeti u obzir kao možda jedan od najvažnijih faktora (hantavirusi koje prenose američki glodavci općenito uzrokuju mnogo ozbiljnije oboljenje u ljudi nego hantavirusi koje prenose glodavci staroga kontinenta). Ko-evolucija hantavirusa i njihovih domaćina ne bi se trebala razmatrati samo sa znanstvenog stajališta. Razumijevanje ovog fenomena i procesa može poboljšati našu sposobnost da predvidimo gdje bi novi

hantavirusi mogli biti pronađeni, jesu li oni patogeni za ljude i koji su čimbenici koji utječu na njihovu patogeničnost, koji bi hantavirusi bili najbolji kandidati za razvoj cjepiva, te za poboljšavanje postojećih dijagnostičkih metoda za ljude ili praćenje glodavaca na različitim geografskim područjima.

Literatura

- [1] Schmaljohn CS. Molecular biology of hantaviruses. U: Elliott RM, ur. *The Bunyaviridae*. New York: Plenum Press, 1996:63–90.
- [2] Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 1996;77:2677–87.
- [3] Plyusnin A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Arch Virol* 2002;147:665–82.
- [4] Antic D, Yong Kang C, Spik K, Schmaljohn CS, Vapalahti O, Vaheri A. Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of hantaviruses. *Virus Res* 1992;24:35–46.
- [5] Elliott RM. The *Bunyaviridae*: concluding remarks and future prospects. U: Elliott RM, ur. *The Bunyaviridae*. New York: Plenum Press, 1996:295–332.
- [6] Elliot RM, Bouloy M, Calisher CH, i sur. *Bunyaviridae*. U: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL i sur., ur. *Virus taxonomy. VIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 2000:599–621.
- [7] Lee H, van den Groen G. Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol* 1989;36:62–102.
- [8] Schmaljohn CS, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 1997;3:95–104.
- [9] Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, Lopez NM, Rossi CM, Rabinovich RD. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 1998;241(2):323–30.
- [10] Markotić A. Human-to-human transmission of hantaviruses. *Lancet* 1997;350:596.
- [11] Schmaljohn CS, Hooper JW. *Bunyaviridae*: the viruses and their replication. U: Knipe DM, Howley PM, ur. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001:1581–633.
- [12] Lee HW, Lee PW, Baek LJ, Chu YK. Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses. *Arch Virol (Supp)* 1990;1:5–18.
- [13] Lee HW, Lee PW. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1978;137:289–308.
- [14] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. U: Schmaljohn CS, Nichol ST, ur. *Hantaviruses*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2001:47–75.
- [15] Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 2003;3:653–61.
- [16] Avšič-Županc T, Xiao SY, Stojanović R, Gligić A, van der Groen J, Le Duc JW. Characterisation of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* 1992;38:132–7.
- [17] Avšič-Županc T, Nemirov K, Petrovec M, i sur. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J Gen Virol* 2000;81:1747–55.
- [18] Lundkvist A, Apekina N, Myasnikov Y, Vapalahti O, Vaheri A, Plyusnin A. Dobrava hantavirus outbreak in Russia. *Lancet* 1997;350:781–2.

- [19] Brummer-Korvenkontio M, Vapalahti O, Henttonen H, Koskela P, Kuusisto P, Vaehri A. Epidemiological study of Nephropathia epidemica in Finland 1989–1996. *Scand J Infect Dis* 1999;31:427–35.
- [20] Alexeyev O, Elgh F, Zhestkov A, Wadell G, Juto P. Hantaan and Puumala virus antibodies in blood donors in Samara, an HFRS-endemic region in European Russia. *Lancet* 1996;347:1483.
- [21] Ahlm C, Linderholm M, Juto P, Stegmayr B, Settergren B. Prevalence of serum IgG antibodies to Puumala virus (hemorrhagic fever with renal syndrome) in northern Sweden. *Epidemiol Infect* 1994;113:129–36.
- [22] Lundkvist A, Wiger D, Horling J, i sur. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *J Gen Virol* 1998;79:2603–14.
- [23] Heyman P, Vervoort T, Escutenaire S, i sur. Incidence of hantavirus infections in Belgium. *Virus Res* 2001;77:71–80.
- [24] Zoller L, Faulde M, Meisel H, i sur. Seroprevalence of hantavirus antibodies in Germany as determined by a new recombinant enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:305–13.
- [25] Rollin PE, Coudrier D, Sureau P. Hantavirus epidemic in Europe, 1993. *Lancet* 1994;343:115–6.
- [26] Groen J, Gerding MN, Jordans JG, Clement JP, Nieuwenhuijs JH, Osterhaus AD. Hantavirus infections in The Netherlands: epidemiology and disease. *Epidemiol Infect* 1995;114:373–83.
- [27] Aberle SW, Lehner P, Ecker M, i sur. Nephropathia epidemica and Puumala virus in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:467–72.
- [28] Pal E, Strle F, Avsic-Zupanc T. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Pomurje region of Slovenia – an 18-year survey. *Wien Klin Wochenschr* 2005;117:398–405.
- [29] Markotić A, Nichol ST, Kuzman I, i sur. Characteristics of Puumala and Dobrava Infections in Croatia. *J Med Virol* 2002; 66:542–51.
- [30] Cvetko L, Markotić A, Plyusnina A, i sur. Puumala virus in Croatia in the 2002 HFRS outbreak. *J Med Virol* 2005;77(2):290–4.
- [31] Lundkvist A, Hukic M, Horling J, Gilljam M, Nichol S, Niklasson B. Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. *J Med Virol* 1997;53:51–9.
- [32] Pejcoch M, Kriz B. Hantaviruses in the Czech Republic. *Emerg Infect Dis* 2003;9:756–7.
- [33] Sibold C, Meisel H, Lundkvist A, i sur. Short report: simultaneous occurrence of Dobrava, Puumala and Tula hantaviruses in Slovakia. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:409–11.
- [34] Golovljova I, Sjolander K, Lindegren G, i sur. Hantaviruses in Estonia. *J Med Virol* 2002;68:589–98.
- [35] Lundkvist A, Lindegren G, Brus Sjolander K, i sur. Hantavirus infections in Latvia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:626–9.
- [36] Papa A, Antoniadis A. Hantavirus infections in Greece – an update. *Eur J Epidemiol* 2001;17:189–94.
- [37] Sironen T, Plyusnina A, Andersen HK, i sur. Distribution of Puumala hantavirus in Denmark: analysis of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from Fyn and Jutland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002;2:37–45.
- [38] Vapalahti O, Lundkvist A, Kukkonen SKJ, i sur. Isolation and characterisation of Tula virus, a distinct serotype in the genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae*. *J Gen Virol* 1996;77:3063–7.
- [39] Schultze D, Lundkvist A, Blauenstein U, Heyman P. Tula virus infection associated with fever and exanthema after a wild rodent bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:304–6.
- [40] Vapalahti O, Lundkvist A, Fedorov V, i sur. Isolation and characterisation of a hantavirus from *Lemmus sibiricus*: evidence for host-switch during hantavirus evolution. *J Virol* 1999;73:5586–92.
- [41] Nichol ST, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ. Hantavirus pulmonary syndrome and newly described hantaviruses in the United States. U: Elliott RM (ur.) *The Bunyaviridae*. New York, Plenum Press 1996;269–80.
- [42] Pini N. Hantavirus pulmonary syndrome in Latin America. *Curr Opin Infect Dis* 2004;17:427–31.
- [43] Henderson WW, Monroe MC, St. Jeor SC, i sur. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology* 1995;214:602–10.
- [44] Rodriguez LL, Owens JH, Peters CJ, Nichol ST. Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 1998;242:99–106.
- [45] Sibold C, Meisel H, Labuda M i sur. Recombination in Tula hantavirus evolution: analysis of genetic lineages from Slovakia. *J Virol* 1999;73:667–75.
- [46] Nemirov K, Henttonen H, Vaehri A, Plyusnina A. Phylogenetic evidence for host switching in the evolution of hantaviruses carried by *Apodemus* mice. *Virus Res* 2002;90:207–15.
- [47] Morzunov SP, Rowe JE, Monroe MC, i sur. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. *J Virol* 1998;72:57–64.
- [48] Xiao SY, Leduc JW, Chu YK, Schmaljohn CS. Phylogenetic analysis of virus isolates in the genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae*. *Virology* 1994;198:205–17.
- [49] Sironen T, Vaehri A, Plyusnina A. Molecular evolution of Puumala virus. *J Virol* 2001;75:11803–10.
- [50] Radošević Z, Mohaček I. The problem of nephropathia epidemica Myhrman-Zetterholm in relation to acute interstitial nephritis. *Acta Medica Scandinavica* 1954;149:221–8.
- [51] Vesenjaj-Hirjan J, Borčić B. Hemoragična groznica s bubrežnim sindromom (HGBS) u Hrvatskoj (Jugoslavija). *Etiologija, Liječnički vjesnik* 1986;108:197–9.
- [52] Borčić B, Puntarić D, Turković B, Aleraj B, Tvrtković N. New natural focus of hemorrhagic fever with renal syndrome in Novska. *Croatian Med J* 1996;37:115–8.
- [53] Miletić Medved M, Markotić A, Cebalo Lj, Turković B, Županc Avšič T. Haemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Lancet* 2002;360:415.
- [54] Cvetko L, Turk N, Markotić A, i sur. Short report: Dual infections with Puumala virus and *Leptospira interrogans* serovar lora in a bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:612–4.
- [55] Petričević I, Kuzman I. Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom u Hrvatskoj – povijesni pregled. *Acta Med Croatica* 2003; 57:387–92.
- [56] Borčić B, Turković B, Aleraj B, Tvrtković N. Hemoragijska groznica s bubrežnim sindromom (HGBS) u Hrvatskoj: učestalost infekcije u ljudi i divlji animalni rezervoari. *Lijec Vjesn* 1991; 113:320–3.
- [57] Ledina D, Bradarić N, Borčić B, i sur. Dinara-New natural focus of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Croat Med J* 2002;43:576–80.
- [58] Scharninghausen JJ, Pfeffer M, Meyer H, Davis DS, Honeycutt RL, Faulde M. Genetic evidence for Tula virus in *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis* populations in Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002;2:19–27.

