

Molekularna detekcija i genska karakterizacija virusa mumpsa

Tanja KOŠUTIĆ GULIJA, mr. sc., dipl. ing. biologije, znanstveni novak-asistent
Maja SANTAK, dr. sc., dipl. ing. biologije
Renata MAŽURAN, prof. dr. sc., dipl. ing. biologije, znanstveni savjetnik
Marijana BARIČEVIĆ, dipl. ing. biologije, znanstveni novak-asistent
Jelena IVANČIĆ-JELEČKI, mr. sc., dipl. ing. biologije
Renata JUG, ing. medicinsko-laboratorijske dijagnostike
Dubravko FORČIĆ, dr. sc., dipl. ing. biologije, znanstveni savjetnik

Imunološki zavod, Rockefellerova 10, Zagreb

Ključne riječi

virus mumpsa
molekularna detekcija
genotipizacija
molekularna epidemiologija

Key words

mumps virus
molecular detection
genotyping
molecular epidemiology

Primljeno: 2007–02–08

Received: 2007–02–08

Prihvaćeno: 2007–03–09

Accepted: 2007–03–09

1. Uvod

Zaušnjaci su zarazna bolest uzrokovana virusom mumpsa. Bolest se klinički manifestira temperaturom, glavoboljom, umorom te oticanjem parotidnih žlijezda [1], iako približno 30 % oboljelih nema karakteristične kliničke simptome bolesti [2]. Premda su zaušnjaci benigna bolest, kod nekih oboljelih dolazi do ozbiljnih komplikacija. Aseptični meningitis razvije se u oko 15 % oboljelih od zaušnjaka, encefalitis u 0,2–0,3 % oboljelih, a orhitis u 20–30 % oboljelih odraslih muškaraca [2].

Pregledni članak

Virus mumpsa uzročnik je zaušnjaka, bolesti koja se može prevenirati cijepljenjem. Mumps je RNK virus koji se u kliničkim uzorcima i u supernatantima inficiranih staničnih kultura nakon izolacije RNK može detektirati RT-PCR testom. Prednosti RT-PCR testa su brzina, specifičnost i mogućnost detekcije malog broja kopija virusa. Genskom karakterizacijom i genotipizacijom virusa omogućeno je epidemiološko praćenje distribucije i cirkuliranja divljih tipova virusa mumpsa koji uzrokuju epidemije i u procijepljenim populacijama. Molekularna detekcija i genska karakterizacija divljih i cjepnih virusa mumpsa provodi se u Republici Hrvatskoj od kraja 90-tih godina.

Molecular detection and genetic characterization of mumps virus

Review article

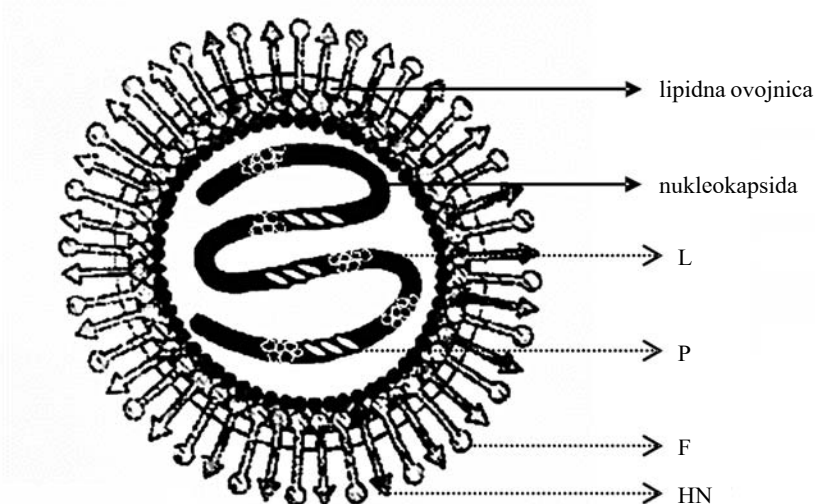
Mumps is an RNA virus that is a cause of the vaccine preventable disease, mumps. In clinical specimens and supernatants of the infected cell cultures its RNA is detectable by RT-PCR test. Advantages of RT-PCR are rapidity, specificity and sensitivity. Genetic characterization and genotyping are basis for molecular epidemiological surveillance of the wild type mumps virus. Mumps outbreaks are also detected in a highly vaccinated population. Molecular detection and characterization of wild and vaccine types of mumps virus has been performed in Croatia since the late nineties.

Mumps je RNK virus koji pripada redu *Mononegavirales*, porodici *Paramyxoviridae*, potporodici *Paramyxovirinae* i rodu *Rubulaviridae* [3].

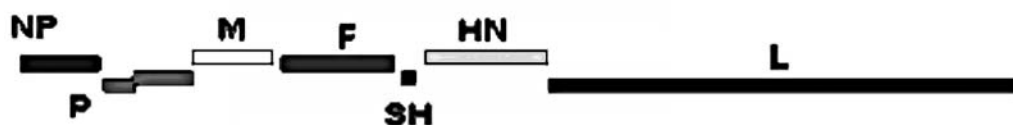
Virusne čestice mumpsa izrazito su pleomorfne, promjera 100–600 nm. Dominiraju grubo sferične čestice (slika 1A), a virus postoji i u filamentoznom ili nepravilnom obliku [3].

Genom virusa čini jednolančana, nesegmentirana RNK negativnog polariteta (–) veličine 15834 nukleotida (nt). RNK je funkcionalno podijeljena na sedam gena koji

A)



B)



Slika 1. Shematski prikaz virusne čestice Paramyxovirusa (A) i organizacija genoma virusa mumpsa (B)

Figure 1. Schematic diagram of Paramyxoviridae virus particle (A), and gene order in the genome of mumps virus (B)

su razdvojeni netranskribirajućim intergenskim regijama od jednog, dva ili sedam nukleotida. Na 3' i 5' krajevima genoma nalaze se nekodirajuće sekvence (engl. *leader* i *trailer*) koje su obrnuto komplementarne i važne su u kapsidaciji, transkripciji i vjerojatno replikaciji virusa [4].

Sedam gena kodira redom za nukleokapsidni protein (NP), fosfoprotein (P), matriks protein (M), fuzijski protein (F), mali hidrofobni protein (SH), hemaglutinin-neuraminidazni protein (HN) i veliki protein (L) [5] (slika 1B).

Virusne čestice građene su od lipoproteinske ovojnice s uklopljenim glikoproteinima HN i F, a s unutarnje strane ovojnice nalazi se M protein.

Unutar ovojnice nalazi se helikalna nukleokapsida građena od virusne RNK i NP proteina, a uz nju su vezani proteini P i L. Kompleks P i L proteina ima funkciju virusne RNK-ovisne RNK polimeraze (slika 1B).

Zaušnjaci se preveniraju cijepljenjem sa živim atenuiranim cjepnim virusima.

Prva cjepiva pripravljena su 60-ih godina 20-og stoljeća [6], a danas se u komercijalno dostupnim cjepivima koristi desetak cjepnih virusa mumpsa. Najčešće se upotrebljavaju cjepni virusi Jeryl-Lynn, Urabe AM9, Leningrad-3, L-Zagreb te RIT 4385 [7].

Smatra se da je virus mumpsa monotipan [7, 8] te da svi cjepni virusi pružaju dugotrajnu zaštitu protiv divljih tipova virusa [8]. Unatoč tome, epidemije mumpsa pojavljuju se čak i u dobro procijepljenim populacijama [9, 10, 11, 12], a u nekim slučajevima postojeća neutralizacijska antitijela ne pružaju zaštitu protiv reinfekcije heterolognim genotipom mumpsa [9, 13].

2. Detekcija virusa mumpsa

Laboratorijska potvrda infekcije virusom mumpsa važna je zbog potvrde kliničke dijagnoze mumpsa i razlikovanja od bolesti sa sličnim simptomima, a različitog etiološkog agensa kao što su virusi parainfluence 1 i 2, echovirusi te virus limfocitnog koriomeningitisa [14].

Metode za dijagnostiku mumpsa dijele se na serološke metode, metode izolacije virusa u kulturi i molekularne metode.

Akutna infekcija virusom mumpsa detektira se : (a) otkrivanjem mumps specifičnih IgM antitijela u serumu, (b) povećanjem titra IgG antitijela u uzorcima seruma sakupljenim u vrijeme akutne faze i nakon bolesti, (c) otkrivanjem citopatogenog učinka virusa mumpsa u

staničnoj kulturi ili (d) detekcijom virusa mumpsa testom reverzne transkripcije i amplifikacije [14].

Najčešće korišteni serološki testovi za detekciju mumpsa su komercijalni enzim-imuno testovi (engl. *enzyme immuno assay*, EIA) kojima se dokazuje pojava IgM ili porast IgG specifičnih antitijela.

Prednosti tih testova su jednostavnost izvođenja i mogućnost obrade velikog broja uzoraka. Zbog toga se koriste u velikom broju laboratorija, unatoč nepostojanju internacionalnog referensa i mogućnosti pojave lažno pozitivnih rezultata zbog interferencije s virusima parainfluenze tipa 1 i 3 [14, 15].

Infekcija virusom mumpsa može se dokazati i izolacijom virusa iz bioloških uzoraka u staničnim kulturama. Uspješna izolacija mora biti potvrđena testom imunofluorescencije s mumps specifičnim antitijelom ili molekularnim metodama [14]. Kao detekcijska metoda, izolacija virusa na staničnim kulturama vremenski je zahtjevnija te zbog svoje niske osjetljivosti nepogodna za detekciju male količine virusa [16].

Prisustvo virusa u uzorcima moguće je dokazati i metodama molekularne biologije kojima se detektira virusna RNK.

2.1. Izolacija virusa na staničnim kulturama

Najvažniji parametar u odabiru vrste stanične kulture je njezina pogodnost za infekciju određenim virusom.

Za izolaciju virusa mumpsa mogu se koristiti stanične kulture Vero (stanice bubrega Afričkog zelenog majmuna), B95a (B limfoblastoidne stanice marmoseta) [24], CaCo-2 (stanice humanog karcinoma kolona) [25] te LLC-MK2 (epitelne stanice bubrega majmuna) [26].

Virus mumpsa najčešće se izolira u kontinuiranoj staničnoj liniji Vero [25, 26]. Vero stanična linija potječe iz 1962. godine, dobro je karakterizirana, lako se propagira i može se komercijalno nabaviti. Osim virusom mumpsa može se inficirati i mnogim drugim virusima kao što su ospice, respiratorni sincicijski virus (RSV), parainfluenza 1, 2, 3, 4A i 4B [27]. Iako još nije definirano koja je stanična linija najpogodnija za izolaciju virusa mumpsa, navedene karakteristike Vero stanične linije razlog su za njezinu čestu upotrebu.

Zbog kontaminacije stanične kulture neželjenim mikroorganizmima uzorci se trebaju transportirati do laboratorija u sterilnim kontejnerima i sterilnim transportnim medijima u što kraćem vremenu.

Infekcija stanične kulture virusom mumpsa detektira se pojavom citopatogenog učinka (engl. *cytopathogenic effect*, CPE), a potvrđuje testom imunofluorescencije ili testom reverzne transkripcije i amplifikacije (RT-PCR). CPE različitih virusa mumpsa ne mora nužno biti jednake morfologije, a ponekad je i neprepoznatljiv [6]. Uzastop-

na supkultivacija virusa na staničnim kulturama može promijeniti njegove genetske karakteristike [28, 29] pa je virus najpogodnije detektirati i karakterizirati molekularnim metodama nakon što manjeg broja supkultivacija [28].

3. Molekularna detekcija virusa mumpsa

Prednosti molekularne detekcije su brzina, specifičnost i velika osjetljivost. No, za izvođenje testova potrebna je posebna oprema i obučeno osoblje što poskupljuje metodu i ujedno predstavlja njezin glavni nedostatak.

Ciljna molekula za molekularnu detekciju virusa mumpsa je virusna RNK koja se može izolirati direktno iz kliničkih uzoraka ili iz virusa izoliranih na staničnim kulturama.

Virusna RNK prevodi se enzimom reverzne transkriptaze u komplementarnu DNK (cDNK), a zatim amplificira u lančanoj reakciji polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR).

3.1. Klinički uzorci za molekularnu detekciju virusa

Za izolaciju virusne RNK pogodni su brojni klinički uzorci: slina [17, 18], urin [18, 19], serum [18] i bris zdrijela [20], a kod oboljelih kod kojih su se pojavile komplikacije kao meningitis ili orhitis virusna RNK se može izolirati i iz cerebrospinalnog likvora (CSL) [16, 19] ili sjemene tekućine [21].

Zbog osjetljivosti virusa mumpsa na povišenu temperaturu i svjetlost, te osjetljivosti virusne RNK na RNazu, uzorci se moraju pohraniti u specifičnim uvjetima. Uzorci koji se obrađuju unutar 6–8 sati od sakupljanja čuvaju se na +4 °C, a uzorci koji se pohranjuju na dulje vrijeme čuvaju se na –20 do –70 °C [22]. Otapanje i ponovno zamrzavanje kliničkih uzoraka može negativno utjecati na kvalitetu RNK koja će se iz njih izolirati [22].

Vrijeme koje je proteklo od pojave simptoma infekcije do vremena u kojem su sakupljeni uzorci također određuje uspješnost detekcije virusa. Uzorkovanje seruma i brisa

Tablica 1. Detekcija virusa mumpsa RT-PCR-om u IgM pozitivnim uzorcima sline prikupljenim tijekom akutne infekcije

Table 1. RT-PCR detection of mumps virus in IgM positive saliva samples. Samples were collected during acute infection

Vrijeme nakon izbijanja simptoma (dani)	% pozitivnih u RT-PCR testu/	
	Lin i sur. [18]	Lin i sur. [23]
1 – 7	61,9	48
8 – 14	36,5	17
>14	6,1	0
nepoznato	19,0	n.d.

n.d. = nije detektirano/not detected

grla preporuča se unutar 3–5 dana od pojave simptoma bolesti, iako se virus može detektirati u brisu grla i 7 dana prije izbijanja simptoma [14]. U uzorcima urina virus se može detektirati također 3–5 dana nakon pojave simptoma, a obilnije se izlučuje u urinu 6–15 dana nakon pojave simptoma [14].

Najveći postotak pozitivnih uzoraka slin zabilježen je kod uzoraka sakupljenim do 7. dana nakon pojave simptoma, a virus se može detektirati u slini sve do 14. dana od pojave simptoma [23, 18] (tablica 1).

3.2. Izolacija virusne RNK iz kliničkih uzoraka i supernatanta staničnih kultura

Izolacija intaktne RNK prvi je, i često kritičan korak u izvođenju molekularnih testova. Zbog prisutnosti RNaza u uzorcima, otopinama i posuđu svaka faza u izolaciji treba biti propisno izvedena (tretiranje otopina dietilpirokarbonatom (DEPC), korištenje jednokratnog plastičnog posuđa slobodnog od RNaza, korištenje nastavaka s barijerom i nošenje rukavica).

RNK se može izolirati klasičnom metodom, najčešće modificiranoj prema metodi Chomczynski i Mackey [30], ili upotrebom nekog od komercijalnih kitova koji su svojim sastavom prilagođeni za izolaciju iz pojedinih vrsta uzoraka.

Uzorke iz kojih se izolira virusna RNK mumpsa dovoljno je promiješati u lizirajućem puferu što će razoriti stanične membrane ili virusnu ovojnica i osloboditi RNK za ekstrakciju.

Postupak izolacije RNK može se podijeliti na sljedeće faze: lizu uzorka, izdvajanje RNK iz lizata, precipitaciju i ispiranje.

Liza se temelji na djelovanju jakih denaturirajućih agensa kao što su gvanidin tiocijanat, gvanidin hidroklorid, litij-klorid (LiCl), natrij-dodecilsulfat (SDS) ili fenol koji istovremeno razaraju stanice i virusne ovojnice te denaturiraju RNaze.

Iz lizata se RNK može izdvojiti smjesom fenol:kloroform, vezanjem na magnetske kuglice ili vezanjem na filtere od staklene vune. Magnetske kuglice i filteri od staklene vune koriste se u komercijalno dostupnim kolonama za izolaciju RNK.

U precipitaciji RNK koristi se alkohol (etanol ili izopropanol) ili sol LiCl. Uobičajena je upotreba alkohola, no upotrebom LiCl dobiva se čišći precipitat jer se ne precipitiraju ugljikohidrati, proteini ili DNK zaostali nakon izdvajanja RNK iz lizata uzorka.

U zadnjoj fazi izolacije, ispiranju, talog RNK ispire se od soli sa 70–80 % etanolom.

Izolirana RNK osjetljiva je na RNaze iz okoline. Zato se prije pohranjivanja, otapa u vodi ili Tris-EDTA puferu (TE pufer) koji moraju biti obrađeni DEPC-om ili posje-

dovati potvrdu da su slobodni od RNaza (engl. *RNase free*).

RNK se čuva na –80 °C. Kako bi se spriječilo nepotrebno odmrzavanje i ponovno zamrzavanje kojima dolazi do fragmentacije RNK, RNK se raspođjeljuje u alikvote dovoljne za jednu upotrebu. Tako pripremljena RNK može se čuvati do godine dana na –80 °C [31].

3.3. Uspostava RT-PCR testa za detekciju virusa mumpsa

Test za molekularnu detekciju virusne RNK sastoji se od reakcija reverzne transkripcije i amplifikacije (RT-PCR). Komercijalni kompleti za detekciju RNK virusa mumpsa nisu dostupni, pa je virus moguće detektirati samo *in-house* metodom. U literaturi postoje metode različitih autora s opisanim uvjetima za detekciju RNK virusa mumpsa pomoću kojih se može osmisliti vlastita metoda [16, 21, 32] (tablica 2).

Reakcija reverzne transkripcije izvodi se pod standardnim uvjetima [34], a zbog povećanja osjetljivosti ili specifičnosti u reakcijskoj smjesi mogu se promijeniti oligonukleotidi, reverzna transkriptaza ili vrijeme trajanja reakcije [33, 34]. Uobičajeno se koriste nasumični heksanukleotidi (engl. *random hexamers*), a u slučajevima negativnog rezultata ili nespecifičnih PCR produkata, umjesto heksanukleotida može se upotrijebiti početnica suprotnog polariteta (engl. *antisense*) [34]. Prema literaturnim podacima reverzne transkriptaze MuLV (engl. *murine leukemia virus*) i AMV (engl. *avian myeloblastosis virus*) jednako su efikasne u stvaranju cDNK [35]. U testovima gdje se u jednoj epruveti odvijaju RT i PCR koriste se enzimi koji su i reverzne transkriptaze i polimeraze (npr. RTth), a vrsta njihove aktivnosti ovisi o temperaturi inkubacije. Produženjem RT reakcije može se povećati duljina stvorene cDNK i tako povećati osjetljivost cijelog testa [34].

Prilikom uspostavljanja testa za amplifikaciju (PCR) bitno je definirati:

- regiju za PCR i specifične početnice
- osjetljivost i specifičnost testa
- uvjete PCR-a.

Dio genoma koji će se amplificirati i prema kojem će se dizajnirati početnice određuje se prema svrsi RT-PCR testa.

U svrhu detekcije i identifikacije virusa mumpsa najčešće se amplificira dio ili cijeli SH gen [9, 23, 37, 38, 39, 40], a ponekad i dijelovi F [41, 42], HN [20], NP [17] ili M [40] gena (tablica 2).

Ako se osim detekcije želi napraviti i filogenetska analiza virusa mumpsa amplificira se cijeli SH gen [43].

Molekularna karakterizacija virusa mumpsa može se raditi u bilo kojem dijelu genoma.

Tablica 2. Osnovne karakteristike nekih RT-PCR protokola za molekularnu detekciju virusa mumpsa**Table 2.** Basic characteristics of RT-PCR protocols for molecular detection of mumps virus

Umnožena regija u genomu	RT-PCR reakcija	Osjetljivost testa	Referenca
SH gen	jednostupanjska dvostupanjska	5×10^3 kopija RNK* 5–50 kopija RNK*	Palacios [16]
SH gen	dvostupanjska	1–10 kopija p.s.	Lin [23]
Dio NP gena	dvostupanjska	n. i.	Sartorius [17]
Dio NP gena	jednostupanjska	1–20 inf. čest. virusa	Boriskin [35]
Dio F gena	dvostupanjski real-time PCR	5 kopija p.s.	Uchida [32]
Dio P i HN gena	dvostupanjska	n. i.	Nagai [20]
Dio M gena	jednostupanjski real-time PCR	1–10 kopija p.s.	Kubar [40]

* sintetska RNK molekula/synthetic RNA, p.s. = plazmidni standard/ plasmid standard,
n.i./n.a. = nije ispitivana/not analysed

Najčešće karakterizirani dio genoma je HN gen u kojem su lokalizirana tri epitopa protiv kojih se stvaraju neutralizirajuća antitijela [19, 44, 45], te zbog mogućeg utjecaja 7616. nukleotida na neurovirulentna svojstva cjepnog virusa Urabe AM9 [46, 47].

Maksimalna osjetljivost i specifičnost RT-PCR testa postiže se dobrim izborom početnica. Početnice se jednostavno i točno dizajniraju pomoću kompjuterskih programa (npr. CloneManager, Oligoware 1.0) namijenjenima za analizu nukleotidnih sekvenci. Nukleotidne sekvence prikupljaju se iz banki gena (EMBL i GenBank).

Početnice koje su u izabranoj regiji komplementarne slijedu nukleotida kod brojnih virusa mumpsa, omogućuju detekciju različitih virusa mumpsa. Obzirom na raznolikost sekvenci taj je uvjet teško zadovoljiti pa se mogu dizajnirati tzv. degenerativne početnice. One su mješavina početnica s različitim nukleotidima na definiranim mjestima i imaju svojstvo specifičnog vezanja na različite nukleotidne sekvence [16].

Specifičnost testa procjenjuje se prema rezultatima RT-PCR testa u kojima se kao uzorak koristi RNK virusa ospica, RSV-a tipa A i B ili humanog parainfluenca virusa tip 1, 2, 3 i 4 [16, 48]. Negativan rezultat tih amplifikacija ukazuje na specifičan RT-PCR test za virus mumpsa.

Jednostupanjskim RT-PCR testom moguće je detektirati virus u velikom rasponu $1-5 \times 10^3$ virusnih čestica (tablica 2).

Prednost RT-PCR testa u usporedbi s drugim metodama detekcije je njegova velika osjetljivost. Granica osjetljivosti testa (engl. *endpoint*) određuje se amplifikacijom serijski razrijeđenih laboratorijskih standarda, koji mogu biti: virusni pulovi poznatog titra [35], linearizirani plazmidi s kloniranim PCR fragmentom ili RNK standardi dobiveni *in vitro* transkripcijom plazmidne DNK s klonira-

nim PCR fragmentom [16, 23]. Prema literaturnim podacima procjenjuje se da je moguće detektirati standard u rasponu od 1–20 virusnih čestica ako se radi o virusnom pulu poznatog titra [35], 5–50 kopija sintetske RNK [16] ili 1–10 kopija plazmidnog standarda [23, 32, 40] (tablica 2).

Komercijalno se ne može nabaviti niti jedan od tih standarda tako da ne postoji mogućnost standardizacije RT-PCR testova između laboratorija niti uspoređivanje osjetljivosti testova opisanih u literaturi.

U 2006. godini Centers for Disease Control and Prevention (CDC) objavio je protokol za razvoj i validaciju RT-PCR testa za detekciju virusa mumpsa, a u tu svrhu laboratoriji javnog zdravstva iz SAD-a mogu nabaviti alikvot virusa mumpsa i izoliranu RNK mumpsa koji služe kao pozitivna kontrola u RT-PCR testu. Alikvoti sadrže lizat stanične kulture Vero koja je inficirana divljim tipom virusa mumpsa [49].

Osjetljivost testa za molekularnu detekciju može se povećati uvođenjem drugog ciklusa amplifikacije, tzv. dvostupanjski PCR (engl. *nested-PCR*). U drugom ciklusu amplifikacije koristi se novi par početnica, a kao uzorak za umnožavanje koristi se produkt prve amplifikacije. Procijenjeno je da je uz dobro odabrane početnice dvostupanjski PCR za 10^2-10^3 puta osjetljiviji od jednostupanjskog PCR testa [16]. Uvođenje drugog para početnica u protokol za molekularnu detekciju zahtijeva dodatno rukovanje uzorcima, pa je veća mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata.

Uvjeti amplifikacije određuju se eksperimentalno. U fazi denaturacije uzorci se inkubiraju na temperaturi 90–95 °C, do 1 minute. Temperatura vezanja početnica (engl. *annealing temperature*, *T_a*) najvažniji je parametar koji treba eksperimentalno odrediti u PCR reakciji [50]. Nalazi se između 40–70 °C, a određuje se empirijski [33].

Kao maksimalna početna vrijednost može se uzeti temperatura taljenja početnica (engl. *melting temperature*, *T_m*) [33]. Faza vezanja početnica traje 30–45 sekundi, a njezinim produžavanjem raste broj nespecifičnih produkata amplifikacije [33]. Faza elongacije odvija se na temperaturi koju određuje vrsta polimeraze (68 ili 72 °C) i traje oko 1 minute za amplifikaciju fragmenta od 1 kilobaze.

Produkti amplifikacije vizualiziraju se nakon elektroforeze u agaroznom gelu koji je obojen etidijskim bromidom. U svakoj elektroforezi uz uzorke se nanosi i biljeg DNK za određivanje veličine produkata (engl. *size marker*, *SM*). Etidijski bromid veže se između lanaca DNK i fluorescira kada se obasja UV svjetlom.

U interpretaciji rezultata RT-PCR testa pozornost treba obratiti na pozitivnu i negativnu kontrolu koje moraju biti uključene u svaki test [22]. Pozitivna kontrola sastoji se od malog broja nukleinskih kiselina koje će se specifično umnožiti u RT-PCR testu [22]. Kao pozitivna kontrola može se koristiti RNK izolirana iz stanica inficiranim virusom mumpsa ili RNK dobivena *in vitro* transkripcijom plazmidne DNK s ukloniranim PCR fragmentom. Negativna kontrola obično se sastoji od vode ili medija za supkultivaciju stanica koji prolaze cijeli proces izolacije RNK i RT-PCR testa.

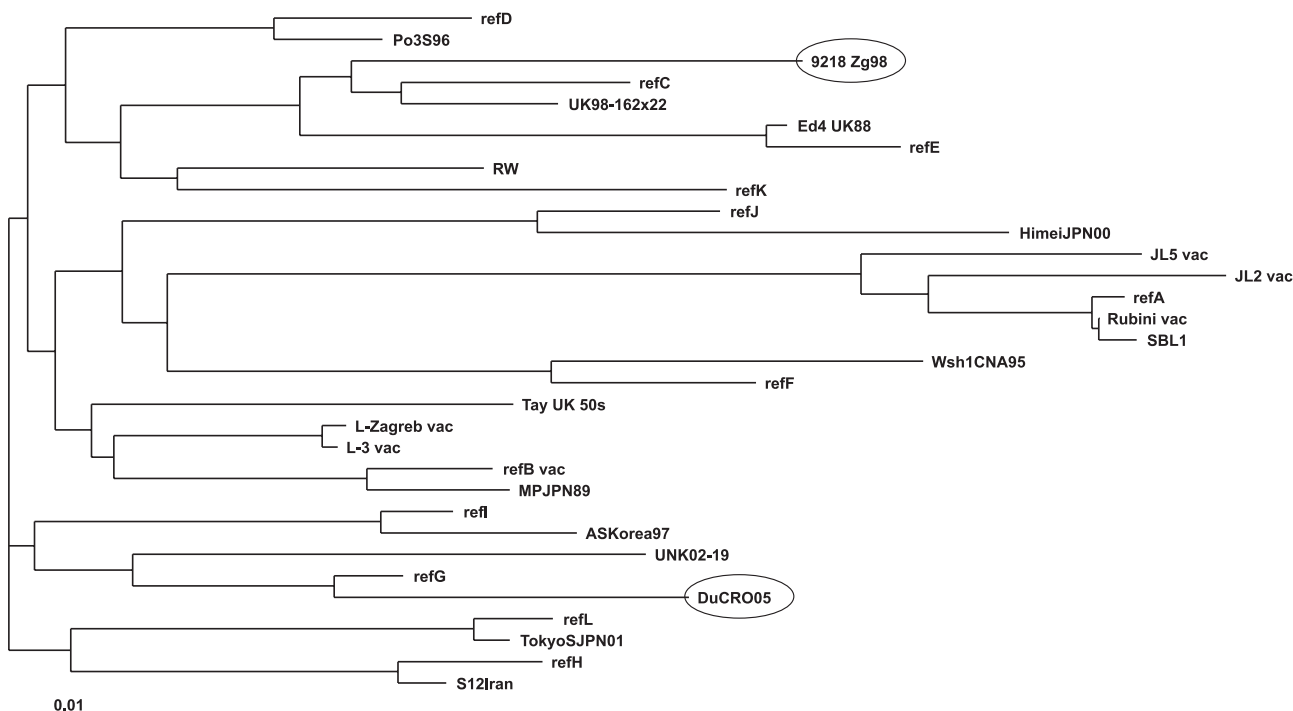
Kontrole su potvrda da je test pravilno izveden i da je mogućnost lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata minimalna. Lažno negativni rezultati obično potječu od

nepravilno sakupljenih i spremljenih uzoraka ili uzoraka u kojima je zbog nepravilnog spremanja razorena RNK. Lažno pozitivni rezultati najčešće su rezultat zagađenja prethodno amplificiranom DNK, ili među-kontaminacije uzoraka tijekom sakupljanja, alikvotiranja ili izolacije RNK.

Pozitivan rezultat RT-PCR testa ukazuje na prisutnost RNK virusa mumpsa u uzorku, što potvrđuje kliničku dijagnozu zaušnjaka i predstavlja početan korak u genskoj karakterizaciji virusa.

4. Genska karakterizacija virusa mumpsa: genotipizacija i filogenetska analiza

Virus mumpsa genski se karakterizira usporednom analizom njegove nukleotidne sekvence sa sekvencama ostalih virusa mumpsa koje su pohranjene u banci gena. Sekvence se određuju direktnim sekvenciranjem PCR produkata ili kloniranjem PCR produkata u plazmidni vektor koji se potom sekvencira. Usporedne analize rade se pomoću kompjuterskih programa (npr. ClustalX, CloneManager, TreeWiew, NJplot) koji omogućuju pronalaženje sličnosti i razlika između sekvenci, te konstruiranje filogenetskih stabala. Najčešća primjena molekularne karakterizacije je u određivanju genotipa virusa mumpsa (genotipizacija) i filogenetskoj analizi. Genotipizacija i filogenetska analiza mumpsa većinom se temelje na analizi nukleotidnih sekvenci hipervarijabilnog SH gena



Slika 2. Filogenetsko stablo virusa mumpsa konstruirano iz sekvenci SH gena od 316 nukleotida. Sekvence su preuzete iz banke gena GenBank. Virusi detektirani na području Hrvatske, 9218/Zg98 i Du/CRO05 nalaze se unutar krugova

Figure 2. Mumps virus phylogenetic tree based on the 316 nucleotide region of the SH gene. Sequences were obtained from GeneBank. Two wild types of Croatian mumps, 9218/Zg98 and Du/CRO05, are in circles

Tablica 3. Predloženi referentni virusi za svaki genotip mumpsa [43]**Table 3.** Proposed reference strain for each genotype of mumps virus [43]

Genotip	Referentni virus	Pristupni broj u GenBank	Država i godina identifikacije
A	End/USA45	D90231	USA 45
B	Urb/Jap67	D90236	JPN67-95
C	Bf/UK75	X63709	GBR75
D	Islip/UK97	AF142766	GBR97
E	Ed2/UK88	X63711	GBR88
F	WLZ1/CNA95	Z77158	CHN95
G	Glouc1/UK96	AF142764	GBR96-05
H	ManchS1/UK95	AF142771	GBR95
I	Odate-1	D86174	JPN93
J	Loug1/UK97	AF142770	GBR97
K	DK81/01	AF365891	DNK81-88
L	Fukuoka49/JPN00	AB105483	JPN00-01
	Leningrad-3** L-Zagreb**	AY493374 AJ272363	RUS53
	Tay/UK50s**	AF142774	GBR50s
	UNK02-19**	AY380077	GBR02

** referentni sojevi potencijalnih novih genotipova/proposed referent strain of potentially new genotypes

[51–57]. SH je najmanji gen u genomu virusa mumpsa s kojega se transkribira mRNK od samo 316 nukleotida i translira u SH protein od 57 aminokiselina [58]. Dok je u ostalim genima omjer *missense/silent* mutacija <0,5, u SH genu je 2,0 što ukazuje na njegovu veliku varijabilnost u odnosu na ostali dio genoma [28, 59]. Biološki utjecaj mutacija u SH genu nije poznat, a pretpostavlja se da velika heterogenost SH gena nema serološkog značaja. SH protein je nestrukturani protein virusa mumpsa koji ima ulogu u inhibiciji signalnog puta faktora tumorske nekroze α (TNF- α) [60] što omogućuje inficiranoj stanici da izbjegne apoptozu, a virusu da se nesmetano propagira.

Temeljem analize SH gena do danas je definirano dvanaest genotipova virusa mumpsa, koji se označavaju slovima od A do L (slika 2).

Prema predloženim kriterijima za genotipizaciju i imenovanje virusa mumpsa iz 2005. [43] novi genotip virusa mumpsa može se definirati ako su zadovoljeni slijedeći uvjeti: (a) nukleotidna sekvenca od 316 nt SH gena mora se razlikovati od svih postojećih SH sekvenci, a različitost sekvence mora biti >5 % kada se uspoređi sa svim sekvencama referentnih virusa (tablica 3); (b) za definiciju novog genotipa potrebno je detektirati najmanje dva ista ili slična virusa; (c) da bi se izbjegla duplikacija, kod definiranja novog genotipa trebaju biti konzultirana još dva laboratorija; (d) nova nukleotidna sekvenca treba biti pohranje-

na u banci gena GenBank i pravilno označena (ime virusa i izvor podataka; izolat virusa ili klinički uzorak virusa).

Prijedlogom je definirano i označavanje novih virusa mumpsa. Naziv treba pružiti osnovne informacije o virusu i sadržavati: oznaku države prema UN ISO3, godinu izolacije virusa, identifikacijski broj izolata u laboratoriju, genotip kojem virus pripada i oznaku **MuVs** ili **MuVi** kojom se definira da li je virus detektiran u kliničkom uzorku ili je izoliran iz stanične kulture. Na primjer, virus detektiran u kliničkom uzorku, izoliran 2005. godine u Velikoj Britaniji, označen kao izolat broj 320 i pripadnik genotipa D imat će oznaku: MuVs-GBR05-320-D [43].

Prema tom prijedlogu, virusi koji već imaju imena po kojima su poznati iz literature ili po kojima su pohranjeni u banku sekvenci, stara imena zadržavaju kao prefikse novim opisnim imenima.

Iako se većina filogenetskih analiza temelji na sekvenci SH gena, postoje i literaturni podaci o filogenetskim analizama HN i F gena [42, 45, 61].

5. Molekularna epidemiologija virusa mumpsa

U 2004. godini 109 država koristilo je cjepivo protiv mumpsa u obaveznim nacionalnim kalendarima cijeplje-

nja. Iako je to znatno smanjilo incidenciju obolijevanja od mumpsa, u periodu 1999.–2004. službeno je zabilježeno 3 miliona oboljelih [2]. Molekularna detekcija i genotipizacija izoliranih virusa omogućava stvaranje baze nukleotidnih sekvenci virusa mumpsa pomoću koje se kronološki i geografski prati distribucija divljih virusa te putevi prijenosa virusa [62, 63, 12]. U zapadnoj hemisferi cirkuliraju genotipovi C-E, G i H, dok su u području Azije izolirani isključivo virusi genotipova B, F i I [1].

Na istom području mogu cirkulirati i virusi različitih genotipova, kao u Velikoj Britaniji gdje od kasnih osamdesetih cirkuliraju genotipovi C, D, H i G. Do tada je bio dominantan genotip C, a pojava genotipa D, H i G podudara se s uvođenjem obaveznog cijepljenja protiv mumpsa [23].

Na pojedinim područjima virusi različitih genotipova izmjenjuju se s vremenom.

U Japanu je genotip B cirkulirao od 1967.–1989., od 1993.–1998. zamijenio ga je genotip D, a od 1999. dominantan je genotip G [1, 41, 63]. Sličan primjer je i Švedska gdje je od 1970.–1980. dominantan bio genotip A. U periodu od 1983.–1985. genotip A se nije pojavljivao da bi se zatim ponovno javio kao dominantan genotip [64, 65].

Nepoznat je mehanizam prirodne selekcije koji utječe na pojavnost i distribuciju genotipova virusa mumpsa. Pretpostavlja se da je jedan od selekcijskih mehanizama i imunost populacije nakon cijepljenja [1]. Tu pretpostavku potvrđuje i nepostojanje novijih kliničkih izolata genotipa A (osim endemskog virusa SBL-1 u Švedskoj) nakon intenzivne upotrebe cjepnog virusa Jeryl-Lynn koji je istog genotipa [62, 37, 28].

U Kanadi je 2006. cirkulirao virus genotipa G za koji je utvrđeno da je gotovo identičan u SH regiji kao i virus koji je istovremeno uzrokovao epidemije mumpsa u SAD-u (Iowa i New Jersey) [12].

Na području Hrvatske sporadično se pojavljuju slučajevi obolijevanja od divljeg tipa virusa mumpsa. Obično obolijevaju necijepljena djeca ili osobe srednje dobi koje nisu preboljele mumps niti su primile cjepivo. Obavezno cijepljenje jednodokomponentnim cjepivom protiv mumpsa koje sadrži cjepni virus L-Zagreb provodi se od 1972. godine, a od 1974. godine koristi se i trokomponentno cjepivo MRP (**m**easles-**r**ubela-**p**arotitis) [66]. Molekularnom detekcijom i genskom karakterizacijom u kliničkim uzorcima iz 1998. i 2005. godine detektirana su dva divlja tipa virusa mumpsa [19]. Prema epidemiološkim i laboratorijskim podacima oba virusa unesena su u Hrvatsku. Virus izoliran 1998. nazvan je 9218/Zg98 i zabilježen je samo kod jednog oboljelog. Sekvenca njegovog SH gena pohranjena je u GenBank pod pristupnim brojem AJ272364, a genskom karakterizacijom SH gena utvrđeno je da ne pripada niti jednom do sada poznatom genotipu (slika 2). 2005. godine izoliran je virus nazvan

Du/CRO05 koji je izazvao manju epidemiju. Sekvenca njegovog SH gena pohranjena je u GenBank pod pristupnim brojem DQ139784, a genskom karakterizacijom utvrđeno je da pripada genotipu G (slika 2) [19].

6. Ostale primjene rezultata molekularne detekcije i genske karakterizacije virusa mumpsa

Rezultati molekularne detekcije i karakterizacije virusa mumpsa primjenjuju se i kod praćenja patogenosti divljih virusa mumpsa, utvrđivanja genetske stabilnosti cjepnih virusa u proizvodnim uvjetima, laboratorijskih istraživanja u slučajevima postvaccinalnog meningitisa i utvrđivanja uzroka epidemija u zadovoljavajuće procijepljenim populacijama.

Konstantna molekularna detekcija i karakterizacija virusa koji se pojavljuju u populaciji potrebna je zbog povezivanja njihove patogenosti s promjenama u genomu. Virus mumpsa kontinuirano evoluirao supkultivacijama u različitim *in vitro* i *in vivo* staničnim sustavima [47, 29, 67]. Time se nasumično može povećati ili smanjiti njegova patogenost [67]. U tu svrhu najčešće je analiziran HN gen u kojem su definirana tri antigena epitopa odgovorna za stvaranje neutralizacijskih antitijela [68, 69, 70]. Pretpostavlja se da promjene u tim dijelovima genoma mogu utjecati na sposobnost virusa da izbjegne imunološki odgovor domaćina [70, 69]. Sigurno je da patogenost virusa nije definirana samo u jednom dijelu genoma nego su to kombinacije promjena u raznim funkcionalnim ili regulatornim regijama [28, 71].

Prema zahtjevima Svjetske zdravstvene organizacije i Europske farmakopeje cjepni virus treba biti genski stabilan u proizvodnim uvjetima [72, 73]. Svi cjepni virusi tijekom proizvodnog procesa umnožavaju se u staničnim kulturama, a zbog virusne RNK polimeraze koja nema mogućnost popravka pogrešaka tijekom replikacije u procesu proizvodnje moguće je nastajanje nasumičnih promjena u genomu. Nepoznata je uloga tih promjena, ali zbog mogućeg utjecaja na sigurnost i imunogeničnost cjepiva genom virusa trebao bi ostati neizmjenjen. Proizvodnja virusnih cjepiva temelji se na sustavu kvalificiranih banki (matična banka, radna banka) živog, atenuiranog, virusa čime se umanjuje ili u potpunosti uklanja mogućnost varijacija u sastavu živog, atenuiranog virusnog cjepiva. Gensku stabilnost moguće je dokazati metodama molekularne detekcije i genske karakterizacije virusa, a u tu svrhu potrebno je analizirati cijeli virusni genom [29, 74].

Kao rijetka komplikacija cijepljenja pojavljuje se aseptični meningitis [2]. Aseptični meningitis koji je uzrokovan cjepnim virusom javlja se 18–34 dana nakon cijepljenja što je dugačak period za pasivno praćenje komplikacija cijepljenja jer bolest mogu uzrokovati i drugi virusi. U oko 90 % slučajeva to su enterovirusi (u područjima gdje se

provodi cijepjenje protiv mumpsa), arbovirusi, a također i divlji virus mumpsa [75]. Zato se u takvim slučajevima etiološki agens određuje molekularnom detekcijom i genskom karakterizacijom virusa mumpsa [7, 76].

Na područjima Švicarske, Portugala, Španjolske i Hong-Konga u dobro procijepljenim populacijama cjepnim virusom Rubini, u periodu 1997.–2000. učestalo su se pojavljivale epidemije mumpsa. Primjenom molekularne detekcije i genotipizacije utvrđeno je da su epidemije izazvali divlji virusi [9, 11, 36, 37, 39, 52, 54], a epidemiološkim istraživanjima utvrđena je niska protektivna efikasnost cjepnog virusa Rubini [7].

Literatura

- [1] Muhlemann K. The molecular epidemiology of mumps virus. *Infection, Genetics and Evolution* 2004; 4: 215–219.
- [2] World Health Organization. Global status of mumps immunization and surveillance. *Wkly Epidemiol Rec* 2005; 48: 417–424.
- [3] Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. U: Fields BN, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, Knipe DM, ur. *Fields-Virology* 2001; 4th edn. Lippincott, Williams&Wilkins Publishers, Philadelphia.2001:1305–1340.
- [4] Clarke DK, Sidhu MS, Johnson JE, Udem SA. Rescue of mumps virus from cDNA. *J Virol* 2000; 74: 4831–4838.
- [5] Elango N, Varsanyi TM, Kövamees J, Norrby E. Molecular cloning and characterization of six genes, determination of gene order and intergenic sequences and leader sequence of mumps virus. *J Gen Virol* 1988; 69: 2893–2900.
- [6] Carbone KM, Wolinsky JS. Mumps Virus. U: Fields BN, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, Knipe DM, ur. *Fields-Virology* 2001; 4th edn. Lippincott, Williams&Wilkins Publishers, Philadelphia.2001:1381.
- [7] World Health Organization. Mumps virus vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2001; 45: 346–355.
- [8] Rubin S, Mauldin J, Chumakov K, Vanderzanden J, Iskow R, Carbone K. Serological and phylogenic evidence of monotypic immune responses to different mumps virus strains. *Vaccine* 2006; 24 (14): 2662–2668.
- [9] Montes M, Cilla G, Artieda J, Vicente D, Basterretxea M. Mumps outbreak in vaccinated children in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. *Epidemiol Infect* 2002; 129(3): 551–6.
- [10] Savard C, Godin C. Outbreak of mumps, Montreal, October 1998 to March 1999-with a particular focus on a school. *Can Commun Dis Rep* 2000; 26(8):69–71.
- [11] Goh KT. Resurgence of mumps in Singapore caused by the Rubini mumps virus vaccine strain. *The Lancet* 1999; 354: 1355.
- [12] Watson-Creed G, Saunders A, Scott J, Lowe L, Pettipas J, Hatchette TF. Two successive outbreaks of mumps in Nova Scotia among vaccinated adolescents and young adults. *CMAJ* 2006; 175(5): 483–488.
- [13] Nojd J, Teele T, Samuelsson A, Orvell C. Mumps virus neutralizing antibodies do not protect against reinfection with a heterologous mumps virus genotype. *Vaccine* 2001; 19: 1727–1731.
- [14] Zimmerman L, Reef S, Wharton M. Mumps. Centers for Disease Control and Prevention. *Vaccine Preventable Disease Surveillance Manual* 2002; 3 rd Edition: Chapter 7.
- [15] Nardone A, Pebody RG, Van den Hof S i sur. Sero-epidemiology of mumps in western Europe. *Epidemiol Infect* 2003; 131: 691–701.
- [16] Palacios G, Jabado O, Cisterna D i sur. Molecular identification of mumps virus genotypes from clinical samples: standardized method of analysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4):1869–78.
- [17] Sartorius B, Penttinen P, Nilsson J i sur. An outbreak of mumps in Sweden, February–April 2004. *Euro Surveill* 2005; 10(9): 191–193.
- [18] Jin L, Brown DWG, Litton PA, White JM. Genetic diversity of mumps virus in oral fluid specimens: application to mumps epidemiology study. *J Infect Dis* 2004; 189: 1001–1008.
- [19] Šantak M, Košutić-Gulija T, Tešović G i sur. Mumps Virus Strains Isolated in Croatia in 1998 and 2005: Genotyping and Putative Antigenic Relatedness to Vaccine Strains. *J Med Virol* 2006; 78: 638–643.
- [20] Nagai T, Nakayama T. Mumps vaccine virus genome is present in throat swabs obtained from uncomplicated healthy recipients. *Vaccine* 2001; 19: 1353–1355.
- [21] Jalal H, Bahadur G, Knowles W, Jin L, Brink N. Mumps epididymo-orchitis with prolonged detection of virus in semen and the development of anti-sperm antibodies. *J Med Virol* 2004; 73(1): 147–50.
- [22] McCreedy BJ, Callaway TH. *Laboratory Design and Work Flow*. U: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, ur. *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1993:149.
- [23] Jin L, Beard S, Brown DWG. Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: Identification of two new genotypes. *J Infect Dis* 1999; 180: 829–833.
- [24] Knowles WA, Cohen BJ. Efficient isolation of mumps virus from a community outbreak using the marmoset lymphoblastoid cell line B95a. *J Virol Methods* 2001; 96(1): 93–6.
- [25] Afzal MA, Dussupt V, Minor PD i sur. Assessment of mumps virus growth on various continuous cell lines by virological, immunological, molecular and morphological investigations. *J Virol Methods* 2005; 126(1–2):149–56.
- [26] Reina J, Ballesteros F, Mari M, Munar M. Evaluation of different continuous cell lines in the isolation of mumps virus by the shell vial method from clinical samples. *J Clin Pathol* 2001; 54(12): 924–926.
- [27] Hierholzer JC, Killington RA. *Virus isolation and quantitation*. U: Mahy B, Kangro HO, ur. *Virology Methods Manual*. Academic Press 1996; 26–29.
- [28] Amexis G, Rubin S, Chatterjee N, Carbone K, Chumakov K. Identification of a new genotype H wild-type mumps virus strain and its molecular relatedness to other virulent and attenuated strains. *J Med Virol* 2003; 70: 284–286.
- [29] Amexis G, Rubin S, Chizhikov V, Pelloquin F, Carbone K, Chumakov K. Sequence diversity of Jeryl Lynn strain of mumps virus: quantitative mutant analysis for vaccine quality control. *Virology*. 2002;300(2):171–9.
- [30] Chomczynski P, Mackey K. Single-step method of total RNA isolation by acid guanidine-phenol extraction. U: *Cell Biology; A laboratory handbook* 1998; 2: 221–224.
- [31] *The Basic: RNA isolation*. Ambion, The RNA company, Applied Biosystems.
- [32] Uchida K, Shinohara M, Shimada S i sur. Rapid and sensitive detection of mumps virus RNA directly from clinical samples by real-time PCR. *J Med Virol* 2005; 75(3):470–4.

- [33] Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. U: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, ur. PCR protocols. A guide to methods and applications. Editors. Academic Press, Inc 1990:3–12.
- [34] GeneAmp® RNA PCR, Kit Components, Applied Biosystems, Roche Molecular Systems 2000, str 1–8.
- [35] Boriskin J, Booth J, Yamada A. Rapid detection of mumps virus by the polymerase chain reaction. *J Vir Meth* 1993; 42: 23–32.
- [36] Utz S, Richard JL, Capaul S, Matter HC, Hrisoho MG, Muhlemann K. Phylogenetic analysis of clinical mumps virus isolates from vaccinated and non-vaccinated patients with mumps during an outbreak, Switzerland 1998–2000. *J Med Virol* 2004. 73(1): 91–96.
- [37] Goncalves G, De Araujo A, Monteiro Cardoso ML. Outbreak of mumps associated with poor vaccine efficacy – Oporto Portugal 1996. *Euro Surveill* 1998; 12: 119–121.
- [38] Van Den Bosch CA, Cohen B, Walters T, Jin L. Mumps outbreak confined to a religious community. *Euro Surveill* 2000; 5: 58–60.
- [39] Visser LE, Gonzalez Perez KC, Ramos Tejera J, Berjon Barrientos AC, Vergara Guerrero Y, Martinez Navarro JF. An outbreak of mumps in the Province of Leon Spain 1995–1996. *Euro Surveill* 1998; 2: 14–18.
- [40] Kubar A, Yapar M, Besirbellioglu B, Avci IY, Guney C. Rapid and quantitative detection of mumps virus RNA by one-step real-time RT-PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49(2):83–8.
- [41] Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Kimura K, Hoshino Y. Characterization of the F gene of contemporary mumps virus strains isolated in Japan. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 167–172.
- [42] Teele T, Johansson B, Yun Z, Orvell C. Antigenic and genetic characterization of the fusion (F) protein of mumps virus strains. *Arch Virol* 2000; 145: 1199–1210.
- [43] Jin L, Rima B, Brown D i sur. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. *Arch Virol* 2005; 150(9):1903–1909.
- [44] Lim CS, Chan KP, Goh KT, Chow VT. Hemagglutinin-neuraminidase sequence and phylogenetic analyses of mumps virus isolates from a vaccinated population in Singapore. *J Med Virol* 2003; 70(2): 287–92.
- [45] Yates PJ, Afzal MA, Minor PD. Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *J Gen Virol* 1996; 77: 2491–2497.
- [46] Brown EG, Dimock K, Wright KE. The Urabe AM9 mumps vaccine is a mixture of viruses differing at amino acid 335 of the hemagglutinin-neuraminidase gene with one form associated with disease. *J Inf Dis* 1996; 174: 619–622.
- [47] Amexis G, Fineschi N, Chumakov K. Correlation of genetic variability with safety of mumps vaccine Urabe AM9 strain. *Virology* 2001; 287: 234–241.
- [48] Okafuji T, Yoshida N, Fujino M i sur. Rapid Diagnostic Method for Detection of Mumps Virus Genome by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Clin Micro* 2005; 43: 1625–1631.
- [49] <http://www.cdc.gov/nip/diseases/mumps/#lab>
- [50] Persing DH. Target Selection and Optimization of Amplification Reactions. U: Persing DH, Smith DH, Tenover FC, White TJ, ur. Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. American Society for Microbiology, Washington DC 1993:88–104.
- [51] Kunkel U, Driesel G, Henning U, Gerike E, Willers H, Schreier E. Differentiation of vaccine and wild mumps viruses by polymerase chain reaction and nucleotide sequencing of the SH gene. *J Med Virol* 1995; 45: 121–126.
- [52] Kunkel U, Schreier E, Siegl G, Schultze D. Molecular characterization of mumps virus strains circulating during an epidemic in Eastern Switzerland 1992/93. *Arch Virol* 1994; 136: 433–438.
- [53] Afzal MA, Buchanan J, Dias JA i sur. RT-PCR based diagnosis and molecular characterisation of mumps viruses derived from clinical specimens collected during the 1996 mumps outbreak in Portugal. *J Med Virol* 1997; 52(4): 349–53.
- [54] Strohle A, Bernasconi C, Germann D. A new mumps virus lineage found in the 1995 mumps outbreak in western Switzerland identified by nucleotide sequence analysis of the SH gene. *Arch Virol* 1996; 141(3–4): 733–41.
- [55] Nagai T, Suzuki T, Shimomura K, Ito Y, Miyazaki C. Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J Med Virol* 2004; 73: 97–104.
- [56] Kim SH, Song KJ, Shin YK i sur. Phylogenetic analysis of the small hydrophobic (SH) gene of mumps virus in Korea: identification of a new genotype. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 173–177.
- [57] Lee JY, Na BK, Lee HD i sur. Complete nucleotide sequence of a mumps virus genotype I strain isolated in Korea. *Virus Genes* 2004; 28: 201–205.
- [58] Elango N, Kovamees J, Varsanyi TM, Norrby E. mRNA sequence and deduced amino acid sequence of the mumps virus small hydrophobic protein gene. *J Virol* 1989; 63(3):1413–5.
- [59] Jin L, Beard S, Hale A, Knowles W, Brown DWG. The genomic sequence of a contemporary wild-type mumps virus strain. *Virus Res* 2000; 70: 75–80.
- [60] Wilson RL, Fuentes SM, Wang P i sur. Function of Small Hydrophobic Proteins of Paramyxovirus. *J Virol* 2006; 80: 1700–1709.
- [61] Inou Y, Nakayama T, Yoshida N i sur. Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J Med Virol* 2004; 73: 97–104.
- [62] Afzal MA, Buchanan J, Heath AB, Minor PD. Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequences only partially reflects geographical origin. *Arch Virol* 1997; 142: 227–238.
- [63] Takahashi M, Nakayama T, Kashiwagi Y i sur. Single genotype of measles virus is dominant whereas several genotypes of mumps virus are co-circulating. *J Med Virol* 2000; 62(2): 278–85.
- [64] Orvell C, Alsheikhly AR, Kalantari M, Johansson B. Characterization of genotype-specific epitopes of the HN protein of mumps virus. *J Gen Virol* 1997; 78 :3187–93.
- [65] Teele T, Johansson B, Jecic A, Forsgren M, Orvell C. Characterization of three co-circulating genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *J Gen Virol* 1998; 79:2929–37.
- [66] Beck M, Weisz-Maleček R, Meško-Prejac M i sur. Mumps vaccine L-Zagreb, prepared in chick fibroblasts. I. Production and field trials. *J Biol Stand* 1989; 17:85–90.
- [67] Rubin SA, Amexis G, Pletnikov M i sur. Changes in mumps virus gene sequence associated with variability in neurovirulent phenotype. *J Virol* 2003; 77(21):11616–24.
- [68] Cusi MG, Fischer S, Sedlmeier R i sur. Localization of a new neutralizing epitope on the mumps virus hemagglutinin-neuraminidase protein. *Virus Res* 2001; 74:133–7.
- [69] Kovamees J, Rydbeck R, Orvell C, Norrby E. Hemagglutinin-neuraminidase (HN) amino acid alterations in neutralization escape mutants of Kilham mumps virus. *Virus Res* 1990; 17:119–29.
- [70] Orvell C, Alsheikhly AR, Kalantari M, Johansson B. Characterization of genotype-specific epitopes of the HN protein of mumps virus. *J Gen Virol* 1997; 78:3187–93.
- [71] Santos-Lopez G, Cruz C, Pazos N, Vallejo V, Reyes-Leyva J, Tapia-Ramirez J. Two clones obtained from Urabe AM9 mumps

- virus vaccine differ in their replicative efficiency in neuroblastoma cells. *Microbes Infect* 2006; 8 :332–9.
- [72] World Health Organization. The requirements for Measles, Mumps, and Rubella Vaccines and Combined Vaccine (Live). WHO Technical Report Series 1994; 840.
- [73] Mumps vaccine (live) 0538. U: European Pharmacopoeia 5th edn. Vol 1. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe 2005: 684–685.
- [74] Ivancic J, Gulija TK, Forcic D i sur. Genetic characterization of L-Zagreb mumps vaccine strain. *Virus Res* 2005; 109:95–105.
- [75] Cassady KA, Whitley RJ. *Viral Central Nervous System Infections*. U: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, ur. *Clinical Virology*, drugo izdanje, ASM Press Washington DC 2002: 27–44.
- [76] World Health Organization. International reference laboratory for mumps virus isolates. *Wkly Epidemiol Rec* 2004; 79:13–24.