

**Karakteristik Molekuler Segmen L Virus Seoul (SEOV) dari
Rattus Norvegicus Asal Semarang, Jawa Tengah**

***MOLECULAR CHARACTERISTIC L SEGMENT SEOUL VIRUS (SEOV) OF
RATTUS NORVEGICUS FROM SEMARANG, CENTRAL JAVA***

Arief Mulyono^{1*}, Ristiyanto¹, Farida Dwi Handayani¹,
Dimas Bagus Wicaksono Putro¹, Arum Sih Joharina¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga
Jl. Hasanudin 123 PO BOX 200 Salatiga, Indonesia
*arief.munich@gmail.com

Submitted : 17-10-2015, Revised : 15-11-2015, Revised : 4-1-2016, Accepted : 15-2-2016

Abstract

Seoul virus (SEOV) is one of four hantaviruses causing haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). The virus was a negative single-strand RNA genome that consists of three segments, S, M, and L. The aim of study was to characterize L segment Seoul virus of R. norvegicus from Semarang and it can be used as biological material such as vaccine development or diagnostic material. The sample of study was RNA Seoul virus isolate of R. norvegicus lung tissue from Semarang. Amplification L segment was used by nested PCR. Data analysis used GenBank database and phylogenetic tree was constructed using Mega 6 software. The result showed the homology of isolate from Semarang and GenBank nucleotide level ranged from 93.1 to 97.1% and amino acid level ranged from 98,1 to 100%. Analysis of phylogenetic showed Seoul virus from Semarang closer to Seoul virus from France and Jakarta. The conclusion of this research was the character of L segment Seoul virus from Semarang has more in common with the Seoul virus from French and Jakarta

Keywords : Seoul virus, L segment, Semarang

Abstrak

Virus Seoul adalah satu dari empat spesies Hantavirus penyebab *Haemorrhagic fever with renal syndrome* (HFRS). Virus Seoul merupakan virus RNA negatif rantai tunggal, terdiri dari tiga segmen yaitu S, M, dan L. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi segmen L virus Seoul dari *R. norvegicus* asal Semarang. Diharapkan isolat virus yang telah terkarakterisasi dapat dijadikan sebagai bahan biologik, baik untuk pengembangan vaksin maupun untuk bahan diagnostik. Sampel penelitian yang digunakan adalah RNA virus Seoul yang diisolasi dari jaringan paru *R. norvegicus* asal Semarang. Amplifikasi segmen L virus Seoul dilakukan dengan nested-PCR. Analisis menggunakan data pembandingan dari GenBank. Pohon filogenetik disusun menggunakan program Mega 6. Hasil penelitian menunjukkan homologi antara virus Seoul asal Semarang dengan sekuen asal GenBank ditingkat nukleotida berkisar antara 93,1 – 97,1% dan ditingkat asam amino 98,1 – 100%. Homologi tertinggi ditingkat nukleotida (97,1%) dengan sekuen virus Seoul asal Perancis. Hasil analisis filogenetik menunjukkan Virus Seoul asal Semarang lebih dekat dengan virus Seoul asal Perancis dan Jakarta. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa karakter segmen L virus Seoul asal Semarang mempunyai lebih banyak kesamaan dengan virus Seoul asal Perancis dan Jakarta.

Kata kunci : Virus Seoul, Segmen L, Semarang

PENDAHULUAN

Haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) adalah salah satu penyakit pada manusia yang penting untuk didiagnosa. Penyebab penyakit ini adalah Hantavirus, virus anggota dari famili Bunyaviridae dan masuk dalam *genus Hantavirus*.¹ Hantavirus ditularkan ke manusia melalui udara yang terkontaminasi dengan air liur, urin atau feses tikus yang terinfeksi. Penularan *Hantavirus* antar tikus dapat melalui gigitan, kemungkinan manusia juga bisa tertular melalui cara tersebut.² Setiap tahun dilaporkan kasus HFRS diseluruh dunia berkisar antar 60.000 sampai dengan 100.000 kasus dan 90% terjadi di Asia.² Kasus HFRS di Indonesia dilaporkan pertama kali pada tahun 2002 dengan jumlah kasus 11 orang. Selanjutnya pada tahun 2004 dilaporkan 7 orang seropositif terhadap *Hantavirus* dari 172 penderita tersangka HFRS yang diperiksa dengan gejala demam 38,5°C, dengan atau tanpa manifestasi perdarahan disertai dengan gangguan ginjal.³

Hantavirus merupakan virus RNA, berbentuk bulat, mempunyai kapsul dan terdiri dari tiga segmen yaitu segmen S, M, dan L. Segmen S (1,7-2,0 kb) mengkode protein nukleokapsid (N), segmen M (3.6kb) mengkode protein prekursor glikoprotein dari dua glikoprotein virus (G 1 dan G2) dan segmen L (6,5 kb) mengkode enzim RNA polymerase.^{2,4} Berbeda dengan genera lain dari Famili Bunyaviridae, *Hantavirus* tidak ditularkan oleh arthropoda tetapi oleh hewan pengerat terutama dari Famili Cricetidae dan Muridae, meskipun penularan oleh insektivora dan kelelawar juga telah dilaporkan.⁵ Saat ini lebih kurang ada 30 spesies *Hantavirus* yang telah teridentifikasi, 23 spesies patogen bagi manusia.¹ Di Asia dikenal dua spesies Hantavirus yang berhubungan dengan HFRS yaitu virus Hantaan (HTNV) dan virus Seoul (SEOV).² Virus Hantaan terdistribusi di China, Russia, dan Korea. Virus Hantaan penyebab HFRS dengan gejala klinis sedang sampai berat, *Case Fatality Rate* (CFR) 15%.⁶ Virus Seoul adalah penyebab HFRS dengan gejala klinis ringan sampai sedang. *Case Fatality Rate* (CFR) yang disebabkan oleh virus Seoul sebesar 1-2%.⁷

Virus Seoul ditemukan tersebar hampir

diseluruh dunia baik itu di Asia, Afrika, Eropa, Amerika Utara dan Amerika Selatan. Tersebar virus Seoul di seluruh dunia terkait dengan persebaran *R. norvegicus* sebagai reservoir virus ini.⁸ Survei seroprevalensi *Hantavirus* pada reservoir pernah dilakukan di beberapa pelabuhan besar di Indonesia, salah satunya di Pelabuhan Tanjung Mas Semarang pada tahun 1985. Survei menunjukkan seroprevalensi virus Seoul pada tikus sebesar 1,2 persen.³ Berdasarkan temuan tersebut perlu dilakukan kajian lebih lanjut, yaitu dengan melakukan karakterisasi molekuler terhadap virus Seoul pada reservoir di Semarang. Tujuan penelitian adalah mengkarakterisasi segmen L virus Seoul yang diisolasi dari *R. norvegicus* asal Semarang. Segmen L merupakan protein yang sangat lestari (*conserve*) dibandingkan dengan segmen S dan M. Segmen L memegang peranan penting untuk replikasi dan transkripsi virus Seoul.⁹ Diharapkan virus yang telah terkarakterisasi dapat dijadikan sebagai sumber kekayaan plasma nutfah genetik (*genetic resources*) untuk dijadikan sebagai bahan biologik, pengembangan vaksin maupun bahan diagnostik lainnya.

BAHAN DAN METODE

Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah RNA virus Seoul yang diisolasi dari jaringan paru *R. norvegicus* asal Semarang positif secara serologi (uji Elisa). Uji Elisa menggunakan Elisa-kit merk Xpress-Bio. Jumlah keseluruhan *R. norvegicus* yang tertangkap dan diperiksa dengan uji Elisa sebanyak 40 ekor dan ada 5 RNA virus Seoul dari *R. norvegicus* positif uji Elisa yang dianalisis dalam penelitian ini yaitu: KMJ 1, KMJ 18, KMJ 27, BHI 3, dan KMJ 3.

Pemeriksaan Laboratorium dengan Nested-PCR

Amplifikasi segmen L virus Seoul mengacu pada Klempa 2006.¹⁰ Segmen L diamplifikasi dengan menggunakan 2 pasang primer. Amplifikasi tahap pertama dengan menggunakan pasangan primer Hanta-L F1: ATG TAY GTB AGT GCW GAT GC dan Hanta-L R1: AAC CAD TCW GTY CCR TCA TC. Amplifikasi ta-

hap kedua menggunakan pasangan primer Hanta-L F2: TGC WGA TGC HAC IAA RTG GTC dan Hanta-L R2: GCR TCR TCW GAR TGR TGD GCA A. Daerah yang diamplifikasi kedua primer tersebut mencakup motif B dan C dari segmen L yang sangat dilestarikan.

Pengaturan nested-PCR untuk tahap pertama menggunakan pasangan primer Hanta-L F1 dan Hanta-L R1. Tahapan prosesnya adalah sebagai berikut: *Hot start* (pre denaturasi) pada suhu 95°C selama 15 menit. Selanjutnya pengaturan untuk preamplifikasi yaitu: 96°C selama 30 detik (denaturasi), 60°C selama 35 detik (*annealing*), 72°C selama 50 detik (*extend*). Di lakukan 7 kali putaran. Pengaturan untuk amplifikasi yaitu: 96°C selama 30 detik (denaturasi), 53°C selama 1 menit (*annealing*), 72°C selama 50 detik (*extend*). Dilakukan 35 kali putaran. Final extention 72°C selama 5 menit. Hold 12°C.

Pengaturan nested-PCR untuk tahap kedua menggunakan pasangan primer Hanta-L F2 dan Hanta-L R2. Tahapan prosesnya adalah sebagai berikut: *Hot start* (pre denaturasi) pada suhu 95°C selama 15 menit. Selanjutnya pengaturan untuk preamplifikasi yaitu: 96°C selama 30 detik (denaturasi), 65°C selama 35 detik (*annealing*), 72°C selama 50 detik (*extend*). Di lakukan 10 kali putaran. Pengaturan untuk amplifikasi yaitu: 96°C selama 30 detik (denaturasi), 53°C selama 1 menit (*annealing*), 72°C selama 50 detik (*extend*). Dilakukan 35 kali putaran. Final extention 72°C selama 5 menit. Hold 12°C.

Hasil amplifikasi kemudian dideteksi dengan metode elektroforesis untuk melihat sesuai tidaknya gen yang berhasil diamplifikasi dengan target yang diharapkan. Hasil amplifikasi dapat dilihat dengan terbentuknya pita-pita (band) pada gel agarose 1%.

Purifikasi Hasil PCR

Tujuan purifikasi untuk menghilangkan sisa-sisa primer forward maupun reverse sebelum dilakukan proses sekuensing. Reagen yang digunakan produk dari *Illustra™ ExoProStar™*. Produk PCR sebanyak 5 µl dimasukkan dalam vial PCR selanjutnya ditambahkan 1 µl *alkaline phosphatase* dan 1 µl *exonuclease I*. Selanjutnya

di-spinningdown dan diinkubasi dalam *thermal cycler* pada suhu 37°C selama 15 menit dan 80°C selama 15 menit.

Menghitung Kuantitas Produk PCR Terpurifikasi

Kuantitas produk PCR diukur menggunakan alat nano drop. Konsentrasi produk PCR didilusi menggunakan *nuclease-free water* sampai konsentrasi yang diinginkan. Produk PCR sebesar 200 – 500 bp memerlukan konsentrasi 3 -10 µg/ µl.

Proses Sekuensing

Reagen yang digunakan dalam proses sekuensing adalah BigDye® Terminator V3.1 *Cycle Sequencing Kit*. Prosedur sekuensing mengikuti intruksi dari perusahaan pembuat kit. Reaksi *cycle sequencing* dijalankan dengan alat *thermocycler* dengan suhu 96°C selama 1 menit, 25 siklus 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik, dan 60°C selama 4 menit. Kemudian *holding* pada 4°C.

Purifikasi Produk Cycle Sequencing

Tujuan dari purifikasi produk *cycle sequencing* adalah untuk menghilangkan ddNTP dan fluorescens. Purifikasi produk sekuensing menggunakan kit dari BigDye® Xterminator. Prosedur sekuensing mengikuti intruksi dari perusahaan pembuat kit. Inkubasi dalam termal cycler 95°C selama 5 menit. Pindahkan dalam plate sekuensing. Plate sekuensing dimasukkan dalam instrumen sekuenser untuk pembacaan.

Analisis Hasil

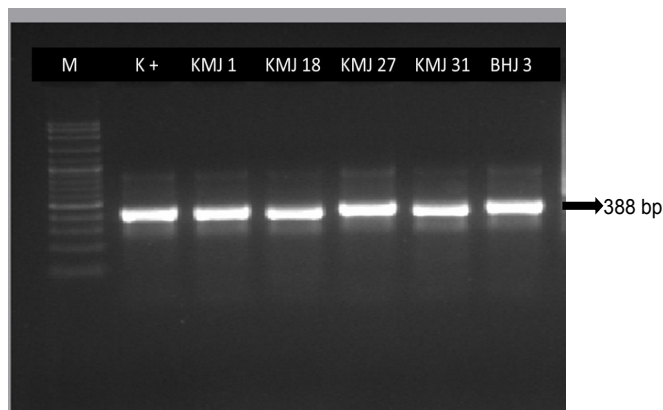
Analisis hasil dilakukan secara deskriptif. Urutan nukleotida hasil sekuensing segmen L virus Seoul dari Semarang dibandingkan dengan sekuen virus Seoul yang tersedia di GenBank. Hasil urutan nukleotida segmen L virus Seoul kemudian diposisikan (*alignment*) menggunakan *Bioedit software*, selanjutnya urutan nukleotida yang telah diposisikan dideduksi menjadi protein dan divisualisasikan dalam bentuk urutan asam amino.

Analisis filogenetik menggunakan program *Mega* 6. dengan metode analisis *maximum likelihood bootstrap* 1000x.

HASIL

Amplifikasi Segmen L Virus Seoul

Hasil amplifikasi segmen L virus Seoul yang diisolasi dari *R. norvegicus* asal Semarang menunjukkan pita spesifik dengan panjang 388 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Segmen L Virus Seoul dari *R. norvegicus* Asal Semarang

Keterangan: M= marker; K + = kontrol positif; KMJ 1, KMJ 18, KMJ 27, KMJ 31, BHJ 3 = sampel virus Seoul dari Semarang

Homologi Ditingkat Nukleotida

Homologi sekuen segmen L antar virus Seoul asal Semarang ditingkat nukleotida identik 100%, sedangkan homologi di tingkat nukleotida antara virus Seoul asal Semarang dengan sekuen asal GenBank berkisar antara 93,1-97,1%. Homologi tertinggi 97,1% dengan sekuen virus Seoul asal Perancis (Tabel 1).

Homologi Ditingkat Asam Amino

Ditingkat asam amino Homologi antara virus Seoul asal Semarang dengan sekuen asal GenBank yang terpilih berkisar antara 98,1-100% (Tabel 2).

Hasil pensejajaran asam amino segmen L antara virus Seoul asal Semarang dengan sekuen asal GenBank menunjukkan motif asam amino yang sama kecuali dengan sekuen AF288297 (China), KP645196 (China), AF285266 (China) yang berbeda 1 asam amino dan KM948594 (Inggris) yang berbeda 2 asam amino (Gambar 2).

Filogenetik

Virus Seoul asal Semarang dalam pohon filogenetik mengelompok menjadi satu, virus Seoul asal Semarang juga lebih dekat dengan virus Seoul asal Jakarta dan Perancis (Gambar 3).

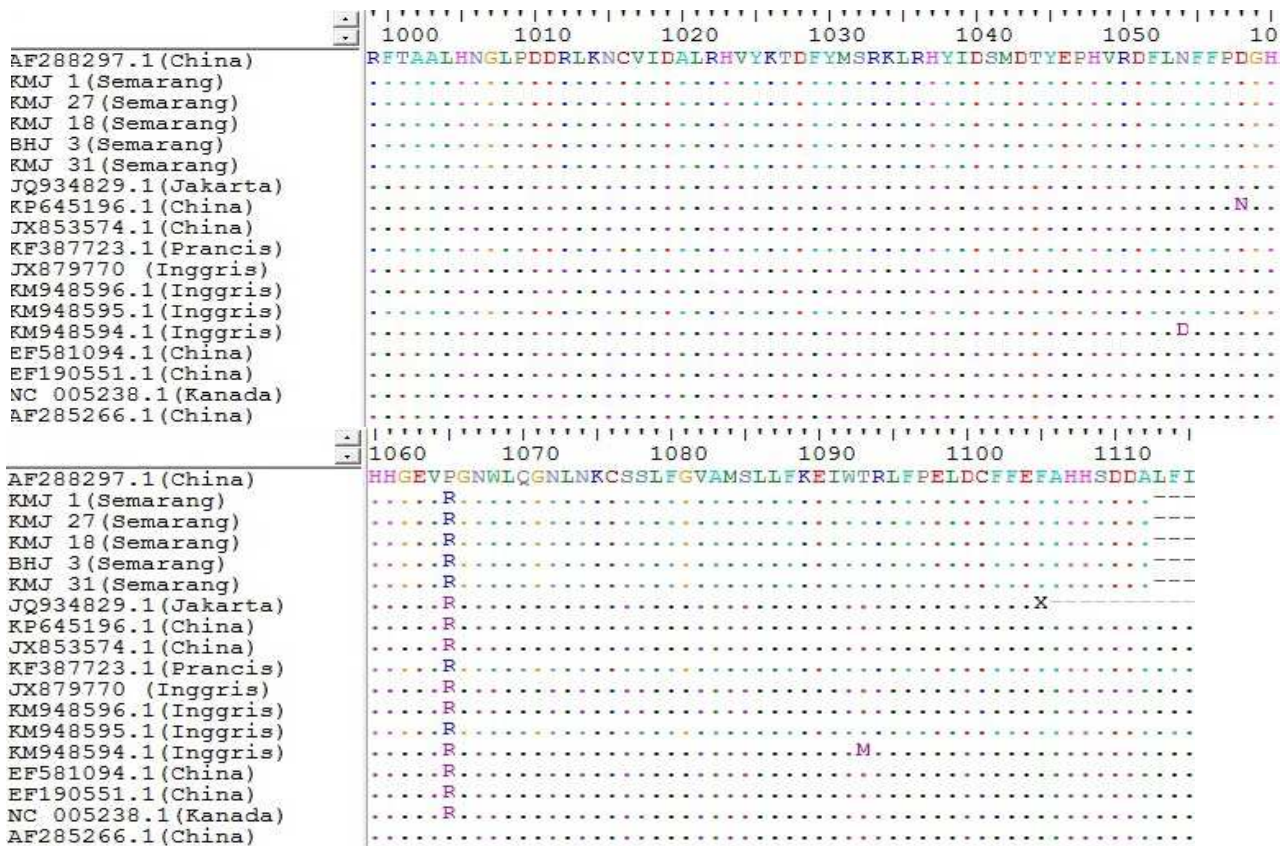
Tabel 1. Homologi Tingkat Nukleotida Segmen L Virus Seoul Asal Semarang dengan Sekuen GenBank

	KMJ 1	KMJ 27	KMJ 18	BHJ 3	KMJ 31
KMJ 1	-	100	100	100	100
KMJ 27	100	-	100	100	100
KMJ 18	100	100	-	100	100
BHJ 3	100	100	100	-	100
KMJ 31	100	100	100	100	-
AF288297 (China)	94,9	94,9	94,9	94,9	94,9
KP645196 (China)	94	94	94	94	94
JX853574 (Korea)	94,3	94,3	94,3	94,3	94,3
KF387723 (Perancis)	97,1	97,1	97,1	97,1	97,1
JX879770 (Inggris)	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1
KM948596 (Inggris)	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1
KM948595 (Inggris)	94,3	94,3	94,3	94,3	94,3
KM948594 (Inggris)	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1
EF581094 (China)	95,9	95,9	95,9	95,9	95,9
EF190551 (China)	95,9	95,9	95,9	95,9	95,9
NC005238 (Kanada)	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6
AF285266 (China)	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6
JQ934829 (Jakarta)	96,8	96,8	96,8	96,8	96,8

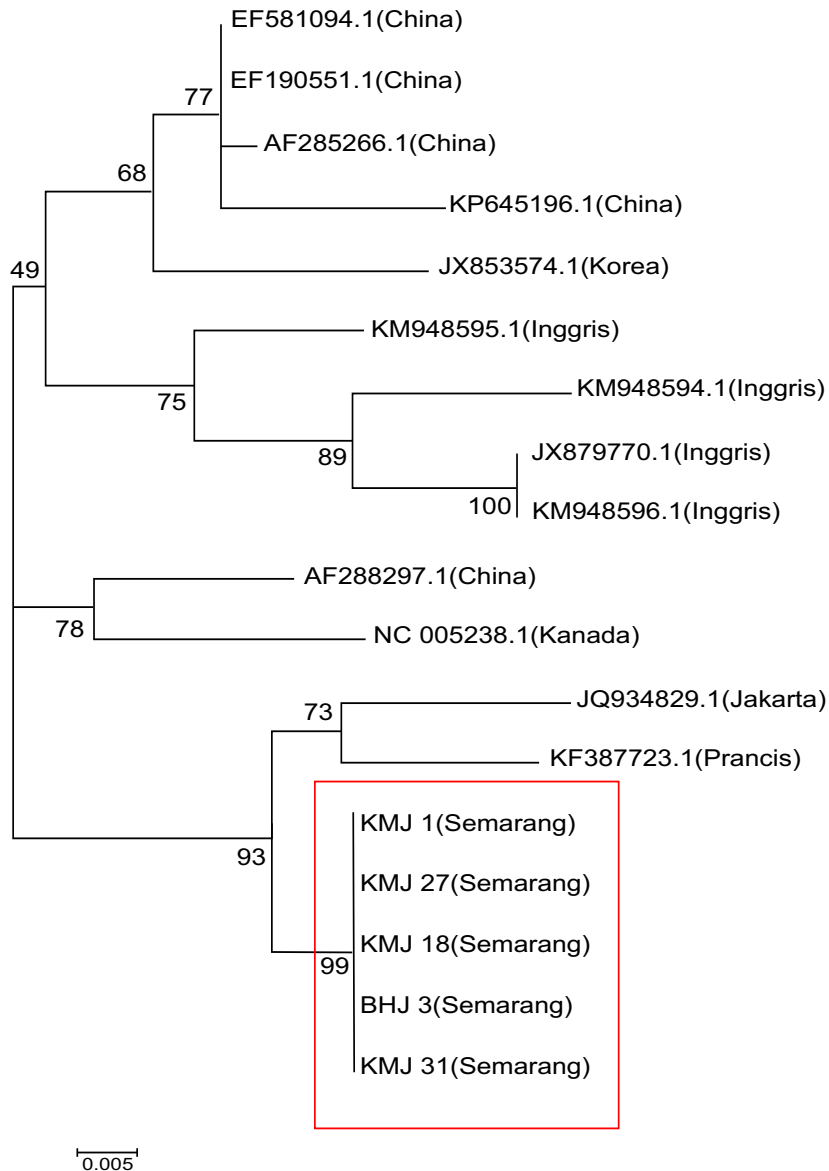
Tabel 2. Homologi Tingkat Asam Amino Segmen L Virus Seoul Asal Semarang dengan Sekuen GenBank

	KMJ 1	KMJ 27	KMJ 18	BHJ 3	KMJ 31
KMJ 1	-	100	100	100	100
KMJ 27	100	-	100	100	100
KMJ 18	100	100	-	100	100
BHJ 3	100	100	100	-	100
KMJ 31	100	100	100	100	-
AF288297 (China)	99	99	99	99	99
KP645196 (China)	99	99	99	99	99
JX853574 (Korea)	100	100	100	100	100
KF387723 (Prancis)	100	100	100	100	100
JX879770 (Inggris)	100	100	100	100	100
KM948596 (Inggris)	100	100	100	100	100
KM948595 (Inggris)	100	100	100	100	100
KM948594 (Inggris)	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1
EF581094 (China)	100	100	100	100	100
EF190551 (China)	100	100	100	100	100
NC005238 (Kanada)	100	100	100	100	100
AF285266 (China)	99	99	99	99	99
JQ934829 (Jakarta)	100	100	100	100	100

Susunan Asam Amino Segmen L Virus Seoul Asal Semarang



Gambar 2. Pensejajaran Sekuen Asam Amino antara Isolat Virus Seoul Asal Semarang dengan Isolat Asal GenBank.



Gambar 3. Pohon Filogeni Sekuen Segmen L Virus Seoul. Pohon Filogeni Dikontruksi dengan Menggunakan Metode Maximum *likelihood* bootstrap 1000x. Virus Seoul Asal Semarang Dalam Kotak Berwarna Merah.

PEMBAHASAN

Identifikasi segmen L dari kelima sekuen virus Seoul yang diteliti menunjukkan gambaran yang hampir sama yakni terbaca pada nukleotida ke-2995 sampai nukleotida ke-3336, sesuai dengan target primer. Amplifikasi parsial segmen L dalam penelitian ini menggunakan primer yang dirancang untuk dapat mendeteksi semua jenis *Hantavirus*.¹⁰ Oleh karena itu, hasil amplifikasi tidak mencakup keseluruhan dari bagian-bagian segmen L virus Seoul. Segmen L virus Seoul

sendiri terdiri dari 6530 nukleotida (2151 asam amino). Hasil amplifikasi dalam penelitian ini mencakup bagian motif B dan C dari 5 motif (A, B, C, D, E) yang paling dilestarikan di segmen L.¹¹

Hasil penelitian menunjukkan homologi 100% segmen L antar virus Seoul asal Semarang baik ditingkat nukleotida maupun asam amino. Homologi yang tinggi ini disebabkan karena virus diisolasi dari tempat dan jenis inang yang sama (*R. norvegicus*). Homologi ditingkat nukleotida antara virus Seoul asal Semarang dengan sekuen dari GenBank sebesar 93,1-97,1%. Hal ini

menunjukkan adanya variasi atau diversitas genetik virus Seoul dari berbagai tempat di dunia. Variasi atau diversitas genetik virus dikarenakan oleh adanya mutasi. Penyebab mutasi adalah aktivitas enzim RNA-dependent RNA polymerase virus yang mudah mengalami kekeliruan serta tidak adanya mekanisme *proof reading* enzim tersebut. Angka mutasi pada Hantavirus berkisar antara 10^{-3} - 10^{-4} perubahan nukleotida per jumlah nukleotida dalam siklus replikasi.² Ada 1 Perubahan nukleotida dari 12.000 nukleotida pada setiap kali replikasi.¹² Selain itu mutasi *Hantavirus* disebabkan bila *Hantavirus* menginfeksi inang yang berbeda serta pengaruh faktor lingkungan.¹³

Homologi ditingkat asam amino virus Seoul asal Semarang dengan sekuen asal GenBank sebesar 98,1-100%, lebih tinggi daripada homologi ditingkat nukleotida. Lebih tingginya homologi ditingkat asam amino menunjukkan substitusi *synonymous* lebih banyak terjadi pada segmen L virus Seoul asal Semarang daripada substitusi *nonsynonymous*. Substitusi *synonymous*/silent mutation merupakan perubahan nukleotida yang tidak menyebabkan perubahan asam amino. Segmen L *Hantavirus* merupakan protein yang sangat lestari dibandingkan dengan segmen S dan M.¹² Sebagian besar perubahan asam amino pada segmen L tidak merubah struktur protein (substitusi konservatif).¹¹

Pohon filogenetik menunjukkan kelima virus Seoul asal Semarang mengelompok menjadi satu, hal tersebut menunjukkan bahwa kelima isolat asal Semarang mempunyai kekerabatan yang lebih dekat dan homologi yang lebih tinggi dibandingkan dengan sekuen lainnya dari GenBank. Virus Seoul asal Semarang dilihat dari pohon filogenetik lebih dekat dengan virus Seoul yang berasal dari Perancis dan Jakarta. Hal ini mungkin berkaitan dengan mekanisme persebaran *R. norvegicus* sebagai pembawa virus Seoul di Indonesia. *R. norvegicus* pertama kali ditemukan di Eropa pada abad ke 18. Pada tahun 1775, tikus ini hadir di Amerika Utara. Kehadirannya di Amerika menyebabkan tikus ini beradaptasi dengan iklim tropis dan seterusnya tersebar ke Benua Asia. Di wilayah Asia Tenggara, mamalia kecil ini berkebangbiak di negara-negara seperti Filipina, Indonesia, Laos, Malaysia, dan Singapura.

Saat ini *R. norvegicus* dapat ditemukan di setiap benua kecuali Antartika. *R. norvegicus* masuk ke Indonesia melalui kapal-kapal yang datang dari Eropa.¹⁴

KESIMPULAN

Karakter segmen L virus Seoul pada *R. norvegicus* asal Semarang mempunyai kesamaan dengan virus Seoul asal Perancis dan Jakarta yang terlihat dari homologi yang tinggi dengan virus Seoul tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Badan Litbang Kesehatan dan Kepala B2P2VRP Salatiga yang telah memberikan dana dan kesempatan untuk penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kepala KKP Semarang beserta staf atas fasilitas dan bantuannya selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR RUJUKAN

1. Plyusnin A, Beaty BJ, Elliott RM, Goldbach R, Kormelink R, Lundkvist A, et al. *Bunyaviridae*, virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier; 2012; 725-74.
2. Jonsson CB, Figueiredo LT & Vapalahti O. A global perspective on *Hantavirus* ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23: 412 - 41.
3. Wibowo. Epidemiologi *Hantavirus* di Indonesia. *Bul. Penelit. Kesehat, Suplemen*. 2010; 44 – 49.
4. Battisti AJ, Chu YK, Chipman PR, Kaufmann B, Jonsson CB & Rossmann MG. Structural studies of Hantaan virus. *J Virol*. 2011; 85: 835-41.
5. Weiss S, Witkowski PT, Auste B, Nowak K, Weber N, Fahr J, Mombouli JV, et al. *Hantavirus* in bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18:159–161.
6. Pettersson L. Transmission and pathogenesis of *Hantavirus* (thesis). Umea: Umea Univ.; 2015.

7. Goeijenbier M, Verner CJ, Gorp B, Rockx MP, Koopmans A, Lundkvist JW, et al. Seoul Hantavirus in brown rats in *the Netherlands: implications for physicians*. *The Netherlands Journal of Medicine*. 2015; (73) 4:155 – 160.
8. Xian DL, Wen PG, Wen W, Yang Z, Zong YH, Dun JZ. Migration of Norway Rats Resulted in the Worldwide Distribution of Seoul Hantavirus Today. *Journal of Virology*. 2012; (86) 2: 973 – 981.
9. Schmaljohn CS. Molecular biology of hantaviruses. In R. M. Elliott (ed.), *The Bunyaviridae*. New York: Plenum Press; 1996. p. 63-90.
10. Klempa B, Calvet EF, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, et al. Hantavirus in African Wood Mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(5): 838–840.
11. Kukkonen SKJ, Vaheri A, Plyusnin A. Completion of the Tula hantavirus genome sequence: properties of the L segment and heterogeneity found in the 3' termini of S and L genome RNAs. *Journal of General Virology*. 1998; 79:2615-2622.
12. Ryan CA. Development of models for the study of the molecular mechanisms of host restriction and adaptation of hantaviruses (thesis). Michigan: Michigan University; 2014.
13. Guillaume C, Maria R, Emmanuelle J, Gael J K, Jean FC. Changes in Diversification Patterns and Signatures of Selection during the Evolution of Murinae-Associated Hantaviruses. *Viruses*. 2014; 6:1112-1134.
14. Dian ID. Tikus riul (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). *Balaba*. 2010; (6) 22: 22-23.