

LJUNGAN VİRUSUN (PARECHOVİRUS B) KEMİRİCİLERDE MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Mahmut Cem ERGON¹, Mert ERDİN^{2,3}, Ferhat MATUR⁴, Mustafa SÖZEN⁵, Ceylan POLAT^{2,6}, Tuğçe GÜNKAN⁷, İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM¹

M. C. Ergon: 0000-0002-4847-987X, M. Erdin: 0000-0001-7285-1654, F. Matur: 0000-0001-9488-1408,

M. Sözen: 0000-0002-1911-605X, C. Polat: 0000-0003-1511-4177, T. Günkan: 0000-0003-1698-6620, İ. M. A. Öktem: 0000-0002-3185-8355

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

²Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

³University of Helsinki, Faculty of Medicine, Medicum, Department of Virology, Helsinki, FİNLANDİYA

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

⁵Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, ZONGULDAK

⁶Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

⁷Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ZONGULDAK

ÖZ

Ljungan virus (LV), Picornaviridae ailesinde bulunan Parechovirus genusunda yer alan kemirici kökenli bir virustur. LV'nin, Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika ve İtalya'da kemiricilerde saptanmış olması dünyada bu virusun geniş bir dağılımı olduğunu düşündürmektedir. Miyokarditli ve tip 1 diyabetli insanlarda LV antikorları gösterilmiş ve insanlarda intrauterin ölüm, ani bebek ölümü ve fetal santral sinir sistemi malformasyonlarında LV ilişkisi saptanmıştır.

Bu çalışma ile Türkiye'de henüz araştırılmamış olan LV'nin Zonguldak ilindeki yabani kemiricilerdeki varlığı hakkında bilgi sahibi olunması ve varsa bölgeye özgü yeni LV suşunun/suşlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada 85 adet Apodemus ve 35 adet Myodes örneklerinden oluşan toplam 120 adet kemiriciye ait beyin dokusu kullanılmıştır. Bu örneklerde, LV genomunda genetik çeşitliliğin yüksek olduğu VP1 bölgesini hedefleyen ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (PZT) yöntemi ile LV nükleik asit varlığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda örneklerde LV nükleik asit varlığı saptanmamıştır.

Tek bir bölge ve iki kemirici cinsine ait örneklerinin analizleri sonucuna göre, Türkiye çapında LV varlığının bulunmadığını söylemek yeterli bir açıklama olmayacaktır. Virüs için uygun olmayan çevresel koşullar da virusun tespit edilememesinde rol oynamış olabilir. Türkiye'de LV durumunun ortaya koyulabilmesi için farklı bölgelerindeki kemiricilerde, daha büyük bir örneklem ile ve daha fazla sayıda kemirici türü ile daha fazla sayıda araştırma yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu araştırma, Türkiye de Ljungan virüs varlığı ile ilgili yapılmış ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: Apodemus, Ljungan virus, Myodes, Türkiye

ABSTRACT

Investigation of Ljungan Virus (Parechovirus B) in Rodents by Molecular Methods

Ljungan virus (LV) is a rodent-borne virus in the genus Parechovirus of the Picornaviridae family. LV has been detected in rodents in Northern Europe, North America and Italy, suggesting a wide distribution of this virus in the world. LV antibodies have been demonstrated in humans with myocarditis and type 1 diabetes, and LV has been correlated with intrauterine death, sudden infant death and fetal central nervous system malformations in humans.

This study aimed to obtain information about the presence of LV, which has not been investigated in Turkey, in wild rodents in Zonguldak province and to determine the new LV strain(s) specific to the region, if any.

A total of 120 brain tissues from 85 Apodemus and 35 Myodes were used in the study. In these samples, the presence of LV nucleic acid was investigated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) method targeting the VP1 region in the LV genome where genetic diversity is high. As a result of the study, the presence of LV nucleic acid was not detected in the samples.

İletişim adresi: Mahmut Cem Ergon. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

Tel: (0232) 412 25 77/4501

e-posta: cem.ergon@deu.edu.tr

Received/Geliş: 14.09.2023 Accepted/Kabul: 24.10.2023 Published Online/Online Yayın: 31.12.2023

Atf/Cite as: Ergon MC, Erdin M, Matur F, Sözen M, Polat C, Günkan T, Öktem İMA. Ljungan virusun (Parechovirus B) kemiricilerde moleküler yöntemle araştırılması. ANKEM Derg. 2023;37(3):68-73.

It will not be a sufficient explanation for the absence of LV presence in Turkey according to the analysis of samples from a single region and two rodent species. Unsuitable environmental conditions for the virus may also have played a role in the lack of virus detection. We concluded that further research on rodents in different regions, with a larger sample size and on more rodent species, is needed to reveal the occurrence of LV in Turkey. This is the first study on Ljungan virus presence in Turkey.

Keywords: Apodemus, Ljungan virus, Myodes, Turkey

GİRİŞ

Ljungan virus (LV), *Picornaviridae* ailesinde bulunan *Parechovirus* genusunda yer alan zarfsız tek iplikçikli bir RNA virusudur. İnsanlardaki miyokardit epidemiyolojisine yönelik etken araştırması sırasında, ilk kez İsveç'te Ljungan vadisindeki *Myodes glareolus* türü kemiricilerden izole edilmiştir⁽¹⁶⁾. Şu ana kadar dört farklı suşu saptanmıştır^(10,16,27). İnsan ve hayvanlardaki hastalıklarla ilişkisinin gözlenmesi nedeniyle son yıllarda LV'ye olan ilgi artmış ve çeşitli kemirici türlerinde varlığı araştırılmıştır^(3,16).

LV, kemirici kökenli bir virus olmakla birlikte insanlardaki hastalıklarla ilişkisi halen araştırılmaktadır. LV, kemiricilerde tip 1 diyabet, miyokardit, ensefalit, intrauterin ölüm ve fetal malformasyona neden olmaktadır^(15,17,24). Yapılan çalışmalarda araştırmacılar, LV'yi gestasyonel hastalıklar ve santral sinir sistemi bozuklukları ile ilişkilendirmişlerdir^(19,20,21,25). İntrauterin ölüm gerçekleşen fetüslerin dokularından LV RNA'sı izole edilmiş ve diyabetik çocuklarda LV'ye karşı antikor varlığı gösterilmiştir^(19,20,25).

Avrupa ve Amerika'da farklı yabancı kemirici türlerinde LV RNA'sı saptanmış^(4,6-8,11,16-18,22,23,27). Bu kemirici türleri içerisinde en yüksek prevalansın *Myodes* türü kemiricilerde saptanması nedeni ile LV için ana konağın *Myodes* olduğu düşünülmektedir^(4,28). Türkiye'deki kemirici popülasyonlarındaki LV varlığı/yaygınlığı ile alakalı bu zamana kadar bir bildirim yapılmamıştır.

Bu çalışma ile Türkiye'deki LV varlığının araştırılması ve prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. LV'nin ana konağı olduğu düşünülen *Myodes*'in yanı sıra LV pozitifliği bildirilmiş olan *Microtus* ve *Apodemus* cinsi kemiricilerin yayılım gösterdiği ve ormanlık habitatlar açısından zengin bir alan olan Zonguldak ili, örneklem alanı olarak tercih edilmiştir⁽²⁾.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2011/07 numaralı karar) onayı ile gerçekleştirilmiş ve Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2018.KB.SAG.067 proje numarası ile desteklenmiştir.

Örnekler

Zonguldak ilindeki kemiriciler arasında dolaşan LV varlığının saptanabilmesi için, 2011-2012 yıllarında "Sherman" tipi canlı yakalama kapanları kullanılarak yaban hayatından toplanmış olan kemiricilere ait arşiv dokuları kullanıldı.

LV'nin santral sinir sistemi üzerindeki etkisi ve yapılan çalışmalarda en yüksek viral yükün beyin dokusunda saptandığının bildirilmesi nedeni^(12,23) ile çalışmada 85'i *Apodemus* ve 35'i *Myodes* türü olmak üzere toplam 120 adet kemiriciye ait beyin dokusu yer aldı. Dokular, işleme alınmaya dek RNA stabilize edici solüsyon (RNAlater, Invitrogen, ABD) içerisinde -80°C'de saklandı.

RNA ve DNA Eldesi

Kemiricilere ait beyin dokuları, TRIzol (ABP Biosciences, ABD) ve steril çelik boncuklar kullanılarak homojenize edildi. Doku homojenizasyonundan sonra, Chomczynski ve Sacchi⁽¹⁾ tarafından bildirilen guanidiniyosiyanat-fenol-kloroform solüsyonu ile RNA ekstraksiyonuna dayanan yöntemle tüm DNA ve RNA izolasyonu yapıldı.

cDNA Eldesi

Elde edilen RNA ürünleri ters transkripsiyon yöntemi ile cDNA'ya çevrildi. Bu amaçla firma önerileri doğrultusunda "random hexamer" primer, ters transkriptaz enzimi, RNaz inhibitörü, deoksinükleotit trifosfat karışımı (dNTP) ve tampon içeren ticari kit (Applied Biological Materials, Kanada) kullanıldı. Kemirici örnekleri ile birlikte, Helsinki Üniversitesi Viral Zoonozlar Araştırma Laboratuvarı'ndan pozitif kontrol olarak temin edilen iki farklı LV suşuna ait RNA örneklerinden de cDNA'lar elde edildi ve çalışmada kullanıldı.

Ters Transkriptaz PZT ile LV Araştırılması

Kemirici ve pozitif kontrol örneklerine, genetik çeşitliliğin yüksek olması nedeni ile genotipleme ve virus karakterizasyonu için tercih edilen LV genomunun VP1 bölgesini hedefleyen ve Kallies⁽¹²⁾ tarafından tasarlanan primerler kullanılarak ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (PZT) uygulandı. Reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, her bir reaksiyon için 2.5 µl 5x tepkime solüsyonu, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 10 pmol Primer LV-VP1-F2659 (5'- AAA GTT GCW CAY ACM TGG TTT GG- 3'), 5 pmol Primer LV-VP1-R3341a (5'- GCA TGT GTC CAA TTT CCA TCA TC- 3') ve 5 pmol Primer LV-VP1-R3341b (5'- GCA TGA ACC CAT TTG CCA TCA TC- 3'), 2.5 U Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, İsviçre) kullanıldı. Ters transkriptaz "touch-down" PZT LV 145SLG ve LV 87-012G izolatları kullanılarak ekibimiz tarafından optimize edildi. PZT koşulları; 95°C'lik ön denatürasyonun ardından 10°C'lik değişim içeren bir "touch-down" basamağı (95°C 15 saniye, 60-50°C arasından her bir döngüde bir derece düşecek şekilde 30 saniye, 72°C 1 dakika 15 saniye olacak şekilde toplam 10 döngü) ve ardından 40 döngümlük bir PZT basamağı daha (95°C 15 saniye, 54°C 30 saniye, 72°C 1 dakika 15 saniye) içermekte idi.

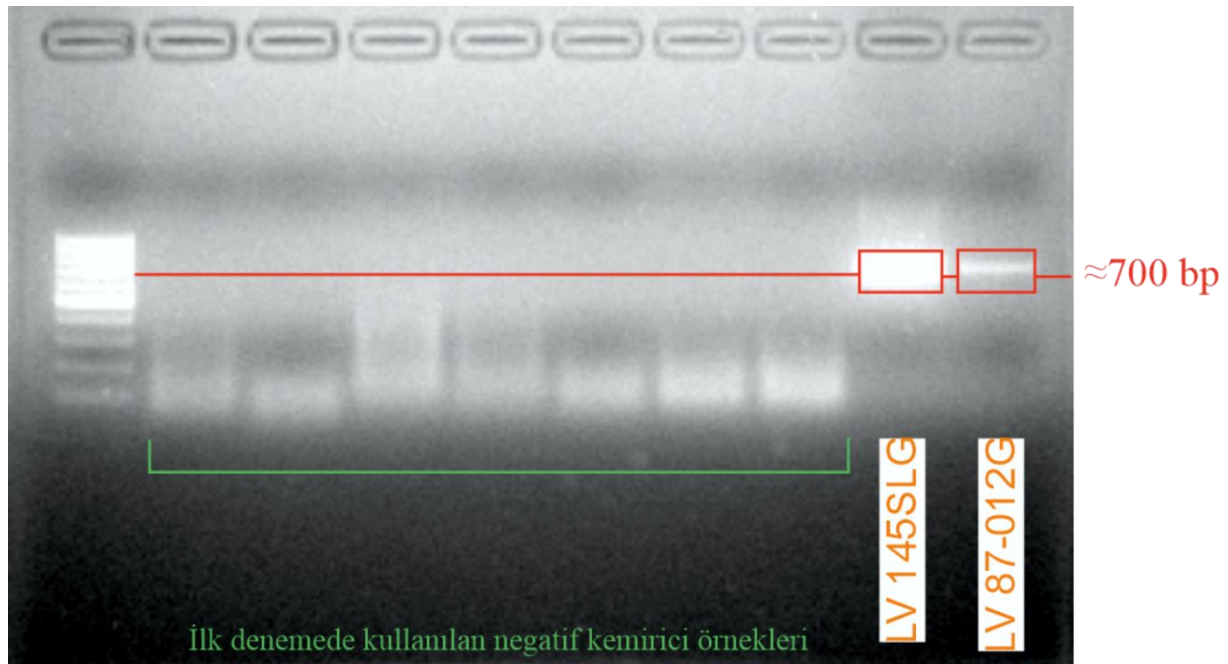
Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntüledi ve LV hedef VP1 bölgesinin büyüklüğüne uygun bant (680 bp) varlığı açısından değerlendirildi.

BULGULAR

Ters Transkriptaz PZT ile LV Araştırılması

Pozitif kontrollerden elde edilmiş olan cDNA'lara VP1 bölgesini hedefleyen ters transkriptaz PZT uygulandıktan sonra elde edilen ürünlerde LV genomundaki hedef VP1 bölgesinin büyüklüğüne uygun bant (680 bp) saptandı (Şekil 1).

Araştırmada yer alan kemirici örneklerinden elde edilen PZT ürünlerinde ise hedeflenen bölgenin büyüklüğüne uygun bant gözlenmedi.



Şekil 1. Kemirgen örneklerine ve pozitif kontrollere uygulanan ters transkriptaz PZT sonucunda elde edilen ürünlere ait jel görüntüsü.

TARTIŞMA

Bir bölgede dolaşımında olan virusların, bunların konak çeşitliliğinin ve bulaş riskinin belirlenmesi, özellikle spesifik bir tedavisi ya da aşısı bulunmayan ve halk sağlığı üzerinde etkisi olan viral patojenler açısından önem taşımaktadır. LV'nin tip 1 diyabetin yanı sıra gestasyonel patolojilerdeki rolü ve zoonotik potansiyeli halen tartışmalıdır^(9,13-15,19,21,26,29). Şimdiye kadar Türkiye'de insanlarda ve hayvan popülasyonlarındaki LV prevalansı ile ilgili bir çalışma yapılmadığından, literatürde güncel durum hakkında bir bilgi bulunmamaktadır.

LV varlığı İsveç, Finlandiya, Danimarka, İngiltere, İtalya gibi Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki farklı kemirici türlerinde saptanmıştır^(4,6-8,11,13,16-18,22,23,27). İsveç ve Finlandiya'da 2009 – 2012 yılları arasında *M. glareolus* türü kemiriciler ile yapılan örnekleme, LV prevalansı %16.2 olarak bildirilmiştir⁽⁴⁾. İngiltere'de yapılan bir çalışmada, kemiricilerde LV varlığı ters transkriptaz PZT yöntemi ile dört farklı kemirici türünde araştırılmış ve %20-27 oranında pozitiflik saptanmıştır⁽²³⁾. İtalya'da *M. glareolus* ve *A. flavicollis* türlerinde LV pozitiflik oranları sırası ile %50 ve %10 olarak bildirilmiştir⁽⁷⁾. Dokuz Avrupa ülkesinden toplanan farklı kemirici türlerinde ise LV prevalansı ortalama %9.8 olarak belirlenmiştir⁽²⁹⁾.

LV enfeksiyonlarının kemiricilerde tip 1 diyabet, miyokardit ve ensefalite neden olduğu bildirilmiştir⁽¹⁵⁾. LV ile enfekte edilmiş gebe farelerle yapılan çalışmalarda düşük, fetüste kafatası, beyin ve uzuv anomalileri gözlenmiştir^(15,17,24). İnsanlarda ise LV enfeksiyonlarının intrauterin ölüm, plasentada enflamasyon, fetal malformasyonlar, miyokardit, ensefalit ve Guillain-Barré sendromu ile korelasyon gösterdiği yönünde serolojik ve epidemiyolojik veriler bulunmaktadır⁽²³⁾. Ayrıca LV RNA'sı intrauterin ölüm gerçekleşen fetüslerin dokularından izole edilmiştir. Diyabetik çocuklarda ise LV'ye karşı antikor varlığı gösterilmiştir^(19,20,25). İnsanlarda miyokardit, tip 1 diyabet ve Guillain-Barré sendromu insidansları ile kemirici yoğunluğu arasında zamana dayalı bir korelasyon gözlenmesi, kemiricilerde LV varlığının araştırılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur⁽¹⁵⁾.

Bu çalışma kapsamında, LV'nin ana konağı olduğu düşünülen *Myodes*'in yanı sıra LV pozitifliği bildirilmiş olan *Microtus* ve *Apodemus* cinsi kemiricilerin yayılım gösterdiği, ormanlık habitatlar açısından zengin bir alan olan Zonguldak ili tercih edilmiştir⁽²⁾. Fakat LV varlığına rastlanmamıştır. Pozitiflik saptanmamasında, bölgesel ve mevsimsel farklılıkların rolü olabilir. Fevola ve ark., LV prevalansının yüksek olmasını, düşük yağış oranı, ormanlık habitatların varlığı ve yüksek rakım ile ilişkilendirmişlerdir⁽⁵⁾. Çalışmanın örnekleme alanı olan Zonguldak ili, ormanlık habitatlar açısından zengin olsa da yağış oranı yüksek ve rakımı düşüktür. Diğer yandan Zonguldak, LV pozitifliklerinin bildirildiği, İsveç ve Finlandiya gibi soğuk iklimin hakim olduğu Kuzey Avrupa ülkelerine göre nispeten daha ılık bir iklime sahiptir. Bu iklimsel özellikler, bir RNA virusu olan LV'nin enfektivitesini sürdürmesi için uygun ortam şartlarını sağlamıyor olabilir.

Bu çalışma, Türkiye'deki LV varlığının araştırılması için başlangıç teşkil etmektedir. Durumun ayrıntılı bir şekilde ortaya konabilmesi için Türkiye'nin daha soğuk ve yüksek rakımlı bölgelerinde, farklı kemirici türlerinden oluşan geniş örnekleme gruplarında kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Kurul Onayı: Çalışma planı, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2011/07 numaralı karar) tarafından onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Proje, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2018.KB.SAG.067 proje numarası ile desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: The study plan was approved by the Local Ethics Committee for Animal Experiments (decision number 2011/07) of Dokuz Eylül University.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial support: The project was supported by Dokuz Eylül University Department of Scientific Research Projects with project number 2018.KB.SAG.067.

KAYNAKLAR

1. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty- something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
2. Çoğal M, Sözen M. Distribution of rodent species (Mammalia: Rodentia) in Zonguldak Province, Turkey. *International Journal of Environment and Geoinformatics (IJECEO).* 2022;9(4):185-93. <https://doi.org/10.30897/ijegeo.1075643>
3. Donoso Mantke O, Kallies R, Niklasson B, Nitsche A, Niedrig M. A new quantitative real-time reverse transcriptase PCR assay and melting curve analysis for detection and genotyping of Ljungan virus strains. *J Virol Methods.* 2007;141(1):71-7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.029>
4. Fevola C, Rossi C, Rosà R, et al. Distribution and seasonal variation of Ljungan virus in bank voles (*Myodes glareolus*) in Fennoscandia. *J Wildl Dis.* 2017;53(3):552-60. <https://doi.org/10.7589/2016-06-145>
5. Fevola, C, Rossi C, Rosso F, et al. Geographical Distribution of Ljungan Virus in Small Mammals in Europe. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2020;20(9):692-702. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2542>
6. Forbes KM, Voutilainen L, Jääskeläinen A, et al. Serological survey of rodent-borne viruses in Finnish field voles. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014;14(4):278-83.
7. Hauffe HC, Niklasson B, Olsson T, Bianchi A, Rizzoli A, Klitz W. Ljungan virus detected in bank voles (*Myodes glareolus*) and yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) from Northern Italy. *J Wildl Dis.* 2010;46(1):262-6. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.1.262>.
8. Jääskeläinen AJ, Kolehmainen P, Voutilainen L, et al. Evidence of Ljungan virus specific antibodies in humans and rodents, Finland. *J Med Virol.* 2013;85(11):2001-8. <https://doi.org/10.1002/jmv.23681>
9. Jääskeläinen AJ, Nurminen N, Kolehmainen P, et al. No Association between Ljungan Virus Seropositivity and the Beta-cell Damaging Process in the Finnish Type 1 Di-abetes Prediction and Prevention Study Cohort. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38(3):314-6.
10. Johansson S, Niklasson B, Maizel J, Gorbalenya AE, Lindberg AM. Molecular analysis of three Ljungan virus isolates reveals a new, close-to-root lineage of the Picornaviridae with a cluster of two unrelated 2A proteins. *J Virol.* 2002;76(17):8920-30. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8920-8930.2002>
11. Johansson ES, Niklasson B, Tesh RB, et al. Molecular characterization of M1146, an American isolate of Ljungan virus (LV) reveals the presence of a new LV genotype. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 4):837-44.
12. Kallies R. Ljungan virus: prevalence in rodents and virus pathogenesis. Dissertation. Robert Koch-Institute Berlin (2010).
13. Krous HF, Langlois NE. Ljungan virus: a commentary on its association with fetal and infant morbidity and mortality in animals and humans. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88(11):947-52. <https://doi.org/10.1002/bdra.20728>
14. Lundstig A, McDonald SL, Maziarz M, et al. Neutralizing Ljungan virus antibodies in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *J Gen Virol.* 2021;102(5):001602.
15. Niklasson B, Hörnfeldt B, Lundman B. Could myocarditis, insulin-dependent diabetes mellitus, and Guillain-Barré syndrome be caused by one or more infectious agents carried by rodents? *Emerg Infect Dis.* 1998;4(2):187-93. <https://doi.org/10.3201/eid0402.980206>
16. Niklasson B, Kinnunen L, Hörnfeldt B, et al. A new picornavirus isolated from bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Virology.* 1999;255(1):86-93. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9557>
17. Niklasson B, Heller KE, Schønecker B, et al. Development of type 1 diabetes in wild bank voles associated with islet autoantibodies and the novel ljungan virus. *Int J Exp Diabetes Res* 2003;4(1):35-44. <https://doi.org/10.1080/15438600303733>
18. Niklasson B, Nyholm E, Feinstein RE, et al. Diabetes and myocarditis in voles and lemmings at cyclic peak densities-induced by Ljungan virus? *Oecologia.* 2006;150(1):1-7.
19. Niklasson B, Samsioe A, Papadogiannakis N, et al. Association of zoonotic Ljungan virus with intrauterine fetal deaths. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007;79(6):488-93. <https://doi.org/10.1002/bdra.20359>
20. Niklasson B, Almqvist PR, Hörnfeldt B, Klitz W. Sudden infant death syndrome and Ljungan virus. *Forensic Sci Med Pathol.* 2009;5(4):274-90.

21. Niklasson B, Samsioe A, Papadogiannakis N, et al. Zoonotic Ljungan virus associated with central nervous system malformations in terminated pregnancy. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol.* 2009;85(6):542-5.
22. Romeo C, Ferrari N, Rossi C, et al. Ljungan virus and an adenovirus in Italian squirrel populations. *J Wildl Dis.* 2014;50(2):409-11.
23. Salisbury AM, Begon M, Dove W, Niklasson B, Stewart JP. Ljungan virus is endemic in rodents in the UK. *Arch Virol.* 2014;159(3):547-51. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1731-6>
24. Samsioe A, Sjöholm A, Niklasson B, Klitz W. Fetal death persists through recurrent pregnancies in mice following Ljungan virus infection. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2008;83(5):507-10. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20169>
25. Samsioe A, Papadogiannakis N, Hultman T, Sjöholm A, Klitz W, Niklasson B. Ljungan virus present in intrauterine fetal death diagnosed by both immunohistochemistry and PCR. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;85(3):227-9. <https://doi.org/10.1002/bdra.20554>
26. Tapia G, Cinek O, Rasmussen T, Grinde B, Rønningen KS. No Ljungan Virus RNA in Stool Samples from the Norwegian Environmental Triggers of Type 1 Diabetes (MIDIA) Cohort Study. *Diabetes Care.* 2010;33(5):1069-71.
27. Tolf C, Gullberg M, Johansson ES, Tesh RB, Andersson B, Lindberg AM. Molecular characterization of a novel Ljungan virus (Parechovirus; Picornaviridae) reveals a fourth genotype and indicates ancestral recombination. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 4):843-53. <https://doi.org/10.1099/vir.0.007948-0>
28. Warvsten A, Bjornfors M, Arvidsson M, et al. Islet autoantibodies present in association with Ljungan virus infection in bank voles (*Myodes glareolus*) in northern Sweden. *J Med Virol.* 2017;89(1):24–31.
29. Zheng L, Wang F, Huang J, Xin H. Evaluation of the association of zoonotic Ljungan virus with perinatal deaths and fetal malformation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2015;105(1):81-5.