

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**SPREMLJANJE PRISOTNOSTI ROTAVIRUSOV
SKUPINE A IN VIRUSA HEPATITISA E PRI DIVJADI**
**DETECTION OF ROTAVIRUS AND HEPATITIS E
VIRUS IN GAME ANIMALS**

Sabina Šturm

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 578.2:639.1.091:616.34:578:57.083.2(043.2)

**SPREMLJANJE PRISOTNOSTI ROTAVIRUSOV SKUPINE A
IN VIRUSA HEPATITISA E PRI DIVJADI**

**DETECTION OF ROTAVIRUS AND HEPATITIS E VIRUS IN
GAME ANIMALS**

Sabina Šturm

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom izr. prof. dr. Andreja Kirbiša in somentorstvom asist. raz. dr. Urške Jamnikar Ciglenečki, na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2016

POVZETEK

Ključne besede: Divjad – virologija; rotavirus – virologija – genetika – klasifikacija; virus hepatitisa E – virologija; RNA virusna; genom virusni; molekulska zaporedje, podatki; zaporedje, analiza – metode; verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo – metode; filogeneza

V raziskavi smo spremajali prisotnost dveh enteričnih virusov, virusa hepatitisa E in rotavirusov skupine A pri divjadi v Sloveniji. Za enterične viruse je značilno, da so razmeroma stabilni v okolju, imajo nizko infektivno dozo, se v visokih koncentracijah izločajo v okolje in so sposobni prenosa med različnimi vrstami. Z dvema molekularnima metodama smo pregledali 117 vzorcev črevesne vsebine divjih živali in določili morebitno prisotnost nukleinske kisline rotavirusa in virusa hepatitisa E. Vsi preiskani vzorci so bili z metodama RT-PCR in RT-PCR v realnem času negativni na prisotnost virusne RNA hepatitisa E. Z metodama RT-PCR in RT-PCR v realnem času smo dokazali rotavirusno RNA v dveh vzorcih črevesne vsebine pri srni. V raziskavi smo z metodo naslednje generacije sekvenciranja prvi na svetu določili celoten genom rotavirusa pri srni z oznako D38/14 in dobljeno nukleotidno zaporedje vnesli v gensko banko. D38/14 smo uvrstili v skupino A rotavirusov. Poleg tega smo ugotovili in prvi na svetu opisali genotipsko kombinacijo G6P[15], kamor spada rotavirus D38/14. Sev D38/14, z izjemo odseka VP4, predstavlja tipično genomsko kompozicijo DS-1, to je G6-P[15]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3.

SUMMARY

Key words: Animals, wild – virology; rotavirus – virology – genetics – classification; hepatitis E virus – virology; RNA viral; genome, viral; molecular sequence data; sequence analysis – methods; reverse transcriptase polymerase chain reaction – methods; phylogeny

The aim of this study was to detect the presence of two enteric viruses, the hepatitis E virus and the rotaviruses from group A, in game animals in Slovenia. Enteric viruses are known for their environmental stability, low infectious dose, interspecies transmission and high concentrations of viral particles in faeces. For detection of the hepatitis E virus and the rotavirus nucleic acid conventional RT-PCR and real-time RT-PCR were performed. The hepatitis E virus was not detected in any of the 117 samples, while the rotavirus was detected with both methods in two samples of roe deer. Following the whole genome sequence analysis, one of two positive samples, D38/14 was characterized by next generation sequencing. In this report we describe the first group A rotavirus detected in roe deer and the complete genome analysis is presented. In addition, a rare combination of genotype G6P[15] is described for the first time. The strain D38/14 - except for the VP4 segment - represents a typical DS-1 genome composition, with the genotype G6-P[15]- I2-R2- C2-M2- A3-N2- T6- E2- H3.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 Opredelitev problema.....	1
1.2 Cilj raziskovanja.....	2
1.3 Delovne hipoteze	2
2 PREGLED LITERATURE	3
2.1 Zootrobo in okužbe ljudi s hrano	3
2.2 Rotavirusi	3
2.2.1 Taksonomska razvrstitev virusa, zgradba in organizacija genoma.....	3
2.2.2 Stabilnost virusa.....	6
2.2.3 Rotavirusne okužbe pri ljudeh	6
2.2.4 Rotavirusne okužbe pri živalih	7
2.2.5 Prenos rotavirusov	8
2.2.6 Diagnostika rotavirusov	9
2.3 Virus hepatitisa E	9
2.3.1 Taksonomska razvrstitev virusa, zgradba in organizacija genoma.....	9
2.3.2 Stabilnost virusa.....	11
2.3.3 Okužbe z virusom hepatitisa E pri ljudeh	12
2.3.4 Okužbe z virusom hepatitisa E pri živalih	12
2.3.5 Prenos virusa hepatitisa E	14
2.3.6 Diagnostika virusa hepatitisa E.....	15
2.4 Divjad.....	16
2.4.1 Živalske vrste zajete v raziskavo	16
2.5 Molekularne metode za določanje nukleinskih kislin	18
2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo.....	18
2.5.2 Določanje nukleotidnega zaporedja.....	20
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 Vzorčenje.....	23
3.2 Priprava vzorcev.....	23
3.3 Izolacija RNA	23

3.4 Rotavirus skupine A	24
3.4.1 Dokaz nukleinske kisline RVA z molekularnimi metodami	24
3.4.2 Določitev nukleotidnega zaporedja pozitivnega vzorca RVA D38/14 z metodo sekvenciranja naslednje generacije	26
3.4.3 Analiza odčitkov NGS	26
3.4.4 Filogenetska analiza odsekov VP4 in VP7	26
3.5 Virus hepatitisa E	27
3.5.1 Dokaz nukleinske kisline HEV z molekularnimi metodami.....	27
4 REZULTATI	29
4.1 Vzorčenje	29
4.2 Rotavirus skupine A	31
4.2.1 Dokaz nukleinske kisline RVA z molekularnimi metodami	31
4.2.2 Analiza z metodo NGS in določitev celotnega virusnega genoma D38/14.....	33
4.2.3 Določanje nukleotidnega zaporedja RVA v regiji VP4	36
4.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja RVA v regiji VP7	38
4.3 Virus hepatitisa E	40
4.3.1 Dokaz nukleinske kisline HEV z molekularnimi metodami.....	40
5 RAZPRAVA	41
5.1 Rotavirus skupine A	41
5.2 Virus hepatitisa E	43
5.3 Zaključek	45
6 SKLEPI	46
7 ZAHVALE	48
8 LITERATURA	49
9 PRILOGE	64

KAZALO TABEL

Tabela 1: Taksonomska uvrstitev rotavirusov	4
Tabela 2: Predlagana taksonomska razvrstitev družine <i>Hepeviridae</i>	10
Tabela 3: Ime in nukleotidno zaporedje začetnih oligo-nt, regija pomnoževanja in velikost pomnoženega produkta	24
Tabela 4: Ime in nukleotidno zaporedje začetnih oligo-nt in MGB sonde, njihovo mesto v genomu in referenčni genom	25
Tabela 5: Ime in nukleotidno zaporedje začetnih oligo-nt, regija pomnoževanja in velikost pomnoženega produkta	28
Tabela 6: Ime in nukleotidno zaporedje začetnih oligo-nt in sonde, regija, mesto v genomu in referenčni genom	28
Tabela 7: Število vzorcev glede na lovsko družino in lovsko upravljavsko območje	30
Tabela 8: Rezultati prisotnosti RVA RNA z metodo RT-PCR in metodo RT-PCR v realnem času	31
Tabela 9: Genotipska razporeditev genoma in celotno nukleotidno zaporedje: primerjava z reprezentativnimi sevi iz genske banke	35
Tabela 10: Rezultati prisotnosti HEV RNA z metodo RT-PCR in metodo RT-PCR v realnem času	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Slika rotavirusov z elektronskim mikroskopom	5
Slika 2: Pogostost G-P rotavirusnih genotipov skozi 8 zaporednih sezont od 2005/06–2012/13 in dinamika cepljenj otrok starih 0-1 leto v Sloveniji.....	7
Slika 3: Organizacija genoma virusa hepatitisa E.....	11
Slika 4: Razporeditev HEV genotipov po svetu.....	14
Slika 5: Shematsko prikazan en cikel PCR reakcije	19
Slika 6: Sekvenator naslednje generacije Ion Personal Genome Machine	21
Slika 7: Polprevodni čip	22
Slika 8: Delež vzorcev posamezne vrste divjadi	29
Slika 9: Geografsko področje lovskih upravljavskih območij vključenih v raziskavo	30
Slika 10: Rezultati prisotnosti RVA RNA	32
Slika 11: Krivulja intenzitete fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri RT-PCR v realnem času za pozitivni vzorec D38/14 (modra krivulja), pozitivno kontrolo (rdeča krivulja) in negativno kontrolo (zelena krivulja)	32
Slika 12: Krivulja intenzitete fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri RT-PCR v realnem času za pozitivni vzorec D110/15 (modra krivulja), pozitivno kontrolo (rdeča krivulja) in negativno kontrolo (zelena krivulja)	33
Slika 13: Filogenetsko drevo odseka VP4.....	37
Slika 14: Filogenetsko drevo odseka VP7.....	39
Slika 15: Krivulja intenzitete fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri RT-PCR v realnem času za negativne vzorce testirane na HEV in pozitivno kontrolo (zelena krivulja).....	40

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

A	purinska baza adenin
AK	aminokislina
BLAST	iskalnik podobnih zaporedij v genski zbirk; ang. Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni par
C	pirimidinska baza citozin
cDNA	komplementarna DNA; ang. complementary DNA
Ct	točka, v kateri signal fluorescence poročevalske molekule preide v eksponencialno rast in prečka linijo fluorescenčnega praga; ang. threshold cycle
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
ELISA	encimskoimunski test; ang. enzyme-linked immunosorbent assay
G	purinska baza gvanin
GenBank	genska banka; ang. gene library
HAV	virus hepatitisa A
HEV	virus hepatitisa E
ICTV	mednarodni odbor za taksonomijo virusov; ang. International Committee on Taxonomy of Viruses
kb	kilobaza
kDa	kilodalton
MEGA	program za filogenetske analize; Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MGB	molekula, ki se veže v mali žleb DNA; ang. minor groove binding
NGS	določanje nukleotidnega zaporedja naslednje generacije; ang. next generation sequencing
NoV	norovirus
NSP	nestrukturna beljakovina; ang. non structural protein
NSP1	nestrukturna beljakovina 1
NSP2	nestrukturna beljakovina 2
NSP3	nestrukturna beljakovina 3
NSP4	nestrukturna beljakovina 4
NSP5	nestrukturna beljakovina 5
NSP6	nestrukturna beljakovina 6
nt	nukleotid
oligo-nt	oligonukleotid
ORF	odprt bralni okvir; ang. open reading frame
PCR	verižna reakcija s polimerazo; ang. polymerase chain reaction
PGM	sekvenator naslednje generacije Ion Personal Genome Machine; ang. Ion Personal Genome Machine sequencer
poliA rep	poliadeniliran rep

RCWG	skupina za klasifikacijo rotavirusov; ang. Rotavirus Classification Working Group
RNA	ribonukleinska kislina
RNaza	ribonukleaza
RT-PCR	metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo; ang. reverse transcription-polymerase chain reaction
RT-PCR v realnem času	metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času; ang. real-time reverse transcription-polymerase chain reaction
RV	rotavirus
RVA	rotavirus skupine A
RVB	rotavirus skupine B
RVC	rotavirus skupine C
RVD	rotavirus skupine D
RVE	rotavirus skupine E
RVF	rotavirus skupine F
RVG	rotavirus skupine G
RVH	rotavirus skupine H
T	pirimidinska baza timin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	pirimidinska baza uracil
VP	strukturna virusna beljakovina; ang. viral protein
VP1	strukturna virusna beljakovina 1
VP2	strukturna virusna beljakovina 2
VP3	strukturna virusna beljakovina 3
VP4	strukturna virusna beljakovina 4
VP6	strukturna virusna beljakovina 6
VP7	strukturna virusna beljakovina 7

1 UVOD

1.1 Opredelitev problema

Zoonoze so bolezni, ki se neposredno ali posredno prenašajo med živalmi in ljudmi (Gubina in sod., 2002). Med pomembnejše zoonoze uvrščamo povzročitelje črevesnih nalezljivih bolezni (Kraigher in sod., 2015), za katere je značilno, da so poleg prenosa med različnimi vrstami tudi razmeroma stabilni v okolju, imajo nizko infektivno dozo in se v visokih koncentracijah izločajo v okolje (Sair in sod., 2002). Zoonotski prenos iz divjih živali na ljudi predstavlja za inštitucije, ki se ukvarjajo z zdravstvenim varstvom ljudi nov izliv, saj se uživanje divjačine ves čas povečuje (Erzar in sod., 2005), prav tako pa so se divje živali prilagodile bivanju v bližini ljudi (Krže, 1982 in 2000), s čimer se povečuje možnost virusne kontaminacije pašnih in poljedelskih površin.

V naši raziskavi smo se osredotočili predvsem na dva povzročitelja črevesnih nalezljivih bolezni: rotaviruse skupine A (RVA) in virus hepatitis E (HEV). HEV zadnja leta predstavlja skrb za javno zdravje ljudi, ne le v razvijajočem svetu, kjer se ljudje okužijo predvsem s kontaminirano vodo, temveč tudi v razvitem svetu, kjer do okužbe največkrat pride zaradi uživanja kontaminiranega mesa domačih prašičev ali divjih živali, predvsem divjih prašičev, jelenjadi in srnjadi (Meng, 2010). Prisotnost HEV je bila do sedaj v Sloveniji pri divjih živalih dokazana le enkrat pri divjih prašičih (Žele in sod., 2016), prisotnost RV pa še nikoli. Znano je, da rotavirusi, še posebej rotavirusi skupine A (RVA), pri majhnih otrocih, mladih divjih in domačih živalih povzročajo akutne gastroenteritise (Fields in Knipe, 2013; Martella in sod., 2010; Matthijnssens in sod., 2009b). V zadnjih letih številne raziskave kažejo, da se RV kljub razlikam v genotipu lahko prenašajo med različnimi živalmi in med živalmi ter ljudmi (Bányai in sod., 2010; Ha in sod., 2009; Luchs in sod., 2012; Matthijnssens in sod., 2010; Mukherjee in sod., 2011; Steyer in sod., 2008). Namen raziskave je bil tako ugotoviti prisotnost HEV in RV pri divjih živalih, saj so te lahko vir okužbe za ljudi.

1.2 Cilj raziskovanja

Cilj naše raziskave je ugotoviti ali sta RVA in HEV sploh prisotna pri divjih živalih v Sloveniji ter ugotoviti njuno pogostost. V primeru prisotnosti enega oziroma obeh virusov nameravamo narediti filogenetsko analizo rotavirusnih sevov in virusnih sevov hepatitisa E iz Slovenije in jih primerjati s sevi, ki so v genski banki.

Raziskava v okviru Prešernove naloge je prva raziskava ugotavljanja prisotnosti nukleinske kisline RVA in HEV pri divjadi v Sloveniji.

1.3 Delovne hipoteze

- a) Pri divjadi v Sloveniji so prisotni rotavirusi skupine A.
- b) Rotavirusni sevi skupine A pri divjadi na območju Slovenije so podobni rotavirusnim sevom skupine A v genski banki.
- c) Pri divjadi v Sloveniji je prisoten virus hepatitisa E. Njegova pogostost je primerljiva z rezultati raziskav iz drugih evropskih držav.
- d) Virusni sevi hepatitisa E pri divjadi na območju Slovenije so podobni virusnim sevom hepatitisa E v genski banki.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Zoonoze in okužbe ljudi s hrano

Zoonoze so bolezni, ki se neposredno ali posredno prenašajo med živalmi in ljudmi. Povzročitelji zoonoz se prenašajo preko poškodovane kože, preko vektorjev, preko stika z okuženimi površinami, z vdihavanjem, z zaužitjem okužene hrane in vode ali z ugrizom okužene živali. Povzročitelji zoonoz ne povzročajo hujših bolezni pri okuženih živalih in služijo kot naravni gostitelj oziroma rezervoar, medtem ko lahko s prenosom na drugo žival ali človeka povzročijo hudo, dolgotrajno bolezen ali celo smrt (Gubina in sod., 2002).

Med pomembnejše zoonoze uvrščamo povzročitelje črevesnih nalezljivih bolezni (Kraigher in sod., 2015), ki se prenašajo med različnimi vrstami, so relativno stabilni v okolju, imajo nizko infektivno dozo in se v visokih koncentracijah izločajo v okolje (Sair in sod., 2002). Mikroorganizmi lahko živila kontaminirajo med procesom proizvodnje, na kmetiji, med klanjem, med nadaljnjo obdelavo in predelavo ter v kuhinji. Med pogoste povzročitelje okužb s hrano spadajo bakterije in njihovi toksini, zajedavci ter virusi (EFSA, 2016). Med tovrstne virusne spadajo norovirusi (NoV), rotavirusi (RV), virus hepatitis A (HAV) in virus hepatitis E (HEV), ki pretežno povzročajo gastroenteritis ali hepatitis pri živalih in ljudeh (FAO in WHO, 2008).

2.2 Rotavirusi

2.2.1 Taksonomska razvrstitev virusa, zgradba in organizacija genoma

Prvi zapisi o rotavirusih (RV) segajo v leta med 1950 in 1960. Takrat so z elektronsko mikroskopijo, iz črevesa miške in rektalnega brisa opice v ujetništvu, odkrili reovirusom podobne virusne delce. Leta 1969 so virusne s podobno morfologijo odkrili v vzorcih iztrebkov goveda z drisko, leta 1973 pa so jih prvič dokazali pri ljudeh (Bishop in sod., 1973). Leta 1978 je Thomas Henry Flewett za virusni delec predlagal ime rotavirus, saj ima na pogled obliko kolesa (iz lat. rota – kolo) (Flewett in sod., 1974). *Rotaviruse* skupaj s *Cardioreovirusi*,

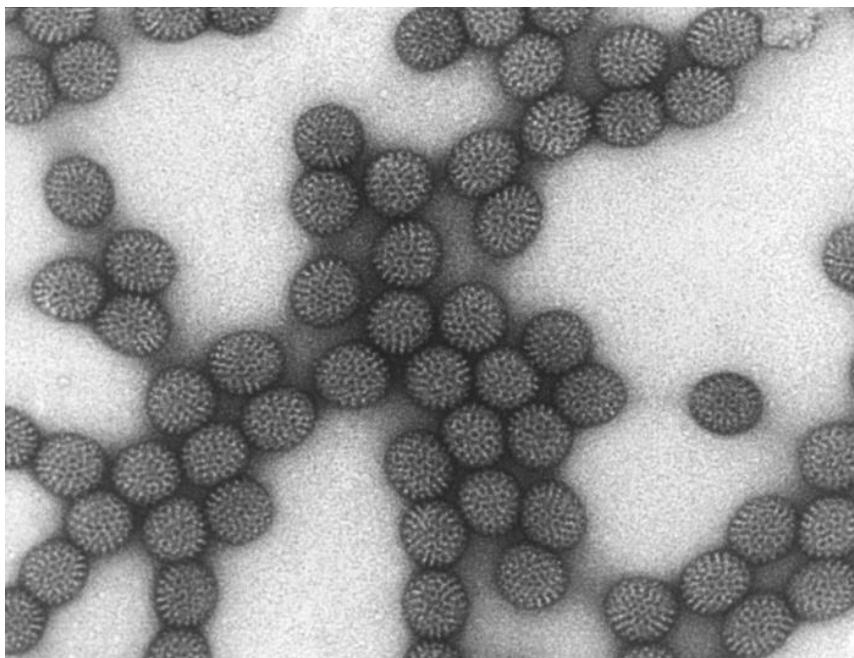
Mimoreovirusi, *Orbivirusi*, *Phytoreovirusi* in *Seadornavirusi* uvrščamo v družino *Reoviridae* in poddružino *Sedoreovirinae* (ICTV, 2015).

Tabela 1: Taksonomska uvrstitev rotavirusov (povzeto po ICTV, 2015)

Table 1: Taxonomy of the *Reoviridae* family (adapted from ICTV, 2015)

DRUŽINA	
<i>Reoviridae</i>	
Poddružina	Poddružina
<i>Sedoreovirinae</i>	<i>Spinareovirinae</i>
Rodovi	Rodovi
<i>Rotavirus</i>	<i>Aquareovirus</i>
<i>Cardoreovirus</i>	<i>Coltivirus</i>
<i>Mimoreovirus</i>	<i>Cypovirus</i>
<i>Orbivirus</i>	<i>Dinovernavirus</i>
<i>Phytoreovirus</i>	<i>Fijivirus</i>
<i>Seadornavirus</i>	<i>Mycoreovirus</i>
	<i>Orthoreovirus</i>
	<i>Oryzavirus</i>

RV so ikozaedrične oblike, brez ovojnice in imajo troslojno proteinsko kapsido. V premeru merijo približno 75 nm (Estes in Cohen, 1989). Njihov genom je velik 18.500 baznih parov (bp) in je sestavljen iz 11 odsekov dvostranske RNA, dolgih od 667 do 3.302 bp (Desselberger, 2014). Genom vsakega izmed odsekov se na 5' koncu začne z gvaninom, kateremu sledi ohranjeno nekodirajoče zaporedje. Za njim sledi kodirajoče zaporedje, ki se konča s stop kodonom. Vsak odsek ima en odprt bralni okvir, z izjemo odseka 11, ki ima dva odprta bralna okvirja. Kodirajočemu odseku sledi stop kodon in 3' konec, ki je bogat s citozinom in ne vsebuje signala za poliadenilacijo (Estes in Cohen, 1989).



Slika 1: Slika rotavirusov z elektronskim mikroskopom (povzeto po CDC, 2014)

Figure 1: Transmission micrograph of rotavirus (adapted from CDC, 2014)

Genom kodira 6 strukturnih in 6 nestruktturnih proteinov. Strukturni proteini so VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, nestruktturni pa NSP (1 – 6). Vsak protein je kodiran na svojem odseku, razen proteinov NSP5 in NSP6, ki sta oba kodirana na odseku 11 (Desselberger, 2014).

Proteina VP4 in VP7 sestavljata zunanjost kapside. VP6 je glavni strukturni protein, ki preko stika z VP7 proteinom povezuje notranjo in zunanjost kapside (Pesavento in sod., 2006). Notranja plast kapside oblikujejo protein VP2 in proteina VP1 in VP3, ki sestavlja encimski replikacijski kompleks (McClain in sod., 2010).

Po antigenskih značilnostih in molekularni sestavi proteina VP6 razvrščamo RV v 8 različnih skupin, od rotavirusov skupine A do H (RVA – RVH) (Matthijssens in sod., 2012). RVA, RVB, RVC in RVH lahko povzročijo okužbo pri ljudeh in pri nekaterih živalskih vrstah. RVD, RVE, RVF in RVG so do sedaj dokazali le pri pticah in prašičih (Matthijssens in sod., 2010; Fauquet in sod., 2005a). Pri ljudeh in živalih so najbolj pogosti rotavirusi skupine A (Matthijssens in sod., 2011).

V skupini A je glede na sekvence VP7 in VP4 vsaj 29 G tipov (VP7) in 41 P tipov (VP4) virusa (Rotavirus Classification Working Group - RCWG). Genotip in serotip G se ujemata,

medtem ko je genotipov P več kakor serotipov P. Tako je za klasifikacijo RVA predpisana dvojna nomenklatura in sicer se za P-jem z arabsko številko in črko piše serotip, za tem pa v kvadratnem oklepaju še genotip, npr. P1A[8] (Fields in Knipe, 2013).

Leta 2013 je skupina za klasifikacijo rotavirusov RCWG vzpostavila klasifikacijo, s katero RVA razvrščamo glede na sekvence vseh enajstih odsekov. Zapis Gx–P[x]–Ix–Rx–Cx–Mx–Ax–Nx–Tx–Ex–Hx (“x” pomeni številko genotipa) predstavlja ureditev celotnega genoma RVA. RCWG sistem omogoča enoten in zanesljiv način za primerjavo celotnih genomov med različnimi gostiteljskimi vrstami (Matthijnsens in sod., 2011).

2.2.2 Stabilnost virusa

RV so stabilni pri pH od 3 do 9. Ob zadostni koncentraciji kalcija ostanejo v iztrebku, pri temperaturi med 4 °C in 20 °C, infektivni več mesecev (Fauquet in sod., 2005a). V vodah rek ostane humani rotavirus infektiven nekaj tednov pri temperaturi med 4 °C in 20 °C (Greening, 2006). Na rokah ohrani kužnost najmanj 4 ure (Ansari in sod., 1988), na okuženih površinah pa tudi več dni (Sattar in sod., 1986).

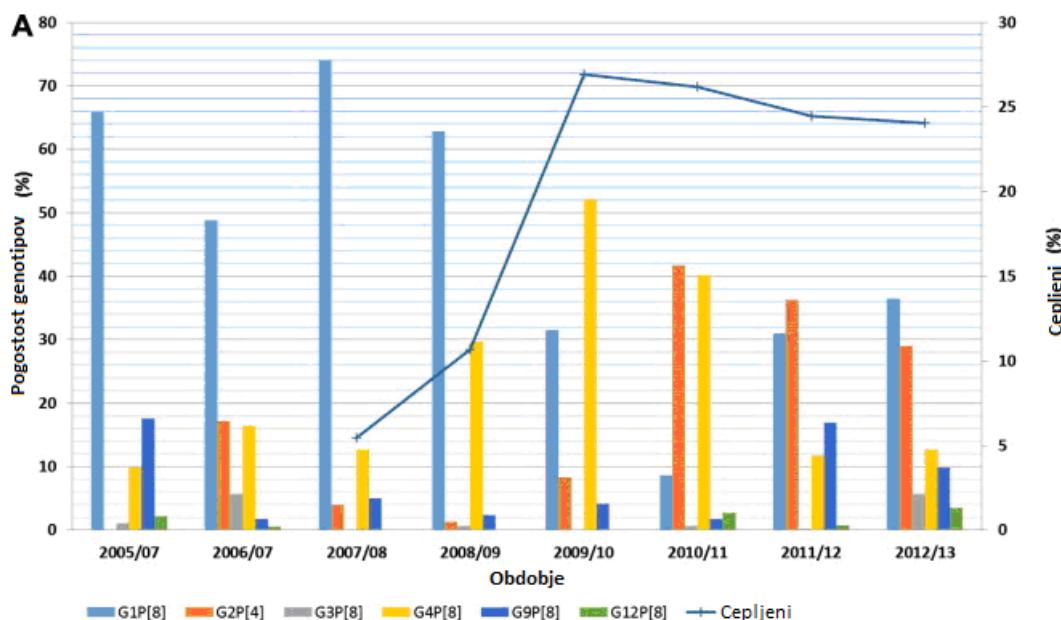
2.2.3 Rotavirusne okužbe pri ljudeh

Pri ljudeh povzročajo okužbe rotavirusi iz skupin RVA, RVB, RVC in RVH (Hull in sod., 2016). RVA so glavni vzrok virusnih gastroenteritisov pri otrocih, ki so okužbi najpogosteje izpostavljeni do petega leta starosti (Ndze in sod., 2012). Okužba lahko poteka asimptomatsko, kot akutni ali kronični gastroenteritis. Klinični znaki akutnega gastroenteritisa so blaga do močna driska, bruhanje, dehidracija, ter pogosto blago povišana telesna temperatura. Bruhanje in driska trajata krajši čas, običajno 3 do 5 dni. Pri otrocih z oslabljenim imunskim sistemom se lahko pojavi kronična oblika bolezni (Anderson in Weber, 2004). Pri odraslih ljudeh so okužbe redkeje zaznavne (Grimwood in Lambert, 2009). V državah v razvoju rotavirusni gastroenteritisi pri otrocih povzročijo 453.000 smrti letno (Tate in sod., 2011). Smrt je najpogosteje posledica dehidracije in odpovedi srca in ožilja (Desselberger, 2014).

Pri otrocih do petega leta starosti je bila ugotovljena 90-95-% seroprevalenca rotavirusov (Cox in sod., 1998), kar kaže na veliko razširjenost RVA okužb pri otrocih. Najpogosteje

S. Šturm: Spremljanje prisotnosti rotavirusov skupine A in virusa hepatitisa E pri divjadi v Sloveniji.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2016. Raziskovalna naloga

kombinacije genotipov RVA pri ljudeh po svetu so G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] in G9P[8] (Santos in Hoshino, 2004). V Sloveniji so se pri otrocih z akutnim gastroenteritisom, od leta 2005 do leta 2013, večinoma pojavljali genotipi G1P[8], G2P[4], G4P[8] in G9P[8], izjemoma tudi genotipa G3P[8] in G12P[8] (Steyer in sod., 2014).



Slika 2: Pogostost G-P rotavirusnih genotipov skozi 8 zaporednih sezont od 2005/06–2012/13 in dinamika cepljenj otrok starih 0–1 leto v Sloveniji (povzeto po Steyer in sod., 2014)

Figure 2: The prevalence of rotavirus G–P genotypes for eight consecutive seasons 2005/06–2012/13 and the dynamic of vaccination coverage among children 0–1 year of age in Slovenia (adapted from Steyer et al., 2014)

2.2.4 Rotavirusne okužbe pri živalih

Rotavirusna okužba pri mladih živalih povzroča drisko, najpogosteje pri teletih, žrebetih in odstavljenih prašičih. Klinična slika je odvisna od starosti, kondicije in imunološkega statusa prizadete živali (Chatzopoulos in sod., 2013). Pri govedu so rotavirusi skupine A glavni vzrok driske novorojenih telet. Zaradi visoke smrtnosti in manjšega prirasta imajo velik ekonomski pomen (Alfieri in sod., 2007; Steyer in sod., 2008). Pri odraslem govedu obstaja možnost okužbe brez kliničnih znakov. Rotavirusi imajo velik ekonomski vpliv tudi v reji prašičev in so pri odraslih prašičih pogosto brez kliničnih znakov (Midgley in sod., 2011; Steyer in sod.,

2008). Mačke in psi redkeje zbolijo za klinično obliko bolezni (Hoshino in sod., 1981; Mochizuki in sod., 1986).

Okužbe z RV so razširjene povsod po svetu. Potrdili so jih pri številnih vrstah sesalcev in ptic (Martella in sod., 2010). Poleg zgoraj naštetih vrst so jih dokazali pri primatih, netopirjih, glodavcih, zajcih, kuncih, divjih karnivorih, kopitarjih in številnih drugih vrstah živali. Med drugimi tudi pri številnih vrstah parkljarjev, vendar je raziskav, ki bi preučevale genome pri parkljarjih malo (Ghosh in Kobayashi, 2014). Dokazan je skupen izvor dveh genomov gvanakov in genoma antilope vrste *Hippotragus niger* ter skupen izvor ovčjega genoma in genoma drugih prežvekovalcev (Matthijnssens in sod., 2009a). Dokazan je tudi prenos RV med divjim in domačim prašičem (Okadera in sod., 2013).

V Sloveniji so med letoma 2004 in 2005 pri domačih prašičih prevladovali genotipi G3P[6], G4P[6], G5P[7] in P[27] v kombinaciji z G1, G2 in G4, skupno je bilo potrjenih 16 G/P kombinacij. Pri govedu so dokazali genotipe G6P[1], G6P[5] in G6P[11] (Steyer in sod., 2008).

2.2.5 Prenos rotavirusov

Glavni način prenosa rotavirusnih okužb je po fekalno-oralni poti (Martella in sod., 2010). Okužena oseba v iztrebek izloča 10^9 virusnih delcev na mililiter (Carter, 2005). Okužba se najpogosteje prenaša z direktnim kontaktom z okuženo osebo ali preko površin kontaminiranih z virusom. V državah v razvoju je glavni vir okužbe voda, kontaminirana s iztrebkom (Tate in sod., 2011), obstaja pa tudi verjetnost okužbe s hrano, kontaminirano z virusom (Martella in sod., 2010). Domnevno se virus prenaša tudi preko zraka (Dennehy in sod., 1998).

Kljub razlikam med genotipi RVA, številne raziskave potrjujejo prenos rotavirusov med različnimi živalskimi vrstami ter med živalmi in ljudmi (Bányai in sod., 2010; Ha in sod., 2009; Luchs in sod., 2012; Matthijnssens in sod., 2010; Mukherjee in sod., 2011; Okadera in sod., 2013). Medvrstni prenos je mogoč zaradi sposobnosti prerezporejanja odsekov (ang. reassortment) ob sočasni infekciji z dvema različnima virusoma istega ali različnega genotipa, ene ali različnih vrst živali ali človeka (Jain in sod., 2014). Možen je tudi direktni prenos živalskega seva na ljudi (Matthijnssens in sod., 2006), ki pa večkrat povzroči le sporadične

primere bolezni, kakor večje izbruhe bolezni med ljudmi. Takšni primeri na epidemiologijo RVA nimajo večjega vpliva (Papp in sod., 2013, Steyer in sod., 2008). RV se z živali na ljudi verjetno prenašajo preko površin in hrane kontaminirane z virusom ali z direktnim stikom z živalmi (Machnowska, 2014).

2.2.6 Diagnostika rotavirusov

Za ugotavljanje izbruhov rotaviroz se uporablajo elektronska mikroskopija, dokaz antigena (ELISA, imunokromatografija, lateksna aglutinacija) in dokaz nukleinskih kislin (RT-PCR, RT-PCR v realnem času) (Ravindran in Viswanathan, 2014). Zaradi velikega števila točkastih mutacij v genomu RVA je oligonukleotidne začetnike za uporabo pri metodah RT-PCR in RT-PCR v realnem času potrebno pogosto preverjati in po potrebi zamenjati (Iturriiza-Gómara in sod., 2004).

2.3 Virus hepatitisa E

2.3.1 Taksonomska razvrstitev virusa, zgradba in organizacija genoma

Prvič so o epidemiji ne-A in ne-B hepatitisa poročali leta 1980 v Indiji (Khuroo, 1980). Kasneje se je izkazalo, da je epidemijo povzročil virus hepatitisa E (HEV), katerega so z metodo imunske elektronske mikroskopije dokazali leta 1983 (Balayan in sod., 1983). Osem let po odkritju so prvič določili nukleotidno zaporedje genoma HEV (Tam in sod., 1991). Od živalskih vrst je bil prvič dokazan pri prašičih, leta 1997 v ZDA (Meng in sod., 1997).

HEV je bil od leta 2004 do leta 2014 uvrščen v družino *Hepeviridae* in rod *Hepevirus* (Fauquet in sod., 2005b). Znotraj rodu sta obstajali dve vrsti, HEV, ki se pojavlja pri sesalcih in HEV, ki se pojavlja pri pticah (Cao in Meng, 2012). HEV, ki se pojavlja pri sesalcih ima en serotip in vsaj 4 genotipe (Meng, 2011). Genetsko različni sevi, ki so jih odkrili pri podganah (Johne in sod., 2010), dihurjih (Raj in sod., 2012), divjih prašičih (Takahashi in sod., 2011), netopirjih (Drexler in sod., 2012) in pri vrsti pacifiškega lososa (*Oncorhynchus clarkii*) (Batts in sod., 2011) so bili razlog za novo preučitev taksonomske razvrstitev virusa.

Leta 2014 je ICTV predlagala zamenjavo imena rodu *Hepevirus*. Rod *Hepevirus* so preimenovali v dva nova rodova, rod *Orthohepevirus*, kamor uvrščajo vse seve, dokazane pri

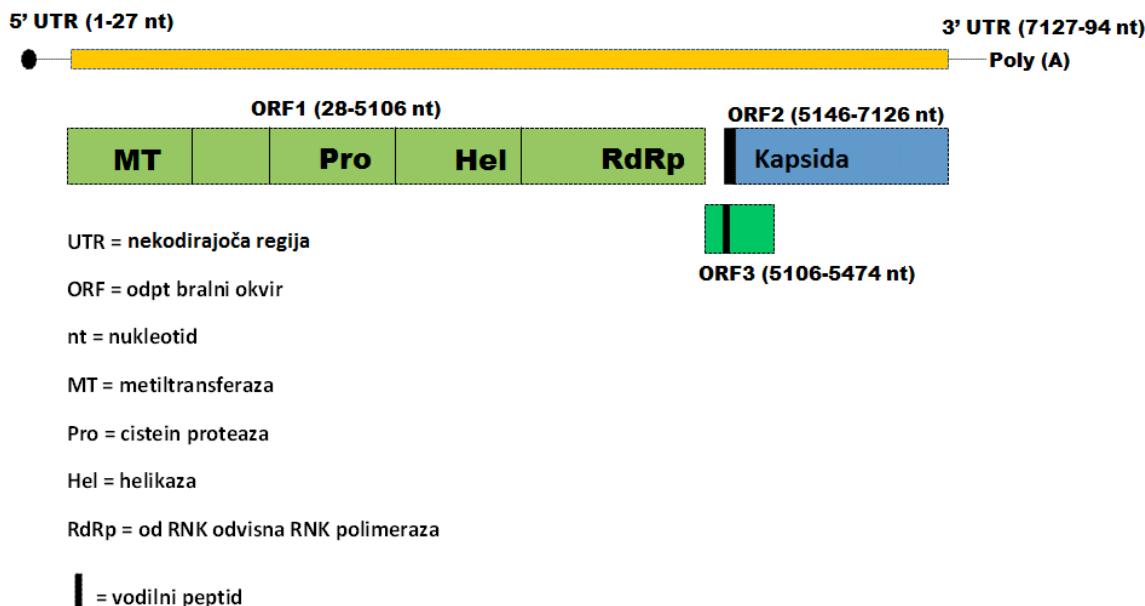
pticah in sesalcih, ter rod *Piscihepevirus*, kamor uvrščajo vse znane seve *cutthroat trout virusa* in seve drugih vrst rib. V rod *Orthohepevirus* spadajo 4 vrste in sicer *Orthohepevirus A, B, C* in *D*. V vrsto *Orthohepevirus A* uvrščajo vse viruse, ki lahko okužijo človeka (do tedaj znan genotip 1-4) in viruse dokazane pri kamealah ter divjih prašičih. Virusi prav tako lahko okužijo prašiče, jelenjad, srnjad, zajce, podgane in munge. V vrsto *Orthohepevirus B* se uvrščajo vsi sevi ptic, v vrsto *Orthohepevirus C* pa vsi sevi dihurjev in večino sevov podgan, ter v vrsto *Orthohepevirus D* vsi sevi netopirjev. Sevi izolirani pri podghanah se uvrščajo pretežno v vrsto *Orthohepevirus C*, poleg tega pa se podgane lahko okužijo tudi s sevi iz vrste *Orthohepevirus A* (Smith in sod., 2014).

Tabela 2: Predlagana taksonomska razvrstitev družine *Hepeviridae* (povzeto po ICTV, 2015)

Table 2: Proposed taxonomic classification of the family *Hepeviridae* (adapted from ICTV, 2015)

Družina	Rod	Vrsta
<i>Hepeviridae</i>		
	<i>Orthohepevirus</i>	<i>Orthohepevirus A</i>
		<i>Orthohepevirus B</i>
		<i>Orthohepevirus C</i>
		<i>Orthohepevirus D</i>
	<i>Piscihepevirus</i>	<i>Piscihepevirus A</i>

HEV je majhen in strukturno preprost RNA virus, ki v premeru meri 27-34 nm, je ikozaedrične oblike in brez ovojnice. Njegov genom je enoverižna, linearna, pozitivno orientirana RNA. Genom je velik 7,2 kb in ima 3 odprte bralne okvirje (ORF 1 – ORF 3), ki se delno prekrivajo. Dolžina genoma se med različnimi živalskimi vrstami malo razlikuje (Ruggeri in sod., 2013). Virusna RNA je sestavljena iz kratke 27 do 35 bp dolge 5' nekodirajoče regije, kateri sledijo trije odprtih bralnih okvirjev ter se zaključi z 65 do 74 bp dolgo nekodirajočo regijo. Za 3' nekodirajočo regijo je od 150 do 200 bp dolg poliA rep (Vasickova in sod., 2007), na začetku 5' konca pa je molekula RNA modificirana s kapo iz 7-metil gvanozina (Kabrane-Lazizi in sod., 1999).



Slika 3: Organizacija genoma virusa hepatitisa E (povzeto po Hussain, 2013)

Figure 3: Genome organization of hepatitis E virus (adapted from Hussain, 2013)

ORF1 obsega približno dve tretjini virusnega genoma in kodira poliprotein, ki vsebuje 1.690 aminokislin (AK) iz katerih po translaciji nastanejo številni nestrukturni proteini – metiltransferaza, domnevna papainu podobna cistein proteaza (ang. papain-like cistein protease), RNA helikaza in od RNA odvisna RNA polimeraza, ki sodelujejo pri virusni replikaciji (Koonin in sod., 1992).

ORF2 se nahaja na 3' koncu genoma in se ne prekriva z ORF1 ter kodira kapsidni protein, ki je velik 660 AK (71 kDa) (Cao in Meng, 2012).

ORF3 je najmanjši bralni okvir med vsemi tremi in se začenja z zadnjim nukleotidom ORF1. Kodira majhen, imunogen, 123 AK velik fosfoprotein (14,5 kDa) (Fields in Knipe, 1996).

2.3.2 Stabilnost virusa

Čas preživetja virusa v okolju ni znan (Scobie in Dalton, 2012), znano pa je, da so viruse, ki so sposobni povzročiti okužbo, dokazali na farmah prašičev, v površinskih vodah in v izdelkih, ki so vsebovali vodo, kontaminirano z virusom (Yugo in Meng, 2013). Znano je, da po eno urnem segrevanju pri 56 °C ostane infektivnih 1 % virusnih delcev (Emerson in sod.,

2005), za dokončno inaktivacijo virusa pa je potrebno dvajset minutno segrevanje pri 71 °C (Barnaud in sod., 2012).

2.3.3 Okužbe z virusom hepatitisa E pri ljudeh

Bolezen v večini primerov poteka z blagimi, gripi podobnimi kliničnimi znaki ali pa je potek bolezni nezaznaven. Okužba s HEV je lahko tudi smrtna (Emerson in Purcell, 2003). Inkubacijska doba traja od 2 do 10 tednov (Aggarwal in Krawczynski, 2000). Klinični znaki so različni, pogosto se pojavi neješčnost, povečanje jeter, bolečine v mišicah, zlatenica, ter občasno slabost, bruhanje in vročina (Fields in Knipe, 2001). HEV običajno povzroči virusni hepatitis z akutnim potekom. Okužba v določenih primerih poteka kronično (Aggarwal in Krawczynski, 2000). Za kronično obliko hepatitisa E pogosteje zbolijo osebe z oslabljenim imunskim sistemom, kot so bolniki s sočasno okužbo s HIV, levkemični bolniki, bolniki z limfomom in bolniki po transplantaciji organov (Kamar in sod. 2008; Le Coutre in sod., 2009; Tamura in sod., 2007; Dalton in sod. 2009; Haagsma in sod., 2008). Resnost in potek bolezni sta odvisna od gostiteljevega telesnega in imunskega stanja, sočasno prisotnih drugih bolezni jeter, ter od virusnega seva in količine virusa (Fields in Knipe, 2001). Na endemskih območjih poročajo o 20%-smrtnosti nosečnic, ki je verjetno odvisna od virusnega genotipa in ostalih sočasnih okužb nosečnic (Emerson in Purcell, 2003). Virus lahko povzroči smrt nosečnice, smrt novorojenca, abortus, prezgodnji porod in zgodnjo smrt dojenčka po porodu (Mushahwar, 2008).

2.3.4 Okužbe z virusom hepatitisa E pri živalih

Domači prašiči se s HEV okužijo pri 2 do 3 mesecih starosti, sledi prehodna viremija, ki traja približno od 1 do 2 tednov. Prašiči so ne glede na starost brez kliničnih znakov, vendar od 3 do 7 tednov izločajo virus z iztrebki. Večina serološko pozitivnih odraslih prašičev virusa ne izloča (Meng, 2010).

Pri domačih prašičih je HEV endemično prisoten v Evropi (Berto in sod., 2012), Steyer in sodelavci so potrdili prisotnost HEV pri domačih prašičih tudi v Sloveniji (2011).

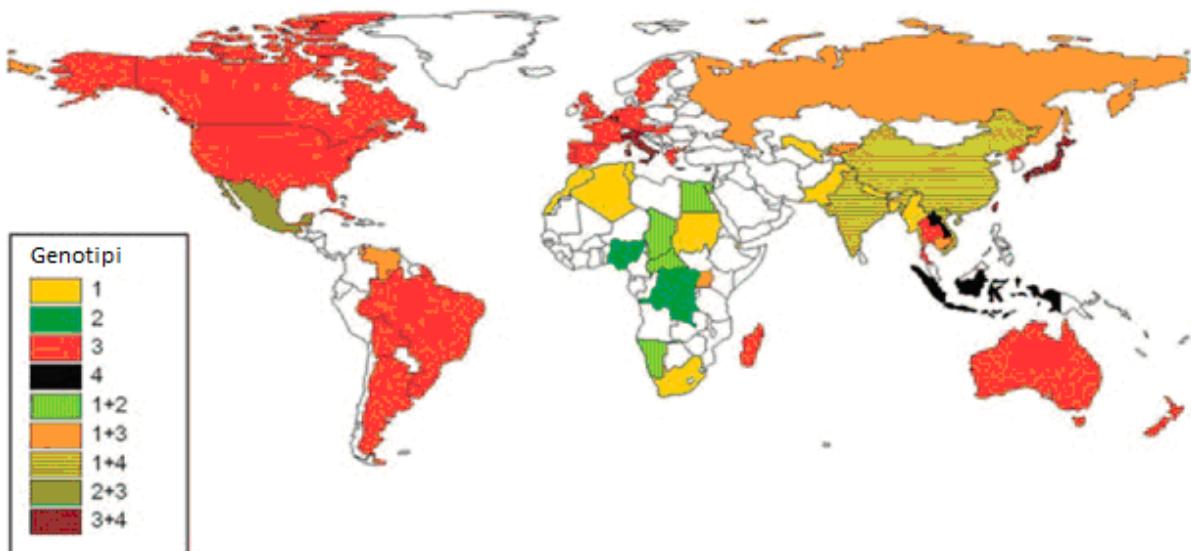
Na Japonskem (Michitaka in sod., 2007), Švedskem (Widen in sod., 2011), Madžarskem (Forgách in sod., 2010), Nizozemskem (Rutjes in sod., 2010), v Franciji (Carpentier in sod.,

2012), Nemčiji (Kaci in sod., 2008), Italiji (Martelli in sod., 2008), Španiji (De Deus in sod., 2007) in Avstraliji (Chandler in sod., 1999) so pri divjih prašičih dokazali protitelesa ali nukleinsko kislino HEV. Odstotek serološko pozitivnih živali ali živali iz katerih je bila izolirana HEV RNA je različen glede na geografsko področje. V različnih raziskavah je serološko pozitivnih prašičev od 17 do 42 %, HEV RNA pa so izolirali v 3-25 % vzorcev (Meng, 2011).

Za razliko od raziskav narejenih pri domačih prašičih, kjer so RNA običajno izolirali pri prašičih starih od 3 do 5 mesecev, so bili divji prašiči, pri katerih so izolirali RNA, stari od 4 do 24 mesecev. Podatki o virulenci HEV pri divjih prašičih zaenkrat še niso znani (Ruggeri in sod., 2013).

Na Japonskem je bilo serološko pozitivnih 3 % Sika jelenjadi (*Cervus nippon nippon*) (Matsuura in sod., 2007) in 35 % Yezo jelenjadi (*Cervus nippon yesoensis*) (Tomiyama in sod., 2009), v Severni Mehiki 62,7 % preiskanih Belorepih jelenov (*Odocoileus virginianus*) (Medrano in sod., 2012), ter na Nizozemskem 5 % preiskane jelenjadi in srnjadi (Rutjes in sod., 2010).

Protitelesa proti HEV so potrdili tudi pri številnih drugih živalskih vrstah, med drugimi pri mungih, ovcah, govedu, kuncih, podganah, mačkah, psih, kozah, makakih ter pticah (Meng, 2011).



Slika 4: Razporeditev HEV genotipov po svetu (povzeto po Ruggeri in sod., 2013)

Barve držav označujejo predominantne seve HEV genotipov v državi pri ljudeh in živalih (predvsem pri prašičih).

Figure 4: Distribution of HEV genotypes worldwide (adapted from Ruggeri et al., 2013)

The colors used for each country represent the predominant HEV genotypes of human and animal isolates (mostly pigs), respectively, from that country.

2.3.5 Prenos virusa hepatitisa E

V državah v razvoju se HEV prenaša predvsem z vodo, kontaminirano z virusom, saj se virus v okolje izloča z iztrebki okuženih ljudi (Aggarwal in Naik, 2009). Na endemično okuženih območjih zaradi hitrega širjenja z vodo in fekalno-oralnega prenosa, prihaja do obsežnih epidemij (Mushahwar, 2008). HEV se iz človeka na človeka redko prenaša (Aggarwal in Naik, 1994), prav tako je redek, vendar možen prenos s krvjo (Mushahwar, 2008).

V preteklosti so okužbe s HEV v razvitem svetu povezovali predvsem s potovanji v endemično okužena območja, danes pa se povečuje število avtohtonih okužb s HEV (Di Bartolo in sod., 2012). Številne raziskave so potrdile prisotnost HEV v odpadnih in površinskih vodah ter odplakah tudi v razvitih državah (Clemente-Casares in sod., 2003; Ippagunta in sod., 2007). HEV lahko preko vode, v kateri je virus, kontaminira kmetijske površine, kar posledično lahko vodi v kontaminacijo rastlinske hrane za živali in ljudi (Kokkinos in sod., 2012). Poleg kontaminacije kmetijskih površin se HEV koncentriра v školjkah s filtracijo vode, kontaminirane z virusom (Smith, 2001). Znani so tudi primeri prenosa HEV preko ne dovolj termično obdelanih mesnih izdelkov v Franciji (Colson in sod.,

2010). Tveganje za okužbo iz okolja je odvisno od stopnje kontaminacije, stabilnosti in infekcijskega odmerka HEV (Van der Poel, 2014).

Prav tako predstavlja tveganje za okužbo z virusom neposreden stik z živalmi, največkrat s prašiči. V številnih raziskavah so testirali ljudi, ki so poklicno izpostavljeni stiku s prašiči in ljudi, ki s prašiči nimajo direktnega stika. Izkazalo se je, da imajo ljudje, ki živijo v tesnem stiku s prašiči višji odstotek protiteles proti HEV (Meng, 2011). Poleg prašičev vir okužbe za človeka predstavlja tudi neposreden ali posreden stik z divjimi živalmi in hišnimi ljubljenci (Yugo in Meng, 2013).

V razvitih državah povezujejo okužbe s HEV tudi z zaužitjem hrane, kontaminirane z virusom. Vir okužbe s hrano so najpogosteje prašičja jetra in svinjina, kontaminirana z virusom. V raziskavah na Japonskem (Yazaki in sod., 2003), Nizozemskem (Bouwnegt in sod., 2007), v ZDA (Feagins in sod., 2007), Veliki Britaniji (Berto in sod., 2012), Italiji, Španiji in Češki (Di Bartolo in sod., 2012) so testirali jetra ali meso domačega prašiča in prisotnost HEV tudi potrdili (Bouwnegt in sod., 2009). Potrjeni so bili tudi sporadični primeri HEV pri ljudeh, ki so jedli meso divjih prašičev (Li in sod., 2005; Matsuda in sod., 2003; Wichmann in sod., 2008) ter meso jelenjadi in srnjadi (Takahashi in sod., 2004; Tomiyama in sod., 2009; Tei in sod., 2003). Večje tveganje za okužbo predstavlja uživanje surovega ali premalo kuhanega mesa (Van der Poel, 2014). Meso jelenjadi in srnjadi, kontaminirano z virusom HEV, tako predstavlja vir okužbe za človeka (Tei in sod., 2003).

Domnevno tudi iztrebki okuženih živali predstavljajo vir okužbe za ljudi, druge divje ali domače živali, kadar ti kontaminirajo vodo, travo ali gozdno rastlinstvo (Mushahwar, 2008).

2.3.6 Diagnostika virusa hepatitisa E

Pri ljudeh so klinični znaki okužbe s HEV nespecifični in so podobni tistim, ki se pojavljajo tudi pri ostalih akutnih jetrnih obolenjih, zato diagnostika okužb s HEV temelji na laboratorijskih testih. Za diagnostiko se, tako pri ljudeh, kot pri živalih, uporablja predvsem ELISA in PCR (Meng, 2010). Za dokazovanje prašičjih sevov HEV so razviti specifični in občutljivi testi RT-PCR (Schlauder in sod., 1999) in testi RT-PCR v realnem času (Jothikumar in sod., 2006).

2.4 Divjad

Med divjad prištevamo vse prostoživeče sesalce in ptice, ki jih lahko lovimo. Ne prištevamo pa zaščitenih vrst in živali, katerih odstrel se izvaja v manjših količinah in le občasno (Marolt, 2009). Po Uredbi o določitvi divjadi in lovnih dob spadajo med lovne vrste navadni jelen (*Cervus elaphus L.*), damjak (*Dama dama L.*), srna (*Capreolus capreolus L.*), gams (*Rupicapra rupicapra L.*), alpski kozorog (*Capra hircus ibex L.*), muflon (*Ovis ammon (aries) musimon Schraber.*), divji prašič (*Sus scrofa L.*), poljski zajec (*Lepus europaeus Pallas*), alpski svizec (*Marmota marmota L.*), navadni polh (*Glis glis L.*), nutrija ali bobrovka (*Myocastor coypus Molina*), pižmovka (*Ondatra zibethica L.*), lisica (*Vulpes vulpes L.*), (*Nyctereutes procyonoides Gray.*), šakal (*Canis aureus L.*), kuna zlatica (*Martes martes L.*), kuna belica (*Martes foina Erxleben.*), jazbec (*Meles meles L.*), fazan (*Phasianus colchicus L.*), raca mlakarica (*Anas platyrhynchos L.*), šoja (*Garrulus glandarius L.*), sraka (*Pica pica L.*) in siva vrana (*Corvus corone cornix L.*) (Uredba o določitvi divjadi in lovnih dob).

2.4.1 Živalske vrste zajete v raziskavo

2.4.1.1 Srnjad

Srnjad je v Sloveniji splošno razširjena vrsta divjadi, najdemo jo od gornje drevesne meje do morja ter na samih stičiščih urbanih naselij in narave. Prehrana je odvisna od okolja, kjer živi. Pretežno se hrani s poganjki, z iglicami in s kmetijskimi rastlinami (Krže, 2000). Letni odstrel srnjadi je leta 2014 znašal 33.219 živali (Statistični urad RS, 2016).

2.4.1.2 Jelenjad

Jelenjad je divjad prostranih gozdov in je izrazito pašna žival, ki se dolgo pase na posameznih mestih. Pretežni del naravne hrane jelenjadi sestavljajo trave, zelišča, drevesni poganjki in listje, pomembni so tudi plodovi različnih vrst. V Sloveniji živi predvsem v jugovzhodnih predelih, to je v Kočevskem, Notranjskem in Krimskem lovsko-gojitvenem območju (Cvenkel, 1989). Letni odstrel jelenjadi je leta 2014 znašal 5.816 živali (Statistični urad RS, 2016).

2.4.1.3 *Gams*

Gams je prebivalec gora in planin. Danes naseljuje tudi predele z nižjo nadmorsko višino, vse do 500 m. V hrani v poletnih mesecih prevladujejo planinske trave in zeli, v zimski hrani pa se močneje pojavljajo poganjki listavcev, grmičja in tudi iglavcev (Cvenkel, 1989). Letni odstrel gamsa je leta 2014 znašal 2.223 živali (Statistični urad RS, 2016).

2.4.1.4 *Muflon*

Muflon živi v tropih in je izrazito pašna divjad, ki se v manjši meri hrani z objedanjem poganjkov in listov grmov in drevja. V poletnem času se zadržuje po senčnih predelih območij s primernim kritjem, pozimi pa v predelih z najtanjšo ali pretrgano snežno odejo. Pozimi je ob visokem snegu in srenu, ki muflona ovira pri gibaju in kopanju hrane izpod snega, v celoti odvisen od hrane na krmišču (Cvenkel, 1989).

2.4.1.5 *Divji prašič*

Divjega prašiča najdemo na celotnem ozemlju Slovenije. Najdemo ga v gozdnatih, močvirnih, ali kulturnih pokrajinh v bližini voda ali barja. Za divjega prašiča je značilna prehranska raznovrstnost, poleg rastlinske namreč potrebuje tudi ustrezен delež živalske hrane (Krže, 1982). Letni odstrel je leta 2014 znašal 9.703 živali (Statistični urad RS, 2016).

2.4.2 *Divjačina*

Divjačinsko meso ali divjačina je meso divjadi, ki na področju gastronomije zavzema pomembno mesto, v zadnjih letih pa je zaradi svojih lastnosti tudi vedno bolj iskana. Divjačina vsebuje velik delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin, od tega še posebno omega-3 maščobne kisline. Poleg omega-3 maščobnih kislin, veljajo beljakovine divjačinskega mesa za biološko visoko vredne beljakovine med živili nasploh. Prav tako pa divjačina na splošno ne vsebuje veliko maščob. Zaradi svoje sestave divjačina velja za visoko kakovosten vir prehrane (Erzar in sod., 2005).

Kljub pozitivnim lastnostim divjačina, zaradi uplenitve in ravnanja z uplenjeno divjadjo, lahko predstavlja vir okužbe za lovca. Kontaminirano meso po vstopu v prehransko verigo predstavlja nevarnost tudi za širši krog ljudi (Vesel, 2015).

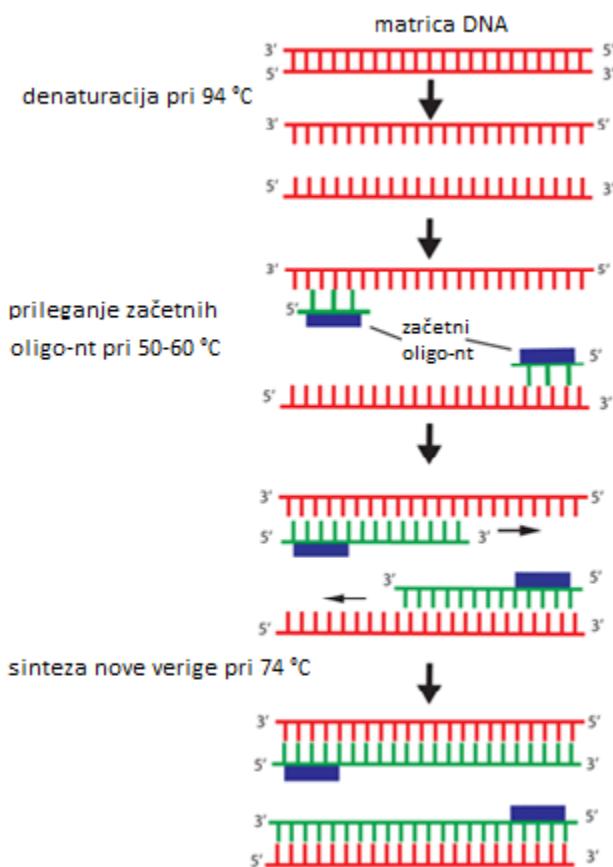
2.5 Molekularne metode za določanje nukleinskih kislin

2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo

Prvi je verižno reakcijo s polimerazo (PCR) opisal Mullis leta 1986 (Mullis, 1990), ter leta 1993 zanjo prejel Nobelovo nagrado iz biokemije. PCR omogoča pomnožitev določenega odseka DNA do velikega števila kopij v kratkem času. Z metodo PCR dokazujemo viruse z in vitro pomnoževanjem želenega odseka virusnega genoma.

2.5.1.1 Dokazovanje DNA

Za PCR reakcijo potrebujemo izolirano nukleinsko kislino, katere del želimo pomnožiti, dva začetna oligo-nt, ki sta komplementarna tarčni molekuli DNA in omejujeta odsek, ki ga želimo pomnožiti, mešanico deoksiribonukleotidtrifosfatov (dNTP), termostabilni encim ter posebno prirejeni pufer, v katerem poteka reakcija. Za uspešno izvedbo PCR reakcije potrebujemo zelo natančen ciklični termostat za natančno uravnavanje temperature med 4 °C in 95 °C. Postopek pomnoževanja želenega odseka DNA je sestavljen iz treh stopenj, ki so shematsko prikazane na sliki 5.



Slika 5: Shematsko prikazan en cikel PCR reakcije (povzeto po Addgene, 2016)

Figure 5: One cycle of PCR reaction shown in a diagram (adapted from Addgene, 2016)

Metoda PCR je sestavljena iz 25–40 ponavljačih se ciklov, v katerih prihaja do sinteze novih molekul DNA. Po končani PCR reakciji moramo količino nastalega PCR produkta izmeriti. Največkrat se uporablja metoda ločevanja delcev DNA po velikosti s pomočjo elektroforeze v gelu (Poljak in sod., 1994).

2.5.1.2 Dokazovanje virusov RNA z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR)

Glavni predpogoj za uspešno dokazovanje virusov RNA z metodo RT-PCR je prepis virusne RNA v komplementarno virusno DNA (cDNA, ang. complementary DNA) z encimom reverzno transkriptazo. To stopnjo imenujemo reverzna transkripcija (RT).

Dokazovanje virusov RNA z metodo PCR je zahtevnejše kot dokazovanje virusov DNA, saj je RNA zaradi svoje enoverižne oblike veliko bolj občutljiva in manj stabilna kot molekula DNA (Fraga in sod., 2008).

2.5.1.3 Metoda RT-PCR v realnem času

Metoda RT-PCR v realnem času predstavlja nadgradnjo klasične metode RT-PCR. Pri tej metodi nastale fluorescenčno označene PCR produkte spremljamo neposredno med pomnoževanjem. Med pomnoževanjem izmerjena fluorescensa narašča eksponentno in je sorazmerna količini nastalih produktov. Izrisana krivulja podaja odvisnost jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov, zaradi česar lahko nastale produkte, ob uporabi ustreznih standardov, kvantificiramo (Mackay, 2004).

2.5.2 Določanje nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje molekul DNA določamo z metodo sekvenciranja. Nov način določanja nukleotidnega zaporedja, s katerim so v enem dnevu analizirali okoli 30.000 baz, so v sedemdesetih letih preteklega stoletja predstavili Sanger in sodelavci (1977). Sangerjeva, klasična metoda je še vedno v uporabi, za izvedbo pa potrebujemo visoko koncentracijo tarčne DNA, kar dosežemo z metodo PCR. Reakcija PCR se ob naključni vključitvi fluorescentno označenega dideoksinukleotida v molekulo DNA ustavi. Mešanica različno dolgih verig DNA, ki so označene z ustreznim fluoroforom, glede na končni nukleotid, je končni produkt reakcije. Določitev nukleotidnega zaporedja je mogoča z ločevanjem označenih verig s kapilarno elektroforezo in odčitavanjem fluoroforov (Berlec in sod., 2010).

2.5.2.1 Sekvenciranje naslednje generacije (ang. next generation sequencing - NGS)

Tehnike določanja nukleotidnega zaporedja so v zadnji letih močno napredovale in omogočajo hitrejše ter uspešnejše pridobivanje genetskih informacij. Termin NGS se uporablja za tehnologijo, ki omogoči identifikacijo vseh želenih sekvenčnih RNA ali DNA v enem postopku sekvenciranja. Postopek je sestavljen iz predpriprave vzorca, priprave knjižnice, samega sekvenciranja z dodajanjem dNTP in obdelavo podatkov z ustreznim programske opremo. Tehnologija se uporablja za tarčno sekvenciranje večih genov naenkrat, sekvenciranje genomov, eksomov in transkriptomov. NGS se vse pogosteje uporablja v

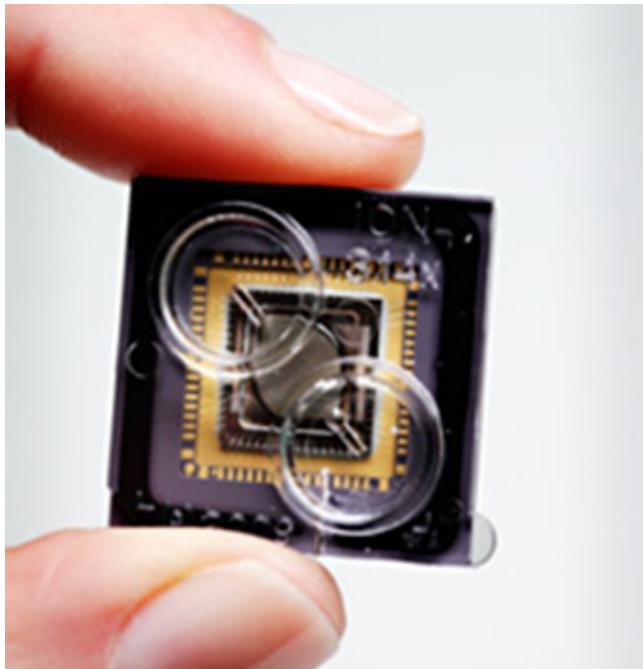
klinični mikrobiologiji in mikrobiologiji, onkologiji, farmacevtiki ter pri raziskovanju dednih bolezni (ThermoFisher Scientific, 2016).



Slika 6: Sekvenator naslednje generacije Ion Personal Genome Machine (povzeto po ThermoFisher Scientific)

Figure 6: Ion Personal Genome Machine (PGM) sequencer (adapted from ThermoFisher Scientific)

Sekvenator naslednje generacije PGM proizvajalca ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, ZDA) deluje na osnovi polprevodniške tehnologije pretočnih pH metrov. Za sekvenciranje naslednje generacije s sekvenatorjem PGM potrebujemo predpripravljen vzorec, ki je izolirana nukleinska kislina DNA oziroma cDNA (RNA, ki smo jo prepisali z metodo reverzne transkripcije), katero razrežemo na približno 200 bp dolge fragmente. Sledi priprava knjižnice NGS. Fragmente DNA povežemo s specifičnimi sekvenčnimi adapterji, jih pritrdimo na površino posebnih mikro ali nano kroglic (ang. Ion Sphere Particles) in jih klonsko pomnožimo z emulzijskim PCR. Vse skupaj prelijemo preko mikro ali nano reaktorskih posodic na silicijevi rezini (»čipu«) (ThermoFisher Scientific, 2016).



Slika 7: Polprevodni čip (povzeto po Singer, 2010)

Figure 7: Semiconductor chip (adapted from Singer, 2010)

V reaktorskih posodicah na čipu poteka reakcija pomnoževanja. Vsakič, ko polimeraza DNA tvori fosfodiestersko vez in vgradi nov komplementaren nukleotid, se s 3'-hidroksilne skupine sprosti H⁺ proton, ki generira spremembo pH vrednosti, ki v polprevodniški plasti čipa inducira spremembo napetosti in s tem neposredno pretvarja kemično informacijo v digitalne signale. Hitrost kemijske reakcije poteče izredno hitro, posledica pa je izredno hitro sekvenciranje (ThermoFisher Scientific, 2016).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorčenje

Za spremjanje prisotnosti rotavirusov skupine A in virusa hepatitisa E pri divjadi v Sloveniji smo v obdobju od julija 2014 do novembra 2015 skupno zbrali 117 vzorcev črevesne vsebine divjadi iz 6 lovskih družin. V raziskavo smo vključili 5 vrst redno odstreljene divjadi. Odvzeli smo 71 vzorcev srnjadi (*Capreolus capreolus*), 28 vzorcev divjih prašičev (*Sus scrofa*), 10 vzorcev gamsa (*Rupicapra rupicapra*), 7 vzorcev jelenjadi (*Cervus elaphus*) in 1 vzorec muflona (*Ovis orientalis musimon*).

Lovci iz lovskih družin Škofja Loka, Krvavec, Šmarca Gora, Ljubno, Polhogradec in Laze so odvzeli del črevesa s črevesno vsebino in ga poslali na Veterinarsko fakulteto na Inštitut za varno hrano, krmo in okolje. Vzorci so bili do uporabe shranjeni v zamrzovalniku na -70 °C.

3.2 Priprava vzorcev

Vsek vzorec smo najprej odmrznili, ga prenesli v sterilno vrečko in z medijem RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) pripravili 10%-suspenzijo. Suspenzijo smo nato homogenizirali in centrifugirali 10 minut na 1000 g. Po centrifugiranju smo supernatant shranili na -70 °C za nadaljnjo analizo.

3.3 Izolacija RNA

Za celokupno izolacijo RNA smo uporabili komplet kemikalij QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Nemčija) in postopek izvedli po navodilih proizvajalca. RNA smo izolirali iz 140 µl supernatanta in jo eluirali v 60 µl elucijskega pufra AVE, ki je priložen kompletu.

3.4 Rotavirus skupine A

3.4.1 Dokaz nukleinske kisline RVA z molekularnimi metodami

3.4.1.1 Dokaz nukleinske kisline RVA z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR)

RT-PCR smo izvajali s kompletom kemikalij One-Step RT-PCR kit (Qiagen, Nemčija). Reakcijska mešanica je vsebovala reagente v razmerjih, kot jih predpisuje proizvajalec. Reakcijska mešanica s končnim reakcijskim volumenom 25 µl je vsebovala: 2 µl RNA, 14 µl vode, ki ne vsebuje DNaz in RNaz, 5 µl 5x reakcijskega pufra, 1 µl 10 mM mešanice dNTP, 1 µl S9-as in S9/cs specifičnih začetnih oligo-nt (20 pmol/µl) in 1 µl RT-PCR encimske mešanice. Temperaturni potek pomnoževanja v termopomnoževalniku T3 (Biometra, Nemčija) je potekal z začetno reverzno transkripcijo pri 50 °C 30 min, sledila je 15-minutna denaturacija pri 94 °C. V nadalnjih 40 temperaturnih ciklih je 30 s dolgi denaturacijski na 94 °C sledilo 30 s dolgo prileganje začetnih oligo-nt pri temperaturi 55 °C in 1 min dolgo podaljševanje verige pri 72 °C. RT-PCR se je zaključil z 10-minutnim končnim pomnoževanjem pri 72 °C. Temu je sledilo ohlajanje reakcije na 4 °C. Pomnožene produkte PCR smo določili z agarozno gelsko elektroforezo v 1,8-odstotnem agaroznem gelu po obarvanju z etidijevim bromidom pod UV-svetlobo na podlagi primerjave velikosti produkta pozitivne kontrole in s primerjavo na standardno 100 bp veliko bazno lestvico DNA (Fermentas, Litva). Za pozitivno kontrolo smo izbrali sev RVA, kateremu smo predhodno določili nukleotidno zaporedje. Specifičnost pomnoževanja smo potrdili na podlagi določitve nukleotidnega zaporedja. Za negativno kontrolo v testu smo namesto RNA vzorca uporabljali vodo, ki ne vsebuje DNaz in RNaz.

Tabela 3: Ime in nukleotidno zaporedje začetnih oligo-nt, regija pomnoževanja in velikost pomnoženega produkta (bp)

Table 3: The name and nucleotide sequence of the initial oligo-nt, region of amplification and size of the amplified product (bp)

ime	nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3'	regija	velikost produkta (bp)	referenca
S9-as	ACTTGCCACCAYTGTTCATT	VP7	403	Schumann in sod., 2009
S9/cs	ATGAATGGTTATGYAAYCCDATGGA			Machnowska in sod., 2014

3.4.1.2 Dokaz nukleinske kisline RVA z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času

Teste RT-PCR v realnem času smo izvajali na aparaturi MX3005P (Stratagene, ZDA). Končni volumen reakcijske zmesi našega testa RT-PCR v realnem času s sondom TaqMan je bil 25 µl in je vseboval: 4,75 µl vode, ki ne vsebuje DNaz in RNaz, 12,5 µl 2x reakcijske mešanice, 0,5 µl 50 mM MgSO₄, 0,5 µl ROX (1:10), 1 µl mešanice vseh sedmih začetnih oligo-nt (20 pmol/µl), 0,25 µl sonde VP2-P (5 nM), 0,5 µl mešanice encimov SSIII RT-Plat Taq Mix in 4 µl vzorca RNA.

Temperaturni pogoji, pod katerimi je potekala reakcija, so obsegali reverzno transkripcijo 15 min pri 50 °C in denaturacijo 2 min pri 95 °C. Sledilo je 45 ciklov 15-sekundne denaturacije pri 95 °C in 1 min pomnoževanja pri 60 °C.

Tabela 4: Ime in nukleotidno zaporedje začetnih oligo-nt in MGB sonde, njihovo mesto v genomu in referenčni genom

Table 4: The name and nucleotide sequences of the oligo-nt and MGB probes, their position in the genome and reference genome

	ime	nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3'	mesto v genomu (bp)	referenčni genom	referenca
pozitivno usmerjeni začetni oligo-nt	VP2-F	Vp2-F1	TCTGCAGACAGTTGAACC TATTAA	2627-2652	AB02276
		Vp2-F2	CAGACACGGTTGAACCC ATTAA	2626-2646	X14942
		Vp2-F3	TCGGCTGATACAGTAGAA CCTATAAATG	2591-2618	AY740740
		Vp2-F4	TGTCAGCTGATACAGTAG AACCTATAAATG	2586-2615	AY787652
		Vp2-F5	TCAGCTGACACAGTAGA ACCTATAAATG	2591-2618	DQ005124 in DQ490552
negativno usmerjeni začetni oligo-nt	VP2-R	Vp2-R1	GTTGGCGTTACAGTCG TTCAT	2645-2667	AY740740
				2675-2697	X14942
				2681-2703	AB02276
	VP2-R	Vp2-R2	GTTGGCGTCTACAATTG TTCAT	2645-2667	DQ005124 in DQ490552
				2642-2664	AY787652
MGB sonda	Vp2-P		6-FAM- ATGCGCATRTTRTCAAHH GCAA-MGB	2622-2643 2619-2640 2652-2673 2658-2679	DQ005124 in DQ490552 AY78765 X14942 AB02276

Gutiérrez-Aguirre in
sod., 2008

3.4.2 Določitev nukleotidnega zaporedja pozitivnega vzorca RVA D38/14 z metodo sekvenciranja naslednje generacije

3.4.2.1 Metoda NGS

Knjižnico RNA smo pripravili s kompletom Ion Total RNA Sequencing Kit v2 (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent, Carlsbad, CA, ZDA) v skladu z navodili proizvajalca (protocol 4476286, revision D), z izjemo, da smo uporabili krajši čas fragmentacije (1 minuto). Emulzijski PCR in obogatitev smo opravili s kompletom Ion PGM™ Template OT2 200 Kit (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent, Carlsbad, CA, ZDA) v skladu z navodili proizvajalca (MAN0007221, revision A.0), z izjemo, da smo za sekvenciranje uporabili koncentracijo knjižnice 10 pM. Koncentracijo in kvaliteto knjižnice NGS smo določali s kapilarno elektroforezo LabChip GX (Perkin Elmer, ZDA). Tako pripravljeno knjižnico smo sekvencirali s tehnologijo Ion Torrent na platformi Ion PGM (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Odčitke smo uredili s programom Ion Torrent Suite v5.0.2.

3.4.3 Analiza odčitkov NGS

Glede na kratko nukleotidno zaporedje VP7 smo v podatkovni zbirki GenBank izbrali referenčni genom PA169 (številka vnosa EF554126-EF554136). S prileganjem odčitkov na referenčni genom smo sestavili konzensusno zaporedje virusnega genoma in pri tem uporabili program Geneious (Biomatters Limited). Konsensusno zaporedje smo tudi ročno pregledali. S programom BLAST smo posamezne odseke genoma primerjali z najbolj podobnimi sevi iz genske banke GenBank. Genotip virusa smo določili na podlagi polimorfizmov in primerjave insercij/delecij ter priporočil za klasifikacijo rotavirusov RCWG.

3.4.4 Filogenetska analiza odsekov VP4 in VP7

Razporeditev nukleotidov odsekov VP4 in VP7 ter primerjalne analize nukleotidnih zaporedij smo izvedli s programom ClustalW, ki je del programa MEGA 6.06 (Tamura in sod., 2013). Iz njih smo na podlagi Kimurovega dvoparametričnega evolucijskega modela (Kimura, 1980) določili genetske razlike (ang. divergence). Filogenetska drevesa smo izdelali z metodo največje verjetnosti (ang. Maximum Likelihood) (Saitou in Nei, 1987), ki je del programa MEGA6.06. Z metodo samovzorčenja (ang. bootstrapping) smo ocenili zanesljivost

filogenetskih dreves in vrednosti statistične podpore posameznih cepitev vpisali na vozlišča dreves, na katerih prikazujejo odstotek ponovljivosti posameznega vozlišča pri 1000 samovzorčenjih.

3.5 Virus hepatitis E

3.5.1 Dokaz nukleinske kisline HEV z molekularnimi metodami

3.5.1.1 Dokaz nukleinske kisline HEV z metodo RT-PCR

Reakcijska mešanica je vsebovala reagente v količinah, kot jih predpisuje proizvajalec. Reakcijska mešanica s končnim reakcijskim volumnom 25 µl je vsebovala: 2 µl RNA, 14 µl vode, ki ne vsebuje DNaz in RNaz, 5 µl 5x reakcijskega pufra, 1 µl 10 mM mešanice dNTP, 1 µl ORF1-S1 in ORF1-a1 specifičnih začetnih oligo-nt (20 pmol/µl) in 1 µl RT-PCR encimske mešanice. Temperaturni potek pomnoževanja v termopomnoževalniku T3 (Biometra, Nemčija) je potekal z začetno reverzno transkripcijo pri 50 °C 30 min, sledila je 15-minutna denaturacija pri 94 °C. V nadalnjih 40 temperaturnih ciklih je 30 s dolgi denaturaciji na 94 °C sledilo 30 s dolgo prileganje začetnih oligo-nt pri temperaturi 55 °C in 1 min dolgo podaljševanje verige pri 72 °C. RT-PCR se je zaključil z 10-minutnim končnim pomnoževanjem pri 72 °C. Temu je sledilo ohlajanje reakcije na 4 °C. Pomnožene produkte PCR smo določili z agarozno gelsko elektroforezo v 1,8-odstotnem agaroznem gelu po obarvanju z etidijevim bromidom pod UV-svetlobo na podlagi primerjave velikosti produkta pozitivne kontrole in s primerjavo na standardno 100 bp veliko bazno lestvico DNA (Fermentas, Litva). Za pozitivno kontrolo smo izbrali sev HEV, kateremu smo predhodno določili nukleotidno zaporedje. Za negativno kontrolo v testu smo namesto RNA vzorca uporabljali vodo, ki ne vsebuje DNaz in RNaz.

Tabela 5: Ime in nukleotidno zaporedje začetnih oligo-nt, regija pomnoževanja in velikost pomnoženega produkta (bp)

Table 5: The name and nucleotide sequence of the initial oligo-nt, region of amplification and size of the amplified product (bp)

ime	nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3'	regija	velikost produkta (bp)	referenca
ORF1-s1	CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC	ORF1	418	Schlauder in sod., 1999
ORF1-a1	CCATCRARRCAGTAAGTGCAGTC			

3.5.1.2 Dokaz nukleinske kisline HEV z metodo RT-PCR v realnem času

Teste RT-PCR v realnem času smo izvajali na aparaturi MX3005P (Stratagene, ZDA). Končni volumen reakcijske zmesi našega testa RT-PCR v realnem času s sondom TaqMan je bil 25 µl in je vseboval: 5 µl vode, ki ne vsebuje DNaz in RNaz, 12,5 µl 2x reakcijske mešanice, 0,5 µl 50 mM MgSO₄, 0,5 µl ROX (1:10), 0,75 µl vsakega začetnega oligo-nt JVHEV-F/R (20 nM), 0,5 µl sonde JVHEV-P (5 nM), 0,5 µl mešanice encimov SSIII RT-Plat Taq Mix in 4 µl vzorca RNA.

Temperaturni pogoji, pod katerimi je potekala reakcija, so obsegali reverzno transkripcijo 15 min pri 50 °C in denaturacijo 10 min pri 95 °C. Sledilo je 45 ciklov 15-sekundne denaturacije pri 95 °C in 1 min pomnoževanja pri 55 °C.

Tabela 6: Ime in nukleotidno zaporedje začetnih oligo-nt in sonde, regija, mesto v genomu in referenčni genom

Table 6: The name and nucleotide sequence of the initial oligo-nt, probes, region, location in the genome and the reference genome

	ime	nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3'	regija	mesto v genomu (bp)	referenčni genom	referenca
pozitivno usmerjeni začetni oligo-nt	JVHEV-F	GGTGGTTCTGGGTGAC	ORF3	5261–5330	M73218	Jothikumar in sod., 2006
negativno usmerjeni začetni oligo-nt	JVHEV-R	AGGGGTTGGTTGGATGA A				
sonda	JVHEV-P	6-FAM- TGATTCTCAGCCCTCGC-BMQ				

4 REZULTATI

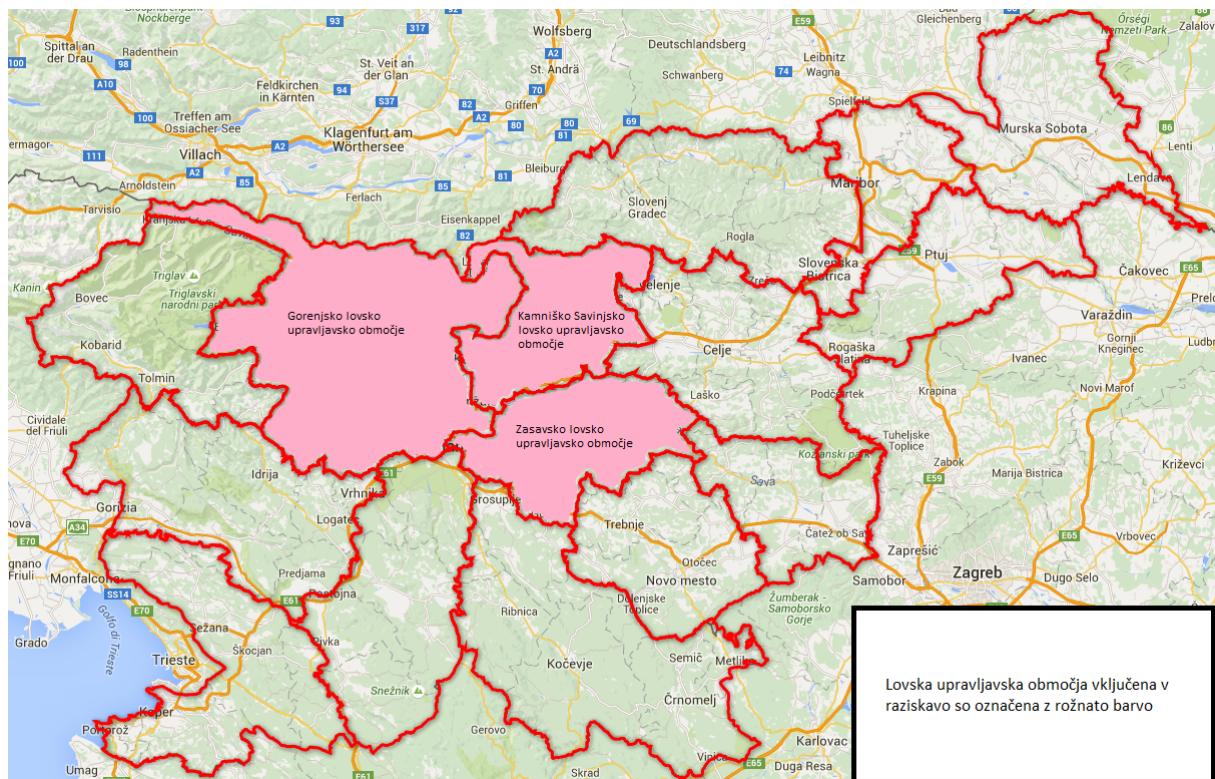
4.1 Vzorčenje

V raziskavi smo na prisotnost virusa hepatitisa E in rotavirusov skupine A testirali 117 vzorcev petih vrst divjadi: 71 vzorcev srnjadi (*Capreolus capreolus*), 28 vzorcev divjih svinj (*Sus scrofa*), 10 vzorcev gamsov (*Rupicapra rupicapra*), 7 vzorcev jelenjadi (*Cervus elaphus*) in 1 vzorec muflona (*Ovis orientalis musimon*).



Slika 8: Delež vzorcev posamezne vrste divjadi

Figure 8: A proportion of samples of each game species



Slika 9: Geografsko področje lovskih upravljavskih območij vključenih v raziskavo

Figure 9: Geographical area of hunting managed areas included in the survey

Raziskava je potekala v obdobju med julijem 2014 in novembrom 2015. Vzorčenje so opravili lovci iz lovskih družin Škofja Loka, Krvavec, Šmarna Gora, Ljubno, Polhov Gradec in Laze. Geografsko področje lovskih upravljavskih območij, v katere spadajo loveske družine je prikazano na sliki 9.

Tabela 7: Število vzorcev glede na lovsko družino in lovsko upravljavsko območje

Table 7: The number of samples depending on the hunting family and hunting managed areas

Lovska družina	Število vzorcev	Lovsko upravljavsko območje	Število vzorcev
Škofja Loka	56		
Krvavec	18		
Šmarna Gora	6	Gorenjsko	84
Polhov Gradec	4		
Ljubno	25	Kamniško Savinjsko	25
Laze	8	Zasavsko	8

4.2 Rotavirus skupine A

4.2.1 Dokaz nukleinske kisline RVA z molekularnimi metodami

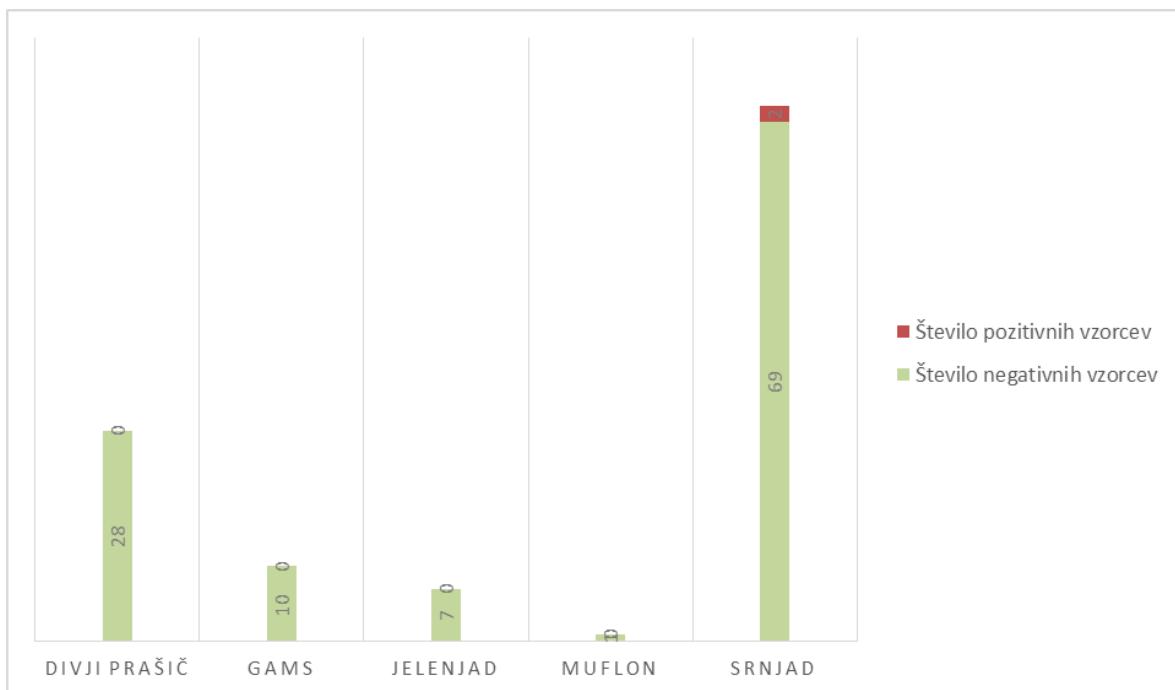
Vzorce smo na prisotnost RVA RNA testirali z dvema molekularnima metodama, RT-PCR in RT-PCR v realnem času.

Tabela 8: Rezultati prisotnosti RVA RNA z metodo RT-PCR in metodo RT-PCR v realnem času (n=117)

Table 8: RT-PCR and real-time RT-PCR results for the presence of RV RNA (n=117)

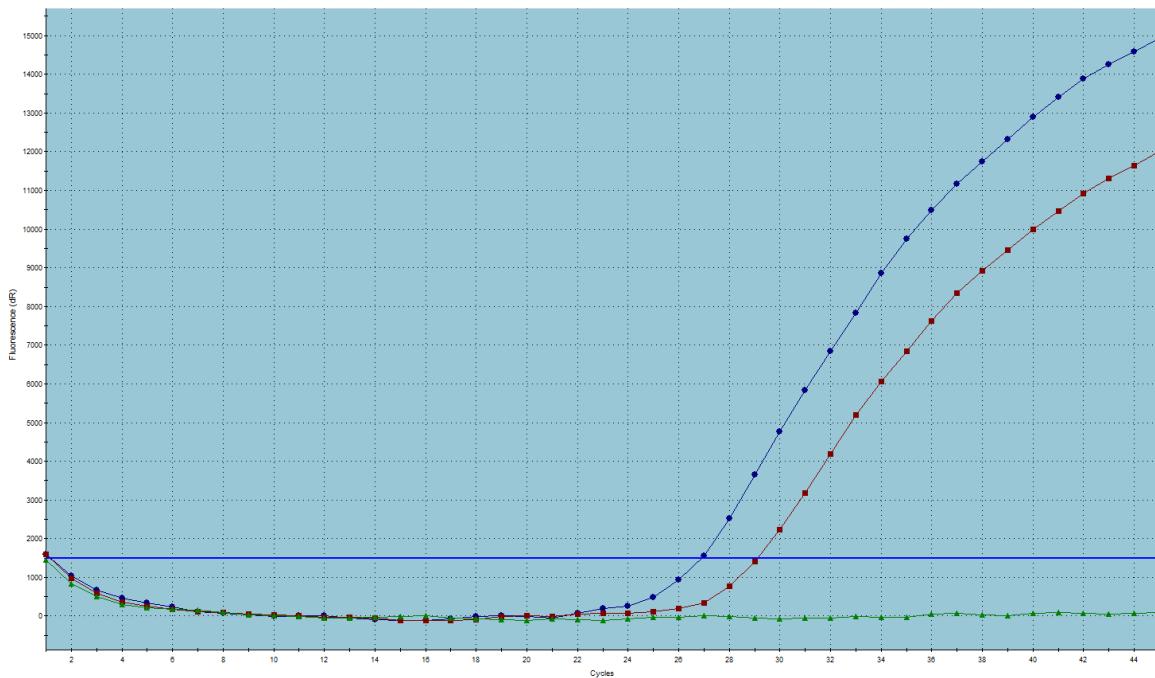
	RT-PCR (pozitivni/vsi)	RT-PCR v realnem času (pozitivni/vsi)
divji prašič	0/28	0/28
srnjad	2/71	2/71
jelenjad	0/7	0/7
gams	0/10	0/10
muflon	0/1	0/1

RVA RNA smo z metodo RT-PCR in z metodo RT-PCR v realnem času dokazali v dveh vzorcih, v vzorcu številka D38/14 in vzorcu številka D110/15. Vzorec D38/14 je bil odvzet 23. septembra 2014 pri Svetem Ožbaltu na območju Lovske družine Škofja Loka, na področju, kjer v bližini ni pašnikov ali kmetij. Vzorec D38/14 pripada srni stari 5 mesecev, primerne kondicije in brez kliničnih znakov. Vzorec D110/15 pa je bil odvzet 25. septembra 2015, na območju lovske družine Krvavec ter prav tako pripada srni.



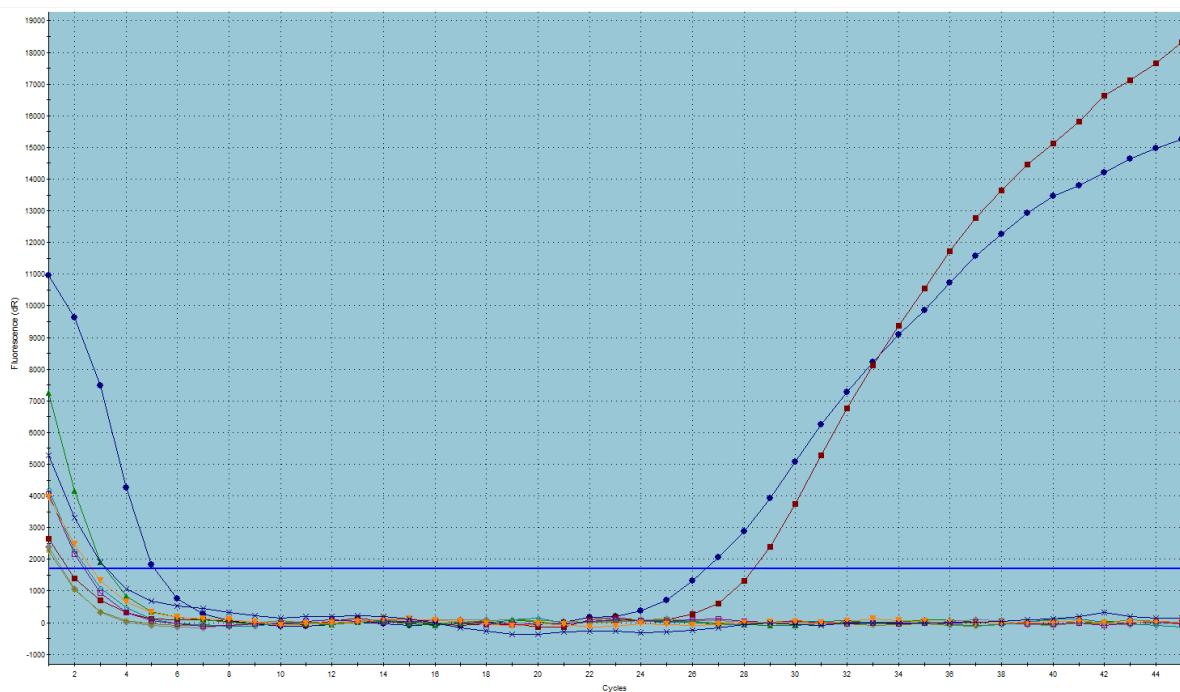
Slika 10: Rezultati prisotnosti RVA RNA (n=117)

Figure 10: The results for the presence of RV RNA (n=117)



Slika 11: Krivulja intenzitete fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri RT-PCR v realnem času za pozitivni vzorec D38/14 (modra krivulja), pozitivno kontrolo (rdeča krivulja) in negativno kontrolo (zelena krivulja)

Figure 11: The curve of fluorescence intensity in correlation with the number of cycles for positive sample D38/14 (blue curve), positive control (red curve) and a negative control (green curve) in real time RT-PCR reaction



Slika 12: Krivulja intenzitete fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri RT-PCR v realnem času za pozitivni vzorec D110/15 (modra krivulja), pozitivno kontrolo (rdeča krivulja) in negativno kontrolo (zelena krivulja)

Figure 12: The curve of fluorescence intensity in correlation with the number of cycles for positive sample D110/14 (blue curve), positive control (red curve) and a negative control (green curve) in real time RT-PCR reaction

4.2.2 Analiza z metodo NGS in določitev celotnega virusnega genoma D38/14

Celotni genom seva PA169 smo uporabili kot referenco za izdelavo celotnega genoma RVA seva D38/14. 3.662 odčitkov smo poravnali z referenčno sekvenco z 18.488 nt, s povprečno globino prekrivanja 22,9. Najmanjše prekrivanje je vključevalo 300-400 nt dolgo regijo odseka VP4, kjer ni bilo odčitkov, ki bi jih lahko poravnali.

Konsenzusno zaporedje odseka VP4 smo primerjali z drugimi RVA zaporedji v podatkovni zbirki GenBank, s programom BLAST. Ugotovili smo, da odsek VP4 pripada genotipu P[15]. Pripravili smo nov referenčni genom, in sicer smo sevu PA169 odsek VP4 zamenjali s odsekom genotipa P[15]. Izdelavo celotnega genoma seva D38/14 smo ponovili s prileganjem odčitkov na nov referenčni genom. Na nov referenčni genom smo poravnali 3.781 odčitkov s povprečno globino prekrivanja 23,2 po celotni dolžini referenčnega genoma.

Ugotovili smo, da je celotna sestava rotavirusnega genotipa seva D38/14, G6-P[15]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3 in je prva opisana taka kombinacija na svetu.

Nukleotidno zaporedje vseh 11 odsekov genoma smo poslali v podatkovno zbirko GenBank, kjer so jim dodelili številko vnosa (ang. accession number): KU708256 (VP7), KU708257 (VP4), KU708258 (VP6), KU708259 (VP1), KU708260 (VP2), KU708261 (VP3), KU708262 (NSP1), KU708263 (NSP2), KU708264 (NSP3), KU708265 (NSP4) in KU708266 (NSP5 in NSP6).

Iz analize celotnega genoma in karakteristik predstavljenih v tabeli 10 je razvidno, da sev D38/14 pripada sestavi genoma DS-1, ugotovljenem pri govedu, ovcah, kozah in drugih kopitarjih. Sevu D38/14 so najbolj sorodni živalski ali zoonotski G6 sevi odkriti pri ljudeh. Nukleotidno zaporedje našega seva se z genomom G6 ujema v 95 % - 99 %, razen odsek VP4, kjer je ujemanje nukleotidnega zaporedja le 89,7-%.

Tabela 9: Genotipska razporeditev genoma in celotno nukleotidno zaporedje: primerjava z reprezentativnimi sevi iz genske banke

Table 9: Genome genotype constellation and whole genome nucleotide sequence: comparison with those of the representative strains from GenBank

nukleotidna primerjava celotnega genoma in reprezentativnih sevov iz genske banke									
	sevi iz genske banke z najvišjim ujemanjem	PA169	P343	UK	NCDV	Bo, G6P[1]	Hu, G6P[1]	Hu, G6P[14]	LLR
VP1 R2	MD4246	97,3 %	govedo	91,6	91,1	92,0	95,0	86,7	86,4
VP2 C2	88977	KJ940162	97,7 %	pes	85,5	85,2	96,1	88,7	88,9
VP3 M2	F343	AB972858	97,2 %	prasik	90,8	97,2	91,9	91,6	83,3
VP4 P[15]	LLR	JQ013306	89,7 %	ovca	67,2	71,2	70,5	73,6	67,4
VP6 I2	Uktc	X53667	98,6 %	govedo-tc	97,5	97,2	98,6	93,5	95,9
VP7 G6	PA169	EF554131	96,9 %	človek	96,9	77,0	83,9	84,7	96,9
NSP1 A3	A44	U23726	96,3 %	govedo	95,1	93,4	88,1	94,2	94,4
NSP2 N2	F343	AB972863	99,0 %	prasik	92,7	99,0	88,2	88,4	92,9
NSP3 T6	PA169	EF554134	97,1 %	človek-tc	97,1	94,6	81,6	95,2	90,1
NSP4 E2	BP1062	FN665697	96,4 %	človek	93,9	91,4	86,0	86,2	95,8
NSP5 H3	B383	FJ347121	98,2 %	govedo	97,6	96,2	93,1	97,3	97,6

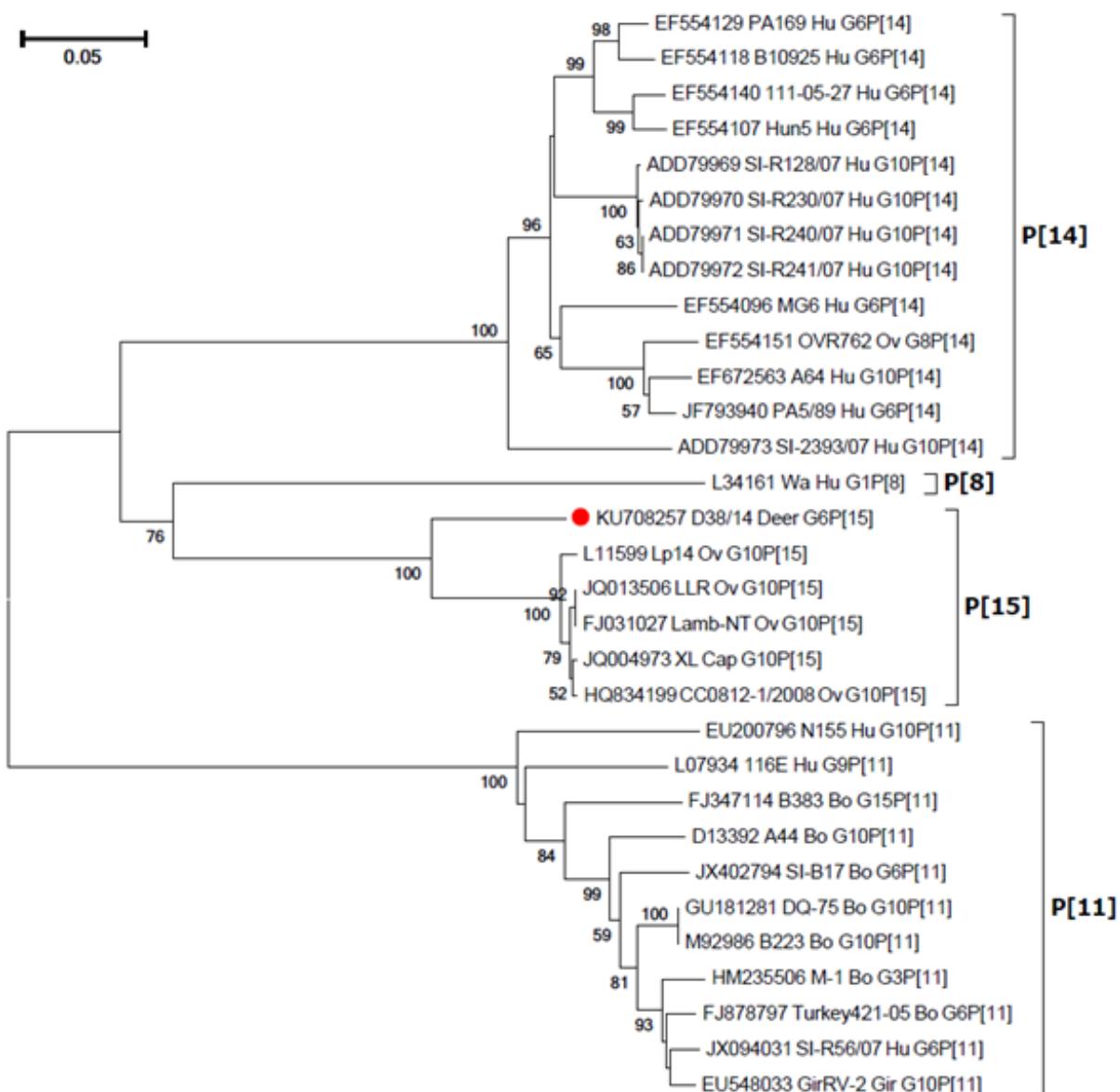
Legenda: Hu – človek; Bo – bovin; Ov – ovčji; Po – prasiki

4.2.3 Določanje nukleotidnega zaporedja RVA v regiji VP4

Iz primerjalnih analiz nukleotidnih zaporedij odsekov VP4 smo med posameznimi zaporedji določili genetske razlike in izdelali filogenetska drevesa. Drevesa smo v odseku VP4 izdelali z metodo največje verjetnosti.

Filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij odseka VP4 smo izvedli na 30 nukleotidnih zaporedjih, pridobljenih iz genske banke in našem sevu D38/14.

Po primerjalni analizi smo ugotovili, da ima najbolj soroden sev v genski banki le 90-% nukleotidno identičnost z VP4 D38/14. Nizko ujemanje seva D38/14 z ostalimi sevi P[15] je potrdila tudi filogenetska analiza. Nukleotidno zaporedje VP4 seva D38/14 je najbolj sorodno ovčjemu-kozjemu sevu G10P[15] iz Kitajske. Ujemanje teh dveh sevov je od 89,3-% do 89,6-%. Visoka vrednost samovzorčenja potrjuje, da sev D38/14 ni uvrščen med seve G10P[15], ampak tvori svojo vejo v filogenetskem drevesu (slika 13).



Slika 13: Filogenetsko drevo odseka VP4

Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij odseka VP4 z P[8], P[11], P[14] in P[15] skupinami genotipov in sev D38/14 (označen z rdečim krogom) znotraj genotipa P[15]. Vrednosti pod 50 niso prikazane. Hu – humani; Bo – bovini; Ov – ovčji; Cap – kozji

Figure 13: The VP4 phylogenetic tree

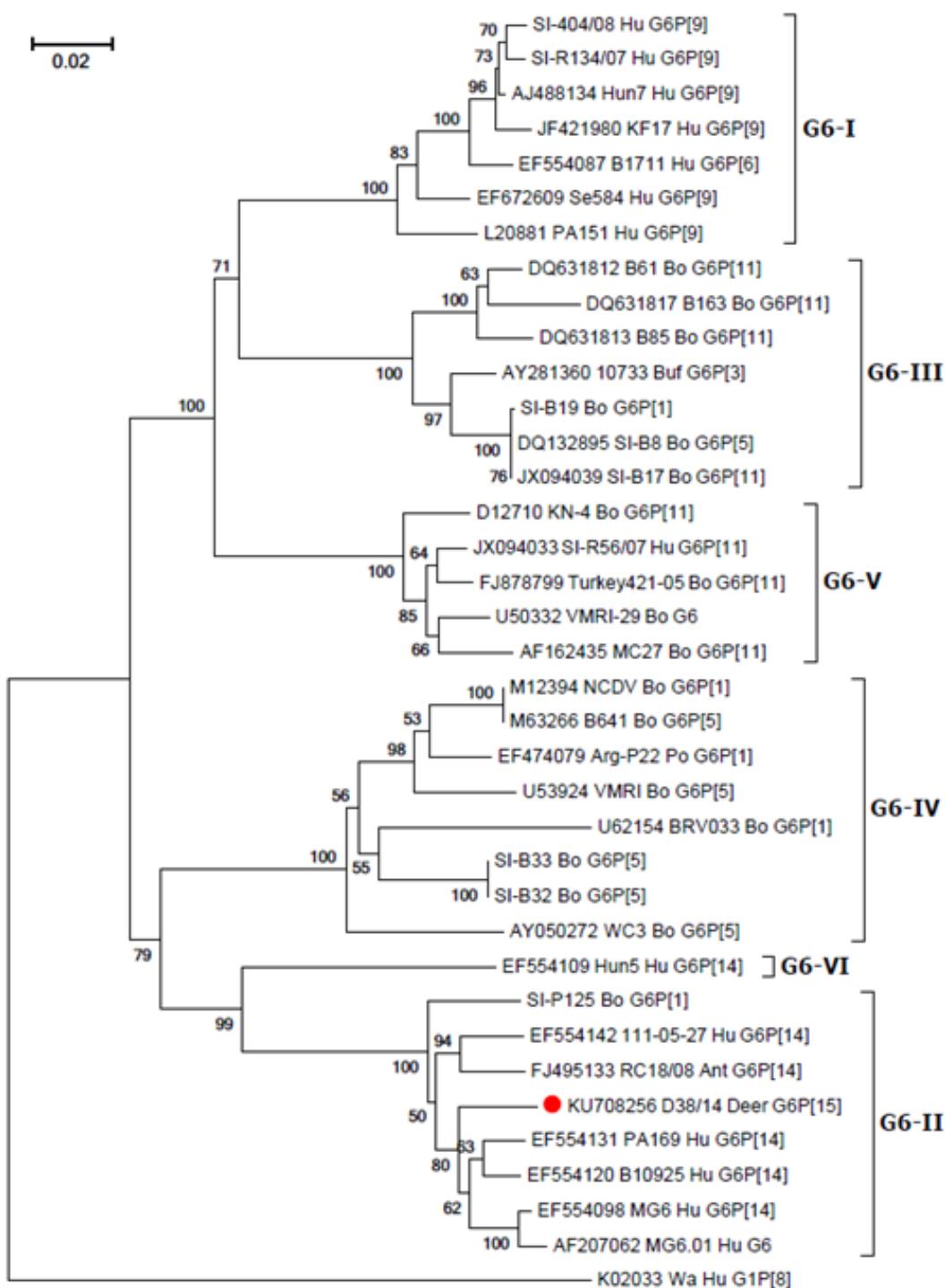
The VP4 phylogenetic tree with P[8], P[11], P[14] and P[15] genotype groups and strain D38/14 (marked with a red circle) within the P[15] genotype. Bootstrap values below 50 are not shown. Hu – human; Bo – bovine; Ov – ovine; Cap – caprine

4.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja RVA v regiji VP7

Iz primerjalnih analiz nukleotidnih zaporedij odsekov VP7 smo med posameznimi zaporedji določili genetske razlike in izdelali filogenetsko drevo. Drevo smo v odseku VP7 izdelali z metodo največje verjetnosti. Filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij odseka VP7 smo izvedli na 36 nukleotidnih zaporedjih, pridobljenih iz genske banke in našem sevu D38/14. Filogenetsko drevo odseka VP7 ima šest vej z nukleotidnimi razlikami znotraj vej od 88,6 % do 100 % in z nukleotidnimi razlikami med vejami od 77,8 % do 88,5 %.

Nukleotidno zaporedje odseka VP7 seva D38/14 se v filogeneskem drevesu nahaja znotraj veje, kamor uvrščamo tudi nekatere humane zoonotske seve G6. Ujemanje seva D38/14 in zoonotskih humanih sevov G6-II je od 94,5 % do 99 % in od 78,5 % do 86,7 % z ostalimi sevi G6 (slika 14).

Sev D38/14 je bil uvrščen v skupino A rotavirusov genotipa G6, ki je najbolj soroden človeškemu sevu PA169, ki izvira iz goveda in ima genotipsko kombinacijo G6P[14].



Slika 14: Filogenetsko drevo odseka VP7

Filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij odseka VP7 z vejami genotipov G6-I do G6-VI. Vrednosti pod 50 niso prikazane. Sev D38/14 je označen z rdečim krogom. Hu – humani; Bo – bovini; Ant – antilopji; Po – prašičji; Buf – bivolji

Figure 14: The VP7 phylogenetic tree

The VP7 phylogenetic tree with G6 genotype lineage assignments G6-I to G6-VI. Bootstrap values below 50 are not shown. The roe deer strain D38/14 is marked (red circle). Hu – human; Bo – bovine; Ant – antelope; Po – porcine; Buf – Buffalo

4.3 Virus hepatitisa E

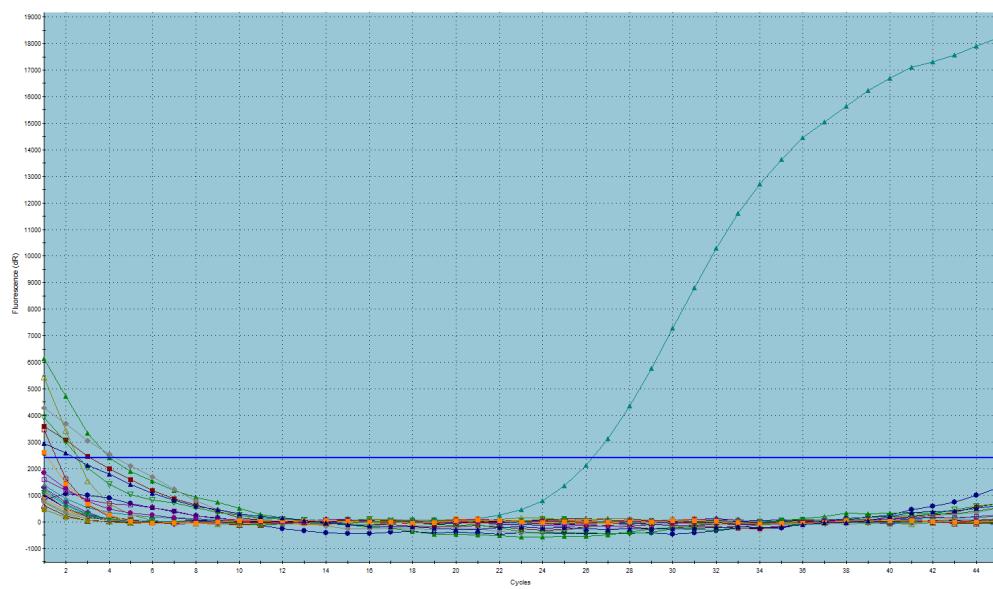
4.3.1 Dokaz nukleinske kisline HEV z molekularnimi metodami

Vzorce smo na prisotnost HEV testirali z dvema molekularnima metodama, RT-PCR in RT-PCR v realnem času.

Tabela 10: Rezultati prisotnosti HEV RNA z metodo RT-PCR in metodo RT-PCR v realnem času (n=117)

Table 10: RT-PCR and real-time RT-PCR results for the presence of HEV RNA (n=117)

	RT-PCR (pozitivni/vsi)	RT-PCR v realnem času (pozitivni/vsi)
divji prašič	0/28	0/28
srnjad	0/71	0/71
jelenjad	0/7	0/7
gams	0/10	0/10
muflon	0/1	0/1



Slika 15: Krivulja intenzitete fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri RT-PCR v realnem času za negativne vzorce testirane na HEV in pozitivno kontrolo (zelena krivulja)

Figure 15: The curve of fluorescence intensity in correlation with the number of cycles for positive control (green curve) and for negative samples in real time RT-PCR reaction

5 RAZPRAVA

V naši raziskavi smo se pri spremeljanju prisotnosti virusov osredotočili predvsem na dva povzročitelja črevesnih nalezljivih bolezni, to so virus hepatitisa E (HEV) in rotavirusi skupine A (RVA). HEV in RVA lahko povzročita izbruhe bolezni ali sporadične primere bolezni pri ljudeh (Machnowska, 2014). Oba se lahko prenašata iz živali na ljudi (Steyer, 2007; Pavio in sod., 2010). Prenos iz divjih živali na ljudi predstavlja za inštitucije, ki se ukvarjajo z zdravstvenim varstvom ljudi nov izziv, saj se uživanje divjačine ves čas povečuje (Erzar in sod., 2005), prav tako pa so se divje živali prilagodile bivanju v bližini ljudi (Krže, 1982 in 2000), s čimer se povečuje možnost virusne kontaminacije pašnih in poljedelskih površin.

Z razvojem hitrejših, zanesljivejših in specifičnih molekularnih metod je določanje in analiza virusov lažja, poleg tega na podlagi ugotovitev lahko določimo poti širjenja virusnih okužb. Tako pridobimo veliko informacij, ki bi nam v prihodnosti lahko pomagale pri zagotavljanju primernih preventivnih ukrepov in zmanjševanju stroškov zdravljenja bolezni.

Z raziskavo smo določili pogostost okužbe divjih živali s HEV in RVA, testiranih na nekaterih geografskih področjih v Sloveniji. V ta namen smo uporabili molekularni metodi RT-PCR in RT-PCR v realnem času. Prisotnost RVA RNA smo dokazali v dveh vzorcih, D38/14 in D110/15. Enemu izmed dveh pozitivnih vzorcev smo določili nukleotidno zaporedje in mu z uporabo filogenetskih orodij določili celotno nukleotidno zaporedje genoma.

5.1 Rotavirus skupine A

Pogostost RVA je nizka, saj smo virus dokazali le pri dveh od 71 vzorcev srnjadi (2,8 %), oziroma pri 1,7 % vseh vzorcev. V splošnem velja, da je pojavnost rotavirusov najvišja pri mladih živalih številnih živalskih vrst (Estes in Kapikian, 2007) in da je za rotavirusne okužbe značilno sezonsko pojavljanje. Največ okužb se v zmernem podnebnem pasu zgodi pozimi (Žnuderl, 2010). Nizko število pozitivnih vzorcev v raziskavi je zato lahko posledica vzorčenja v vseh starostnih skupinah oziroma naključnega vzorčenja preko celega leta.

V vzorcih smo prisotnost rotavirusov dokazali z metodo RT-PCR v realnem času, s katero dokazujemo širok spekter sevov rotavirusov iz vzorcev ljudi in številnih živalskih vrst. Metodo so razvili Gutiérrez-Aguirre in sodelavci (2008) in pomnožuje gen za strukturni protein VP2, ki je eden izmed najbolj ohranjenih genov RVA. Izbrana metoda je bila za našo raziskavo primerna, saj smo pričakovali RVA genotip C2, ki ga izbrana metoda tudi določa.

V raziskavi smo z metodo NGS prvi na svetu dokazali in določili celoten genom rotavirusa pri srni. Rezultate raziskave smo tudi objavili v mednarodni reviji s faktorjem vpliva (Jamnikar Ciglenečki in sod., 2016). Sev D38/14 smo uvrstili v skupino A rotavirusov. Poleg tega smo ugotovili in prvi na svetu opisali genotipsko kombinacijo G6P[15], kamor spada rotavirus skupine A D38/14 (Jamnikar Ciglenečki in sod., 2016). Sev D38/14 predstavlja tipično sestavo genoma DS-1, z izjemo odseka VP4 (G6-P[15]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3), ki je bila v preteklosti že opisana pri različnih živalskih vrstah, tudi pri govedu in drugih prezvekovalcih (Matthijnsens in sod., 2009a). Odsek VP4 našega seva pripada genotipu P[15], kljub temu pa se v 89,7 % razlikuje od drugih genotipov P[15], opisanih pri ovcah in pri kozi (G10P[15]) na Kitajskem (Chen et al., 2009; Shen et al., 1993). Prav zato obstaja zelo majhna verjetnost, da bi sev D38/14 izviral iz ovčjega-kozjega seva G10P[15]. Trenutno še ne moremo potrditi ali je v primeru seva D38/14 prišlo do rekombinacije med G10P[15] in drugimi G6 sevi, saj so za to potrebne dodatne analize.

Filogenetsko drevo odseka VP7 ima šest vej z nukleotidnimi razlikami znotraj vej od 88,6 % do 100 % in z nukleotidnimi razlikami med vejami od 77,8 % do 88,5 %. Rotavirusni sevi skupine A G6P[5] in G6P[1] najdeni pri govedu, večinoma spadajo v skupino G6-IV, medtem ko spadajo goveji G6P[11] v skupino G6-V in G6-III. Predstavniki zoonotske skupine G6-I so večinoma sevi G6P[9], ki so jih dokazali pri ljudeh. Podoben zoonotski potencial predstavlja tudi skupina G6-II, kamor spadajo rotavirusni sevi skupine A G6P[14]. Ker spada tudi sev D38/14, ki smo ga našli pri srni, v skupino G6-II zanj predvidevamo, da ima zoonotski potencial (Jamnikar Ciglenečki in sod., 2016).

Z razvojem molekularne diagnostike dokazovanja virusov ves čas prihaja tudi do odkrivanja novih genotipov rotavirusov. Veliko raznolikost rotavirusnih genotipov lahko pripišemo prerazporejanju genoma med človeškimi in živalskimi rotavirusi (Steyer, 2007). Prav tako se rotavirusi v velikih količinah izločajo z iztrebki okuženih živali, infektivna doza je nizka, v

okolju pa so zelo obstojni. Ti dejavniki omogočajo direkten ali indirekten prenos rotavirusov iz divjih ali domačih živali na ljudi (Greening, 2006). V splošnem velja, da so rotavirusi prisotni pri divjih prežvekovalcih (Ghosh in Kobayashi, 2011), pa vendar je bila do sedaj na tem področju objavljena le ena raziskava leta 1979, kjer so rotavirus pri jelenjadi (*Cervidae*) dokazali z metodo gelske elektroforeze (Tzipori in sod., 1976).

Srnjad je splošno razširjena vrsta divjadi, ki živi blizu poljedelskih površin in ravno zaradi svoje prilagodljivosti velja za najštevilčnejšo divjad v Sloveniji (Marolt, 2009). Zaradi tega bi lahko do prenosa rotavirusov iz srnjadi na ljudi prišlo na različne načine, na primer preko direktnega stika lovca z uplenjeno srno med evisceracijo trupa in odstranjevanjem črevesa, preko kontaminacije svojih rok. Takšen trup bi ob vstopu v prehransko verigo ob sočasnem neupoštevanju higieniskih priporočil lahko predstavljal vir okužbe za potrošnike. Poleg tega bi do okužbe ljudi lahko prišlo ob stiku ljudi s površinami, vodo ali ostalimi viri iz poljedelskih in pašnih površin, kontaminiranih s iztrebkom srnjadi, ki je kontaminiran z rotavirusi. Kontaminirano okolje je možen vir okužbe tudi za druge divje živali in za domače živali, ki so v stiku s srnjadjo. Verjetnost za prenos na zgoraj opisane načine je sicer majhna, saj so v Evropi dokazani redki primeri medvrstnega prenosa ter prerazporejanja genoma med človeškimi in živalskimi rotavirusi (Steyer, 2007). Kljub temu ne moremo zanemariti dejstva, da odkritje potencialno zoonotskega seva rotavirusa skupine A pri srnjadi v Sloveniji pomeni, da je srnjad možen rezervoar le tega. Ta bi v prihodnosti lahko povzročal okužbe in bolezni pri ljudeh.

5.2 Virus hepatitisa E

V raziskavi smo z molekularnimi metodami dokazovali prisotnost HEV pri divjih živalih. O prisotnosti HEV pri divjih živalih poročajo iz številnih držav. Protitelesa proti HEV ali nukleinsko kislino so pri divjih prašičih dokazali na Japonskem (Michitaka in sod., 2007), Švedskem (Widen in sod., 2011), Madžarskem (Forgách in sod., 2010), Nizozemskem (Rutjes in sod., 2010), v Franciji (Carpentier in sod., 2012), Nemčiji (Kaci in sod., 2008), Italiji (Martelli in sod., 2008), Španiji (De Deus in sod., 2007) in Avstraliji (Chandler in sod., 1999). Protitelesa proti HEV ali nukleinsko kislino so pri jelenjadi dokazali na Japonskem (Matsuura in sod., 2007; Tomiyama in sod., 2009), v Severni Mehiki (Medrano in sod., 2012) in v številnih drugih državah. Na Nizozemskem (Rutjes in sod., 2010), v Nemčiji (Neumann

in sod., 2016), ter na Madžarskem (Forgách in sod., 2010) pa so poleg protiteles proti HEV in nukleinske kisline pri jelenjadi, le-to dokazali tudi pri srnjadi. Divji prašiči poleg domačih prašičev veljajo za glavni rezervoar okužb s HEV, dokazan pa je bil tudi zoonotski prenos HEV iz divjih prašičev in jelenjadi na ljudi (Pavio in sod., 2010).

Seroprevalenca HEV pri divjih prašičih iz različnih držav znaša od 17 do 42 %, prevalenca HEV RNA pa od 3 do 25 %. Leta 2015 so v Sloveniji na prisotnost protiteles in HEV RNA pregledali 288 vzorcev serumov divjih prašičev in ugotovili 30,21 % seroprevalenco, le enemu izmed serološko pozitivnih vzorcev pa so dokazali HEV RNA (Žele in sod., 2015). Podobne rezultate so dobili tudi v raziskavi v Italiji (Martinelli in sod., 2013). Zato menimo, da je negativen rezultat v naši raziskavi verjetno posledica prenizkega števila pregledanih vzorcev, ki v okolje tisti trenutek niso izločali virusa. Rezultat je lahko tudi posledica izbora vrste vzorca. V različnih raziskavah so dokazali HEV v različnih vrstah vzorcev, v iztrebku, jetrih, serumu, žolču in mišičnini, skoraj vedno pa je bil HEV dokazan v jetrih ali žolču (Martinelli in sod., 2013), zato bi mogoče z dokazovanjem HEV v jetrih ali žolču dokazali HEV tudi pri divjih prašičih v tej raziskavi.

Pogostost HEV pri divjih prežvekovalcih je zelo slabo raziskana. Na Japonskem so na področju, kjer so dokazali HEV RNA pri 3 od 7 divjih prašičev, dokazali le 1 % HEV RNA pozitivnih srn (Takahashi in sod., 2004), v drugi raziskavi na Japonskem so dokazali 4 % seroprevalenco pri srnjadi, vendar niti serum niti jetra niso vsebovala HEV RNA. Avtor raziskave na Madžarskem za nižji odstotek pozitivnih vzorcev iztrebkov kot možnost navaja, da prežvekovalci virus v iztrebku izločajo krajši čas ali v nižjih koncentracijah in zato virusa z diagnostičnimi metodami ni bilo mogoče dokazati (Forgách in sod., 2010). Za dokazovanje HEV RNA je bila v naši raziskavi odvzeta črevesna vsebina divjih parkljarjev, kar bi lahko botrovalo rezultatom naše raziskave, saj HEV RNA pri srnjadi, jelenjadi, gamsih in muflonu v vzorcih črevesne vsebine nismo dokazali. Da bi zagotovili, da katera od metod ne daje lažno negativnih rezultatov, smo vse vzorce pregledali tako z metodo RT-PCR, kot tudi z metodo RT-PCR v realnem času.

Kljub negativnim rezultatom ne moremo trditi, da HEV pri divjih prašičih v Sloveniji ni prisoten, še posebej zato ker je tudi v Sloveniji predhodna raziskava pokazala 30,21-% seroprevalenco in 0,35-% prevalenco HEV pri divjih prašičih v Sloveniji (Žele in sod., 2015).

Glede na različne vrste vzorcev in dobljene rezultate raziskav narejenih v Sloveniji, bi za natančnejšo oceno prevalence HEV med divjimi prašiči potrebovali nadaljnje raziskave, kjer bi vrste vzorcev prilagodili ali povečali njihovo število.

Tudi za potrditev prisotnosti HEV RNA pri ostalih divjih živalih v Sloveniji bi bilo potrebno nadaljnje raziskave omejiti na posamezno živalsko vrsto, povečati število vzorcev in prilagoditi vrste vzorcev, glede na do sedaj znane podatke.

V prihodnosti bi za določitev poti širjenja okužb HEV koristile raziskave, v katerih bi sočasno vzorčili ljudi, domače prašiče, divje prašiče in ostale divje živali.

5.3 Zaključek

Namen raziskave je pridobiti več podatkov o prisotnosti rotavirusa skupine A in virusa hepatitisa E pri divjih živalih v Sloveniji. Prisotnost HEV RNA pri divjih živalih v študiji nismo dokazali. Prisotnost RVA RNA pa smo dokazali pri 1,7 % pregledanih vzorcev oziroma pri 2 od 71 srn (2,8 %), pri ostalih živalskih vrstah RVA RNA nismo dokazali.

Za potrditev rezultatov in ugotovitev vloge divjih živali pri prenosu HEV in RVA bi bile potrebne nadaljnje raziskave, v katerih bi vzorčili tudi na preostalih geografskih področjih v Sloveniji, ki v tej raziskavi niso bila zajeta. Poleg tega bi bilo potrebno povečati število vzorcev vsake posamezne vrste, ter poleg črevesne vsebine pregledati, v primeru dokazovanja HEV RNA tudi jetra in žolč. V primeru dokazovanja RVA RNA bi bilo potrebno tudi prilagoditi čas vzorčenja na zimske mesece in vzorčiti predvsem mlade živali.

Ne glede na nizko prevalenco rotavirusov pri divjadi smo z metodo NGS prvi na svetu določili genom rotavirusa skupine A, izoliranega pri srni. Genotip P[15], ki smo ga določili s filogenetsko analizo odseka VP4, je redko dokazan in je bil do sedaj opisan le v kombinaciji z ovčjim G10 sevom. V raziskavi tako poročamo o prvi detekciji rotavirusnega seva skupine A, G6P[15] pri srni. Ker je bil s filogenetsko analizo odseka VP7 vzorec uvrščen v linijo G6-II, obstaja možnost, da ima sev zoonotski potencial. Da bi ugotovili pomen seva G6P[15] za divje, domače živali in ljudi ter njegovo razširjenost, bi bile potrebne nadaljnje študije rotavirusnih sevov skupine A pri divjadi, domačih živalih in ljudeh.

6 SKLEPI

Hipoteza 1: Pri divjadi v Sloveniji je prisoten rotavirus skupine A.

Hipotezo smo potrdili, saj smo prisotnost rotavirusa dokazali pri 2 od 71 vzorcev srnjadi (2,8 %) oz. pri 2 od 117 vzorcev vseh divjih živali (1,7 %), ki smo jih preiskali v raziskavi.

Hipoteza 2: Rotavirusni sevi skupine A pri divjadi na območju Slovenije so podobni rotavirusnim sevom skupine A v genski banki.

Hipotezo smo deloma potrdili, saj imajo vsi segmenti RVA D38/14, z izjemo segmenta VP4, več kot 96,3%-nukleotidno identičnost z rotavirusnimi sevi v genski banki. Le segment VP4 ima 89,7%. Sev D38/14 je v regiji VP4 najbolj soroden ovčemu-kozjemu sevu G10P[15] iz Kitajske. Ujemanje teh dveh sevov je od 89,3% do 89,6%.

Hipoteze nismo popolnoma potrdili tudi zato, ker smo s primerjalno analizo celotnega genoma RVA D38/14 ugotovili, da genotipska kombinacija G6P[15] do sedaj na svetu še ni bila opisana. Visoka vrednost samovzorčenja namreč potrjuje, da sev D38/14 ni uvrščen med seve G10P[15], ampak tvori svojo vejo v filogenetskem drevesu. Sev D38/14 je uvrščen v skupino A rotavirusov genotipa G6 in je najbolj soroden človeškemu sevu PA169, ki izvira iz goveda in ima genotipsko kombinacijo G6P[14].

Hipoteza 3: Pri divjadi v Sloveniji je prisoten virus hepatitisa E. Njegova pogostost je primerljiva z rezultati raziskav iz drugih evropskih držav.

Hipotezo smo ovrgli, saj prisotnosti virusa hepatitisa E pri divjadi v Sloveniji nismo dokazali. Klub temu predvidevamo, da bi ob večjemu številu pregledanih vzorcev prisotnost HEV dokazali, saj so prisotnost HEV pri divjih živalih do sedaj potrdili tudi v državah, ki mejijo na Slovenijo in sicer v Italiji, na Madžarskem in Hrvaškem.

Hipoteza 4: Virusni sevi hepatitisa E pri divjadi na območju Slovenije so podobni virusnim sevom hepatitisa E v genski banki.

Hipotezo, da so virusni sevi hepatitisa E pri divjadi na območju Slovenije podobni virusnim sevom hepatitisa E v genski banki smo ovrgli, saj prisotnosti virusa v preiskanih vzorcih divjih živali nismo dokazali.

7 ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Andreju Kirbišu za strokovno pomoč, prijaznost in potrežljivost. Še posebej se zahvaljujem somentorici asist. raz. dr. Urški Jamnikar Ciglenečki, za vse strokovne in nestrokovne nasvete, za nudenje pomoči ob vsaki uri, za spodbujanje, potrežljivost in razumevanje. Brez nje raziskovalne naloge v takšni obliki ne bi bilo.

Zahvaljujem se lovcem Roku Drešarju, Janezu Hafnerju, Samu Kumarju, Nejcu Nastranu, Jožetu Podmeninšku in Gašperju Pustovrhu za zbiranje vzorcev.

Zahvaljujem se dr. Urški Kuhar za izvedbo NGS in znan. sod. dr. Andreju Steyerju za pomoč pri filogenetskih analizah rotavirusa.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje za pomoč in prijaznost.

Zahvaljujem se Emi za lektoriranje raziskovalne naloge, Luku za pregled angleškega povzetka ter doc. dr. Diani Žele, Nastji, Mihni in njegovi mami Minki za pomoč pri zbiranju literature.

Zahvaljujem se družini in prijateljem za razumevanje, potrežljivost, dobro voljo, za pogum in stanje ob strani. Prav posebna zahvala gre prašičku Ottu in ježu Važiču.

8 LITERATURA

Addgene. Polymerase Chain Reaction (PCR). Sidney: addgene, 2016.

<https://www.addgene.org/plasmid-protocols/pcr/> (29. jun. 2016)

Aggarwal R, Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(1): 9–20.

Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(9): 1484–93.

Aggarwal R, Naik SR. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J Hepatol* 1994; 21(5): 718–23.

Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Trop Anim Health Prod* 2007; 38: 521–6. Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: e93 (9 str.).

Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *J Clin Microbiol* 1988; 26(8): 1513–8.

Balyan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-a, non-b hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 20(1): 23–31.

Bányai K, Papp H, Dandár E, et al. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain. *Infect Genet Evol* 2010; 10(7): 1140–4.

Barnaud E, Rogée S, Garry P, Rose N, Pavio N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(15): 5153–9. <http://aem.asm.org/content/78/15/5153.full> (29. jun. 2016)

Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J. A novel member of the family *Hepeviridae* from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res* 2011; 158: 116–23.

Berlec A, Štrukelj B. Nova generacija tehnik določanje nukleotidnega zaporedja: korak k osebni medicini. *Farm Vestn* 2010; 61(4): 203–8.

Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M. Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(8): 1358–60.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3414023/> (29. jun. 2016)

Berto A, Backer JA, Mesquita JR, Nascimento MS, Banks M, Martelli F, Ostanello F, et al. Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes* 2012; 25(5): 190.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells od duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; 302(7841): 1281–3.

Bouwknegt M, Lodder-Verschoor F, van der Poel WH, Rutjes SA, de Roda Husman AM. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot* 2007; 70(12): 2889–95.

Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CB, et al. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* 2009; 5(1): e7 (12 str.). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647918/> (29. jun. 2016)

Cao D, Meng XJ. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg Microbes Infect* 2012; 1(8): e17 (10 str.).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3630916/> (29. jun. 2016)

Carpentier A, Chaussade H, Rigaud E, et al. High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J Clin Microbiol* 2012; 50(9): 2888–93.
<http://jcm.asm.org/content/50/9/2888.full> (29. jun. 2016)

Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 1354–80.

Centers for Disease Control and Prevention. Photos of rotavirus. Georgia: CDC, 2016.
<http://www.cdc.gov/rotavirus/about/photos.html> (26. jun. 2014)

Chandler JD, Riddell MA, Li F, Love RJ, Anderson DA. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol* 1999; 68(1/2): 95–105.

Chatzopoulos DC, Athanasiou LV, Spyrou V, Fthenakis GC, Billinis C. Rotavirus infections in domestic animals. *J Hellenic Vet Med Soc* 2013; 64(2): 150–60.

Chen Y, Zhu W, Sui S, Yin Y, Hu S, Zhang X. Whole genome sequencing of lamb rotavirus and comparative analysis with other mammalian rotaviruses. *Virus Genes* 2009; 38(2): 302–10.

Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, et al. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(4): 448–54.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2957966/> (29. jun. 2016)

Colson P, Borentain P, Queyriaux B et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 2010; 202(6): 825–34.

Cox MJ, Azevedo RS, Nokes DJ, et al. Seroepidemiology of group A rotavirus in suburban Sao Paulo, Brazil. *Epidemiol Infect* 1998; 120: 327–34.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809411/> (29. jun. 2016)

Cvenkel F. Lovčev priročnik: učbenik za lovski izpit. Ljubljana: Lovska zveza Slovenije, 1989: strani 65–107 (strokovna knjižnica Lovske zveze Slovenije, 3).

Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2009. 361(10): 1025–7.

De Deus N, Peralta B, Pina S, et al. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol* 2007; 129: 163–70.

Dennehy PH, Nelson SM, Crowley BA, Saracen CL. Detection of rotavirus RNA in hospital air samples by polymerase chain reaction (PCR). *Pediatr Res* 1998; 43: 143A.

Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res* 2014; 190: e75–96.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170214002640> (29. jun. 2016)

Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, et al. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(8): 1282–9.
http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/8/11-1783_article (29. jun. 2016)

Drexler JF, Seelen A, Corman VM, et al. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family *Hepeviridae*. *J Virol* 2012; 86(17): 9134–47. <http://jvi.asm.org/content/86/17/9134.full> (29. jun. 2016)

Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 2005; 192(5): 930–3. <http://jid.oxfordjournals.org/content/192/5/930.full.pdf+html> (29. jun. 2016)

Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 2003; 13(3): 145–54.

Erzar M, Černač J, Mehle J, Pirih T, Leskovic B. Divjačina. Ljubljana: Lovska zveza Slovenije, 2005: 5–23.

Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989; 53(4): 410–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372748/pdf/microrev00043-0040.pdf> (29. jun. 2016)

Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer, 2007: 1917–74.

European Food Safety Authority. Food-borne zoonotic diseases. Parma: EFSA, 2016.
<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodbornezoonoticdiseases> (29. jun. 2016)

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. London: Elsevier Academic Press 2005a; 485–94.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. London: Elsevier Academic Press 2005b; 853–7.

Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 2007; 88(3): 912–7.
<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.82613-0#tab2> (29. jun. 2016)

Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia: Raven Press, 1996: 2831–43.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 1347–1401.

Fields BN, Knipe DM. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 3051–61.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet 1974; 2(7872): 61–3.

Food and Agriculture Organization, World Health Organisation. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: meeting report. Rome: FAO; Geneva: WHO, 2008: 3. (Microbiological risk assessment series No. 13.)
<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/viruses/en/> (29. jun. 2016)

Forgách P, Nowotny N, Erdelyi K, et al. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. Vet Microbiol 2010; 143(2/4): 106–16.

Fraga D, Meulia T, Fenster S. Unit 10.3 real-time PCR. In: Gallagher SR, Wiley EA, eds. Current protocols: essential laboratory techniques. New Jersey: John Wiley & Sons 2008: 10.3.5.

Ghosh S, Kobayashi N. Exotic rotaviruses in animals and rotaviruses in exotic animals. Virusdisease 2014; 25(2): 158–72.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188176/> (29. jun. 2016)

Ghosh S, Kobayashi N. Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. Future Microbiol 2011; 6(9): 1049–65.

Greening GE. Human and animal viruses in food (including taxonomy of enteric viruses). In: Goyal SM ed. Viruses in foods. New York: Springer, 2006: 5–42. (Food Microbiology and Food Safety)

Grimwood K, Lambert SB. Rotavirus vaccines: opportunities and challenges. Hum Vaccin 2009; 5(2): 57–69.

Gubina M, Ihan A, Števanec M. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002: 395–403.

- Gutiérrez-Aguirre I, Steyer A, Boben J, Gruden K, Poljsak-Prijatelj M, Ravnikar M. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2547–54.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519481/> (29. jun. 2016)
- Ha TP, Kim HJ, Saif LJ, et al. Sequence analysis of unusual P[7]G5 bovine rotavirus strains reveals evidence of interspecies transmission. *J Clin Microbiol* 2009; 47(10): 3329–32.
<http://jcm.asm.org/content/47/10/3329.full.pdf> (29. jun. 2016)
- Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2008; 14(4): 547–53.
- Hoshino Y, Baldwin CA, Scott FW. Isolation and characterization of feline rotavirus. *J Gen Virol* 1981; 54: 313–23.
- Hull JJ, Marthaler D, Rossow S, et al. Genomic sequence of the first porcine rotavirus group H strain in the United States. *Genome Announc* 2016; 4(2): e-01763-15.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786673/> (29. jun. 2016)
- Hussain Z. Genomic Heterogeneity of hepatitis viruses (A-E): role in clinical implications and treatment. In: Serviddio G ed. Practical Management of Chronic Viral Hepatitis. InTech 2013: 35. <http://www.intechopen.com/books/practical-management-of-chronic-viral-hepatitis/genomic-heterogeneity-of-hepatitis-viruses-a-e-role-in-clinical-implications-and-treatment> (26. jun. 2016)
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2015 Release.
Family: *Hepeviridae*. London: ICTV, 2015.
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (29. jun. 2016)
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2015 Release.
Family: *Reoviridae*. London: ICTV, 2015.
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (29. jun. 2016)
- Ippagunta SK, Naik S, Sharma B, Aggarwal R. Presence of hepatitis E virus in sewage in northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol* 2007; 79(12): 1827–31.
- Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* 2004; 31(4): 259–65.

Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: Is their surveillance needed? *Vaccine* 2014; 32(27): 3367–78.

Jamnikar-Ciglenečki U, Kuhar U, Šturm S, Kirbiš A, Rački N, Steyer A. The first detection and whole genome characterization of the G6P[15] group A rotavirus strain from roe deer. *Vet Microbiol* 2016; 191: 52–9.

Johne R, Heckel G, Plenge-Bönig A, et al. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(9): 1452–5.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294985/> (29. jun. 2016)

Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 2006; 131(1): 65–71.

Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol* 1999; 73(10): 8848–50.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112909/> (29. jun. 2016)

Kaci S, Nöckler K, Johne R. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet Microbiol* 2008; 128(3/4): 380–5.

Kamar N, Selves J, Mansuy J-M, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008; 358(8): 811–7.

<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0706992#t=article> (29. jun. 2016)

Khuroo MS. Study of an epidemic of non-a, non-b hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-a, non-b type. *Am J Med* 1980; 68(6): 818–24.

Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, et al. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ Virol* 2012; 4(4): 179–91. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12560-012-9087-8> (29. jun. 2016)

Koonin EV, Gorbalyena AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: Delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(17): 8259–63.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC49897/> (29. jun. 2016)

Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2014. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2015.

<http://www.nizz.si/sl/epidemiolosko-spremljanje-nalezljivih-bolezni-letna-porocila> (29. jun. 2016)

Krže B. Divji prašič: biologija, gojitev, ekologija. Ljubljana: Lovska zveza Slovenije, 1982: strani 9–52. (Zlatorogova knjižnjica, 13).

Krže B. Srnjad: biologija, gojitev, ekologija. Ljubljana: Lovska zveza Slovenije, 2000: strani 7 – 18. (Zlatorogova knjižnjica, 27).

Le Coutre P, Meisel H, Hofmann J, et al. Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut* 2009; 58(5): 699–702.

Li T-C, Chijiwa K, Nobuyuki S, et al. Hepatitis E Virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(12): 1958–60.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367655/> (29. jun. 2016)

Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona R de C, Timenetsky M do C. Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. *J Clin Virol* 2012; 54(1): 89–92.

Machnowska P. Detection and characterization of potentially zoonotic enteric viruses in livestock and the influence of probiotics on their shedding. Berlin: Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, 2014. Doktorska disertacija.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(3): 190–212.

Marolt M. Okoljski vidika lova in lovstva v Sloveniji. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo, 2009. Diplomsko delo.

Martella V, Bánya K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 2010; 140(3/4): 246–55.

Martelli F, Caprioli A, Zengarini M, et al. Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol* 2008; 126: 74–81.

Martinelli N, Pavoni E, Filogari D, et al. Hepatitis E virus in wild boar in the central northern part of Italy. *Transbound Emerg Dis* 2013; 62(2): 217–22.

Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S. Severe hepatitis E Virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 2003; 188(6): 944.
<http://jid.oxfordjournals.org/content/188/6/944.full.pdf+html> (29. jun. 2016)

Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, et al. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 2007; 152(7): 1375–81.

Matthijnssens J, Rahman M, Martella V, et al. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J Virol* 2006; 80(8): 3801–10.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1440464/> (29. jun. 2016)

Matthijnssens J, Potgieter CA, Ciarlet M, et al. Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order *Artiodactyla*? *J Virol* 2009a; 83(7): 2917–29.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2655590/> (29. jun. 2016)

Matthijnssens J, Taraporewala ZF, Yang H, et al. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *J Virol* 2009b; 84(4): 2013–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2812371/> (29. jun. 2016)

Matthijnssens J, Martella V, Van Ranst M. Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. *Future Virol* 2010; 5(4): 385–90.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus classification working group (RCWG). *Arch Virol* 2011; 156(8): 1397–413. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398998/> (29. jun. 2016)

- Matthijnsens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger UU, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol* 2012; 157(6): 1177–82.
- McClain B, Settembre E, Temple BRS, Bellamy RA, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol* 2010; 397(2): 587–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860780/> (29. jun. 2016)
- Medrano C, Boadella M, Barrios H, et al. Zoonotic pathogens among white-tailed deer, northern Mexico, 2004–2009. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(8): 1372–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3414034/> (29. jun. 2016)
- Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(18): 9860–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23282/> (29. jun. 2016)
- Meng XJ. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 2011; 161(1): 23–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3126906/> (29. jun. 2016)
- Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 2010; 140(3–4): 256–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2814965/> (29. jun. 2016)
- Michitaka K, Takahashi K, Furukawa S, et al. Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res* 2007; 37(3): 214–20.
- Midgley SE, Bánya K, Buesa J, et al. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol* 2011; 156: 238–45.
- Mochizuki M, Minami K, Sakamoto H. Sero-epizootiological studies on rotavirus infection of dogs and cats. *J Vet Sci* 1986; 48: 957–64.
- Mukherjee A, Ghosh S, Bagchi P, et al. Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from north-eastern India: Evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(9): 1343–6.
- Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262(4): 56–61.

- Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 2008; 80(4): 646–58.
- Ndze VN, Akum AE, Kamga GH, et al. Epidemiology of rotavirus diarrhea in children under 5 years in northern Cameroon. *Pan Afr Med J* 2012; 11: 73.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361211/> (29. jun. 2016)
- Neumann S, Hackl SS, Piepenschneider M, et al. Serologic and molecular survey of hepatitis E virus in german deer populations. *J Wildl Dis* 2016; 52(1): 106–13.
- Okadera K, Abe M, Ito N, et al. Evidence of natural transmission of group A rotavirus between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. *Infect Genet Evol* 2013; 20: 54–60.
- Papp H, Borzák R, Farkas S, et al. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect Genet Evol* 2013; 19: 71–80.
- Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 2010; 41(6): 46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2865210/> (29. jun. 2016)
- Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 309: 189–219.
- Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo: nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
- Raj SV, Smits SL, Pas SD, et al. Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(8): 1369–70.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3414025/> (29. jun. 2016)
- Ravindran ADK, Viswanathan KN. Foodborne Illnesses. In: Bopé ET, Kellerman RD. Conn's current therapy 2014: latest approved methods of treatment for the practicing physician. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014: 95.
- Ruggeri FM, Di Bartolo M, Ostanello F, Trevisani M. Hepatitis E virus: an emerging zoonotic and foodborne pathogen. New York: Springer-Verlag New York Inc., 2013: 3–47.

Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Lodder WJ et al. Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *J Virol Methods* 2010; 168(1/2): 197–206.

Sair AI A, D’Souza DH D, Jaykus LA. Human enteric viruses as causes of foodborne disease. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2002; 1(2): 73–89.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12): 5463–7.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2004; 15(1): 29–56.

Sattar SA, Lloyd-Evans N, Springthorpe VS, Nair RC. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: Potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J Hyg* 1986; 96(2): 277–89.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2129638/> (29. jun. 2016)

Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 1999; 57(3): 243–51.

Schumann T, Hotzel H, Otto P, Johne R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virol J* 2009; 386(2): 334–43.

Scobie L, Dalton HR. Hepatitis E: Source and route of infection, clinical manifestations and new developments. *J Viral Hepat* 2012; 20(1): 1–11.

Shen S, Burke B, Desselberger U. Nucleotide sequences of the VP4 and VP7 genes of a Chinese lamb rotavirus: evidence for a new P type in a G10 type virus. *Virology* 1993; 197(1): 497–500.

Singer E. Biomedicine: Democratizing DNA Sequencing. *MIT Technology Review*, 2010: 2/6. <https://www.technologyreview.com/s/421929/democratizing-dna-sequencing/> (29. jun. 2016)

Smith DB, Simmonds P, Jameel S, et al. Consensus proposals for classification of the family *Hepeviridae*. *J Gen Virol* 2014; 95(10): 2223–32.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4165930/> (29. jun. 2016)

Smith JL. A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 2001; 64(4): 572–86.

Statistični urad Republike Slovenije. Odstrel divjadi (število), Slovenija, letno: Jelenjad, 2014. Ljubljana 2015.

http://pxweb.stat.si/pxweb/Database/Okolje/16_gozdarstvo_lov/03_16731_gozd_splosno/03_16731_gozd_splosno.asp (29. jun. 2016)

Statistični urad Republike Slovenije. Odstrel divjadi (število), Slovenija, letno: Srnjad, 2014. Ljubljana 2015. (29. jun. 2016)

http://pxweb.stat.si/pxweb/Database/Okolje/16_gozdarstvo_lov/03_16731_gozd_splosno/03_16731_gozd_splosno.asp (29. jun. 2016)

Statistični urad Republike Slovenije. Odstrel divjadi (število), Slovenija, letno: Divji prašič, 2014. Ljubljana 2015.

http://pxweb.stat.si/pxweb/Database/Okolje/16_gozdarstvo_lov/03_16731_gozd_splosno/03_16731_gozd_splosno.asp (29. jun. 2016)

Statistični urad Republike Slovenije. Odstrel divjadi (število), Slovenija, letno: Gams, 2014. Ljubljana 2015.

http://pxweb.stat.si/pxweb/Database/Okolje/16_gozdarstvo_lov/03_16731_gozd_splosno/03_16731_gozd_splosno.asp (29. jun. 2016)

Steyer A. Rotavirusni genotipi pri ljudeh in pomen medvrstnih prenosov. *Med Razgl* 2007; 46(2): 83–8.

Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Barlic-Maganja D, Marin J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol* 2008; 89: 1690–8.

<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.2008/001206-0#tab2> (29. jun. 2016)

Steyer A, Sagadin M, Kolenc M, Poljšak-Prijatelj M. Molecular characterization of rotavirus strains from pre- and post-vaccination periods in a country with low vaccination coverage: the case of Slovenia. *Infect Genet Evol* 2014; 28: 413–25.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713481400224X> (29. jun. 2016)

Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 2004; 330(2): 501–5.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682204006749> (29. jun. 2016)

Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, et al. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* 2011; 92(4): 902-8.

<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.029470-0#tab2>
(29. jun. 2016)

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991; 185(1): 120–31.

Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, et al. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with t-cell lymphoma. *Hepatol Res* 2007; 37(2): 113–20.

Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2011; 12(2): 136–41.

Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362(9381): 371–3.

ThermoFisher Scientific. Ion Torrent. Weltham: ThermoFisher Scientific, 2016.

<https://www.thermofisher.com/si/en/home/brands/ion-torrent.html> (29. jun. 2016)

Tomiyama D, Inoue E, Osawa Y, Okazaki K. Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yesoensis*, in Hokkaido, Japan. *J Viral Hepat* 2009; 16(7): 524–8.

Tzipori S, Caple IW, Butler R. Isolation of a rotavirus from deer. *Vet Rec* 1976; 99(20): 398.

Uredba o določitvi divjadi in lovnih dob. Ur List RS 2004; 14(101): 12159–60

Van der Poel WH. Food and environmental routes of hepatitis E virus transmission. *Curr Opin Virol* 2014; 4: 91–6.

Vasickova P, Psikal I, Kralik P, Widen F, Hubalek Z, Pavlik I. Hepatitis E virus: a review. *Vet Med-Czech* 2007; 52(9): 365–84.

Vesel Š. Iz gozda do vilic: pravilno ravnanje za zdravo divjačino. *Lavec* 2015; 98(6): 317–22.

Wichmann O, Schimanski S, Koch J, et al. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 2008; 198(12): 1732–41.

<http://jid.oxfordjournals.org/content/198/12/1732.full> (29. jun. 2016)

Widen F, Sundqvist L, Matyi-Toth A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol Infect* 2011; 139(03): 361–71.

Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 2003; 84: 2351–7.

<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19242-0#tab2> (29. jun. 2016)

Yugo DM, Meng XJ. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10(10): 4507–33.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823334/> (29. jun. 2016)

Žele D, Barry AF, Hakze-van der Honing RW, Venguš G, van der Poel WH. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies and first detection of hepatitis E virus in wild boar in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016; 16(1): 71–4.

Žnuderl K. Rotavirusni genotipi pri hospitaliziranih otrocih v ljubljanski regiji v letu 2008.

Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010. Diplomsko delo.

9 PRILOGE

Priloga 1: Objavljen izvirni znanstveni članek



Short communication

The first detection and whole genome characterization of the G6P[15] group A rotavirus strain from roe deer



Urska Jamnikar-Ciglenecki^{a,*}, Urska Kuhar^b, Sabina Sturm^a, Andrej Kirbis^a, Nejc Racki^c, Andrej Steyer^d

^a Institute of Food Safety, Feed and Environment, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia

^b Institute of Microbiology and Parasitology, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia

^c Department of Biotechnology and Systems Biology, National Institute of Biology, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

^d Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Zaloška 4, 1000 Ljubljana, Slovenia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2016

Received in revised form 25 May 2016

Accepted 26 May 2016

Keywords:

Rotavirus

G6P[15]

Roe deer

Phylogenetic analysis

Next generation sequencing

ABSTRACT

Although rotaviruses have been detected in a variety of host species, there are only limited records of their occurrence in deer, where their role is unknown. In this study, group A rotavirus was identified in roe deer during a study of enteric viruses in game animals. 102 samples of intestinal content were collected from roe deer (56), wild boars (29), chamois (10), red deer (6) and mouflon (1), but only one sample from roe deer was positive. Following whole genome sequence analysis, the rotavirus strain D38/14 was characterized by next generation sequencing. The genotype constellation, comprising 11 genome segments, was G6-P[15]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3. Phylogenetic analysis of the VP7 genome segment showed that the D38/14 rotavirus strain is closely related to the various G6 zoonotic rotavirus strains of bovine-like origin frequently detected in humans. In the VP4 segment, this strain showed high variation compared to that in the P[15] strain found in sheep and in a goat. This finding suggests that rotaviruses from deer are similar to those in other DS-1 rotavirus groups and could constitute a source of zoonotically transmitted rotaviruses. The epidemiological status of group A rotaviruses in deer should be further investigated.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rotaviruses are members of the *Reoviridae* family that are characterized by a segmented dsRNA genome enclosed in a triple layer capsid. Eleven segments of the genome generate six structural proteins (VP1–4, VP6 and VP7) and six non-structural proteins (NSP1–6) (Estes and Greenberg, 2013). The classification of rotaviruses into at least eight groups, from A to H, is based on the antigenic properties of the VP6 proteins (Estes and Greenberg, 2013; Matthijssens et al., 2012). From a medical and veterinary perspective, the rotavirus group A (RVA) is the most important member of the genus, and is associated with acute gastroenteritis in children and in young domestic and wild animals (Estes and Greenberg, 2013; Martella et al., 2010; Matthijssens et al., 2010). The genetic characteristics of the VP7 and VP4 rotavirus genes are of significant interest for rotavirus molecular epidemiology, since

they determine the dual genotype classification (Gentsch et al., 1992; Gouvea et al., 1990). To date, 29G and 41P genotypes have been described, with more than sixty G-P combinations. The Rotavirus Classification Working Group (RCWG) has presented a whole genome based genotyping system, based on the nucleotide sequence identity cut-off percentages for each of the 11 RVA gene segments (Matthijssens et al., 2011).

Despite the differences between genotypes, there have been several reports of interspecies transmission between animals and humans, as well as between various animal species (Bányai et al., 2010; Matthijssens et al., 2010; Steyer et al., 2008; Trojnár et al., 2013). It is a matter of concern that wildlife, as well as domestic animals may act as a source of infection for humans (Martella et al., 2010). There is only one study, from 1979, in which a deer rotavirus was detected using gel electrophoresis (Smith and Tzipori, 1979; Tzipori et al., 1976). Nevertheless, the genome of deer rotaviruses, knowledge of which would provide limited insights into the evolutionary patterns of these viruses, has not been analysed in detail (Ghosh and Kobayashi, 2014).

A positive sample from roe deer, containing RVA, was detected during a survey throughout Slovenia designed to screen some of

* Corresponding author at: Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Institute of Food Safety, Feed and Environment, Gerbičeva 60, SI-1115 Ljubljana, Slovenia.

E-mail address: urska.jamnikar@vf.uni-lj.si (U. Jamnikar-Ciglenecki).

the game animals as a potential source of enteric viruses and to evaluate the possible zoonotic transmission. The aim of the present study was to analyse the whole genome of the novel rotavirus strain detected in a roe deer. This first reported whole genome analysis provides additional information about rotavirus circulation in nature and its evolutionary pattern.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and molecular detection of RVA

In 2014 and 2015 a survey throughout Slovenia was performed to screen certain game animals as a potential source of rotaviruses. In total, 102 samples of game animal intestinal content were collected from five different wildlife species, comprising 56 samples from roe deer (*Capreolus capreolus*), 29 from wild boars (*Sus scrofa*), 10 from chamois (*Rupicapra rupicapra*), 6 from red deer (*Cervus elaphus*) and 1 from mouflon (*Ovis musimon*). The age of game animals was from 5 months to 10 years and were culled in 5 Slovenian hunting families between July 2014 and March 2015. The RVA positive sample D38/14 was collected in September 2014 in Sv. Ožbolt in hunting family Škofja Loka, in the area where there is no livestock pasture or farmlands. A sample was collected from female roe deer aged 5 months having the appropriate weight and no specific clinical signs. Samples of intestinal content of each animal were collected by hunters after culling. The lower part of each intestine was placed in a sterile plastic bag. Samples were stored at -20°C and, as soon as possible, sent to the Veterinary Faculty where they were stored below -60°C until used. 10% suspensions of samples were prepared in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) and centrifuged for 10 min at 1000g. The supernatant was used for nucleic acid (NA) extraction using the QIAamp viral RNA mini kit, according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany). Each sample was tested with a real-time RT-PCR assay using VP2-specific primers, as described (Gutiérrez-Aguirre et al., 2008). Each sample was also tested with RT-PCR for the detection and amplification of a short VP7 segment (Machnowska et al., 2014) followed by direct sequencing of the amplicon for confirmation.

2.2. Enrichment of viral particles

Rotavirus enrichment, with separation from background NA, was achieved for positive sample using ion exchange chromatography, with methacrylate monolithic supports in a manner similar to that described by Steyer et al. (2013) with minor modifications. Two mL of 10% suspension of intestinal content was diluted in 18 mL of loading buffer (50 mM HEPES, pH 7) and centrifuged at 2000g for 2 min. In order to prevent clogging of the monolithic chromatography column, the supernatant was filtered through a 0.45 μm cellulose acetate filter (Sartorius, Göttingen, Germany). Filtrated sample was loaded on to a CIM QA disk monolithic column (BIA separations, Ajdovščina, Slovenia) at a flow rate of 3 mL/min, using an AKTA purifier chromatographic system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). After loading, non-bound material was washed off with 12 mL of loading buffer. Bound material was then eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl in 50 mM HEPES, pH 7 in 64 column volumes; 26 fractions of 1 mL were collected.

2.3. RNA extraction of selected chromatography fractions and evaluation of enrichment

Total RNA was extracted from fractions 3 to 26 (250 μl) using the Trizol[®] method (Invitrogen, GB) and phase lock gel tubes (5 PRIME, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The RNA extracted from each fraction was tested with real-time RT-PCR, as described by Gutiérrez-Aguirre et al. (2008), to determine the theoretical viral RNA concentration in units/ μl . To obtain the fraction with the highest virus/background NA ratio, the total NA concentrations in fractions from 11 to 17 were measured, using a Qubit[®] fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with a Qubit[®] dsDNA HS assay kit and a Qubit[®] RNA HS assay kit, following the manufacturer's instructions (Invitrogen, CA, USA). Accordingly, fraction 14 was used for next generation sequencing (NGS).

2.4. NGS and analysis of sequence reads

The RNA library was prepared using the Ion Total RNA Sequencing Kit v2 (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol (4476286, revision D). Emulsion PCR and enrichment were carried out using the Ion PGM™ Template OT2 200 Kit (Thermo Fisher Scientific–Ion Torrent, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol (MAN0007221, revision A.0). The concentrations of library DNA fragments and their size distribution were determined with a LabChip GX instrument using the DNA High-Sensitivity Assay (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The amplified library was sequenced on the Ion PGM platform using the Ion PGM HiQ Sequencing Kit and Ion 314 Chip v2 (Thermo Fisher Scientific–Ion Torrent, Carlsbad, CA, USA). Sequenced Ion Torrent reads were checked for quality and trimmed using Ion Torrent Suite v5.0.2. Reads from the NGS analysis were mapped to the concatenated reference genome from PA169 strain obtained from GenBank (accession numbers EF554126–EF554136) using Geneious software with default parameters (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). The consensus sequence was constructed by manual examination of polymorphisms and indels compared to the reference sequence.

Genome segments were aligned with the most identical strains deposited in GenBank using the BLAST search for each of the genome segments. The genome segment genotype was assigned according to the genotype cut-offs determined previously with the recommendations for rotavirus classification proposed by the RCWG (Matthijssens et al., 2008).

2.5. Phylogenetic analysis of the genome segments

Nucleotide alignment was carried out for the 11 genome segments, using the ClustalW algorithm. Sequences were aligned with the rotavirus genomes deposited in GenBank. Maximum Likelihood phylogenetic trees were constructed, based on the Kimura-2 parameter model and using MEGA 6.06 software (Tamura et al., 2013). Branch statistics were calculated with bootstrap analysis of 1000 replicates.

3. Results

Of the 102 samples tested, only one sample of intestinal content from roe deer (D38/14) collected in September 2014 in the hunting family Škofja Loka, Slovenia was positive for rotavirus RNA with real-time RT-PCR as well as with RT-PCR. The RT-PCR amplification product from the VP7 region of rotavirus was sequenced and identified as an RVA of genotype G6, most closely identical to the bovine-like human PA169 strain with G6P[14] genotype combination.

3.1. NGS analysis and construction of the complete genome sequence

According to the short VP7 nucleotide sequence the whole genome sequence of the PA169 strain was used as the reference sequence for constructing the whole genome sequence of RVA

strain D38/14. 3662 reads were mapped to the reference sequence of 18,488 nucleotides, with a mean coverage of 22.9. The lowest coverage, including a 300–400 nucleotide region with no reads mapped, was in the VP4 genome segment. The consensus sequence of the partial VP4 segment was compared with those of other RVA sequences in the GenBank, using BLAST search. This revealed that the VP4 segment was of the P[15] genotype. A new reference genome sequence was therefore created, using the PA169 strain with a VP4 genome segment replaced by one of the P[15] genotype. Construction of the whole genome sequence of the D38/14 strain was repeated with mapping of the NGS reads to the new reference sequence, in which 3781 reads were mapped to the new reference construct with a slightly higher mean coverage of 23.2 and no gapped region.

The consensus sequence was analysed after manual examination and, according to the cut-off values for each of the genome segments, the whole genome genotype constellation of strain D38/14 was obtained as G6-P[15]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3. The nucleotide sequences of all eleven genome segments were deposited in GenBank and are available under the following accession numbers: KU708256 (VP7), KU708257 (VP4), KU708258 (VP6), KU708259 (VP1), KU708260 (VP2), KU708261 (VP3), KU708262 (NSP1), KU708263 (NSP2), KU708264 (NSP3), KU708265 (NSP4) and KU708266 (NSP5 and NSP6).

3.2. Phylogenetic analysis of the genome segments

In the BLAST search, the lowest maximum nucleotide identity, of only 90%, was observed for the VP4 segment of the D38/14 strain (Table 1). Its low relationship to the existing P[15] strains deposited in GenBank was also confirmed in the phylogenetic

analysis. Our strain D38/14 was most closely related to the ovine-caprine G10P[15] strains from China, with 89.3–89.6% nucleotide sequence identity. It is not clustered together with the known P[15] strains, but is a distinct lineage, supported by the high bootstrap value (Fig. 2). The only P[15] strain from GenBank not included in our analysis was the bovine AD63 strain, as only 471 nucleotide long VP4 sequence was deposited and was too short for a reliable analysis. However, in this short sequence the AD63 strain shared only 86.1% nucleotide sequence identity to our Roe deer strain, whereas other P[15] strains shared 88.9%–89.1% identity. In the VP7 phylogenetic tree (Fig. 1), the D38/14 strain is found within the G6-II lineage, together with the representatives of the G6 zoonotic rotavirus strains detected in humans, sharing 94.5%–99.0% nucleotide sequence identity within the lineage and 78.5%–86.7% identity with the representatives of other G6 lineages.

From the complete genome analysis and the characteristics presented in Table 1 it is clear that the strain D38/14 from roe deer belongs to the DS-1 genome profile found in cattle, sheep, goat and other animal species within the ungulates group. The strain shares the highest nucleotide sequence identity with animal or zoonotic G6 strains detected in humans, ranging between 95.04% and 98.95% nucleotide sequence identity, with the exception of VP4 with only 89.67% nucleotide sequence identity. Although the genome constellation resembles the DS-1 genome profile in most of the genome segments (VP1–VP3, VP6, NSP2, NSP4), it was clustered away from the DS-1 reference strain and other human G2P[4] rotavirus strains in phylogenetic analysis (Figs. 1–4; Suppl. 1–7). This was most evident in the VP6 and NSP4 phylogenetic trees (Figs. 3 and 4). A close phylogenetic relatedness to bovine and

Table 1

Genome genotype constellation and whole genome nucleotide sequence: comparison with those of the representative strains from GenBank.

Whole genome nucleotide comparison to representative strains from GenBank												
Most similar strains from GenBank				PA169	P343	UK	NCDV	B10925	111-05-27	LLR		
Genotype	Strain	Accession number	Identity	Host	Hu, G6P[14]	Po, G10P[5]	Bo, G6P[5]	Bo, G6P[1]	Hu, G6P[14]	Hu, G6P[14]	Ov, G10P[15]	
VP1	R2	RF	J04346	97.3%	Bovine	91.6	91.1	92.0	95.0	86.7	86.4	85.9
VP2	C2	88977	KJ940162	97.7%	Canine	85.5	85.2	96.1	96.7	88.7	88.9	87.6
VP3	M2	P343	AB972858	97.2%	Porcine	90.8	97.2	91.9	91.6	83.3	83.9	84.5
VP4	P[15]	LLR	JQ013506	89.7%	Ovine	67.2	71.2	70.5	73.6	67.5	67.4	89.7
VP6	I2	Uktc	X53667	98.6%	Bovine-Tc	97.5	97.2	98.6	93.5	95.9	98.5	86.7
VP7	G6	PA169	EF554131	96.9%	Human	96.9	77.0	83.9	84.7	96.9	95.4	75.9
NSP1	A3	A44	U23726	96.3%	Bovine	95.1	93.4	88.1	94.2	94.4	93.9	74.2
NSP2	N2	P343	AB972863	99.0%	Porcine	92.7	99.0	88.2	88.4	92.9	96.3	88.4
NSP3	T6	PA169	EF554134	97.1%	Human-tc	97.1	94.6	81.6	95.2	90.1	90.4	92.2
NSP4	E2	BP1062	FN665697	96.4%	Human	93.9	91.4	86.0	86.2	95.8	95.2	89.5
NSP5	H3	B383	FJ347121	98.2%	Bovine	97.6	96.2	93.1	97.3	97.6	97.7	94.6

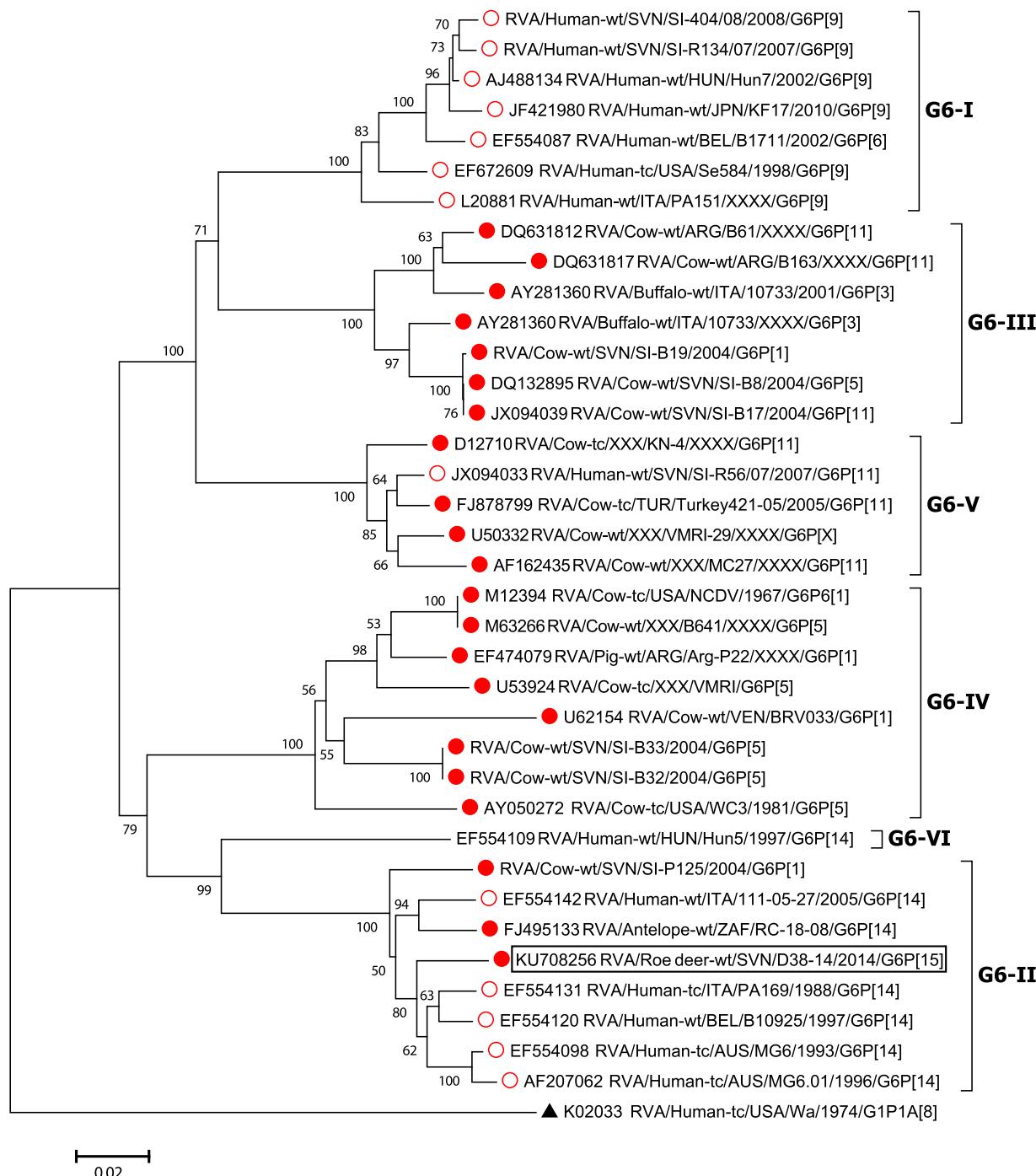


Fig. 1. The VP7 phylogenetic tree with G6 genotype lineage assignments G6-I to G6-VI. Bootstrap values below 50 are not shown. The roe deer strain D38/14 is marked. ●—animal rotavirus strain; ○—zoonotic rotavirus strain; ▲—human rotavirus strain

other ungulate rotaviruses was evident in all the genome segments.

4. Discussion

The first analysis of the whole genome of a roe deer rotavirus is reported. From the epidemiological point of view, it appears that rotaviruses are not often present in these animals, since the prevalence of RVA in roe deer was only 1.8% (1/56). Rotavirus is well known to exhibit the highest incidence in young animals

(Estes and Greenberg, 2013), so the low prevalence could be a result of sampling in a wider age group, while animals from 6 months to 10 years were included in the study. The other reason for the low prevalence could be the sampling period, which was not focused just on the high season for rotavirus infections, samples being collected from summer to spring. In general, one of the reasons for the low prevalence could be the screening method. However, in our case, real-time RT-PCR was selected as the primary detection method and, as presented in the initial publication by Gutiérrez-Aguirre et al. (2008), the method was developed as a

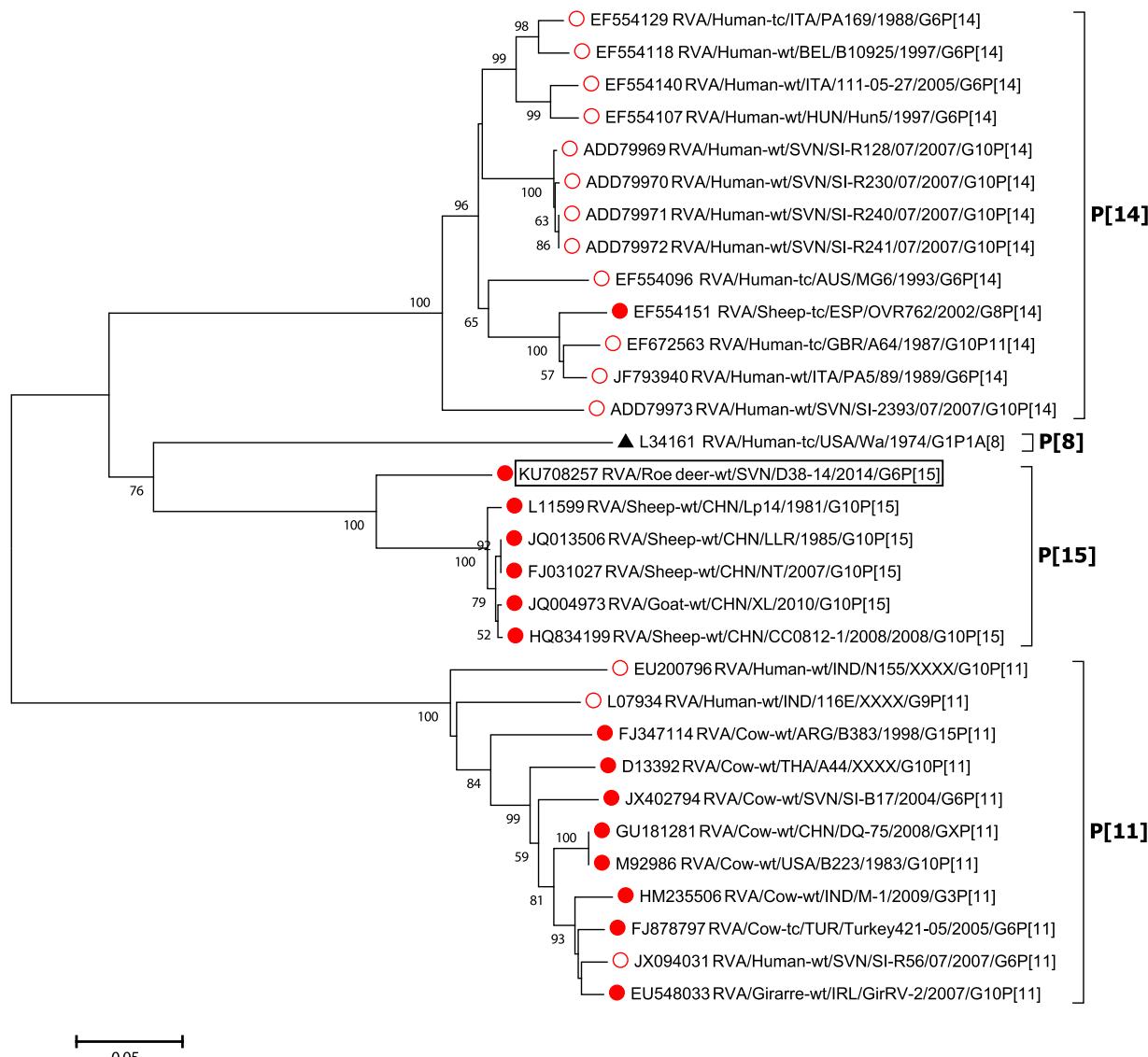


Fig. 2. The VP4 phylogenetic tree with P[8], P[11], P[14] and P[15] genotype groups and strain D38/14 (marked) within the P[15] genotype. Bootstrap values below 50 are not shown.

●—animal rotavirus strain; ○—zoonotic rotavirus strain; ▲—human rotavirus strain

broad range detection method and has been tested on a variety of human and animal samples. In addition, the target gene is VP2, which is one of the most highly conserved genes in the rotavirus genome. The genotype C2 is well covered by the method and, in our case, mostly the genotype C2 was expected in the target animals.

In this report we describe the first RVA detected in roe deer and the complete genome analysis is presented. In addition, a rare combination of genotype G6P[15] is described for the first time. The strain D38/14 exhibits a typical DS-1 genome composition, except for the VP4 segment, with the genotypes G6-P[15]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3 having already been described in various animal species, including cattle and other ungulate species (Matthijnsens et al., 2009). The VP4 genome segment of this strain belongs to the P[15] genotype but shows higher variability than those of other P[15] strains described, namely the G10P[15] strains detected in sheep and in a goat, both from China (Chen et al., 2009; Shen et al., 1993). It is thus unlikely that the VP4 segment originated from the ovine-caprine G10P[15] strains. At the same time, it is also not possible to

speculate on possible recombination events between the G10P[15] ovine-caprine and other G6 rotavirus strains.

In the VP7 phylogenetic tree, six lineages (G6-I-G6-VI) can be distinguished, with nucleotide diversities of 88.6%–100.0% within and 77.8%–88.5% between the clades. They share certain clear characteristics: rotavirus strains G6P[5] and G6P[1], detected in cattle, were mostly found in the G6-IV lineage, and bovine G6P[11] in the G6-V and G6-III lineages. However, mainly G6P[9] strains were grouped in the G6-I, representing the zoonotic rotavirus strains detected in humans. Similarly, G6-II comprises mainly the zoonotic G6P[14] rotavirus strains detected in humans. Since the roe deer strain D38/14 is clustered within the “zoonotic” G6-II lineage, it may represent a potential emerging zoonotic rotavirus. The stability of RVAs in the environment, their presence in large amounts in the faeces of infected animals and the possibility of cross-species transmission all pose a potential zoonotic threat for humans in direct or indirect contact with wildlife or domestic animals (Greening, 2006). However, to date P[15] rotavirus strain

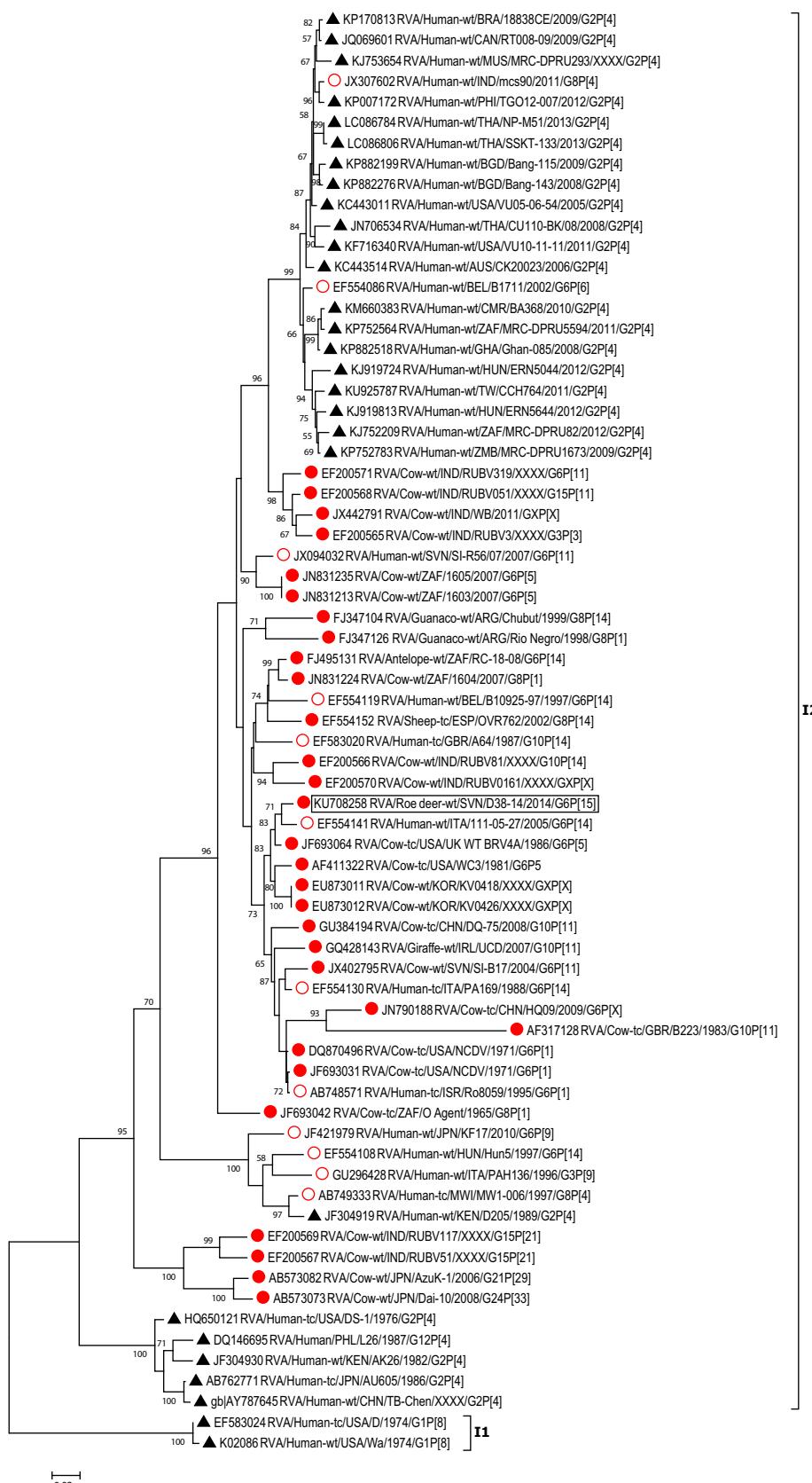


Fig. 3. Phylogenetic analysis of the VP6 group A rotavirus sequences, obtained from GenBank and the roe deer D38/14 strain.
●—animal rotavirus strain; ○—zoonotic rotavirus strain; ▲—human rotavirus strain

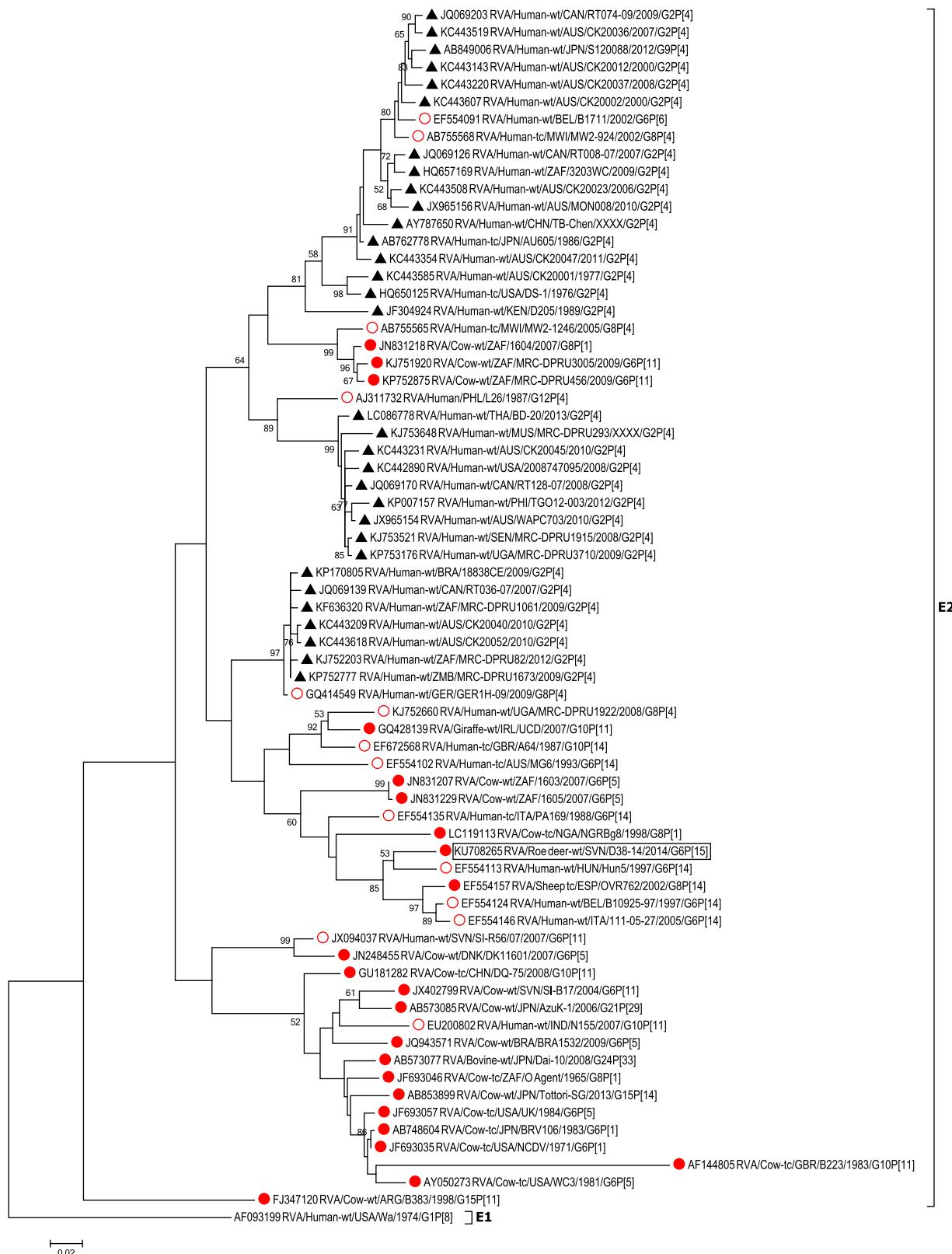


Fig. 4. Phylogenetic analysis of the NSP4 rotavirus sequences, obtained from GenBank and the roe deer D38/14 strain.
●—animal rotavirus strain; ○—zoonotic rotavirus strain; ▲—human rotavirus strain

has not been reported from a human rotavirus infection. The phylogenetic analysis of all genome segments demonstrates clearly, that the D38/15 roe deer strain evolved in a different

direction as the human DS-1 strains, and was found in a phylogenetic cluster, together with rotaviruses from bovine and other ungulates. This may suggest that G6P[15] is probably more

prone to cross the species barrier to other related animals within the “ungulate group” than being the high-potential zoonotic transmissible virus.

In Slovenia, roe deer is widespread and a common game animal. It is estimated that 33,219 roe deer were culled in the year 2014. This species occupies a wide variety of habitats, including deciduous, mixed and coniferous forests, moorland, pastures, arable land and in suburban areas with large gardens. It prefers landscapes with a mosaic of woodland and farmland. Roe deer is mostly hunted for its meat, its antlers, which represent hunter's trophy and also for its skin. Due to the aforementioned facts, there are several routes for RVA transmission from roe deer to livestock and humans (Meng et al., 2009). A game animal that is infected with RVA, for example, may contaminate the environment with its excrement, thus creating the possibility of transmission of rotaviruses to livestock or humans. Additionally, a hunter may infect both himself and the meat he handles when eviscerating the carcass and handling the intestines. Although such events are not likely to result in high levels of infection, a continuing input of rotavirus strains into the human population is possible, albeit at a very low level (Cook et al., 2004).

5. Conclusion

[15] genotype rotaviruses are rare, found so far only in combination with G10 ovine strains. Here we report the first detection of the G6P[15] rotavirus in roe deer. While phylogenetic analysis shows that the D38/14 strain belongs to the G6-II lineage, it is possible that this strain has zoonotic potential, although more information is needed for a firm conclusion. Further investigations on rotavirus strains in game animals and livestock could expand the evolving history of the G6P[15] strain.

Acknowledgements

This work was supported by the Slovenian Ministry of Education, Science and Sport (Research program P4-0092). The authors thank Rok Drešar, Janez Hafner, Samo Kumar, Nejc Nastran, Jože Podmeninšek and Gašper Pustovrh for providing the samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.019>.

References

- Bányai, K., Papp, H., Dandár, E., Molnár, P., Mihály, I., Van Ranst, M., Martella, V., Matthijnssens, J., 2010. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain. *Infect. Genet. Evol.* 10, 1140–1144.
- Chen, Y., Zhu, W., Sui, S., Yin, Y., Hu, S., Zhang, X., 2009. Whole genome sequencing of lamb rotavirus and comparative analysis with other mammalian rotaviruses. *Virus Genes* 38, 302–310.
- Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M.I., El-Attar, L., Gray, J., 2004. The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infect.* 48, 289–302.
- Estes, M.K., Greenberg, H.B., 2013. Rotaviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1347–1401.
- Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B.K., Bhan, M.K., 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1365–1373.
- Ghosh, S., Kobayashi, N., 2014. Exotic rotaviruses in animals and rotaviruses in exotic animals. *Virus Dis.* 25, 158–172.
- Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B., Fang, Z.Y., 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276–282.
- Greening, G.E., 2006. Human and animal viruses in food. In: Goyal, S.M. (Ed.), *Viruses in Foods*. Springer, New York, pp. 24–26.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Steyer, A., Boben, J., Gruden, K., Poljsak-Prijatelj, M., Ravnikar, M., 2008. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2547–2554.
- Machnowska, P., Ellerbroek, L., Johne, R., 2014. Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet. Microbiol.* 168, 60–68.
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 140, 246–255.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómez, M., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Patton, J.T., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153, 1621–1629.
- Matthijnssens, J., Potgieter, C.A., Ciarlet, M., Parreño, V., Martella, V., Bányai, K., Garaiocochea, L., Palombo, E.A., Novo, L., Zeller, M., Arista, S., Gerna, G., Rahman, M., Van Ranst, M., 2009. Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J. Virol.* 83, 2917–2929.
- Matthijnssens, J., Taraporewala, Z.F., Yang, H., Rao, S., Yuan, L., Cao, D., Hoshino, Y., Mertens, P.P., Carner, G.R., McNeal, M., Sestak, K., Van Ranst, M., Patton, J.T., 2010. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *J. Virol.* 84, 2013–2026.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómez, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397–1413.
- Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., Johne, R., 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 157, 1177–1182.
- Meng, X.J., Lindsay, D.S., Sriranganathan, N., 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 364, 2697–2707.
- Shen, S., Burke, B., Desselberger, U., 1993. Nucleotide sequences of the VP4 and VP7 genes of a Chinese lamb rotavirus: evidence for a new P type in a G10 type virus. *Virology* 197, 497–500.
- Smith, M., Tzipori, S., 1979. Gel electrophoresis of rotavirus RNA derived from six different animal species. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 57, 583–585.
- Steyer, A., Poljsak-Prijatelj, M., Barlic-Maganja, D., Marin, J., 2008. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J. Gen. Virol.* 89, 1690–1698.
- Steyer, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Kolenc, M., Koren, S., Kutnjak, D., Pokorn, M., Poljsak-Prijatelj, M., Racki, N., Ravnikar, M., Sagadin, M., Fratnik Steyer, A., Toplak, N., 2013. High similarity of novel orthoreovirus detected in a child hospitalized with acute gastroenteritis to mammalian orthoreoviruses found in bats in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3818–3825.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Trojnář, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 94, 136–142.
- Tzipori, S., Caple, I.W., Butler, R., 1976. Isolation of a rotavirus from deer. *Vet. Rec.* 99, 398.