

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**DOLOČITEV CELOTNIH GENOMOV
ASTROVIRUSOV PRI SRNAH**

**SEQUENCING OF COMPLETE ASTROVIRUS
GENOMES IN ROE DEER**

Vita Čivnik

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 578.5:57.065:57.088.7:599.735.341(043.2)

**DOLOČITEV CELOTNIH GENOMOV
ASTROVIRUSOV PRI SRNAH**

**SEQUENCING OF COMPLETE ASTROVIRUS
GENOMES IN ROE DEER**

Vita Čivnik

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom doc. dr. Urške Jamnikar Ciglenečki in somentorstvom znan. sod. dr. Urške Kuhar na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2019

POVZETEK

Ključne besede: Astroviridae – genetika; zaporedje aminokislin; sekvenciranje celotnega genoma; filogenija; srna.

Astrovirusi povzročajo drisko in enteritis pri številnih vrstah sesalcev in nekaterih vrstah ptic, opisujejo pa tudi primere astrovirusnih okužb izven črevesja. Za astroviruse sta značilni široka genetska variabilnost in možnost rekombinacijskih dogodkov, zadnje čase pa se pojavlja tudi vprašanje o zoonotskem prenosu. Do sedaj obstaja le en opis astrovirusov pri srnah, in sicer so Smits in sod. (2010) določili del genoma dveh astrovirusov in ju poimenovali CcAstV-1 in CcAstV-2. V naši raziskavi smo prvi na svetu z metodo sekvenciranja naslednje generacije določili celotno zaporedje dveh genomov astrovirusov pri srnah (AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14). Izvedli smo filogenetske analize, v katerih smo slovenska astrovirusna seva primerjali s sevi astrovirusov, ki so dostopni v podatkovni zbirki GenBank. Organizacija genomov slovenskih sevov je značilna za rod *Mamastrovirus*. Seva AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14 sta sorodna in v primerjavi z drugimi astrovirusi, objavljenimi v podatkovni zbirki GenBank, najsorodnejša drugim astrovirusom pri srnah. Genetska razdalja v regiji ORF2 med AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 ter danskimi astrovirusnimi sevi pri srnah znaša od 3,9 % do 25,1 %, astrovirusnimi sevi ostalih živalskih vrst pa od 14,8 % do 46,5 %. Filogenetske analize in analize genetskih razdalj aminokislinskih zaporedij v regiji ORF2 kažejo, da sodita seva AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 v isti genotip kot CcAstV-1, CcAstV-2, astrovirusna seva vodnega bizona in enogrbe kamele, sev sečuanskega takina, ježevca in jaka ter nekateri sevi PoAstV in BoAstV, ki taksonomsko še niso uvrščeni.

SUMMARY

Key words: Astroviridae – genetics; amino acid sequence; whole genome sequencing; phylogeny; roe deer.

Astroviruses cause diarrhoea and enteritis in many mammalian and some avian species. There are also reports of extra-intestinal findings of astroviruses. High genetic variability and the possibility of recombination events are characteristic for astroviruses and recently, a concern about the potential zoonotic transmission of astroviruses to humans has arisen. Only one description of astrovirus in roe deer has been made so far. Smits et al. (2010) have described part of the genome and named the strains CcAstV-1 and CcAstV-2. In this study, two complete genome sequences of roe deer astroviruses (AstV SLO/D5-14 and AstV SLO/D12-14) were determined for the first time by using the method of next generation sequencing. Phylogenetic analysis was performed comparing Slovenian roe deer astrovirus strains with other astrovirus strains available in GenBank. The complete genomes contain typical *Mamastrovirus* organization. Strains AstV SLO/D5-14 and AstV SLO/D12-14 are most closely related to each other and, in comparison to other astroviruses in GenBank, to other roe deer strains. The genetic distance in the ORF2 region between AstV SLO/D12-14, AstV SLO/D5-14 and Danish roe deer astrovirus strains is between 3.9 % and 25.1 %, and between AstV SLO/D12-14, AstV SLO/D5-14 and astroviruses of other animal species between 14.8 % and 46.5 %. Phylogenetic and genetic distance analyses of amino acid sequences in the ORF2 region show that AstV SLO/D12-14 and AstV SLO/D5-14 belong to the same genotype as CcAstV-1, CcAstV-2, water buffalo, dromedary, Sichuan takin, porcupine and yak astrovirus strains and some PoAstV and BoAstV strains, which are unclassified.

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 PREGLED ZGODOVINSKIH PODATKOV O ASTROVIRUSIH	3
2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV	6
2.3 STRUKTURA VIRUSA	9
2.4 PATOGENEZA IN NASTANEK DRISKE	10
2.5 ČLOVEŠKI ASTROVIRUSI	11
2.5.1 Klinična slika	11
2.5.2 Prenos	11
2.6 ŽIVALSKI ASTROVIRUSI	12
2.6.1 Astrovirusi pri srnah	12
2.6.2 Ovčji astrovirusi	13
2.6.3 Goveji astrovirusi	14
2.6.4 Mačji astrovirusi	14
2.6.5 Prašičji astrovirusi	15
2.6.6 Astrovirusi kun	15
2.6.7 Pasji astrovirusi	15
2.6.8 Astrovirusi pri netopirjih	16
2.6.9 Ptičji astrovirusi	16
2.7 GENETSKA VARIABILNOST	17
2.8 ZOONOTSKI POTENCIAL	17
2.9 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (NGS)	18

2.9.1 Sistem za sekvenciranje Ion Torrent (Ion PGM)	20
3 MATERIALI IN METODE.....	22
3.1 VZORČENJE IN DOKAZ PRISOTNOSTI AstV	22
3.2 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (NGS)	22
3.2.1 Osamitev RNA z reagentom Trizol.....	22
3.2.2 Sinteza dvostranske cDNA	23
3.2.3 Fragmentacija cDNA	24
3.2.4 Popravilo koncev ter vezava adapterjev in črtnih kod	24
3.2.5 Čiščenje in izbira fragmentov želene velikosti	24
3.2.6 Kvantifikacija knjižnice s PCR v realnem času	25
3.2.7 Združevanje vzorcev, emulzijski PCR in obogatitev	26
3.2.8 Sekvenciranje z Ion PGM	26
3.3 BIOINFORMACIJSKA OBDELAVA PODATKOV	26
3.4 FILOGENETSKE ANALIZE	27
4 REZULTATI	28
4.1 VZORČENJE IN DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI NUKLEINSKE KISLINE ASTROVIRUSOV	28
4.2 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (NGS)	29
4.3 ANALIZA GENOMOV ASTROVIRUSOV	30
4.4 FILOGENETSKE ANALIZE	31
4.4.1 Filogenetska analiza aminokislinskih zaporedij v regiji ORF1a	33
4.4.2 Filogenetska analiza aminokislinskih zaporedij v regiji ORF1b.....	35
4.4.3 Filogenetska analiza aminokislinskih zaporedij v regiji ORF2	37
5 RAZPRAVA.....	39
6 SKLEPI.....	43
7 ZAHVALE	45
8 LITERATURA.....	46

KAZALO TABEL

Tabela 1: Kronologija odkritij, prvih ugotovitev in <i>in vitro</i> osamitev astrovirusov (povzeto po De Benedictis in sod., 2011)	5
Tabela 2: Število vzorcev glede na lovsko upravljavsko območje in lovsko družino.	28
Tabela 3: Podobnost aminokislinskih zaporedij sevov AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14 z AstV sevi iz podatkovne zbirke GenBank.	32

Kazalo slik

Slika 1: Filogenetsko drevo družine <i>Astroviridae</i> (povzeto po Bosch in sod., 2014).....	8
Slika 2: Delci HAstV iz vzorcev blata pod transmisijskim elektronским mikroskopom (povzeto po Bosch in sod., 2014).	9
Slika 3: Shematski prikaz organizacije HAstV genoma (povzeto po Walter in sod., 2002) ...	10
Slika 4: Filogenetsko drevo aminokislinskega zaporedja v regiji astrovirusov ORF2 (povzeto po Smits in sod., 2010)	13
Slika 5: Naprava Covaris® M220 Focused-ultrasonicator™ (povzeto po Covaris, Inc.)	19
Slika 6: Sekvenator Ion PGM (povzeto po ThermoFisher Scientific).....	20
Slika 7: a) Zgradba Ion Torrent čipa; b) Zaznavanje spremembe pH vrednosti ob vezavi nukleotida (povzeto po Mardis, 2013).....	21
Slika 8: Geografsko področje lovskih upravljavskih območij vključenih v raziskavo (povzeto po ZGS, 2018).....	29
Slika 9: Organizacija genomov astrovirusnih sevov AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14.	30
Slika 10: Filogenetsko drevo AstV na nivoju aminokislin v regiji ORF1a z metodo največjega verjetja (ML).	34
Slika 11: Filogenetsko drevo AstV na nivoju aminokislin v regiji ORF1b z metodo največjega verjetja (ML).	36
Slika 12: Filogenetsko drevo AstV na nivoju aminokislin v regiji ORF2 z metodo največjega verjetja (ML).	38

SEZNAM OKRAJŠAV

AAstV	rod <i>Avastrovirus</i>
AK	aminokislina
AMV RT	reverzna transkriptaza virusa ptičje mieloblastoze (angl. <i>avian myeloblastosis virus reverse transcriptase</i>).
AMV	virus ptičje mieloblastoze (angl. <i>avian myeloblastosis virus</i>)
ANV	virus aviarnega nefritisa (angl. <i>avian nephritis virus</i>)
AstV	astrovirus
BaAstV	astrovirus pri netopirjih (angl. <i>bat astrovirus</i>)
BdAstV	astrovirus velike pliskavke (angl. <i>bottlenose dolphin astrovirus</i>)
BIC	Bayesov informacijski kriterij (angl. <i>Bayesian information criterion</i>)
BLAST	iskalnik podobnih zaporedij v podatkovni zbirki GenBank (angl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BoAstV	goveji astrovirus (angl. <i>bovine astrovirus</i>)
bp	bazni par
BVD	bovina virusna diareja (angl. <i>bovine viral diarrhea</i>)
CaAstV	pasji astrovirus (angl. <i>canine astrovirus</i>)
CAstV	piščančji astrovirus (angl. <i>chicken astrovirus</i>)
CcAstV	astrovirus pri srnah (angl. <i>Capreolus capreolus astrovirus</i>)
cDNA	komplementarna DNA (angl. <i>complementary DNA</i>)
CslAstV	astrovirus kalifornijskega morskega leva (angl. <i>California sea lion astrovirus</i>)
DAstV	račji astrovirus (angl. <i>duck astrovirus</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksiribonukleotid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)

FeAstV	mačji astrovirus (angl. <i>feline astrovirus</i>)
GenBank	podatkovna zbirka GenBank
HAstV	človeški astrovirus (angl. <i>human astrovirus</i>)
HMOAstV	ljudem, kunam in ovcam podobni astrovirusi (angl. <i>human, mink and ovine-like astrovirus</i>)
ICTV	Mednarodni odbor za taksonomijo virusov (angl. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
ISP	kroglice, na katere se v postopku sekvenciranja naslednje generacije vežejo fragmenti DNA knjižnice (angl. <i>Ion Sphere Particles</i>)
MAstV	rod <i>Mamastrovirus</i>
MEGA	računalniški program za oblikovanje filogenetskih dreves (angl. <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>)
MiAstV	astrovirus kun (angl. <i>mink astrovirus</i>)
ML	metoda največjega verjetja (angl. <i>Maximum Likelihood</i>)
MUSCLE	program za poravnavo nukleotidnih ali proteinih zaporedij (angl. <i>MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation</i>)
NGS	sekvenciranje naslednje generacije (angl. <i>next generation sequencing</i>)
nt	nukleotid
NTR	nekodirajoča regija (angl. <i>nontranslated region</i>)
ORF	odprt bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i>)
OvAstV	ovčji astrovirus (angl. <i>ovine astrovirus</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PGM	sekvenator (angl. <i>Personal Genome Machine</i>)
PoAstV	prašičji astrovirus (angl. <i>porcine astrovirus</i>)
poliA rep	poliadeniliran rep
RAstV	astrovirus podgan (angl. <i>rat astrovirus</i>)
RdRp	od RNA odvisna polimeraza RNA (angl. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)

RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	metoda obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
SMS	sindrom tresočih minkov (angl. <i>shaking mink syndrome</i>)
SPF	brez specifičnih patogenih organizmov (angl. <i>specific pathogen free</i>)
SRSVs	mali okrogli strukturirani virusi (angl. <i>small round-structured viruses</i>)
SRVs	mali okrogli virusi (angl. <i>small round viruses</i>)
ssRNA	enoverižna ribonukleinska kislina
TAstV	puranji astrovirus (angl. <i>turkey astrovirus</i>)
v-Pro	serinska proteaza

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Predstavniki družine *Astroviridae*, v katero sta uvrščena rodova *Mamastrovirus* (MAstV) in *Avastrovirus* (AAstV), povzročajo drisko in enteritis pri številnih sesalcih in nekaterih vrstah ptic, pri pticah in pri nekaterih sesalcih pa tudi opisujejo primere astrovirusnih (AstV) okužb izven črevesja (Bosch in sod., 2014). Novejše raziskave povezujejo astroviruse s primeri vnetja možganov in hrbtenjače pri kunah, govedu, ovkah, prašičih in tudi ljudeh (Blomström in sod., 2010; Quan in sod., 2010; Wunderli in sod., 2011; Li in sod., 2013; Brown in sod., 2015; Arruda in sod., 2017; Pfaff in sod., 2017). Astrovirusi se prenašajo po fekalno-oralni poti, najpogosteje z zaužitjem kontaminirane hrane in vode. Njihova stabilnost v pitni, sladki in morski vodi jim omogoča prenos v okolju (Pintó in sod., 1996; Bosch in sod., 2014). Vir kontaminacije vode so lahko iztrebki okuženih domačih živali ter divjadi, v katerih se nahajajo marsikateri potencialni povzročitelji zoonoz (Santo Domingo in Edge, 2010; Pandey in sod., 2014). Do sedaj opisani MAstV in AAstV so genetsko zelo raznoliki, opisanih pa je tudi vedno več rekombinacij – tudi med astrovirusi različnih živalskih vrst (Pantin-Jackwood in sod.; 2006; Strain in sod., 2008; Tse in sod., 2011). Vedno več podatkov je, da astrovirusi niso vrstno specifični in da so živalski in človeški sevi sorodni, kar skupaj z veliko genetsko raznolikostjo in možnostjo rekombinacij kaže na veliko verjetnost zoonotskega prenosa (Vu in sod., 2017).

Srnjad je razširjena po celotni Sloveniji. Živi v gozdovih, ki so obkroženi s travniki, pašniki in njivami. Prilagodila se je tudi življenju na odprtih poljih ter se močno približala naseljem, prav tako pa prihaja v stik z živalmi na kmetijah na obrobju gozdov, s čimer lahko pride tudi do prenosa virusov.

Do sedaj je bila na svetu opravljena le ena raziskava o prisotnosti astrovirusov pri srnah na Danskem, vendar njihovega celotnega genoma niso določili (Smits in sod., 2010). Tse in sod. (2011) so na podlagi rezultatov filogenetskih analiz pri raziskavah govejih astrovirusov (BoAstV) predvideli, da ti spadajo v isti podtip kot astrovirusi pri srnah, in to kljub temu, da pripadajo različnim gostiteljem. Opravili so tudi dodatne analize genetskih razdalj med BoAstV in astrovirusi pri srnah na področju regije ORF2 in ugotovili, da bi za zanesljivejše trditve potrebovali zaporedja celotnih genomov astrovirusov pri srnah.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Namen našega raziskovalnega dela je bil določiti nukleotidna zaporedja celotnih genomov astrovirusov pri srnah s sekvenciranjem naslednje generacije (NGS), s tehnologijo Ion Torrent. Raziskava je bila opravljena na vzorcih pretekle raziskave, v kateri so v treh vzorcih črevesne vsebine srnjadi z metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) dokazali prisotnost astrovirusov. Na podlagi dobljenih nukleotidnih zaporedij celotnih genomov astrovirusov smo izvedli filogenetske analize, v katerih smo slovenske seve astrovirusov pri srnah primerjali z astrovirusi, ki so objavljeni v podatkovni zbirki GenBank.

Raziskava v okviru Prešernove naloge je prva raziskava na svetu, v kateri smo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov astrovirusov pri srnah.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- a) Astrovirusi, ki so prisotni pri srnah v Sloveniji, imajo organizacijo genoma, značilno za rod MAstV.
- b) Sevi astrovirusov, najdeni pri srnah v Sloveniji, so med seboj sorodni.
- c) Sevi slovenskih astrovirusov pri srnah so najsorodnejši danskim sevom astrovirusov pri srnah.
- d) Sevi slovenskih astrovirusov pri srnah spadajo v nov genotip znotraj nove genetske skupine, skupaj z ostalimi taksonomsko še neuvrščenimi astrovirusnimi sevi pri prežvekovalcih.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 PREGLED ZGODOVINSKIH PODATKOV O ASTROVIRUSIH

Virusi, ki jih sedaj uvrščamo v družino *Astroviridae*, so prvič omenjeni v delih Appletona in Higginsa (1975), ki sta z elektronsko mikroskopijo v vzorcih blata otrok z blago drisko in bruhanjem odkrila 28–30 nm velike delce. Še istega leta sta Madeley in Cosgrove (1975) prvič uporabila termin "astrovirusi" (AstV) v zvezi z majhnimi okroglimi virusi z značilno zvezdasto morfologijo, ki sta jih odkrila v vzorcih blata dojenčkov z gastroenteritisom. Poimenovanje izvira iz grške besede *astron*, kar pomeni zvezda. Ti delci so bili zaradi svojih ravnih robov uvrščeni v skupino "malih okroglih virusov" (angl. *small round viruses*, SRVs), za razliko od npr. kalicivirusov, ki so jih uvrstili v skupino "malih okroglih strukturiranih virusov" (angl. *small round-structured viruses*, SRSVs), saj so pod elektronskim mikroskopom njihovi robovi neostri in nitasti (Madeley, 1989).

Astrovirusi so bili na podlagi strukture genoma uvrščeni v svojo družino *Astroviridae*, ločeno od ostalih virusov s pozitivno orientirano enoverižno ribonukleinsko kislino (ssRNA) (Monroe in sod., 1995). Družina astrovirusov je na podlagi morfologije viriona sprva zajemala le en rod, *Astrovirus* (Monroe in sod., 1995), kasneje pa so jo glede na izvornega gostitelja razdelili na robove *Mamastrovirus* (MAstV), kamor so uvrščeni AstV pri sesalcih, in *Avastrovirus* (AAstV), kamor so uvrščeni astrovirusi pri pticah (Mendez in Arias, 2007).

Kmalu po prvih opisih virusa pri ljudeh so se začeli pojavljati opisi astrovirusom podobnih delcev pri domačih živalih. Najprej so jih našli pri jagnjetih in teletih z drisko (Snodgrass in Gray, 1977; Woode in Bridger, 1978). Na podlagi kliničnih in viroloških opazovanj primerov akutnega pogina rac v osemdesetih letih so bili astrovirusi povezani s hepatitism, ki je povzročal te pogine (Gough in sod., 1984). To je bil najverjetnejše prvi dokaz astrovirusov, katerih prisotnost so dokazali zunaj črevesja. Že leta 1960, desetletje pred odkritjem astrovirusov in 20 let pred njihovo identifikacijo kot povzročiteljev hepatitisa pri racah, je prišlo pri njih do izbruha akutnega hepatitisa, ki ga sedaj pripisujejo astrovirusom (Aspin, 1965).

Seznam živalskih vrst, ki so dovetne za astrovirusne okužbe, trenutno obsega številne udomačene, sinantropne in divje živalske vrste – ptice in sesalce, živeče tako v kopenskem kot v vodnem okolju. Astroviruse so dokazali v vzorcih blata sesalcev, kot so mačke, psi, govedo,

srne, miši, podgane, prašiči, ovce, kune, netopirji, gepardi, zajci in celo morski levi ter delfini, pa tudi v vzorcih izločkov ptičev, kot so purani, kokoši, race, golobi, pegatke in številne divje akvatične ptice (Bosch in sod., 2014).

Leta 1981 sta Lee in Kurtz prvič osamila in namnožila človeške astroviruse (HAstV) na primarnih celičnih kulturah, čez tri leta so opisali že pet genotipov, v naslednjih desetih letih pa še dva (Kurtz in Lee, 1984; Risco in sod., 1995). Leta 1997 so predlagali obstoj še osmega genotipa (Belliot in sod., 1997). Do leta 2008 je veljalo, da obstaja le osem različnih genotipov HAstV, ki jih sedaj uvrščamo med klasične HAstV. Z novejšimi metodami so odkrili skupine še neopisanih virusov, ki se glede na organizacijo genoma zelo razlikujejo od že opisanih astrovirusov. Tako je leta 2008 skupina znanstvenikov v vzorcu blata avstralskega dečka določila genom virusa, ki so ga poimenovali MLB1 (AstV-MLB1), leta 2009 pa v Virginiji še AstV-VA1 (Finkbeiner in sod., 2008; Finkbeiner in sod., 2009). Ta čas je pri odraslih popotnikih druga skupina identificirala tri nove vrste HAstV, ki so jih poimenovali, "ljudem, kunam in ovcam podobni astrovirusi" (HMOAstV) tipa A, B in C (Kapoor, 2009). V tabeli 1 je predstavljena kronologija prvih ugotovitev in *in vitro* osamitev astrovirusov.

Tabela 1: Kronologija odkritij, prvih ugotovitev in *in vitro* osamitev astrovirusov (povzeto po De Benedictis in sod., 2011).

Table 1: Chronology of astroviruses discovered, year of first detection and in vitro isolation (adopted from De Benedictis et al., 2011).

VRSTA GOSTITELJA	LETO UGOTOVITVE	LETO OSAMITVE	KLINIČNI ZNAKI
Človek (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	1975	1981	Gastroenteritis pri otrocih
Domača ovca (<i>Ovis aries</i>)	1977	-	Driska pri jagnjetih
Domače govedo (<i>Bos taurus</i>)	1978	1985	Driska pri teletih, asimptomatsko
Domača kokoš (<i>Gallus gallus</i>)	1979	1979	Interstičijski nefritis pri mladih piščancih, enteritis
Prašič (<i>Sus scrofa</i>)	1980	1980	Driska pri pujskih, asimptomatsko
Domači pes (<i>Canis lupus familiaris</i>)	1980	-	Driska pri pasjih mladičih, asimptomatsko
Mačka (<i>Felis catus</i>)	1981	-	Pireksija in blaga driska, asimptomatsko
Navadni jelen (<i>Cervus elaphus</i>)	1981	1981	Driska
Domača raca (<i>Anas platyrhynchos domestica</i>)	1984	1985	Akuten hepatitis in smrtnost pri račjih mladičih
Hišna miš (<i>Mus musculus</i>)	1985	-	Driska, asimptomatsko
Puran (<i>Meleagris meleagris</i>)	1980	1991	Kompleks puranjih enteritsov (PEC), sindrom puranje mortalnosti in enteritisa (PEMS)
Ameriški mink (<i>Neovison vison</i>)	2002	-	Predodstavljena driska, bolezen tresočih minkov
Navadna pegatka (<i>Numida meleagris</i>)	2005	-	Enteritis
Žužkojadi netopir	2008	-	-
Gepard (<i>Acinonyx jubatus</i>)	2009	-	Letargija in anoreksija, vodena driska
Kalifornijski morski lev (<i>Zalophus californianus</i>)	2010	-	Driska pri mladičih, odrasli klinično zdravi
Stellerjev morski lev (<i>Eumelopias jubatus</i>)	2010	-	Mladiči brez znakov driske
Navadna velika pliskavka (<i>Tursiops truncatus</i>)	2010	-	Klinično zdravi
Siva podgana (<i>Rattus norvegicus</i>)	2010	-	-
Srna (<i>Capreolus capreolus</i>)	2010	-	Driska

2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Astroviruse uvrščamo v družino *Astroviridae*, kamor spadajo virusi brez ovojnice ter s pozitivno orientirano ssRNA (Matsui in Greenberg, 1996). Glede na izvor in strukturo genoma so družino *Astroviridae* razdelili v dva rodova: MAstV, kamor so uvrščeni vsi genotipi človeških astrovirusov in ostalih sesalcev, ter AAstV, kamor so uvrščeni ptičji astrovirusi (Mendez in Arias, 2007).

Razdelitev astrovirusov je do leta 2012 temeljila na gostiteljih, pri katerih so bili virusi izolirani, kar pa se ni ujemalo s filogenijo. Zaradi novih odkritij astrovirusov pri novih vrstah gostiteljev in astrovirusov, ki so genetsko bolj raznoliki od že znanih astrovirusov pri določeni vrsti gostitelja, so ponovno opredelili razdelitev sesalskih in ptičjih astrovirusov. Na osnovi genetske analize celotne kapsidne regije na nivoju aminokislin, je rod MAstV sedaj razdeljen na genetsko skupino I in genetsko skupino II (angl. *genogroup I*, *genogroup II*). V vsako genetsko skupino pa so uvrščeni astrovirusi različnih gostiteljev, ki so še nadaljnje razdeljeni glede na genetske kriterije in vrsto gostitelja (Bosch in sod., 2014); številni sevi pa še vedno ostajajo nerazvrščeni. Slika 1 prikazuje filogenetsko drevo družine *Astroviridae*.

Trenutna razvrstitev Mednarodnega odbora za taksonomijo virusov (angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) vsebuje 19 različnih virusnih vrst znotraj rodu MAstV. V genetsko skupino I spadajo mamastrovirusi 1–7, v genetsko skupino II pa mamastrovirusi 8–19 (Bosch in sod., 2012; Donato in Vijaykrishna, 2017):

V genetsko skupino I so razvrščeni:

- *Mamastrovirus 1* (človek - HAstV),
- *Mamastrovirus 2* (mačka - FeAstV),
- *Mamastrovirus 3* (prašič - PoAstV),
- *Mamastrovirus 4* (kalifornijski morski lev - CslAstV),
- *Mamastrovirus 5* (pes - CaAstV),
- *Mamastrovirus 6* (človek - HAstV),
- *Mamastrovirus 7* (velika pliskavka - BdAstV).

V genetsko skupino II pa:

- *Mamastrovirus 8* (človek - HAstV),

- *Mamastrovirus 9* (človek - HAstV),
- *Mamastrovirus 10* (kuna - MiAstV)
- *Mamastrovirus 11* (kalifornijski morski lev - CslAstV)
- *Mamastrovirus 12* (netopir - BaAstV)
- *Mamastrovirus 13* (ovca - OvAstV)
- *Mamastrovirusi 14–19* (netopir - BaAstV)

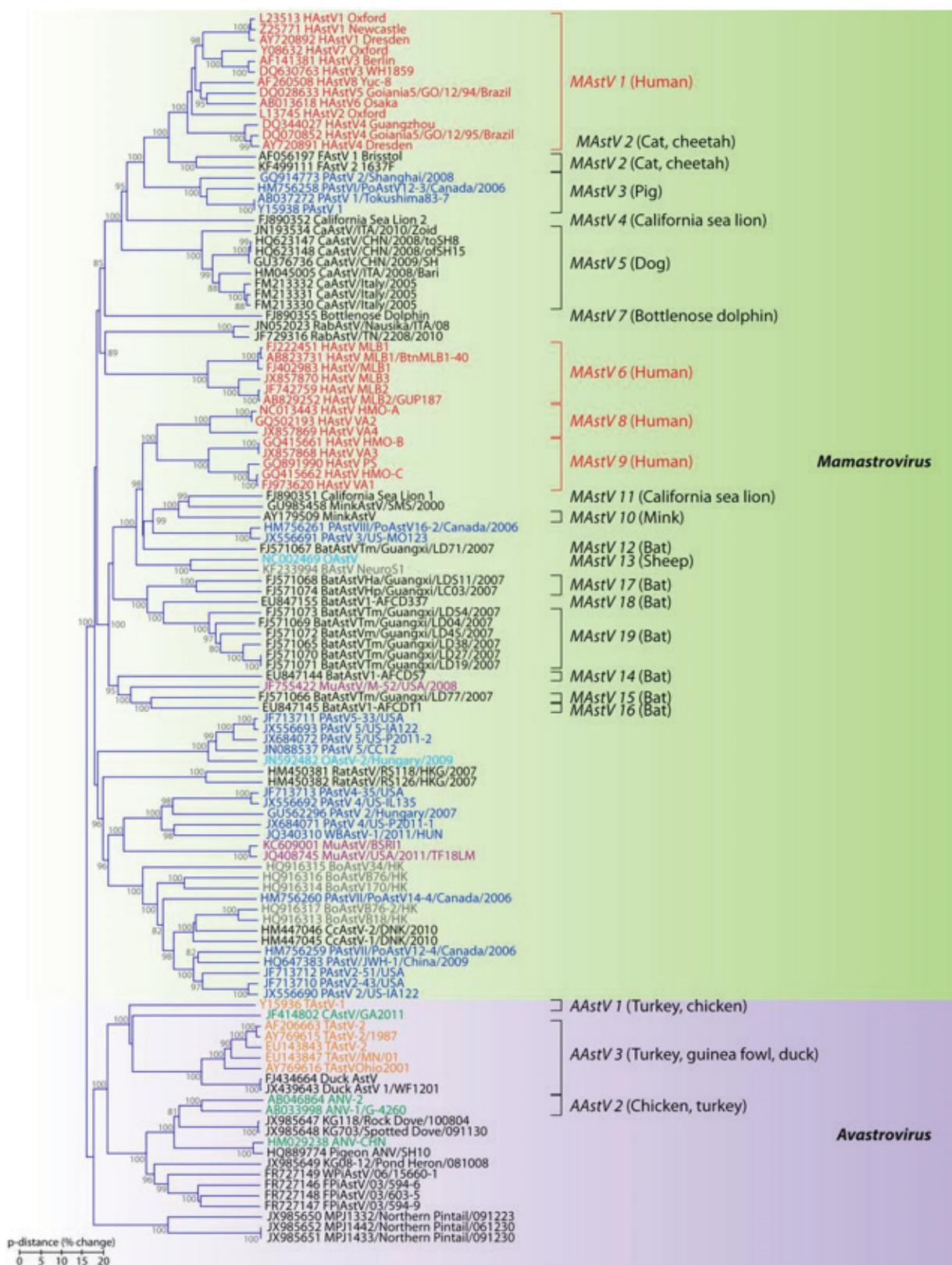
Tudi virusi iz rodu AAstV so razdeljeni v dve genetski skupini (Bosch in sod., 2012; Donato in Vijaykrishna, 2017):

V genetsko skupino I so razvrščeni:

- *Avastrovirus 1* (puran – TAstV-1)
- *Avastrovirus 2* (piščanec – ANV-1 in ANV-2 (angl. *avian nephritis virus*))

V genetsko skupino II so razvrščeni:

- *Avastrovirus 3* (puran - TAstV-2 in raca – DAstV)

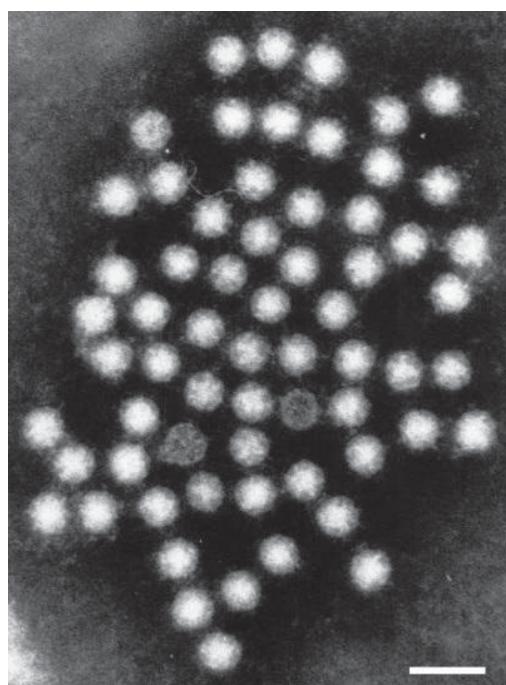


Slika 1: Filogenetsko drevo družine *Astroviridae* (povzeto po Bosch in sod., 2014)

Figure 1: Phylogenetic relationships within the family *Astroviridae* (adopted from Bosch et al., 2014)

2.3 STRUKTURA VIRUSA

Astrovirusni virioni so brez ovojnice in v premeru merijo od 28 do 33 nm. Imajo ikozaedrično strukturo kapside. Virusni delci imajo značilno pet ali šestkrako zvezdasto strukturo, robove pa gladke (Willcocks in sod., 1994). Slika 2 prikazuje HAstV pod transmisijskim elektronским mikroskopom. Proteini virusne kapside nastanejo po cepitvi prekurzorskega proteina, za katero je zapis v regiji odprtrega bralnega okvirja 2 (angl. *open reading frame*, ORF). Predpostavljajo, da je N-terminalna regija prekurzorskega kapsidnega proteina odgovorna za pakiranje virusne ribonukleinske kisline (RNA), izjemno variabilna C-terminalna regija pa vsebuje nevtralizacijske determinante in služi pritrjevanju na gostiteljeve receptorje (Dubovi in MacLachlan, 2011).

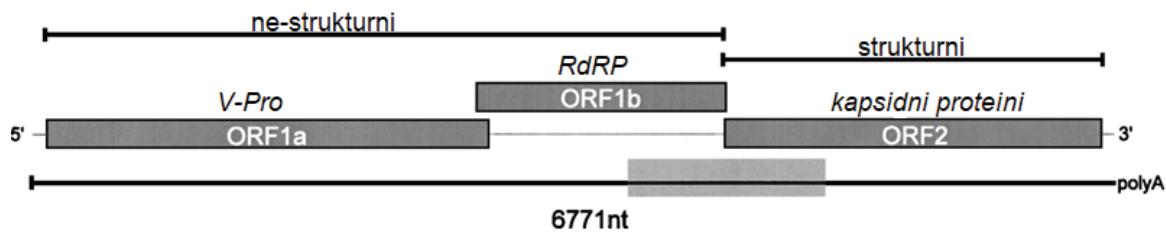


Slika 2: Delci HAstV iz vzorcev blata pod transmisijskim elektronskim mikroskopom (povzeto po Bosch in sod., 2014).

Figure 2: HAstV particles observed by transmission immunoelectron microscopy in feces (adopted from Bosch et al., 2014).

Astrovirusi vsebujejo eno molekulo infektivne, pozitivno orientirane ssRNA, velike od 6,4 do 7,7 kb (Bosch in sod., 2012). Genom vsebuje 5' in 3' nekodirajoči regiji (NTRs), poliadeniliran rep (poliA) in tri odprte bralne okvirje: ORF1a, ORF1b in ORF2. ORF1a in ORF1b skupaj kodirata nestrukturna poliproteina (nsp) 1a in 1ab, ki s posttranslacijsko cepitvijo oblikujeta

serinsko proteazo (v-Pro), od RNA odvisno polimerazo RNA (RdRp) ter številne druge proteine z dosedaj še neznano vlogo. ORF2 kodira strukturni kapsidni poliprotein in je vključen tudi v podgenomsko RNA, ki se sintetizira med pomnoževanjem virusa (Mendez in sod., 2002; Kiang in Matsui, 2002; Mendez in Arias, 2007). Slika 3 prikazuje organizacijo HAstV genoma.



Slika 3: Shematski prikaz organizacije HAstV genoma (povzeto po Walter in sod., 2002).

Figure 3: Schematic diagram of the genome organization of HAstV (adopted from Walter et al., 2002)

2.4 PATOGENEZA IN NASTANEK DRISKE

Podatkov o patogenezi astrovirusov je zaenkrat še zelo malo. Znano pa je, da predstavniki družine *Astroviridae* povzročajo drisko in enteritis pri številnih sesalcih in nekaterih vrstah ptičev. V črevesju, kjer je prišlo do okužbe z astrovirusom, je malo histoloških in vnetnih sprememb, ki so sicer značilne pri okužbah z enteričnimi virusi (npr. večje uničenje črevesnega epitelija in vnetni odgovor) (Bosch in sod., 2014). To je bil razlog, da so spremembe črevesja po okužbi z astrovirusi še dodatno raziskovali in preučevali mehanizme, ki bi lahko povzročili drisko. Na podlagi histopatoloških raziskav perzistentno okuženih imunsko oslabelih otrok z gastroenteritisom so ugotovili, da je astrovirusna okužba omejena na tanko črevo, kjer so prizadeti enterociti tankega črevesja (Sebire in sod., 2004).

2.5 ČLOVEŠKI ASTROVIRUSI

2.5.1 Klinična slika

Okužbe s HAstV prizadenejo predvsem otroke, ostarele in ljudi z oslabljenim imunskim sistemom, povzročijo pa lahko tudi okužbe pri odraslih ljudeh z normalno delajočim imunskim sistemom (Glass in sod., 1996; Pager in Steele 2002). Serološke raziskave nakazujejo, da se večina otrok že zelo zgodaj v življenju sreča z okužbo s HAstV in razvije specifična protitelesa, ki jih ščitijo pred nadaljnji okužbami (Kriston in sod., 1996; Koopmans in sod., 1998). HAstV navadno le redko povzročijo blago vodeno drisko, ki traja 2–3 dni. Poleg driske so pogosto prisotni tudi drugi simptomi, kot so bruhanje, vročina, bolečine v trebuhu ter splošno slabo počutje (Lee in sod., 2013). Kljub temu, da so o smrtnih primerih že poročali, pa do teh pride zelo redko (Singh in sod., 1989). Primeri asimptomatskih okužb so opisani tako pri otrocih kot pri odraslih posameznikih (Mendez-Toss in sod., 2004). Raziskave v zadnjem času potrjujejo tudi povezavo astrovirusnih okužb s posameznimi primeri vnetnih procesov v možganskih tkivih (Quan in sod., 2010; Wunderli in sod., 2011; Brown in sod., 2015).

2.5.2 Prenos

HAstV se prenašajo po fekalno-oralni poti, najpogosteje z zaužitjem kontaminirane hrane in vode. Fekalna kontaminacija predmetov in hrane je tako pogost povzročitelj astrovirusnih izbruhoval v vrtcih, jaslih, bolnišnicah, šolah in vojaških objektih (Abad in sod., 2001; Gallimore in sod., 2005). Eden od dejavnikov okužbe je lahko tudi prenos z vodo, saj virusom prenose v okolje omogoča njihova stabilnost v pitni, sladki in celo morski vodi (Pintó in sod., 1996; Bosch in sod., 2014). HAstV se lahko izloča v zelo velikem številu, do 10^{13} genomskeh kopij na gram blata okuženega posameznika (Caballero in sod., 2003). Ker postopki obdelave odpadnih voda ne zagotavljajo popolne odstranitve virusnih patogenov, se HAstV z odpadnimi vodami lahko izločajo v okolje (Pintó in sod., 2001) ter kontaminirajo morsko, sladko in podzemno vodo (Pintó in sod., 1996; Le Guyader in sod., 2000). Vir vodne kontaminacije so lahko iztrebki okuženih domačih živali ter divjadi. Takšno kontaminacijo je tudi težko preprečiti oz. omejiti (Santo Domingo in Edge, 2010; Pandey in sod., 2014).

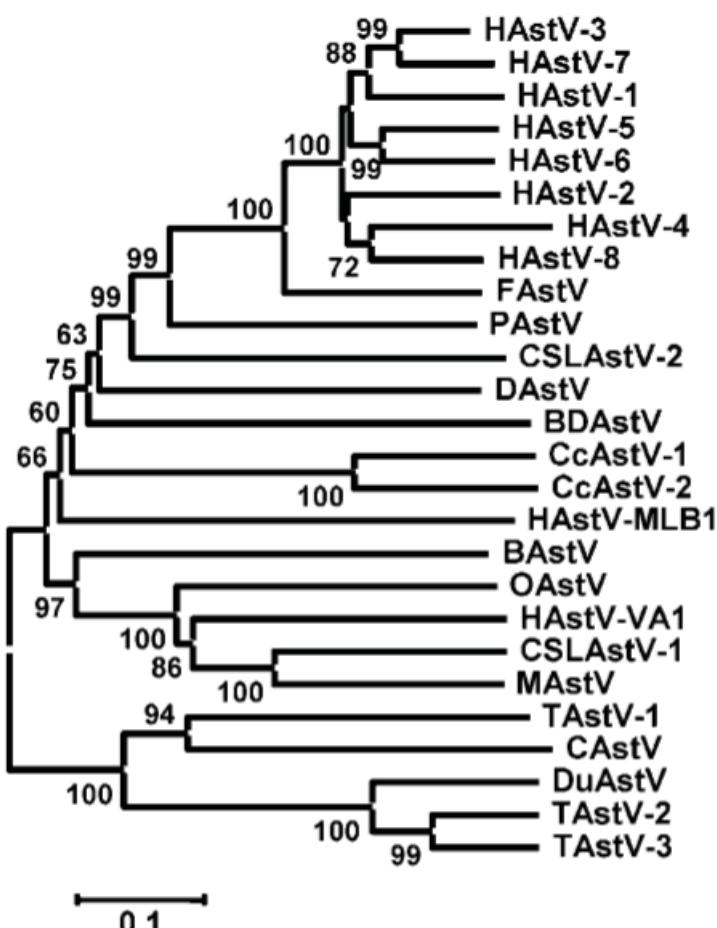
2.6 ŽIVALSKI ASTROVIRUSI

Astroviruse so odkrili pri mnogih živalskih vrstah – sesalcih in pticah. Pri večini vrst virusa povezujejo z gastroenteritisom (Chu in sod., 2008). Pri nekaterih pticah virusi prizadenejo črevesje, najdemo pa jih tudi izven črevesja (Mendez in Arias, 2007). Obstajajo tudi novejše raziskave, ki povezujejo astroviruse s primeri vnetja možganov in hrbtenjače pri kunah, govedu, ovcah in prašičih (Blomström in sod., 2010; Li in sod., 2013; Pfaff in sod., 2017; Arruda in sod., 2017). V preteklosti so v večini raziskav proučevali človeške astroviruse in astroviruse domačih živali, relativno malo pa je bilo znanega o prevalenci astrovirusov pri divjih živalih (Chu in sod., 2008). Z uporabo sekvenciranja naslednje generacije (angl. *next generation sequencing*, NGS) je identifikacija virusov veliko lažja (Donato in Vijaykrishna, 2017).

2.6.1 Astrovirusi pri srnah

Do sedaj so bili astrovirusi pri srnah (CcAstV) še relativno neraziskani. Virus so prvič izolirali in okarakterizirali leta 2010, ko so na Danskem poročali o izbruhi gastroenteritisov v populaciji evropske srne (*Capreolus capreolus*) (Smits in sod., 2010). V vzorcih blata desetih obolelih srn so dokazovali prisotnost bakterij, parazitov in virusa bovine virusne diareje (BVD), a so bili rezultati vseh preiskav negativni (Smits in sod., 2010). Pri dveh srnah pa so dokazali prisotnost astrovirusov ter seva poimenovali CcAstV-1 in CcAstV-2, vendar pa ni znano, če je bil astrovirus tudi glavni etiološki dejavnik nastanka driske.

Genetska razdalja med astrovirusoma pri srnah in ostalimi astrovirusi je bila večja v kapsidni regiji kot v RdRp regiji, kar nakazuje na močan pozitivni selekcijski pritisk s strani gostiteljevega imunskega sistema (van Hemert in sod., 2007). Genetska razdalja med CcAstV-1 in 2 je bila podobna tisti med HAstV serotipi 1–8, zato so avtorji astroviruse pri srnah razdelili na dva serotipa. Odkrita virusa pri srnah sta bila genetsko sorodna BoAstV do te mere, da se predvideva možen preskok med gostiteljem – govedom in srnjadjo (Tse in sod., 2011). Slika 4 prikazuje filogenetsko drevo ORF2 regije astrovirusov.



Slika 4: Filogenetsko drevo aminokislinskega zaporedja v regiji astrovirusov ORF2 (povzeto po Smits in sod., 2010)

Figure 4: Phylogenetic tree of the ORF2-encoded amino acids of astroviruses (adopted from Smits et al., 2010)

2.6.2 Ovčji astrovirusi

Astrovirusna okužba pri jagnjetih je po vsej verjetnosti ena prvih zabeleženih astrovirusnih okužb pri živalih (Snodgrass in Gray, 1977). Celotno nukleotidno zaporedje genoma OvAstV je dostopno v podatkovni zbirki GenBank in je podlaga za nadaljnje raziskave na področju analiz delovanja in rekombinacij MAstVs (Jonassen in sod., 2003). Kasneje so namreč ugotovili, da so novoodkriti astrovirusi iz vzorcev človeškega blata, zaradi skupnega prednika, v tesnem genetskem sorodstvu z OvAstV in MiAstV (Finkbeiner in sod., 2009; Kapoor in sod., 2009).

2.6.3 Goveji astrovirusi

BoAstV spada med eno od prvih ugotovljenih živalskih astrovirusnih okužb. Prvič so ga izolirali leta 1978 v Angliji (Woode in Bridger, 1978). Eksperimentalne okužbe telet s sevom BoAstV, odkritim v Angliji, niso povzročile klinične slike, zato so BoAstV sprva pripisali avirulentnost (Woode in sod., 1984). Odsotnost kliničnih znakov je verjetno razlog, da se z BoAstV v nadaljnjih raziskavah niso posebej ukvarjali, saj so sklenili, da v naravnih pogojih ne obstaja povezava med virusom in hujšo obliko driske pri teletih (Woode in Bridger, 1978; Woode in sod., 1984). Nekateri sevi so bili nedavno povezani z boleznijo centralnega živčevja (Li in sod., 2013; Bouzalas in sod., 2014; Schlottau in sod., 2016; Wuthrich in sod., 2016). Med BoAstV sta v preteklosti spadala le dva genotipa, in sicer BoAstV-1 ter BoAstV-2 (Woode in sod., 1985), sedaj pa je znano, da med farmsko populacijo goveda kroži več različnih genetskih skupin sevov BoAstV (Donato in Vijaykrishna, 2017). Tse in sod. (2011) so dokazali sočasno okužbo enega gostitelja z dvema različnima sevoma BoAstV, kar je pogoj za genetsko rekombinacijo med različnimi sevi. Tse in sod. (2011) so tudi dokazali, da je skozi evolucijo prišlo do vsaj enega rekombinacijskega dogodka med BoAstV in astrovirusi pri srnah v regiji ORF2. Filogenetske analize kažejo, da BoAstV podobne viruse najdemo tudi pri jakih in vodnih bizonih (Donato in Vijaykrishna, 2017).

2.6.4 Mačji astrovirusi

Okužba mačk s FeAstV lahko povzroči povišano telesno temperaturo in blago drisko (Harbour in sod., 1987), ob prisotnosti drugih bolezni, ki oslabijo mačji imunski sistem, pa lahko astrovirusi povzročijo hujšo obliko gastroenteritisa (Moschidou in sod., 2011). Mačji astrovirusi so sorodni HAstV (Donato in Vijaykrishna, 2017). Predvidevajo, da je prišlo do medvrstnega prenosa virusa s prašičev na mačke ter naprej iz mačk na ljudi (Lukashov in Goudsmit, 2002).

Kasneje so odkrili astrovirus tudi pri gepardih (*Acinonyx jubatus*) v ujetništvu, ki so imeli klinične znake gastroenteritisa. Zaradi podobnosti s FeAstV v regiji ORF2 predpostavljajo, da je tudi v tem primeru prišlo do medvrstnega prenosa med mačkami in gepardi (Atkins in sod., 2009).

2.6.5 Prašičji astrovirusi

PoAstV so odkrili v različnih državah po celi svetu, kar nakazuje na široko geografsko razpršenost virusa (Geyer in sod., 1994; Ulloa in Gutierrez, 2010; Shan in sod., 2012, Brnić in sod., 2014). Prisotnost PoAstV so dokazali tudi v blatu popolnoma zdravih domačih in divjih prašičev (Luo in sod., 2011; Reuter in sod., 2011; Reuter in sod., 2012). Simptomi gastroenteritisa se pojavljajo predvsem pri mladih živalih v povezavi z drugimi virusnimi okužbami (Bridger, 1980; Indik in sod., 2006; Luo in sod., 2011). Astrovirus so izolirali tudi v tkivu centralnega živčevja pri prašičih z živčnimi znaki in vnetjem možganskega tkiva ter hrbtenjače (Arruda in sod., 2017). Uradno klasificirani so PoAstV-1 – PoAstV-5 (Donato in Vijaykrishna, 2017). Na Češkem so ugotovili podobnost prašičjega seva PoAstV s človeškim sevom HAstV-3 (Reuter in sod., 2011). Obstajajo tudi dokazi o številnih rekombinacijah v variabilni regiji ORF2 med različnimi sevi PoAstV ter med sevi PoAstV in sevi HAstV. Rekombinacije med človeškimi in prašičjimi sevi so se pojavile na področjih, kjer ljudje bivajo v neposredni bližini prašičev, avtorji raziskave pa predpostavljajo, da se je prenos zgodil s človeka na prašiča in ne obratno (Ulloa in Gutierrez, 2010).

2.6.6 Astrovirusi kun

Astrovirusne okužbe kun se pojavljajo predvsem v povezavi s sindromom predodstavitevne driske (Englund in sod., 2002), dokazali pa so tudi novejši sev astrovirusa v možganskem tkivu kune s t.i. sindromom tresočih minkov (angl. *shaking mink syndrome*, SMS) (Blomström in sod., 2010). Leta 2003 so celotnemu genomu astrovirusa, ki ga povezujejo s tem sindromom, določili nukleotidno zaporedje in ga uvrstili med novejše astroviruse (Mittelholzer in sod., 2003). Ugotovili so tudi nizko stopnjo podobnosti s človeškim sevom HAstV-PS (Quan in sod., 2010).

2.6.7 Pasji astrovirusi

CaAstV ali astrovirusom podobni delci pri psih so bili ugotovljeni v mnogih državah (Grellet in sod., 2012; Marshall in sod., 1984; Toffan in sod., 2009). O sami epidemiologiji in klinični

pomembnosti CaAstV ni znanega veliko (Zhou in sod., 2017), so pa prisotnost virusa velikokrat dokazali pri psih z drisko v povezavi z drugimi enteričnimi okužbami (Williams, 1980; Martella in sod., 2011). Čeprav psi sobivajo z ljudmi, pa CaAstV niso tako tesno sorodni HAstV, kot npr. FeAstV (Donato in Vijaykrishna, 2017).

2.6.8 Astrovirusi pri netopirjih

Okužba netopirjev z astrovirusi ne povzroča kliničnih znakov (Drexler in sod., 2011). Za BaAstV sta značilni velika genetska raznolikost in visoka prevalenca (Chu in sod., 2008; Zhu in sod., 2009; Drexler in sod., 2011). V raziskavah so ugotovili sočasno okužbo netopirjev s koronavirusi in BaAstV, med katerimi prihaja tudi do rekombinacij. Nekateri BaAstV so filogenetsko sorodni tudi s HAstV (Chu in sod., 2008). Študije kažejo na to, da so netopirji dovetni za okužbo z astrovirusi drugih gostiteljev in so zato pomemben dejavnik pri genetski raznolikosti in medvrstnem prenosu virusa (Donato in Vijaykrishna, 2017).

2.6.9 Ptičji astrovirusi

V rod AAstV spadajo različni astrovirusi, za katere je dovetnih več različnih vrst ptic. Ti virusi povzročajo obolenja, kot so hepatitis, enteritis in nefritis (Pantin-Jackwood in sod., 2013). DAstV-1 in DAstV-2 povzročata račji hepatitis, nevarno akutno bolezen od 1 do 2 tednov starih račijih mladičev in lahko povzroči tudi do 90 % smrtnost. Filogenetske raziskave kažejo, da so sevi DAstV-1 sorodni sevom TAstV-2 in obstaja možnost, da so se prenesli s puranov na race (Fu in sod., 2009). DAstV-2 trenutno še ni klasificiran (Donato in Vijaykrishna, 2017).

Do danes so znani trije genetsko različni TAstV (1–3) (Donato in Vijaykrishna, 2017). TAstV-1 je eden izmed najpogosteje izoliranih virusov pri puranih, obolelih za drisko. Določitev celotnih genomov TAstV-1 in 2 je pokazala, da sta si ta genetsko nesorodna, zato po novem TAstV-1 spada v vrsto *Avastrovirus* 1, TAstV-2 pa v *Avastrovirus* 3. TAstV-3 še ni klasificiran (Jonassen in sod., 2003; Strain in sod., 2008; Donato in Vijaykrishna, 2017).

ANV povzroča subklinične okužbe z možno slabšo rastjo in letargijo (Imada in sod., 1979; Yamaguchi in sod., 1979). Znana sta dva genetsko različna ANV: ANV-1 in ANV-2 (Donato in

Vijaykrishna, 2017). V raziskavi Baxendale in Mebatson (2004) so s piščančjim astrovirusom (CAstV) načrtno okuženi enodnevni piščanci dobili blago drisko ter distenzijo tankega črevesja, hkrati pa so ugotovili, da se CAstV antigensko in genetsko razlikuje od ANV.

2.7 GENETSKA VARIABILNOST

Zaradi narave RdRp, ki je podvržena napakam v prepisovanju, so RNA virusi bolj genetsko variabilni kot virusi z deoksiribonukleinsko kislino (DNA). Tudi astrovirusi niso izjema, saj so do sedaj opisani MAstVs in AAstVs genetsko zelo raznoliki (De Benedictis in sod., 2011).

Poleg tega je opisanih vedno več rekombinacij. Med prvimi je bila opisana rekombinacija med klasičnimi sevi HAstV, ko so Walter in sod. (2001) identificirali virus, ki je vseboval ORF2 regijo virusa HAstV-5 ter ORF1b regijo virusa HAstV-3, kar kaže na rekombinacijo v tranzicijski regiji ORF1b-ORF2. Pri otroku iz Kenije so odkrili virus, katerega deli genoma so pripadali kar trem različnim klasičnim sevom HAstV zaradi rekombinacije na področju ORF1b-ORF2 in možne dodatne rekombinacije v regiji ORF1a (Wolfaardt in sod., 2011). Rekombinacijski dogodki so opisani tudi med različnimi živalskimi vrstami astrovirusov (Pantin-Jackwood in sod.; 2006, Strain in sod., 2008; Tse in sod., 2011).

2.8 ZOONOTSKI POTENCIAL

Poraja se pomembno vprašanje o sposobnosti rekombinacije živalskih astrovirusov s HAstV, kar bi lahko vodilo do obolenj pri ljudeh, lahko pa bi prišlo tudi do zoonotskega prenosa astrovirusov iz živali na ljudi (De Benedictis in sod., 2011). Obstajajo raziskave, ki kažejo na domnevno rekombinacijo med HAstV in CslAstV, kar bi lahko pomenilo, da imajo skupnega prednika ali pa je prišlo do zoonotskega prenosa (Rivera in sod., 2010; De Benedictis in sod., 2011). Podobne hipoteze obstajajo tudi o rekombinaciji med PoAstV in HAstV (Ulloa in Gutierrez, 2010).

Tudi odkritje o domnevnih skupnih prednikih podganjih astrovirusov (RAstV), MiAstV, OvAstV ter novih HAstV je postavilo vprašanje o zoonotskem prenosu (Kapoor in sod., 2009; Chu in sod., 2010). Čeprav ni gotovih dokazov o njem, pa obstajajo raziskave o možnosti medvrstnega prenosa med živalmi in ljudmi, kar nakazuje na zoonotski potencial (De Benedictis in sod.,

2011). Lukashov in Goudsmith (2002) sta na podlagi filogenetske analize dokazala možen prenos astrovirusov s prašičev na mačke in nato preko neznanega vmesnega gostitelja na ljudi, v raziskavi narejeni v Kanadi, pa so dokazovali prenos astrovirusov z ljudi na prašiče (Luo in sod., 2011).

Nedavna raziskava, izvedena na primatih, je dokazala možnost okužbe z različnimi sevi astrovirusov, tesno sorodnimi s tistimi, ki se sicer pojavljajo pri drugih vrstah – sesalcih, pticah in celo ljudeh (Karlsson in sod., 2015). Pri ljudeh pa so dokazali protitelesa proti živalskim sevom astrovirusov (Meliopoulos in sod., 2014).

V zadnjem obdobju je iz raziskav razvidno, da so človeški in živalski sevi astrovirusov sorodni in vedno več podatkov kaže na to, da astrovirusi niso vrstno specifični. To, skupaj z veliko genetsko raznolikostjo in možnostjo rekombinacij, kaže na veliko verjetnost zoonotskega prenosa (Vu in sod., 2017).

2.9 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (NGS)

Sekvenciranje je določanje nukleotidnega zaporedja DNA. Leta 1977 je Sanger s sodelavci predstavil metodo sekvenciranja prve generacije, ki se uporablja še danes (Sanger in sod., 1977). Leta 2005 pa je podjetje 454 Life Sciences poslalo na tržišče prvi komercialno dostopen sekvenator druge generacije GS 20 in začelo se je obdobje sekvenciranja naslednje generacije (angl. *next-generation sequencing*, NGS), ki je občutno spremenilo področje genetskih raziskav (Voelkerding in sod., 2009).

NGS metode so znane tudi kot visoko zmogljive metode sekvenciranja (angl. *high-throughput sequencing*) (Besser in sod., 2018). Ne gre zgolj za eno metodo, pač pa za skupino metod, ki so jih razvili v zadnjem desetletju in pol (Muzzey in sod., 2015). Z uporabo NGS se odpirajo nove možnosti za odkrivanje novih virusov in bakterij ter za preučevanje njihove genetske raznolikosti (Kutnjak in sod., 2015). Pri metodah NGS se proizvede več sto milijonov odčitkov (angl. *reads*) na eksperiment, ti pa so v povprečju krajši in obsegajo od približno 50 do 600 nukleotidov (Progar in Petrovič, 2013).

Trenutno so v uporabi tako metode NGS kot tudi sekvenciranje po Sangerju. V veterinarskih laboratorijih se metode NGS uporabljam predvsem za določanje nukleotidnih zaporedij celotnih

genomov ali posameznih delov genoma ter za odkrivanje novih genov ali mikroorganizmov v okviru metagenomskih raziskav (Progar in Petrovič, 2013).

Poznamo več različnih sistemov ali tehnologij NGS, katere temeljijo na različnih načinih delovanja (Muzzey in sod., 2015). Med seboj se razlikujejo v samem načinu določanja nukleotidnega zaporedja, priprava vzorca pa pri vseh poteka na podoben način. Po osamitvi RNA ali DNA sledi priprava knjižnice za sekvenciranje. V kolikor smo osamili RNA, jo je potrebno prepisati v komplementarno DNA (cDNA) ter jo nato fragmentirati oz. razrezati na krajšo dolžino, ki ustreza določenemu sistemu. To lahko naredimo z mehansko ali encimsko fragmentacijo (Berlec in Štrukelj, 2010). Mehansko fragmentacijo DNA lahko izvajamo z ultrasonikatorjem Covaris (slika 5), ki deluje na način prenosa akustične energije majhne valovne dolžine in je usmerjena direktno v vzorec, s čimer omogoča natančno kontrolo hidrodinamskih strižnih sil. Gre za izotermičen proces brez neposrednega kontakta (Covaris Inc., 2012).



Slika 5: Naprava Covaris® M220 Focused-ultrasonicator™ (povzeto po Covaris, Inc.)

Figure 5: Covaris® M220 Focused ultrasonicator™ instrument (adopted from Covaris, Inc.)

Fragmentaciji DNA sledi ligacija (prilepljanje) adapterjev z encimom DNA ligazo, lahko pa vsak vzorec označimo tudi s črtno kodo (angl. *barcode*), ki omogoča sočasno sekvenciranje večjega števila vzorcev. Po sekvenciranju, katerega mehanizem se med različnimi tehnologijami razlikuje, sledi bioinformacijska obdelava dobljenih podatkov (Mardis, 2013).

2.9.1 Sistem za sekvenciranje Ion Torrent (Ion PGM)

Polprevodniška tehnologija Ion Torrent zaznava spremembo pH vrednosti, do katere prihaja ob sprostitvi vodikovih ionov (H^+), ki so stranski produkt pri vezavi nukleotidov v nastajajoči verigo (Mardis, 2013). Tehnologije Ion Torrent v primerjavi z drugimi tehnologijami ne potrebujejo optičnih komponent za odčitavanje nukleotidov in so zato cenovno dostopnejše. Sistem Ion Personal Genome Machine (PGM) (slika 6) lahko v enem ciklu (5–7 ur), odvisno od uporabljenega čipa, proizvede do 5,5 milijonov odčitkov, ustvari do 2 Gb podatkov, z dolžino odčitkov do 400 baznih parov (Ansorge in sod., 2017). Izbiramo lahko med tremi čipi Ion Chip v2 različne zmogljivosti: 314, 316 in 318 (Liu in sod., 2012).

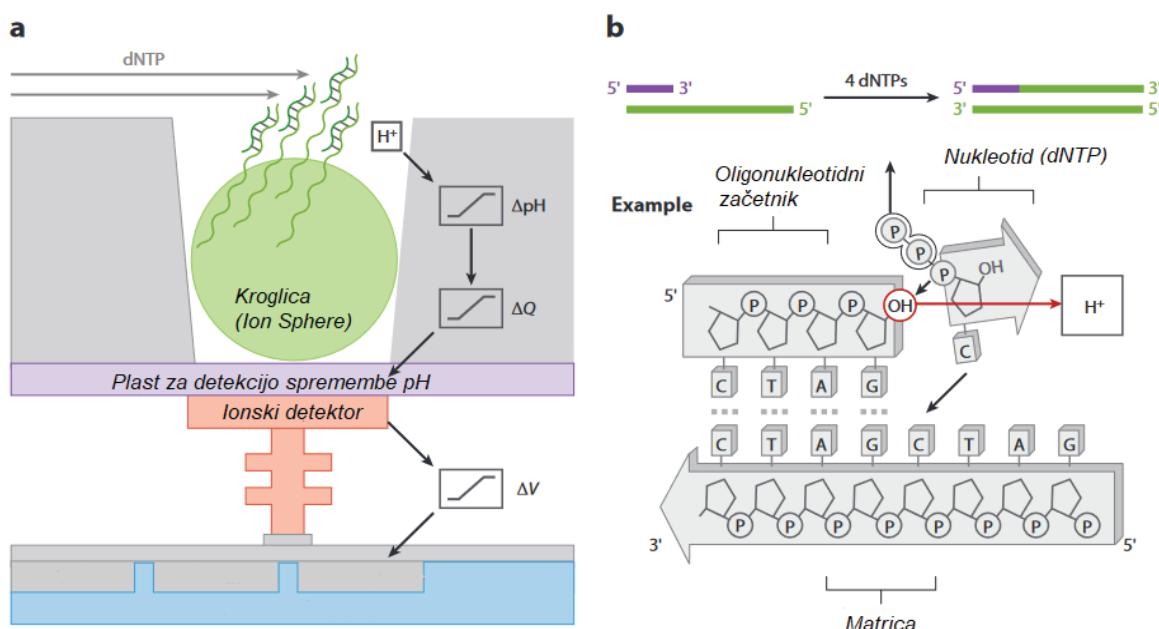


Slika 6: Sekvenator Ion PGM (povzeto po ThermoFisher Scientific)

Figure 6: Ion PGM sequencer (adopted from ThermoFisher Scientific)

Priprava knjižnice je sestavljena iz fragmentacije DNA, encimskega popravila koncev ter vezave adapterjev. Klonsko pomnoževanje fragmentov knjižnice poteka v emulzijski verižni reakciji s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) na površini kroglic (angl. *Ion Sphere Particles*, ISPs). Ker imajo kroglice kovalentno vezana nukleotidna zaporedja, ki so komplementarna tistim na adapterjih, so fragmenti za pomnoževanje z adapterji vezani na kroglice. Kroglice z vezanimi DNA fragmenti dodamo emulziji z oljnimi kapljicami, ki

vsebujejo reagente, potrebne za PCR. S pomnoževanjem v kapljicah vzporedno nastane več sto tisoč PCR pomnožkov. Kroglice imajo tako na površini PCR pomnožke, ki ustreza molekuli DNA iz knjižnice. Sledita ločitev olja od vodne raztopine (razbitje kapljic) ter obogatitev kroglic, kjer je bilo pomnoževanje uspešno. Obogatene kroglice nanesemo v jamice na čipu (angl. *Ion Chip*) (slika 7a), pod katerimi je polprevodna plast čipa za zaznavanje sprememb v električni napetosti po vgradnji ustreznih nukleotidov med sekvenciranjem (Mardis, 2013). Po vezavi komplementarnega nukleotida se namreč sprosti vodikov proton, kar vodi do spremembe pH vrednosti, ki se prevede v spremembo električne napetosti in se ustvari digitalni signal (slika 7b). Nukleotidno zaporedje tarčne molekule se določi glede na intenzivnost signala med zaporedno izpostavljivijo različnim vrstam nukleotidov. Ob ponovni vezavi istega nukleotida bo električni signal močnejši. Podatki, pridobljeni na sekvenatorju Ion PGM, se avtomatsko prenesejo na Torrent Server. Podatke nato obdelamo z bioinformatskimi orodji (Duncan in Patel, 2017).



Slika 7: a) Zgradba Ion Torrent čipa; b) Zaznavanje spremembe pH vrednosti ob vezavi nukleotida (povzeto po Mardis, 2013).

Figure 7: a) Structure of the Ion Torrent Ion Chip; b) pH sensing of nucleotide incorporation (adopted from Mardis, 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORČENJE IN DOKAZ PRISOTNOSTI AstV

Med julijem 2014 in oktobrom 2015 je potekala raziskava o spremeljanju prisotnosti nekaterih enteričnih virusov pri divjadi. Vzorčenje je potekalo s pomočjo lovcev iz šestih lovskih družin v Sloveniji (Škofja Loka, Krvavec, Šmarca Gora, Ljubno, Polhograjski Gradec in Laze). Vzorčili so črevesno vsebino tudi pri srnah (*Capreolus capreolus*). Lovci so poslali vzorce dela črevesja srnjadi skupaj z vsebino na Veterinarsko fakulteto na Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, kjer so iz vsakega vzorca naredili 10 % suspenzijo z medijem RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Suspenzijo so homogenizirali in centrifugirali 10 minut pri $1000\times g$ ter supernatant shranili pri -70°C za nadaljnjo analizo (Šturm, 2016). V kasnejših raziskavah so dokazovali prisotnost nukleinske kisline različnih enteričnih virusov (Jamnikar-Ciglenečki in Kirbiš, 2016a). Med drugim so v raziskavi z metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) v treh vzorcih srnjadi od 65 (D5/14, D12/14 ter D45/14) dokazali prisotnost astrovirusne nukleinske kisline, z metodo po Sangerju pa določili nukleotidno zaporedje produktov PCR in opravili filogenetske analize v regiji RdRp (Jamnikar-Ciglenečki in Kirbiš, 2016b).

3.2 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (NGS)

3.2.1 Osamitev RNA z reagentom Trizol

Iz treh vzorcev črevesne vsebine pri srni (D5/14, D12/14 ter D45/14) smo izvedli osamitev RNA. Po navodilih proizvajalca smo za osamitev nukleinskih kislin uporabili reagent TRIzol™ (Invitrogen, ZDA). Reagent TRIzol™ omogoča hitro in kvalitetno osamitev celokupne RNA iz celic in vzorcev tkiva človeškega, živalskega, rastlinskega in bakterijskega porekla. Je raztopina fenola, gvanidin izotiocianata ter drugih komponent, ki omogočajo osamitev različnih vrst RNA večjih in manjših molekularnih velikosti.

Osamitev RNA smo izvedli tako, da smo k $250 \mu\text{L}$ supernatanta, ki smo ga pridobili iz 10 % suspenzije vzorca, dodali $750 \mu\text{L}$ reagenta TRIzol™ in vse skupaj homogenizirali s pipetiranjem. Epruveto smo pri sobni temperaturi inkubirali 5 minut, dodali $200 \mu\text{L}$ kloroform in inkubirali

še nadalnjih 5 minut. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 15 minut pri 4°C in 12.000×g. Zgornjo vodno plast smo prenesli v novo epruveto in preostanek zavrgli. Vodni plasti smo dodali 500 µL izopropanola ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo epruveto centrifugirali 10 minut pri 4°C in 12.000×g. Supernatant smo zavrgli in pelet sprali s 750 µL 75 % ohlajenega etanola. Vzorec smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in nato centrifugirali 5 minut pri 7.500×g in 4°C. Pelet smo posušili na zraku in ga raztopili v 30 µL vode, proste RNaz.

3.2.2 Sinteza dvoverižne cDNA

Za prepis virusne RNA v cDNA smo uporabili komplet cDNA Synthesis System (Roche, Nemčija), Random-Hexamer-Primer (Roche, Nemčija) in 0.2 M etilendiamintetraocetno kislino (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) (pH 8.0). Postopek je vključeval sintezo prve verige in nato še druge verige DNA.

Najprej smo v 0,2 mL PCR epruveto odpipetirali 4 µL 400 µM Random-Hexamer-začetnih oligonukleotidov in dodali 17 µL RNA. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 2 minuti pri 95°C in 2 minuti pri 4°C, nato pa dodali 19 µL reakcijske mešanice za sintezo prve verige, ki je vsebovala: 8 µL 5x reakcijskega pufra virusa ptičje mieloblastoze (angl. *avian myeloblastosis virus*, AMV) (5× RT-buffer AMV), 4,0 µL 0,1 M ditiotreitola (DTT), 4,0 µL 10 mM deoksiribonukleotidov (dNTP), 1,0 µL 25 U/µL Protector RNase Inhibitorja in 2 µL 25 U/µL reverzne transkriptaze virusa ptičje mieloblastoze (angl. *avian myeloblastosis virus reverse transcriptase*, AMV RT). Inkubacija je potekala 10 minut pri 25°C ter 60 minut pri 42°C. Po končani inkubaciji smo epruveto hranili pri 4°C. Pripravili smo reakcijsko mešanico za sintezo druge verige, ki je vsebovala 30 µL 5x pufra za sintezo druge verige (5x 2nd strand synthesis buffer), 72 µL vode (PCR Grade), 1,5 µL 10 mM dNTP in 6,5 µL encima za drugo verigo (2nd strand enzyme). 110 µL te reakcijske mešanice smo dodali mešanici s sintetizirano prvo verigo DNA ter inkubirali 2 uri pri 16°C. Po inkubaciji smo dodali 20 µL T4 DNA polimeraze in inkubirali 5 minut pri 16°C. Dodali smo 17 µL 0,2 M EDTA, pH 8,0 in s tem ustavili delovanje encima.

3.2.3 Fragmentacija cDNA

Pri pripravi knjižnice za sekvenciranje celotnih genomov astrovirusov smo najprej izvedli fragmentacijo DNA z aparatujo Covaris® M220 Focused-ultrasonicator™ (Covaris, ZDA), ki je namenjena mehanski fragmentaciji DNA. Uporabili smo parametre, ki omogočajo pripravo fragmentov v velikosti 400 bp.

Fragmentirano cDNA smo dali na led in očistili ter koncentrirali z magnetnimi kroglicami Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter, ZDA). Uporabili smo 130 µL fragmentirane cDNA, ki smo ji dodali 234 µL kroglic in s pipeto premešali ter 5 minut inkubirali na rotatorju na sobni temperaturi, da se je DNA vezala na magnetne kroglice. Epruveto z DNA vezano na magnetne kroglice smo nato dali za 5 minut na magnetno stojalo in s pipeto pobrali tekočino ter jo zavrgli. K DNA, ki je ostala vezana na kroglice, smo dodali 500 µL 80 % etanola in inkubirali 30 sekund. Etanol smo odpipetirali in zavrgli ter spiranje z etanolom še enkrat ponovili. Epruveto smo z odprtim pokrovom inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, da je etanol popolnoma izhlapel. Epruveto smo odstranili s stojala in DNA raztopili v 23 µL vode, proste RNaz in inkubirali 2 minuti. Epruveto smo dali za 2 minuti na magnetno stojalo in nato 20,5 µL DNA prenesli neposredno v reakcijsko mešanico za popravilo koncev.

3.2.4 Popravilo koncev ter vezava adapterjev in črtnih kod

Za popravilo koncev ter vezavo adapterjev in črtnih kod smo po navodilih proizvajalca uporabili komplet reagentov GeneRead™ DNA Library L Prep Kit (Qiagen, Nemčija). Reakcijsko mešanico smo pripravljali na ledu, uporabljali smo vodo, prosto RNaz (Qiagen, Nemčija)

3.2.5 Čiščenje in izbira fragmentov želene velikosti

Za čiščenje v postopku priprave knjižnic NGS in za izbiro fragmentov želene velikosti smo uporabili magnetne kroglice Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter, ZDA). Magnetne kroglice smo s stresanjem premešali. Uporabili smo 80 µl DNA knjižnice, ki smo ji dodali 144 µl magnetnih kroglic in s pipeto premešali ter 5 minut inkubirali na rotatorju na sobni temperaturi, da se je DNA vezala na magnetne kroglice. Nato smo epruveto z DNA vezano na magnetne

kroglice prenesli za 5 minut na magnetno stojalo, s pipeto pobrali tekočino ter jo zavrgli. K DNA, ki je ostala vezana na magnetnih kroglicah, smo dodali 500 µl 80 % etanola in inkubirali 30 sekund. Etanol smo odpipetirali in zavrgli ter spiranje še enkrat ponovili. Epruveto smo z odprtim pokrovom inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, da je etanol popolnoma izhlapel. Odstranili smo jo z magnetnega stojala in DNA, vezano na magnetne kroglice, raztopili v 27 µL vode, proste RNaz in inkubirali 2 minuti. Potem smo epruveto dali na magnetno stojalo za 2 minuti in nato 25 µL raztopljene DNA prenesli v novo epruveto. Preostanek DNA, vezane na magnetne kroglice, smo ponovno raztopili v 27 µL vode, proste RNaz in inkubirali 2 minuti. Epruveto smo dali na magnetno stojalo za 2 minuti in nato vanjo prenesli 25 µL raztopljene DNA, tako da je v njej bilo 50 µL ter dodali še 50 µL vode.

Za izbiro fragmentov želene velikosti smo k 100 µL raztopljene DNA knjižnice dodali 55 µL magnetnih kroglic, premešali s pipeto in 5 minut inkubirali na rotatorju na sobni temperaturi, pri čemer so se predolgi DNA fragmenti vezali na magnetne kroglice. Epruveto smo prenesli za 2 minuti na magnetno stojalo, nato pa s pipeto prenesli tekočino v novo epruveto. Potem smo dodali 15 µL magnetnih kroglic, premešali s pipeto in 5 minut inkubirali na rotatorju na sobni temperaturi, pri čemer so se DNA fragmenti želene velikosti vezali na kroglice. Nato smo epruveto z DNA, vezano na magnetne kroglice, prenesli za 5 minut na magnetno stojalo in s pipeto pobrali tekočino ter jo zavrgli. K DNA, ki je ostala vezna na magnetne kroglice, smo dodali 500 µl 80 % etanola in inkubirali 30 sekund. Etanol smo odpipetirali in zavrgli ter spiranje ponovili še enkrat. Epruveto smo z odprtim pokrovom inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, da je etanol popolnoma izhlapel. Nato smo jo odstranili s stojala in DNA, vezano na magnetne kroglice, raztopili v 17,5 µL vode, proste RNaz in inkubirali 2 minuti. Dali smo jo na stojalo za 2 minuti in nato 15 µL DNA prenesli v novo epruveto. Preostanek DNA, vezane na magnetne kroglice, smo ponovno raztopili v 17,5 µL vode, proste RNaz, in inkubirali 2 minuti. Epruveto smo dali na stojalo za 2 minuti in nato vanjo prenesli 15 µL DNA, tako da je bilo v njej skupno 30 µL.

3.2.6 Kvantifikacija knjižnice s PCR v realnem času

Koncentracijo knjižnic smo opredelili s kvantitativno metodo PCR v realnem času (angl. *real-time PCR*) s kompletom GeneRead Library Quant Kit (Qiagen, Nemčija) ter fluorimetrično

metodo s kompletom Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ZDA) in fluorometrom Qubit 3.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalcev.

3.2.7 Združevanje vzorcev, emulzijski PCR in obogatitev

Pomnoževanje fragmentov, vezanih na kroglice ISP, smo izvedli z emulzijskim PCR na aparaturi Ion One Touch 2 (Thermo Fisher Scientific, ZDA), obogatitev pozitivnih ISP pa na aparaturi Ion One Touch ES (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca s kompletom Ion Personal Genome Machine (PGM)TM Hi-Q View OT2 400 (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Pripravljene knjižnice smo glede na rezultate kvantifikacije ustrezzo razredčili ter združili v skupen vzorec, ki smo ga dodali k reakcijski mešanici za emulzijski PCR.

3.2.8 Sekvenciranje z Ion PGM

Pred uporabo smo sekvenator Ion PGMTM (Thermo Fisher Scientific, ZDA) očistili in pripravili za uporabo po navodilih proizvajalca. Za sekvenciranje smo uporabili čip 318 v2 (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in komplet Ion PGMTM Hi-Q View Sequencing Solutions (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca.

3.3 BIOINFORMACIJSKA OBDELAVA PODATKOV

S programskimi orodji Ion Torrent Suite v.5.6.0 smo ocenili kvaliteto pridobljenih odčitkov in jih odstranili konce, na katere so bili vezani adapterji, črtne kode in začetni oligonukletidi S programom Geneious v.1.0.5 (Biomatters Ltd., Nova Zelendija) smo še dodatno porezali konce s slabo kvaliteto.

Pridobljene odčitke smo sestavili (angl. *de novo assembly*) v soseske (angl. *contigs*) z orodjem SPAdes v.3.10.0 (Bankevich in sod., 2012). Z algoritmoma BLASTn in BLASTx (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*) smo nukleotidna zaporedja sosesk primerjali z zaporedji v podatkovni zbirkni GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). S programom Geneious

v.11.0.5 (Biomatters Ltd., Nova Zelandija) smo odčitke nato prilagali na sestavljenе sošeske, ki so predstavljale genome astrovirusov (angl. *reference mapping*).

Kodirajoče regije oz. odprte bralne okvirje virusnih genomov smo določili s programom Geneious ORF Finder.

3.4 FILOGENETSKE ANALIZE

Za regije odprtih bralnih okvirjev ORF1a, ORF1b in ORF2 smo nukleotidna zaporedja prevedli v aminokislinska (AK) in s programom MUSCLE (Edgar, 2004) izvedli njihovo poravnavo (angl. *alignment*). Za filogenetske analize smo uporabili program MEGA v.7.0.21 (Kumar et al., 2016). Na podlagi poravnava AK zaporedij smo z modelom *p*-distance izračunali genetske razdalje, nato pa z metodo največjega verjetja (angl. *maximum likelihood*, ML) izdelali filogenetska drevesa za ORF1a, ORF1b in ORF2. Na podlagi najnižje vrednosti Bayesovega informacijskega kriterija (angl. *Bayesian information criterion*, BIC) smo izbrali najboljši substitucijski model za vsako od treh regij ORF. Za izdelavo dreves v regiji ORF1a smo uporabili evolucijski model LG+G+I, v regiji ORF1b model LG+G in v regiji ORF2 model LG(+freqF)+G. Zanesljivost filogenetskih dreves smo ocenili z metodo samovzorčenja (angl. *bootstrapping*) s 1000 ponovitvami.

4 REZULTATI

4.1 VZORČENJE IN DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI NUKLEINSKE KISLINE ASTROVIRUSOV

V predhodni raziskavi je bilo na prisotnost astrovirusov analiziranih 65 vzorcev črevesne vsebine srnjadi. Vzorčenje je potekalo med julijem 2014 in oktobrom 2015. Pri vzorčenju so sodelovale lovske družine Krvavec, Šmarca gora, Škofja Loka, Polhov Gradec in Ljubno (tabela 2). Geografsko področje njihovih lovskih upravljavskih območij je prikazano na sliki 8. Z metodo RT-PCR je bila v treh vzorcih (D5/14, D12/14 in D45/14) od 65 (4,6 %) dokazana prisotnost nukleinske kisline astrovirusov. Vsi trije vzorci so bili odvzeti v gorenjskem lovskem upravljaljskem območju, in sicer vzorec D5/12 na območju lovske družine Šmarca gora ter vzorca D12/14 in D45/14 na območju lovske družine Škofja Loka.

Tabela 2: Število vzorcev glede na lovsko upravljavsko območje in lovsko družino.

Table 2: The number of samples depending on the hunting managed areas and hunting families.

Lovska družina	Število vzorcev	Lovsko upravljavsko območje	Število vzorcev
Krvavec	11	gorenjsko	53
Šmarca gora	6		
Škofja Loka	35		
Polhov Gradec	1		
Ljubno	12	kamniško savinjsko	12



Slika 8: Geografsko področje lovskih upravljavskih območij vključenih v raziskavo. Vključena območja so obarvana s sivo barvo (povzeto po ZGS, 2018).

Figure 8: Geographical area of the hunting managed areas included in the survey. The included areas are colored in gray (adopted from ZGS, 2018).

4.2 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (NGS)

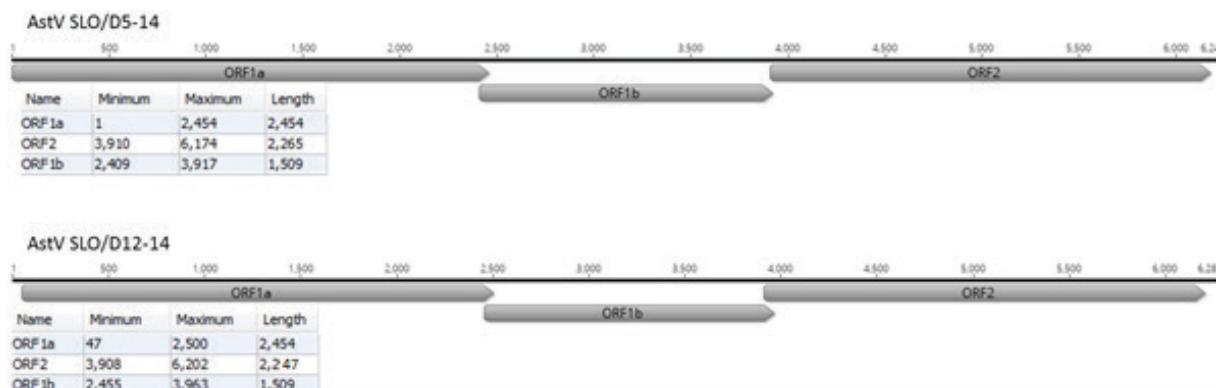
Z metodo NGS smo določali nukleotidno zaporedje celotnega genoma astrovirusa iz treh vzorcev, kjer je bila z RT-PCR ugotovljena prisotnost astrovirusne RNA. Po odstranitvi adapterjev in odčitkov slabe kakovosti smo za vzorec D5/14 pridobili 2.510.839 odčitkov s povprečno dolžino 238 bp, za vzorec D12/14 1.681.129 odčitkov z dolžino 240 bp in za vzorec D45/14 523.022 odčitkov z dolžino 265 bp.

Po *de novo* sestavljanju odčitkov v soseske smo za vzorec D5/14 pridobili 10.360 sosesk, za vzorec D12/14 13.549 sosek in za vzorec D45/14 16.184 sosesk. Soseske smo z algoritmoma BLASTn in BLASTx primerjali z nukleotidnimi zaporedji v podatkovni zbirkki GenBank. V vzorcih D5/14 in D12/14 smo tako določili soseski, ki sta predstavljali astrovirusna genoma,

in sicer AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14. V vzorcu D45/14 nismo našli sošeske, ki bi predstavljala astrovirusni genom.

4.3 ANALIZA GENOMOV ASTROVIRUSOV

S sekvenciranjem smo dosegli 118-kratno povprečno pokritost genoma seva AstV SLO/D12-14 in 19-kratno povprečno pokritost genoma seva AstV SLO/D5-14. Genom seva AstV SLO/D12-14 je bil dolg 6.274 nukleotidov (nt), genom seva AstV SLO/D5-14 pa 6.245 nt, brez poliA repa. Organizacija obeh genomov je bila značilna za rod MASTV. V vsakem genomu so bili prisotni trije odprtih bralnih okvirjev, in sicer ORF1a, ORF1b in ORF2, v smeri od 5' do 3' konca genoma (slika 9). ORF1a in ORF1b sta pri obeh sevih dolga po 2.454 in 1.509 nt ter se prekrivata na področju 46 nt. Signalno zaporedje 5'-AAAAAAAC-3' se je v genomu obeh sevov nahajalo v bližini 3' konca regije ORF1a. Regija ORF2 je bila pri sevu SLO/D12-14 dolga 2.247 nt, medtem ko je bila pri sevu SLO/D5-14 dolga 2.265 nt. Regiji ORF1b in ORF2 sta se v obeh genomih prekrivali za 8 nt.



Slika 9: Organizacija genomov astrovirusnih sevov AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14.

Figure 9: Organization of the genomes of astrovirus strains AstV SLO/D5-14 and AstV SLO/D12-14.

Nukleotidno zaporedje obeh slovenskih astrovirusnih genomov pri srnah smo poslali v podatkovno zbirkovo GenBank, kjer so jima dodelili številko vnosa (angl. *accession number*): MN150124 (AstV SLO/D5-14) in MN150125 (AstV SLO/D12-14).

4.4 FILOGENETSKE ANALIZE

Rezultati algoritma BLASTn v regijah ORF1a, ORF1b in ORF2 so pokazali, da sta seva AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 najsorodnejša drugim astrovirusom pri srnah, nekaterim BoAstV, astrovirusom pri jakih, sečuanskih ali tibetanskih takinih in vodnih bizonih. Seva sta sorodna tudi astrovirusnim sevom pri enogrbih kamelah in pri ježevcu, preostalim BoAstV sevom in nekaterim PoAstV. Ti sevi astrovirusov trenutno še niso uvrščeni v genetske skupine. V filogenetsko analizo smo vključili taksonomsko neuvrščene astrovirusne seve, ki so sorodni sevoma AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 in tudi izbrane seve genetske skupine I in II ter AAstV pri puranih, ki so dostopni v podatkovni zbirki GenBank (tabela 3).

Nukleotidna zaporedja regij ORF1a, ORF1b in ORF2 slovenskih sevov AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 ter sevov astrovirusov, dostopnih v podatkovni zbirki GenBank smo prevedli v AK zaporedja in jih med seboj poravnali. Za posamezne pare AK zaporedij smo izračunali genetske razdalje in izdelali filogenetska drevesa za vsako od regij ORF (pogl. 4.4.1–4.4.3).

Tabela 3: Podobnost aminokislinskih zaporedij sevov AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14 z AstV sevi iz podatkovne zbirke GenBank.

Table 3: Amino acid identity between strains AstV SLO/D5-14, AstV SLO/D12-14 and strains available in GenBank database.

SEVI V GenBank	UJEMANJE NA NIVOJU AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA					
	AstV SLO/D5-14			AstV SLO/D12-14		
	ORF1a	ORF1b	ORF2	ORF1a	ORF1b	ORF2
AstV_D5-14_Roe_deer_CcAstV/roe_deer/SLO/D5-14/2014				86,5 %	95,8 %	77,5 %
AstV_D12-14_Roe_deer_CcAstV/roe_deer/SLO/D12-14/2014	86,5 %	95,8 %	77,5 %			
HM447045.1_Deer/CcAstV-1/DNK/2010	NA	NA	86,3 %	NA	NA	74,9 %
HM447046.1_Deer/CcAstV-2/DNK/2010	NA	NA	77,5 %	NA	NA	96,1 %
KJ476833.1_Bovine_astrovirus_strain_BAstGX-G1	NA	NA	86,7 %	NA	NA	76,4 %
KJ476838.1_Water_buffalo_astrovirus_strain_BufAstGX-M552	NA	NA	76,9 %	NA	NA	75,6 %
KJ476837.1_Water_buffalo_astrovirus_strain_BufAstGX-M541	NA	NA	76,7 %	NA	NA	75,4 %
HQ916313.1_Bovine_astrovirus_B18/HK	84,7 %	95,0 %	75,8 %	92,1 %	95,4 %	75,6 %
LC047796.1_Bovine_BoAstV/JPN/Kagoshima1-7/2014	91,3 %	94,6 %	75,4 %	84,7 %	95,2 %	74,9 %
HQ916317.1_Bovine_astrovirus_B76-2/HK	84,1 %	96,0 %	78,2 %	90,5 %	96,4 %	76,9 %
MG660832.1_Sichuan_takin_astrovirus	83,9 %	93,5 %	85,2 %	90,2 %	93,3 %	76,4 %
KJ476835.1_Bovine_astrovirus_strain_BAstGX-J22	NA	NA	84,4 %	NA	NA	75,8 %
KJ476832.1_Bovine_astrovirus_strain_BAstGX-J27	NA	NA	84,6 %	NA	NA	75,8 %
KJ476836.1_Bovine_astrovirus_strain_BAstGX-J8	NA	NA	84,4 %	NA	NA	75,8 %
KJ476834.1_Bovine_astrovirus_strain_BAstGX-J7	NA	NA	84,8 %	NA	NA	76,0 %
KJ620980.1_Bovine_BAstV-GX27/CHN/2014	83,4%	95,8 %	84,6 %	88,9 %	96,0 %	75,8 %
KJ620979.1_Bovine_BAstV-GX7/CHN/2014	82,8%	95,4 %	84,8 %	88,9 %	95,6 %	76,0 %
KJ571486.1_Porcupine_astrovirus_Hb/LP084/Guangxi	NA	83,5 %	76,7 %	NA	83,1 %	72,6 %
KJ495987.1_Porcine_astrovirus_2_clone_KDC-6	NA	NA	73,0 %	NA	NA	72,4 %
LC201590.1_Porcine_PoAstV2/JPN/Ishi-Ya6/2015	73,8 %	82,6 %	72,8 %	74,0 %	81,6 %	73,4 %
JF713712.1_Porcine_astrovirus_2_strain_51/USA	73,3 %	84,1 %	71,7 %	73,3 %	83,7 %	69,4 %
KR868721.1_Dromedary_astrovirus_isolate_DcAstV-169	73,8 %	83,9 %	71,1 %	74,1 %	82,6 %	67,0 %
KR868722.1_Dromedary_astrovirus_isolate_DcAstV-64	74,3 %	83,7 %	71,3 %	74,8 %	82,4 %	67,0 %
KR868723.1_Dromedary_astrovirus_isolate_DcAstV-135	73,5 %	84,1 %	72,4 %	74,4 %	82,2 %	69,0 %
KY940076.1_Porcine_Mamastrovirus_2_isolate_K321	73,2 %	82,6 %	68,5 %	72,8 %	81,4 %	65,3 %
KY940077.1_Porcine_Mamastrovirus_2_isolate_U083	72,3 %	82,4 %	66,0 %	71,5 %	81,4 %	65,7 %
JF713710.1_Porcine_astrovirus_2_strain_43/USA	73,3 %	84,1 %	69,0 %	73,3 %	83,1 %	69,4 %
LC201585.1_Porcine_PoAstV2/JPN/Bu5-10-1/2014	72,2 %	84,3 %	69,8 %	73,0 %	83,7 %	70,0 %
JX556690.1_Porcine_AstV2-US-IA122	72,0 %	84,5 %	69,4 %	73,3 %	84,3 %	69,4 %
KM822593.1_Yak_astrovirus_isolate_S8	83,3 %	95,0 %	71,3 %	92,3 %	95,8 %	69,8 %
LC047788.1_Bovine_BoAstV/JPN/Ishikawa9728/2013	76,2 %	87,2 %	53,5 %	76,4 %	87,0 %	54,6 %
LC047789.1_Bovine_BoAstV/JPN/Hokkaido11-7/2009	75,9 %	88,3 %	53,5 %	75,7 %	87,9 %	55,7 %
LC047792.1_Bovine_BoAstV/JPN/Hokkaido12-18/2009	75,2 %	87,7 %	55,5 %	75,7 %	87,4 %	55,9 %
LC047795.1_Bovine_BoAstV/JPN/Kagoshima1-2/2014	76,0 %	87,7 %	54,2 %	76,0 %	87,0 %	54,8 %
LC047801.1_Bovine_BoAstV/JPN/Kagoshima2-52/2015	76,0 %	87,0 %	53,7 %	75,7 %	87,2 %	55,0 %
HQ916314.1_Bovine_astrovirus_B170/HK	75,7 %	86,4 %	60,4 %	75,6 %	86,4 %	60,4 %
KP982872.1_Porcine_astrovirus_2_isolate_Bel-12R021	72,2 %	82,6 %	57,6 %	74,1 %	81,8 %	57,0 %
LC201592.1_Porcine_PoAstV2/JPN/Ishi-Ya8/2015	74,0 %	83,1 %	54,8 %	73,2 %	81,8 %	56,5 %
LC201593.1_Porcine_PoAstV2/JPN/Ishi-Im3/2015	70,4 %	83,3 %	59,3 %	72,0 %	81,4 %	57,8 %
LC047787.1_Bovine_BoAstV/JPN/Ishikawa24-6/2013	83,8 %	95,4 %	47,1 %	90,5 %	95,8 %	45,0 %
LC047797.1_Bovine_BoAstV/JPN/Kagoshima2-3-1/2015	83,9 %	95,0 %	47,1 %	89,4 %	96,0 %	46,5 %

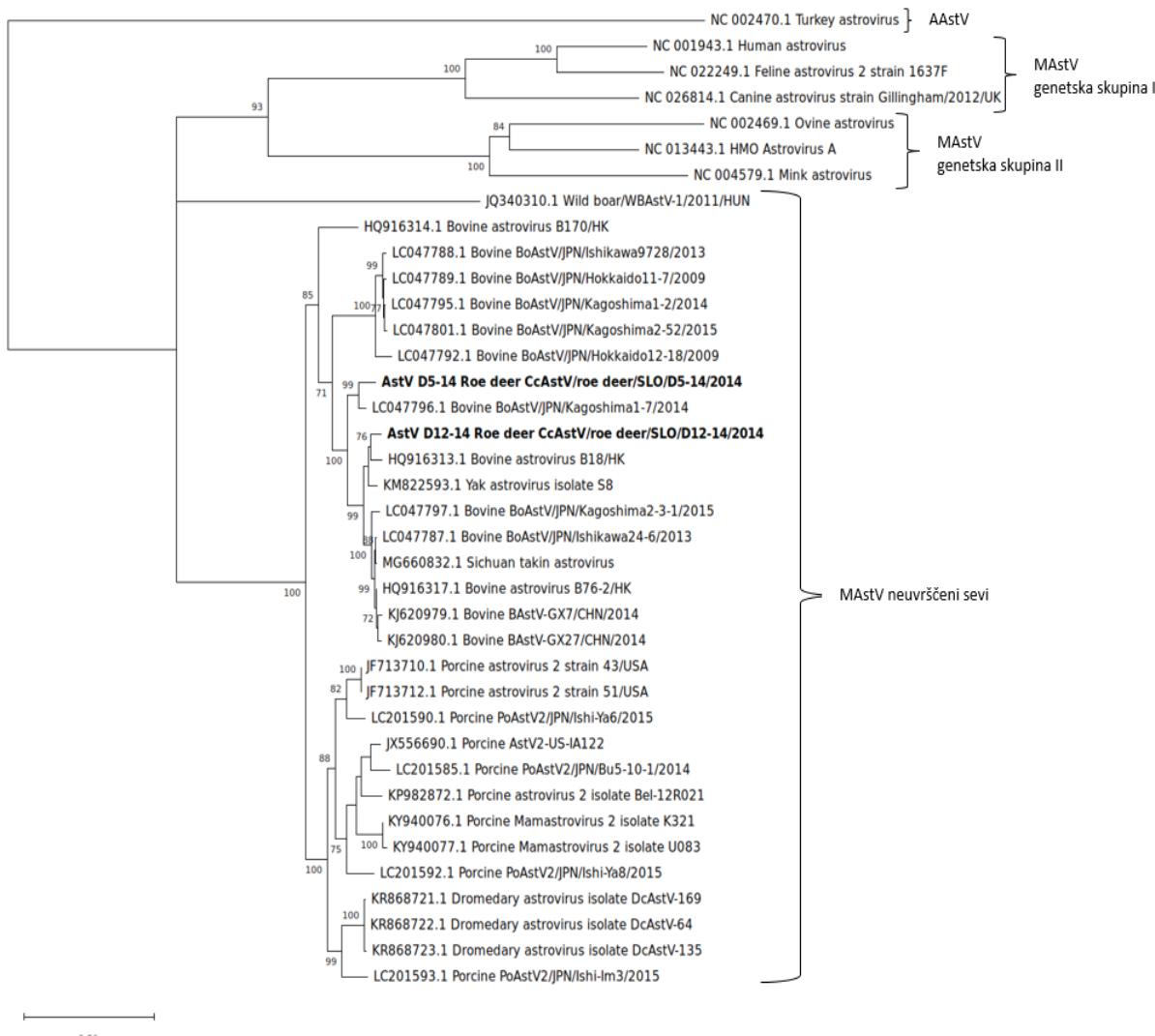
SEVI V GenBank	UJEMANJE NA NIVOJU AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA					
	AstV SLO/D5-14			AstV SLO/D12-14		
	ORF1a	ORF1b	ORF2	ORF1a	ORF1b	ORF2
JQ340310.1_Wild_boar/WBAstV-1/2011/HUN	37,1 %	56,7 %	40,7 %	36,7 %	57,5 %	41,5 %
NC_026814.1_Canine_astrovirus_strain_Gillingham/2012/UK	28,8 %	59,0 %	35,8 %	29,6 %	59,2 %	36,0 %
NC_001943.1_Human_astrovirus	29,4 %	60,3 %	36,8 %	31,4 %	60,3 %	35,5 %
NC_022249.1_Feline_astrovirus_2_strain_1637F	28,5 %	58,2 %	36,2 %	29,9 %	59,0 %	34,0 %
NC_034975.1_California_sea_lion_astrovirus_2	NA	NA	30,8 %	NA	NA	30,8 %
NC_002469.1_Ovine_astrovirus	30,4 %	52,1 %	30,8 %	29,9 %	53,8 %	30,8 %
NC_013443.1_HMO_Astrovirus_A	29,3 %	50,6 %	28,5 %	30,2 %	50,8 %	29,1 %
NC_004579.1_Mink_astrovirus	28,6 %	54,8 %	27,4 %	28,8 %	55,2 %	27,8 %
NC_002470.1_Turkey_astrovirus	22,5 %	42,1 %	23,3 %	23,6 %	42,5 %	24,4 %

4.4.1 Filogenetska analiza aminokislinskih zaporedij v regiji ORF1a

Opravili smo filogenetske analize AK zaporedja v regiji ORF1a ter izdelali filogenetsko drevo (slika 10). Na podlagi filogenetskih analiz in analiz genetskih razdalj smo ugotovili, da sta slovenska seva astrovirusov pri srnah glede na regijo ORF1a najsorodnejša nekaterim sevom BoAstV in astrovirusom pri jakih. Odstotki ujemanja na nivoju AK zaporedja v regiji ORF1a med AstV SLO/D5-14, SLO/D12-14 ter drugimi sevi astrovirusov so prikazani v tabeli 3. Sev AstV SLO/D5-14 je najsorodnejši japonskemu sevu BoAstV/JPN/Kagoshima1-7/2014 z 91,3 % ujemanjem AK zaporedja, medtem ko je sev AstV SLO/D12-14 najsorodnejši astrovirusu pri jakih (Yak_astrovirus_isolate_S8) z 92,3 % ujemanjem ter sevu BoAstV iz Hong Konga (Bovine_astrovirus_B18/HK) z 92,1 % ujemanjem.

Slovenska seva astrovirusov pri srnah se na AK nivoju v regiji ORF1a med seboj ujemata v 86,5 %. Astrovirusni sev AstV SLO/D5-14 se na nivoju AK v regiji ORF1a v od 75,2 % do 84,7 % ujema s preostalimi sevi BoAstV v podatkovni zbirkni GenBank, v 83,9 % z astrovirusnim sevom sečuanskega takina, v 83,3 % s sevom pri jakih in od 73,5 % do 74,3 % s sevi pri enogrbih kameleah. Ujemanje AK zaporedja seva AstV SLO/D5-14 s sevi PoAstV znaša od 70,4 % do 74,0 %.

Astrovirusni sev AstV SLO/D12-14 se na nivoju AK v regiji ORF1a v od 75,6 % do 90,5 % ujema s preostalimi sevi BoAstV v podatkovni zbirkni GenBank, v 90,2 % z astrovirusnim sevom sečuanskega takina in od 74,1 % do 74,8 % s sevi pri enogrbih kameleah. Ujemanje AK zaporedja seva AstV SLO/D12-14 s sevi PoAstV znaša od 71,5 do 74 %.



Slika 10: Filogenetsko drevo AstV na nivoju aminokislin v regiji ORF1a z metodo največjega verjetja (ML). Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po modelu LG+G+I. Na razvejitvah so navedene statistične podpore posameznih cepitev pri 1000 samovzorčenjih, ki so višje od 700. Seva AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14 sta prikazana odebelenjo.

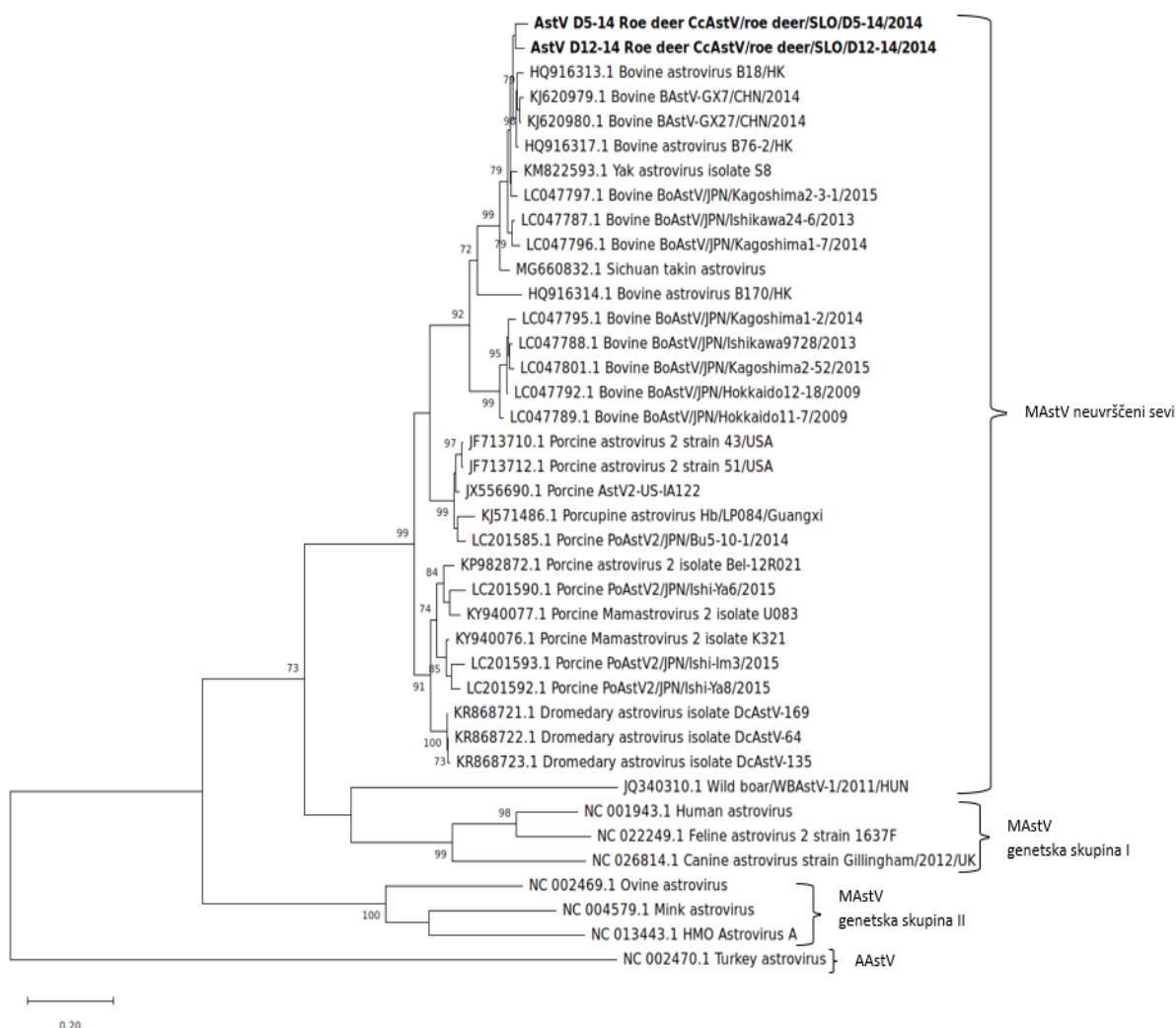
Figure 10: Phylogenetic tree of the AstV ORF1a region amino acid sequence with maximum likelihood method (ML). Branch lengths are proportional to genetic distances after the model LG+G+I. The numbers at the nodes represent bootstrap values at 1000 replicates that are higher than 700. Strains AstV SLO/D5-14 and AstV SLO/D12-14 are shown in bold.

4.4.2 Filogenetska analiza aminokislinskih zaporedij v regiji ORF1b

Opravili smo filogenetske analize AK zaporedja v regiji ORF1b ter izdelali filogenetsko drevo (slika 11). Na podlagi filogenetskih analiz in analiz genetskih razdalj smo ugotovili, da sta slovenska seva astrovirusov pri srnah na nivoju AK zaporedja v regiji ORF1b najsorodnejša nekaterim sevom BoAstV. Odstotki ujemanja na nivoju AK zaporedja v regiji ORF1b med AstV SLO/D5-14, SLO/D12-14 ter drugimi sevi astrovirusov so prikazani v tabeli 3. Oba slovenska seva astrovirusov pri srnah sta najsorodnejša sevu *Bovine_astrovirus_B76-2/HK* iz Hong Konga (HQ916317), kjer znaša ujemanje v AK zaporedju za sev AstV SLO/D5-14 96,0 %, za sev AstV SLO/D12-14 pa kar 96,4 %.

AK zaporedji slovenskih astrovirusov pri srnah se v regiji ORF1b med seboj ujemata v 95,8 %. Astrovirusni sev AstV SLO/D5-14 se na nivoju AK ujema s preostalimi sevi BoAstV v podatkovni zbirkni GenBank v od 86,4 do 95,8 %, z astrovirusnim sevom sečuanskega takina v 93,5 %, s sevom pri jakih v 95,0 %, s sevom ježevca v 83,5 % in s sevi pri enogrbih kamelah v od 82,6 % do 84,1 %. Ujemanje AK zaporedja seva AstV SLO/D5-14 s sevi PoAstV znaša od 82,4 % do 84,5 %.

Astrovirusni sev AstV SLO/D12-14 se na nivoju aminokislin v regiji ORF1b ujema s preostalimi sevi BoAstV v podatkovni zbirkni GenBank v od 86,4 % do 96,0 %, s sevom pri jaku v 95,8 %, s sevom sečuanskega takina 93,3 %, s sevom ježevca v 83,1 % in s sevi enogrbih kamel v od 82,2 % do 82,6 %. Ujemanje AK zaporedja seva AstV SLO/D12-14 s sevi PoAstV znaša od 81,4 % do 84,3 %.



Slika 11: Filogenetsko drevo AstV na nivoju aminokislin v regiji ORF1b z metodo največjega verjetja (ML). Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po modelu LG+G. Na razrazvezitvah so navedene statistične podpore posameznih cepitev pri 1000 samovzorčenjih, ki so višje od 700. Seva 700 AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14 sta prikazana odebeleno.

Figure 11: Phylogenetic tree of the AstV ORF1b region amino acid sequence with maximum likelihood method (ML). Branch lengths are proportional to genetic distances after the model LG+G. The numbers at the nodes represent bootstrap values at 1000 replicates that are higher than 700. Strains AstV SLO/D5-14 and AstV SLO/D12-14 are shown in bold.

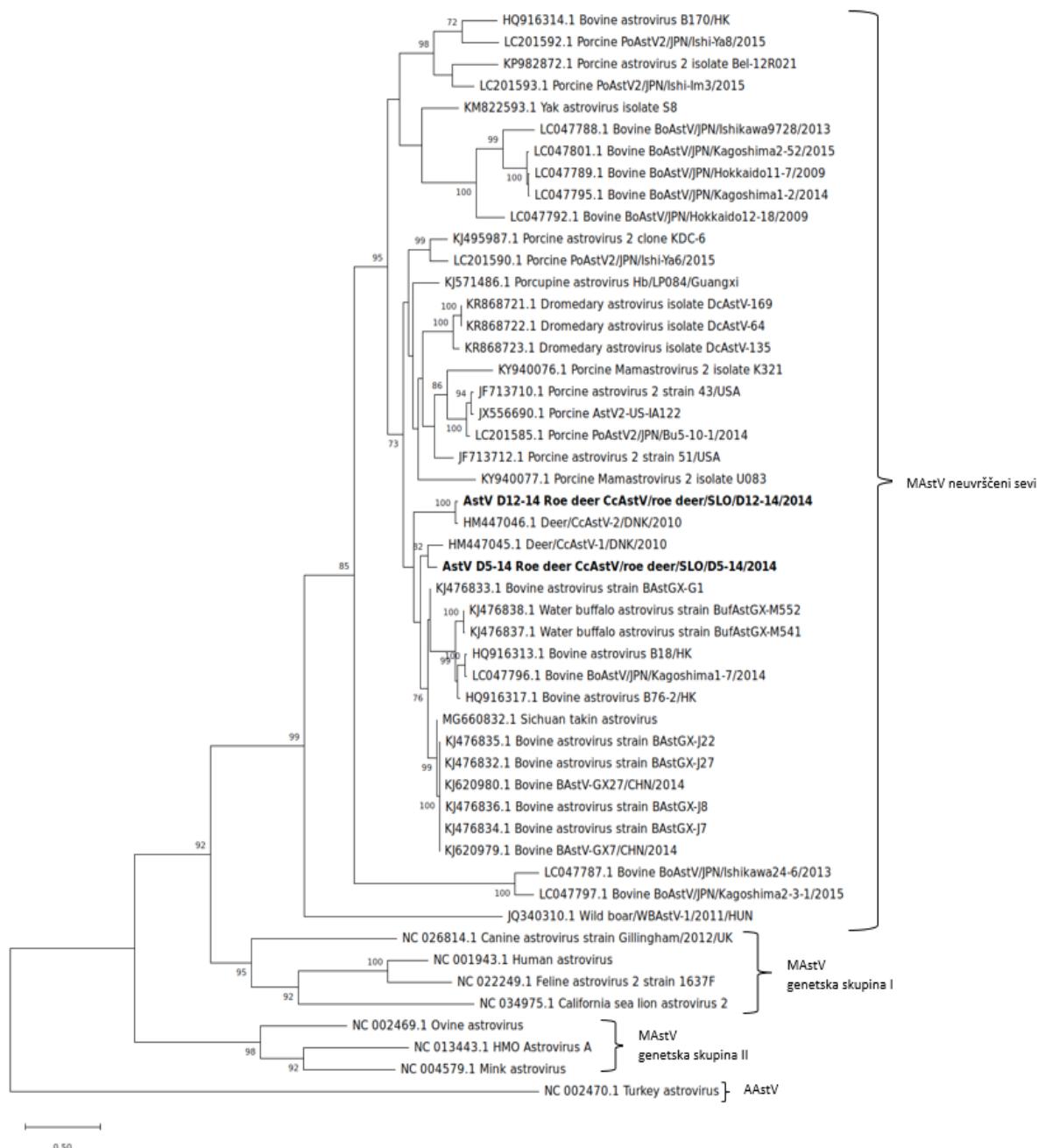
4.4.3 Filogenetska analiza aminokislinskih zaporedij v regiji ORF2

Opravili smo filogenetske analize AK zaporedja v regiji ORF2 ter izdelali filogenetsko drevo (slika 12). Rezultati kažejo, da slovenska seva astrovirusov pri srnah na filogentskem drevesu tvorita gručo z visoko statistično podporo s sevi BoAstV, z astrovirusnimi sevi pri jakih, z astrovirusom pri sečuanskem takinu, ježevcu, z astrovirusnimi sevi pri vodnih bizonih, enogrbih kamelah, z nekaterimi sevi PoAstV in tudi z dvema sevoma astrovirusov pri srnah, ki so sicer glede na ICTV še neuvrščeni. Predvidevamo, da ti sevi spadajo v nov genotip znotraj nove genetske skupine.

Na podlagi filogenetske analize in analize genetskih razdalj smo ugotovili, da sta slovenska seva astrovirusov pri srnah najSORODNEJŠA astrovirusom pri srnah z Danske (CcAstV-1 in CcAstV-2). Odstotki ujemanja na nivoju AK zaporedja v regiji ORF2 med AstV SLO/D5-14, SLO/D12-14 ter drugimi sevi astrovirusov so prikazani v tabeli 3. Astrovirusni sev AstV SLO/D5-14 je najSORODNEJŠI sevu CcAstV-1 in se na nivoju AK zaporedja ujema v 86,3 %, medtem ko je sev AstV SLO/D12-14 najSORODNEJŠI sevu CcAstV-2 in se na nivoju AK zaporedja z njim ujema v 96,1 %.

AK zaporedji obeh slovenskih sevov astrovirusov pri srnah se v regiji ORF2 ujemata v 77,5 %. Astrovirusni sev AstV SLO/D5-14 se na nivoju AK v regiji ORF2 ujema z astrovirusnim sevom sečuanskega takina v 85,2 %, s sevom pri jakih v 71,3 %, s sevom ježevca v 76,7 %, s sevoma pri vodnih bizonih v 76,7 % oz. 76,9 % ter od 71,1 % do 72,4 % z astrovirusnimi sevi pri enogrbih kamelah. Sev AstV SLO/D5-14 se s sevi BoAstV ujema od 47,1 % do 86,7 %. Ujemanje AK zaporedja seva SLO/D5-14 in PoAstV znaša od 54,8 % do 73,0 %.

AstV sev SLO/D12-14 se na nivoju AK v regiji ORF2 ujema z astrovirusnim sevom sečuanskega takina v 76,4 %, s sevom pri jakih v 69,8 %, s sevom ježevca v 72,6 %, s sevoma pri vodnih bizonih v 75,4 % oz. 75,6 % ter z sevi pri enogrbih kamelah od 67,0 % do 69,0 %. Sev AstV SLO/D12-14 se s sevi BoAstV ujema v od 45,0 % do 76,9 %. Ujemanje AK zaporedja seva SLO/D12-14 in PoAstV znaša od 56,5 % do 73,4 %.



Slika 12: Filogenetsko drevo AstV na nivoju aminokislin v regiji ORF2 z metodo največjega verjetja (ML). Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po modelu LG(+freqF)+G. Na razrazvejitvah so navedene statistične podpore posameznih cepitev pri 1000 samovzorčenjih, ki so višje od 700. Seva AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14 sta prikazana odebeleno.

Figure 12: Phylogenetic tree of the AstV ORF2 region amino acid sequence with maximum likelihood method (ML). Branch lengths are proportional to genetic distances after the model LG(+freqF)+G. The numbers at the nodes represent bootstrap values at 1000 replicates that are higher than 700. Strains AstV SLO/D5-14 and AstV SLO/D12-14 are shown in bold.

5 RAZPRAVA

Za astroviruse sta značilni široka genetska variabilnost in možnost rekombinacijskih dogodkov. Astrovirusi so prisotni v črevesni vsebini ali iztrebkih mnogih vrst ptic in sesalcev, vključno z ljudmi. Najpogosteje je njihova patologija povezana z gastroenteritisom; pri pticah in pri nekaterih sesalcih pa opisujejo tudi primere astrovirusnih okužb izven črevesja. Redko povzročijo okužbe pri zdravih ljudeh, prizadenejo pa predvsem otroke, ostarele in ljudi z oslabljenim imunskim sistemom (De Benedictis in sod., 2011).

Do sedaj je le malo znanega o astrovirusnih okužbah pri divjih živalih, vključno s srnami. Ker pa se zaradi načina rokovanja z odstreljeno divjadjo poveča možnost kontaminacije mesa s patogenimi mikroorganizmi iz črevesja, je še posebej pomembno, da te patogene poznamo.

Z uporabo sekvenciranja naslednje generacije sta odkrivanje in analiza novih virusov olajšana. V naši raziskavi smo s sekvenciranjem naslednje generacije, s tehnologijo Ion Torrent, kot prvi na svetu določili celotna genoma dveh astrovirusov pri srnah (AstV SLO/D12-14 in SLO/D5-14). Prisotnost nukleinske kisline astrovirusov so v raziskavi Jamnikar-Ciglenečki in Kirbiš (2016b) dokazali v treh vzorcih (D5/14, D12/14 in D45/14). V tretjem vzorcu (D45/14) nismo uspeli določiti nukleotidnega zaporedja astrovirusnega genoma, saj nismo našli nobene soseske, ki bi predstavljalva vsaj del le-tega. Izvedli smo filogenetske analize, kjer smo seva AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 primerjali s sevi astrovirusov, ki so dostopni v podatkovni zbirki GenBank.

Pogostost astrovirusov pri srnah je v Sloveniji nizka, saj so virus dokazali le pri treh od 65 vzorcev srnjadi, kar predstavlja 4,6 %. Za astroviruse je značilna višja pojavnost pri mladih živalih mnogih živalskih vrst, navadno pa so odkriti v fecesu živali z drisko (Chen in sod., 2015; Nagai in sod., 2015; Woo in sod., 2015). Pri govedu sicer velja, da črevesne okužbe z astrovirusi pogosto potekajo brez simptomov (De Benedictis in sod., 2011).

V Koreji so teleta z drisko astrovirus izločala v večjem številu kakor odrasle živali (Oem in An, 2014), prav tako so v Braziliji ugotovili, da teleta z drisko izločajo več astrovirusov (Candido in sod., 2015). Na Japonskem so odkrili astroviruse v vzorcih 15 telet, od katerih jih je 11 imelo drisko (Nagai in sod. 2015). Prav tako so na Kitajskem prisotnost astrovirusov dokazali v vzorcih 60,3 % jakov s simptomi gastroenteritisa (driske), medtem ko so pri jakih brez izraženih simptomov prisotnost virusa dokazali le v 2,7 % vzorcev. V drugi raziskavi so ugotovili, da

lahko astroviruse izloča od 60 do 100 % vseh telet na farmi (Bridger in sod., 1984), le 2,4 % asimptomatskih odraslih govedi pa je bilo pozitivnih na astrovirus (Tse in sod., 2011). Nizko število pozitivnih vzorcev v raziskavi v Sloveniji lahko torej pripisemo naključnemu vzorčenju v vseh starostnih skupinah, vzorčenju neglede na klinične znake gastroenteritisa ter relativno nizkemu številu pregledanih živali, ki v okolje tisti trenutek niso izločali virusa. Pogostost astrovirusnih okužb pri srnah je do sedaj slabo raziskana, saj je objavljena le ena raziskava, in sicer na Danskem, kjer so v dveh od desetih vzorcev iztrebkov srn z drisko dokazali prisotnost virusa CcAstV-1 in CcAstV-2 (Smits in sod., 2010).

Organizacija genomov AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 je značilna za rod *Mamastrovirus*. V vsakem genomu so prisotni trije bralni okvirji, in sicer ORF1a, ORF1b ter ORF2, v smeri od 5' do 3' konca genoma. ORF1a in ORF1b skupaj kodirata nestrukturna poliproteina 1a in 1ab, ki nato s cepitvijo oblikujeta regiji serinske proteaze (v-Pro) in od RNA odvisne RNA polimeraze (RdRp), ORF2 pa kodira strukturni kapsidni poliprotein (Mendez in Arias, 2007). Podobno organizacijo genoma imajo med drugimi tudi BoAstV, astrovirusi pri jakih, sečuanskih takinih in enogrbih kameliah (Tse in sod., 2011; Chen in sod., 2015; Nagai in sod., 2015; Woo in sod., 2015; Guan in sod., 2018). ORF1a in ORF1b sta pri sevih AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 dolga 2.454 in 1.509 nt ter se prekrivata na področju 46 nt, seva pa se razlikujeta v dolžini regije ORF2, ki je pri AstV SLO/D12-14 dolga 2.247 nt, pri AstV SLO/D5-14 pa 2.265 nt. Podobne dolžine imajo tudi regije ORF nekaterih prej omenjenih astrovirusov: pri jakih je ORF1a dolg 2.454 nt, ORF1b 1.509 nt in ORF2 2.310 nt (Chen in sod., 2015), pri japonskih sevih BoAstV je dolžina ORF1a regije od 2.331 do 2.562 nt, ORF1b od 1.476 do 1.515 nt in ORF2 od 2.214 do 2.319 nt (Nagai in sod., 2015), pri hongkonških sevih BoAstV pa je dolžina ORF1a regije od 2.448 do 2.454 nt, ORF1b od 1.566 do 1.611 nt ter ORF2 od 2.280 do 2.312 nt (Tse in sod., 2011).

Genetske razlike med sevoma AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 so bile največje v regiji ORF2, ki kodira kapsidni protein. To se sklada z ugotovitvami ostalih raziskav in je najverjetnejše posledica pozitivnega seleksijskega pritiska na kodirajočo regijo kapsidnega proteina s strani imunskega sistema (van Hemert in sod., 2007; Smits in sod., 2010; Tse in sod., 2011).

Rod MAstV je na osnovi genetske analize celotne kapsidne regije na nivoju AK in izvornega gostitelja razdeljen na genetsko skupino I in genetsko skupino II, ki sta razdeljeni še na posamezne genotipe oz. vrste. Glede na predlog za razvrstitev mednarodnega odbora za taksonomijo virusov (ICTV; <http://ictvonline.org>) je povprečna genetska razdalja (p-distance)

med genetskimi skupinami AstV 67,1 % ($\pm 1,6\%$), med genotipi oz. vrstami znotraj genetske skupine pa od 33,8 % do 78,3 % (Bosch in sod., 2012). Naši rezultati kažejo, da sta seva AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 najsorodnejša drugim CcAstV, nekaterim BoAstV, astrovirusom pri jakih, sečuanskih ali tibetanskih takinih in vodnih bizonih. Seva sta sorodna tudi astrovirusnim sevom pri enogrbih kamelih, pri ježevcu, preostalim BoAstV sevom in nekaterim PoAstV. Ti sevi astrovirusov zaenkrat taksonomsko še niso uvrščeni, predvidevamo pa, da bodo ti sevi, skupaj z AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14, v prihodnosti uvrščeni v novo genetsko skupino. Filogenetske analize AK zaporedja v regiji ORF2 kažejo, da astrovirusna seva AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 spadata v isti genotip oz. vrsto kot CcAstV-1, CcAstV-2, nekateri sevi BoAstV, astrovirusna seva vodnega bizona, sev sečuanskega takina, sevi enogrbih kamel, ježevca, astrovirusni sev jaka in nekateri sevi PoAstV. Sev CcAstV-2 se s slovenskim sevom AstV SLO/D12-14 na podlagi AK zaporedja v regiji ORF2 ujema v 96,1 %, kar pomeni, da gre najverjetneje za isti podtip virusa.

Astrovirusna seva AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 se s CcAstV-1 in CcAstV-2 v regiji ORF2 ujemata od 74,9 % do 96,1 %, s hongkonškimi sevi BoAstV (Bovine_astrovirus_B18/HK, Bovine_astrovirus_B76-2/HK in Bovine_astrovirus_B170/HK) pa od 60,4 % do 78,2 %. Študija Tse in sod. (2011) je pokazala, da se sekvene hongkonških sevov BoAstV in danskih sevov astrovirusov pri srnah ujemajo od 41,6 do 68,2 %. Na podlagi filogenetske analize sklepajo, da so kljub različnim gostiteljem BoAstV in CcAstV sevi iste vrste, kar potrjuje tudi naša raziskava. Opravili so tudi dodatne analize genetskih razdalj med BoAstV in astrovirusi pri srnah na področju ORF2 regije in ugotovili, da bi za podrobnejšo filogenetsko uvrstitev potrebovali zaporedja celotnih genomov astrovirusov pri srnah (Tse in sod., 2011).

Pri astrovirusnih okužbah pogosto naletimo na hkratne okužbe z različnimi enteričnimi virusi (Taylor in sod., 1997; Bhattacharya in sod., 2006; Koh in sod., 2008; Nagai in sod., 2015), obstajajo pa tudi primeri hkratnih okužb z različnimi sevi astrovirusov, npr. pri prašičih in govedu (Luo in sod., 2011; Tse in sod., 2011). Na japonskem so ugotovili hkratno okužbo z BoAstV in drugimi enteričnimi virusi pri 10/11 telet z drisko, pri enemu pa celo hkratno okužbo z dvema BoAstV iz različnih linij (Nagai in sod., 2015). Pri štirih teletih brez driske so identificirali le BoAstV, zaradi česar Nagai in sod. (2015) predvidevajo, da BoAstV povzročajo drisko le pri hkratnih okužbah z drugimi enteričnimi virusi. Hkratnih okužb pri srnah v naši raziskavi ne moremo potrditi. V pretekli raziskavi so pri dveh srnah v isti skupini vzorcev

sicer ugotovili prisotnost rotavirusa, niso pa ugotovili prisotnosti astrovirusa (Šturm, 2016). Pri astrovirusnih sevih AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 klinična slika gastroenteritisa pri srnjadi ni bila izražena. Za natančnejše razumevanje klinične slike, ki jo povzročajo astrovirusi pri srnah, bi bilo potrebno raziskavo razširiti na srne z znaki gastroenteritisa ter v vzorcih blata poiskati še druge morebitne enterične viruse.

Hkratne okužbe predstavljajo možnost za rekombinacijo različnih astrovirusnih sevov med seboj. Obstaja tudi možnost rekombinacije človeških in živalskih astrovirusnih sevov (Rivera in sod., 2010; Ulloa in Gutiérrez, 2010). Tse in sod. (2011) so potrdili vsaj en rekombinacijski dogodek med hongkonškimi sevi BoAstV in astrovirusi pri srnah. Tudi Chen in sod. (2015) v svoji študiji, narejeni na jakih z drisko, predvidevajo, da je prišlo do vsaj enega rekombinacijskega dogodka z astrovirusi pri srnah in astrovirusi pri jakih v regiji ORF2.

Srnjad je razširjena po celotni Sloveniji. Dandanes se je močno približala območjem, kjer živijo ljudje, prav tako pa prihaja v stik z rejnimi živalmi na obrobju gozdov. Je najštevilčnejša divjad v Sloveniji, lovci jo lovijo zaradi mesa in kože, srnjake pa zaradi rogov, ki predstavljajo trofejo. Zaradi genetske variabilnosti in možnosti rekombinacijskih dogodkov obstaja vprašanje prenosa astrovirusov z srnjadi na ljudi. Čeprav ni gotovih dokazov o zoonotskem prenosu astrovirusov, pa obstajajo raziskave o možnosti medvrstnega prenosa med živalmi in ljudmi, kar nakazuje na zoonotski potencial (De Benedictis in sod., 2011). To bi se lahko zgodilo na različne načine, recimo ob rokovajujočih lovcih z odstreljeno divjadjo, kjer bi ob odstranjevanju črevesja prišlo do kontaminacije rok in posledično tudi mesa. Takšno meso bi ob neupoštevanju higieniskih priporočil lahko predstavljal vir okužbe z astrovirusi za ljudi. Poleg tega bi lahko srnjad s svojimi iztrebki kontaminirala površine, poljščine in vodo ter tako predstavljala vir okužbe ne samo za ljudi, pač pa tudi za druge divje in domače živali. Znano je, da astrovirusi dolgo preživijo v pitni, sladki in celo morski vodi (Pintó, 1996). Opisan medvrstni prenos je sicer malo verjeten, vseeno pa bi lahko ob ustreznih mutacijah in prerazporejanju genoma med HAstV ali astrovirusi drugih živalskih vrst in astrovirusi pri srnah prišlo do novih sevov, ki bi lahko okužili druge živali in celo ljudi.

6 SKLEPI

Hipoteza 1: Astrovirusi, ki so prisotni pri srnah v Sloveniji, imajo organizacijo genoma, značilno za rod Mamastrovirus (MAstV).

Hipotezo smo potrdili, saj je genom seva AstV SLO/D12-14 dolg 6.274 nt, genom seva AstV SLO/D5-14 pa 6.245 nt, brez poliA repa. V vsakem genomu so prisotni poliA rep in trije odprti bralni okvirji: ORF1a, ORF1b in ORF2, v smeri od 5' do 3' konca genoma. Signalno zaporedje 5'-AAAAAAC-3' se v genomu obeh sevov nahaja v bližini 3' konca regije ORF1a.

Hipoteza 2: Sevi astrovirusov, najdeni pri srnah v Sloveniji, so med seboj sorodni.

Hipotezo smo potrdili, saj se seva AstV SLO/D5-14 in AstV SLO/D12-14 pri srnah na aminokislinskem nivoju v regiji ORF1a med seboj ujemata v 86,5 %, v regiji ORF1b v 95,8 %, v regiji ORF2 pa v 77,5 %.

Hipoteza 3: Sevi slovenskih astrovirusov pri srnah so najsorodnejši danskim sevom astrovirusov pri srnah.

Hipotezo smo potrdili. Filogenetske analize aminokislinskega zaporedja v regiji ORF2 kažejo, da seva AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 spadata v isti genotip oz. vrsto kot CcAstV-1, CcAstV-2. Astrovirusni sev SLO/D5-14 je najsorodnejši sevu CcAstV-1 in se na nivoju aminokislinskega zaporedja ujemata v 86,3 %, medtem ko je sev AstV SLO/D12-14 najsorodnejši sevu CcAstV-2 in se na nivoju aminokislinskega zaporedja ujemata v 96,1 %.

Hipoteza 4: Sevi slovenskih astrovirusov pri srnah spadajo v nov genotip znotraj nove genetske skupine, skupaj z ostalimi taksonomsko še neuvrščenimi astrovirusnimi sevi pri prežvekovalcih.

Hipotezo smo potrdili. Glede na ICTV je predlog za razvrstitev povprečna genetska razdalja (p-distance) med astrovirusnimi genetskimi skupinami 67,1 % ($\pm 1,6\%$), med genotipi oz. vrstami znotraj genetske skupine pa od 33,8 % do 78,3 % (Bosch in sod., 2012). Filogenetske analize in analize genetskih razdalj aminokislinskega zaporedja v regiji ORF2 kažejo, da seva AstV SLO/

D12-14 in AstV SLO/D5-14 spadata v isti genotip kot CcAstV-1, CcAstV-2, astrovirusna seva vodnega bizona, enogrbe kamele, sev sečuanskega takina, ježevca, jaka, nekateri sevi PoAstV ter sevi BoAstV, ki taksonomsko še niso uvrščeni. Genetska razdalja v regiji ORF2 med AstV SLO/D12-14 in AstV SLO/D5-14 ter danskimi astrovirusnimi sevi pri srnah znaša od 3,9 % do 25,1 %, astrovirusnimi sevi ostalih živalskih vrst pa od 14,8 % do 46,5 %.

7 ZAHVALE

Najprej se iz srca zahvaljujem mentorici doc. dr. Urški Jamnikar Ciglenečki in somentorici znan. sod. dr. Urški Kuhar za vso pomoč, potrpežljivost in čas, ki sta mi ga posvetili. Zaradi vaju je bil moj uvod v raziskovalno delo nadvse pozitivna izkušnja.

Prav tako se za pomoč in prijaznost zahvaljujem vsem zaposlenim na Enoti za virologijo Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo.

Zahvaljujem se mami za lektoriranje in nasvete glede jezika, prof. Evi Meži za lektoriranje angleškega povzetka in Rodrigu za pomoč pri oblikovanju slik.

Nacetu se zahvaljujem za vso podporo, razumevanje in tehnično pomoč.

Za dobro voljo in spodbudne besede se zahvaljujem očetu, mami in vsem prijateljem.

8 LITERATURA

- Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pinto RM, Bosch A. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 3904–7.
- Ansorge WJ, Katsila T, Patrinos GP. Perspectives for future DNA sequencing techniques and applications. In: Patrinos GP, eds. Molecular diagnostics. 3rd ed. London: Academic Press, 2017: 141–53.
- Appleton H, Higgins PG. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1975; 305(7919): 1297.
- Arruda B, Arruda P, Hensch M, et al. Porcine Astrovirus type 3 in central nervous system of swine with polioencephalomyelitis. *Emerg Infect Dis* 2017; 23(12): 2097–100.
- Asplin FD. Duck hepatitis: vaccination against two serological types. *Vet Rec* 1965; 77(50): 1529–30.
- Atkins A, Wellehan JF Jr, Childres AL, Archer LL, Fraser WA, Citino SB. Characterization of an outbreak of astroviral diarrhea in a group of cheetahs (*Acynonx jubatus*). *Vet Microbiol* 2009; 136(1/2): 160–5.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* 2012; 19(5): 455–77.
- Baxendale W, Mebatsion T. The isolation and characterization of astroviruses from chickens. *Avian Pathol* 2004; 33(3): 364–70.
- Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol* 1997; 142(7), 1323–34.
- Berlec A, Štrukelj B. Nova generacija tehnik določanja nukleotidnega zaporedja: korak k osebni medicini. *Farm vestn* 2010; 61(4): 203–8.
- Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 335–41.

- Bhattacharya R, Sahoo GC, Nayak MK, et al. Molecular epidemiology of human astrovirus infections in Kolkata, India. *Infect Genet Evol* 2006; 6(6): 425–35.
- Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, Berg M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol* 2010; 48(12): 4392–6.
- Bosch A, Guix S, Krishna NK, et al. Astroviruses. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier, 2012: 953–9.
- Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human Astroviruses. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(4): 1048–74.
- Bouzalas IG, Wuthrich D, Walland J, et al. Neurotropic astrovirus in cattle with nonsuppurative encephalitis in Europe. *J Clin Microbiol* 2014; 52(9): 3318–24.
- Bridger JC, Hall GA, Brown JF. Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. *Infect Immun* 1984; 43 (1): 133–8.
- Bridger JC. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *Vet Rec* 1980; 107(23): 532–3.
- Brnić D, Jemeršić L, Keros T, et al. High prevalence and genetic heterogeneity of porcine astroviruses in domestic pigs. *Vet J* 2014; 202(2): 390–2.
- Brown JR, Morfopoulou S, Hubb J, et al. Astrovirus VA1/HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2015; 60(6): 881–8.
- Caballero S, Guix S, El-Senousy WM, Calico I, Pinto RM, Bosch A. Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: association with serotype-3 strains. *J Med Virol* 2003; 71(2): 245–50.
- Candido M, Alencar AL, Almeida-Queiroz SR, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of bovine astrovirus in Brazil. *Arch Virol* 2015; 160(6):1519–25.

- Chen X, Zhang B, Yue H, et al. A novel astrovirus species in the gut of yaks with diarrhoea in the Qinghai–Tibetan Plateau, 2013. *J Gen Virol* 2015; 96(12):3672–80.
- Chu DKW, Chin AWH, Smith GJ, et al. Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *J Gen Virol*. 2010; 91(10): 2457–62.
- Chu DKW, Poon LLM, Guan Y, Peiris JSM. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol* 2008; 82(18): 9107–14.
- Covaris. DNA shearing for NGS: with the M220 focused-ultrasonicator. Woburn: Covaris, 2012.
- De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. Astrovirus infections in humans and animals: molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol* 2011; 11(7): 1529–44.
- Donato CM, Vijaykrishna D. The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian Astroviruses. *Viruses* 2017; 9(5): e102 (18 str.) https://www.researchgate.net/publication/316852558_The_Broad_Host_Range_and_Genetic_Diversity_of_Mammalian_and_Avian_Astroviruses#pf3 (28. 4. 2018).
- Drexler JF, Corman VM, Wegner T, et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(3): 449–56.
- Dubovi EJ, MacLachlan NJ. Astroviridae. In: Dubovi EJ, MacLachlan NJ, eds. Fenner's veterinary virology: 4th ed. London: Academic Press, 2011: 451–4.
- Duncan DL, Patel NM. Next-generation sequencing in the clinical laboratory. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, eds. Diagnostic molecular pathology: a guide to applied molecular testing. London: Academic Press, 2017: 25–33.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(5):1792–7.
- Englund L, Chriel M, Dietz HH, Hedlund KO. Astrovirus epidemiologically linked to pre-weaning diarrhoea in mink. *Vet Microbiol* 2002; 85(1): 1–11.

Finkbeiner SR, Kirkwood CD, Wang D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virol J* 2008; 5: e117 (17 str.)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2576171/> (7. 8. 2019)

Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, et al. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol* 2009; 83(20): 10836–9.

Fu Y, Pan M, Wang X, et al. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. *J Gen Virol* 2009; 90(5): 1104–8.

Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, et al. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 3890–4.

Geyer A, Steele AD, Peenze I, Lecatsas G. Astrovirus-like particles, adenoviruses and rotaviruses associated with diarrhoea in piglets. *J S Afr Vet Assoc* 1994; 65(4): 164–6.

Glass RI, Noel J, Mitchell D, et al. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol* 1996; 12: 287–300.

Gough RE, Collins MS, Borland E, Keymer LF. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Vet Rec* 1984; 114(11): 279.

Grellet A, De Battisti C, Feugier A, et al. Prevalence and risk factors of astrovirus infection in puppies from French breeding kennels. *Vet Microbiol* 2012; 157(1/2): 214–9.

Guan TP, Teng JLL, Yeong KY, et al. Metagenomic analysis of Sichuan takin fecal sample viromes reveals novel enterovirus and astrovirus. *Virology* 2018; 521:77–91.

Harbour DA, Ashley CR, Williams PD, Gruffydd-Jones TJ. Natural and experimental astrovirus infection of cats. *Vet Rec* 1987; 120(23): 555–7.

Imada T, Yamaguchi S, Kawamura H. Pathogenicity for baby chicks of the G-4260 strain of the picornavirus ‘avian nephritis virus’. *Avian Dis* 1979; 23(3): 582–8.

Indik S, Valiček L, Smid B, Dvorakova H, Rodak L. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus. *Vet Microbiol* 2006; 117(24): 276–83.

Ion PGM Dx System. Waltham: Thermo Fischer Scientific, 2016. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/clinical/diagnostic-testing/instruments-automation/genetic-analysis-instruments/ion-pgm-dx.html> (26. 6. 2019)

Jamnikar Ciglenečki U, Kirbiš A. Detection of enteric viruses in game animals in Slovenia. In: Book of abstracts. 3rd International Vetistanbul Group Congress: proceedings. Sarajevo, Veterinarski fakultet, 2016a: 159–61.

Jamnikar Ciglenečki U, Kirbiš A. Phylogenetic analyses of astrovirus in roe deer. In: Book of abstracts. 3rd International Vetistanbul Group Congress: proceedings. Sarajevo, Veterinarski fakultet, 2016b: 143–4.

Jonassen CM, Jonassen T TØ, Sveen TM, Grinde B. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Res* 2003; 91(2): 195–201.

Kapoor A, Li L, Victoria J, et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol* 2009; 90(12): 2965–72.

Karlsson EA, Small CT, Freiden P, et al. Non-human primates harbor diverse mammalian and avian astroviruses including those associated with human infections. *PLoS Pathog* 2015; 11(11): e1005225 (17 str.) <http://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1005225&type=printable> (10. 5. 2018).

Kiang D, Matsui SM. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *J Gen Virol* 2002; 83(1): 25–34.

Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Jee YM. Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. *J Korean Med Sci* 2008; 23(6):937–40.

Koopmans MP, Bijen MH, Monroe SS, Vinje J. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5(1): 33–7.

Kriston S, Willcocks MM, Carter MJ, Cubitt WD. Seroprevalence of astrovirus types 1 and 6 in London, determined using recombinant virus antigen. *Epidemiol Infect* 1996; 117(1): 159–64.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33(7):1870–4.

Kurtz JB, Lee TW. Human astrovirus serotypes. *Lancet* 1984; 2(8416): 1405.

Kutnjak D, Gutierrez-Aguirre I, Ravnikar M. Uporaba sekvenciranja naslednje generacije v virologiji. In: MiniSimpozij 2015: Proteinske pore, sekvenciranje in bioinformatika. Ljubljana: Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo, 2015: 8.

Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommeuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(8): 3241–8.

Lee RM, Lessler J, Lee RA, et al. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2013; 13(1): e446 (11 str.) https://www.researchgate.net/publication/257073350_Incubation_periods_of_viral_gastroenteritis_A_systematic_review (8. 5. 2018)

Li L, Diab S, McGraw S, Barr B, et al. Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(9): 1385–92.

Liu L, Yinh L, Shiliang L. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: e251364 (11 str.) <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/251364/> (26. 6. 2019)

Lukashov VV, Goudsmit J. Evolutionary relationships among Astroviridae. *J Gen Virol* 2002; 83(6): 1397–405.

Luo Z, Roi S, Dastor M, Gallice E, Laurin MA, l'Homme Y. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Vet Microbiol* 2011; 149(3/4): 316/23.

Madeley CR, Cosgrove BP. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; 306(7932): 451–2.

- Madeley CR. Epidemiology of gut viruses. In: Farthing MJG, eds. *Viruses and the gut*. Welwyn Garden City: Smith Kline and French Laboratories, 1989: 5–15.
- Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem* 2013; 6: 287– 303.
- Marshall JA, Healey DS, Studdert MJ et al. Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. *Aust Vet J* 1984; 61(2): 33–8.
- Martella V, Moschidou P, Lorusso E, et al. Detection and characterization of canine astroviruses. *J Gen Virol* 2011; 92(8): 1880–7
- Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 811–24.
- Meliopoulos VA, Kayali G, Burnham A, et al. Detection of antibodies against turkey astrovirus in humans. *PLoS ONE* 2014; 9: e96934 (6 str.)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4020816/> (11. 5. 2018).
- Mendez E, Arias CF. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 981–1000.
- Mendez E, Fernandez-Luna T, Lopez S, Mendez-Toss M, Arias CF. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol* 2002; 76(16): 7996–8002.
- Mendez-Toss M, Griffin DD, Calva J, et al. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 151–7.
- Mittelholzer C, Hedlund KO, Inglund L, Dietz HH, Svensson L. Molecular characterization of a novel astrovirus associated with disease in mink. *J Gen Virol* 2003; 84(11): 3087–94.
- Monroe SS, Carter MJ, Herrmann JE, Kurtz JB, Matsui SM. *Astroviridae*. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, eds. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Vienna: Springer-Verlag, 1995: 364–84.

- Moschidou P, Martella V, Lorusso E et al. Mixed infection by feline astrovirus and feline panleukopenia virus in a domestic cat with gastroenteritis and panleukopenia. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23(3): 581–4.
- Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: from mechanism to variant calling. *Curr Genet Med Rep.* 2015; 3(4): 158–65.
- Nagai M, Omatsu T, Aoki H, et al. Full genome analysis of bovine astrovirus from fecal samples of cattle in Japan: identification of possible interspecies transmission of bovine astrovirus. *Arch Virol* 2015; 160(10): 2491–501.
- Oem JK, An DJ. Phylogenetic analysis of bovine astrovirus in Korean cattle. *Virus Genes* 2014; 48(2): 372–5.
- Pager CT, Steele AD. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clin Infect Dis* 2002; 35(11): 1452–3.
- Pandey PK, Kass PH, Soupir ML, Biswas S, Singh VP. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express* 2014; 4: e51 (16 str.)
<http://www.amb-express.com/content/4/1/51> (22. 4. 2018)
- Pantin-Jackwood M, Todd D, Koci M. Avian astroviruses. In: Schultz-Cherry S, ed. *Astrovirus research: essential ideas, everyday impacts, future directions*. New York: Springer Science+Business Media, 2013: 151–80.
- Pantin-Jackwood MJ, Spackman E, Woolcock PR. Phylogenetic analysis of Turkey astrovirus reveals evidence of recombination. *Virus Genes* 2006; 32(2): 187–92.
- Pfaff F, Schlottau K, Scholes S, et al. A novel astrovirus associated with encephalitis and ganglionitis in domestic sheep. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64(3): 677–82.
- Pintó RM, Abad FX, Gajardo R, Bosch A. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(5):1811–13.
- Pintó RM, Villena C, Le Guyader F, et al. Astrovirus detection in wastewater samples. *Water Sci Technol* 2001; 43(12): 73–6.

- Progar V, Petrovič U. The effect of next generation sequencing parameters on the reliability of metagenomic studies. *Inform Med Slov* 2013; 18(1/2): 1–8.
- Quan PL, Wagner TA, Briese T, et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(6): 918–25.
- Reuter G, Nemes C, Boros A, Kapusinzky B, Delwart E, Pankovics P. Astrovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Hungary. *Arch Virol* 2012; 157(6): 1143–7.
- Reuter G, Pankovics P, Boros A. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. *Arch Virol* 2011; 156(1): 125–8.
- Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, Humphrey CD, Sanchez-Fauquier A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol* 1995; 76(2): 2075–80.
- Rivera R, Nollens H, Venn-Watson S, Gulland F, Wellehan JJ. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *Gen Virol* 2010; 91(1):166–73.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463–7.
- Santo Domingo JW, Edge TA. Identification of primary sources of faecal pollution. In: Rees G, Pond K, Kay D, eds. *Safe management of shellfish and harvest waters*. London: World Health Organization (WHO); IWA Publishing, 2010: 51–80.
- Schlottau K, Schulze C, Bilk S, et al. Detection of a novel bovine astrovirus in a cow with encephalitis. *Transbound Emerg Dis* 2016; 63(3): 253–9.
- Sebire NJ, Malone M, Shah N, Anderson G, Gaspar HB, Cubitt WD. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Pathol* 2004; 57(9): 1001–3.
- Shan T, Wang C, Tong W, et al. Complete genome of a novel porcine astrovirus. *J Virol* 2012; 86(24): 13820–1.
- Singh PB, Sreenivasan MA, Pavri KM. Viruses in acute gastroenteritis in children in Pune, India. *Epidemiol Infect* 1989; 102(2): 345–53.

Smits SL, Van Leeuwen M, Kuiken T, Hammer AS, Simon JH, Osterhaus AD. Identification and characterization of deer astroviruses. *J Gen Virol* 2010; 91(11): 2719–22.

Snodgrass DR, Gray EW. Detection and transmission of 30 nm virus particles (Astroviruses) in feces of lambs with diarrhoea. *Arch Virol* 1977; 55(4): 287–91.

Strain E, Kelley LA, Schultz -Cherry S, Muse SV, Koci MD. Genomic analysis of closely related astroviruses. *J Virol* 2008; 82(10): 5099–103.

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

Taylor MB, Marx FE, Grabow WO. Rotavirus, astrovirus and adenovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in a South African child care centre. *Epidemiol Infect* 1997; 119(2): 227–30.

Toffan A, Jonassen CM, De Battisti C, et al. Genetic characterization of a new astrovirus detected in dogs suffering from diarrhoea. *Vet Microbiol* 2009; 139(1/2): 147–52.

Tse H, Chan WM, Tsoi HW, et al. Re-discovery and genomic characterization of bovine astroviruses, *J Gen. Virol* 2011; 92(8): 1888–98.

Ulloa JC, Guiterrez MF. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. *Can J Microbiol* 2010; 56(7): 569–77.

van Hemert FJ, Lukashov VV, Berkhout B. Different rates of (non-)synonymous mutations in astrovirus genes; correlation with gene function. *Virol J* 2007; 4: e25 (12 str.)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828050/> (10. 5. 2018)

Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009; 55(4): 641–58.

Vu D-L, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Epidemiology of classic and novel human astrovirus: gastroenteritis and beyond. *Viruses* 2017; 9(2): e33 (23 str.)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5332952/pdf/viruses-09-00033.pdf>
(10. 5. 2018)

Walter JE, Briggs J, Guerrero ML, et al. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch Virol* 2002; 146 (12): 2357–67.

Walter JE, Mitchell DK, Guerrero ML, et al. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. *J Infect Dis* 2001; 183(5): 681–6.

Willcocks MM, Brown TDK, Madeley CR, Carter MJ. The complete sequence of a human astrovirus. *J Gen Virol* 1994; 75(7): 1785–8.

Williams FP Jr. Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in diarrheal stools of beagle pups. *Arch Virol* 1980; 66(3): 215–26.

Wolfhardt M, Kiulia NM, Mwenda JM, Taylor MB. Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(2): 728–31.

Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. A novel astrovirus from dromedaries in the Middle East. *J Gen Virol* 2015; 96(9): 2697–707.

Woode GN, Bridger JC. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* 1978; 11(4): 441–52.

Woode GN, Gourley NE, Pohlenz JF, Liebler EM, Mathews SL, Hutchinson MP. Serotypes of bovine astrovirus. *J Clin Microbiol* 1985; 22(4): 668–70.

Woode GN, Pohlenz JF, Gourley NE, Fagerland JA. Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J Clin Microbiol* 1984; 19(5): 623–30.

Wunderli W, Meerbach A, Gungor T et al. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS One* 2011; 6(11): e27483 (9 str.)
<https://pdfs.semanticscholar.org/5094/9c6f16b36f7384a2706577da356920355a69.pdf>
(8. 5. 2018)

Wüthrich D, Boujon CL, Truchet L, et al. Exploring the virome of cattle with non-suppurative encephalitis of unknown etiology by metagenomics. *Virology* 2016; 493: 22–30.

Yamaguchi S, Imada T, Kawamura H. Characterization of a picornavirus isolated from broiler chicks. *Avian Dis* 1979; 23(3): 571–81.

ZGS. Letni lovsko upravljavski načrt za II. Gorenjsko lovsko upravljavsko območje za leto 2018. Kranj: Zavod za gozdove Slovenije, Območna enota Kranj, 2018: 8.
http://www.zgs.si/fileadmin/zgs/main/img/CE/lovstvo/LUN_2018/Letni_LUN_II_Gorenjsko-osnutek.pdf (10. 7. 2019)

Zhou H, Liu L, Li R, et al. Detection and genetic characterizatin of canine astroviruses in pet dogs in Guanxi, China. *Virol J* 2017; 14: 165 (6 str.)
<https://virologyj.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12985-017-0823-4> (29. 4. 2018)

Zhu HC, Chu DK, Liu W, et al. Detection of diverse astroviruses from bats in China. *J Gen Virol* 2009; 90(4): 883–7.