

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



Jernej Kmetec

**UGOTAVLJANJE IN MOLEKULARNA
OPREDELITEV VIRUSOV ORF PRI GAMSU
(*Rupicapra rupicapra*) TER PAPILOMAVIRUSOV PRI
SRNI (*Capreolus capreolus*) IN NAVADNEM JELENU
(*Cervus elaphus*)**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2021

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina

UDK 639.111.1/.2.091:578.821:57.083.2:57.088.7:575.86 (043.3)

Jernej Kmetec, dr. vet. med.

**UGOTAVLJANJE IN MOLEKULARNA OPREDELITEV
VIRUSOV ORF PRI GAMSU (*Rupicapra rupicapra*) TER
PAPILOMAVIRUSOV PRI SRNI (*Capreolus capreolus*) IN
NAVADNEM JELENU (*Cervus elaphus*)**

Doktorska disertacija

**IDENTIFICATION AND MOLECULAR
CHARACTERISATION OF ORF VIRUSES IN CHAMOIS
(*Rupicapra rupicapra*) AND PAPILOMAVIRUSES IN ROE
DEER (*Capreolus capreolus*) AND RED DEER (*Cervus elaphus*)**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2021

Jernej Kmetec

Ugotavljanje in molekularna opredelitev virusov Orf pri gamsu (*Rupicapra rupicapra*) ter papilomavirusov pri srni (*Capreolus capreolus*) in navadnem jelenu (*Cervus elaphus*)

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele ter Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: izr. prof. dr. Gorazd Vengušt

Somentorica: znan. sod. dr. Urška Kuhar

Izjava o delu: Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Hostnik (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

Članica: doc. dr. Urška Jamnikar Ciglencečki (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

Član: prof. dr. sc. Zdravko Janicki (Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet)

»Quidquid agis, prudenter agas et respice finem.«

IZVLEČEK

Ključne besede: Divjad – virologija; orf virus – genetika; kužni ektim; protitelesa proti virusom – kri; papilomaviridae – genetika – klasifikacija; papilomavirusne okužbe – virologija – patologija; virusni genom; sekvenciranje celotnega genoma – metode; filogenija

Kužni ektim povzroča virus Orf, ki spada v družino *Poxviridae*, rod *Parapoxvirus*. V doktorski nalogi opisujemo analizo dveh genomov izolatov virusov Orf pri gamsih (sev ORFV_82/13 in sev ORFV_12/17). Z metodo sekvenciranja naslednje generacije (angl. *next-generation sequencing*, NGS) smo prvi določili skoraj celotno nukleotidno zaporedje genomov (angl. *nearly complete genome*) virusov Orf pri gamsih. Analiza genomov virusov Orf pri gamsih je pokazala visoko stopnjo sorodnosti z virusi Orf pri ovcah in kozah. Genoma sta na nivoju nukleotidnega zaporedja med seboj 99,93-odstotno podobna in se od genomov drugih virusov Orf, dostopnih v podatkovni zbirki NCBI GenBank, razlikujeta od 7,61 % (ovčji sev NZ2) do 11,62 % (kozji sev NP). Filogenetska analiza genov osrednje regije je pokazala, da sta virusa Orf pri gamsih tvorila svojo filogenetsko podskupino. V doktorski nalogi smo z ugotavljanjem prisotnosti protiteles proti virusom Orf s serum nevtralizacijskim testom ugotavljali prekuženost populacije gamsov z virusom Orf. Testirali smo 40 vzorcev serumov gamsov. Rezultati testa so bili negativni pri 38 vzorcih, dveh rezultatov ni bilo mogoče odčitati zaradi citotoksičnega učinka vzorca seruma na celično kulturo. S pregledom arhivskih vzorcev zadnjih dveh desetletij, upoštevajoč posredovane podatke lovskih družin ter izkušnje Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele, smo ugotovili ciklično pojavljanje kužnega ektima pri gamsih. Fibropapilomi so benigni tumorji kože, ki jih povzročajo virusi iz družine *Papillomaviridae*. Bolezen z izraženimi kliničnimi znaki kaže v Evropi tendenco širjenja med populacijo srn, medtem ko je pri navadnem jelenu opažena redko. V nalogi opisujemo primere fibropapilomatoze pri srnah in navadnem jelenu z značilno klinično in histopatološko sliko. Z metodo NGS smo določili nukleotidno zaporedje celotnih genomov sedmih papilomavirusov (PV), in sicer šestim sevom PV pri srnah (CcaPV1 sev 31-16, CcaPV1 sev 32-16, CcaPV1 sev 37-14, CcaPV1 sev 63-15, CcaPV1 sev 103-16 in CcaPV1 sev 84-14) in enemu sevu PV pri navadnem jelenu (CePV1v sev 64-14). Pri srnah smo potrdili okužbo s tipom CcaPV1 in pri navadnem jelenu s podtipom CePV1v. Primerjava virusnih genomov z že znanimi genomi iz NCBI GenBank je pokazala visoko genetsko stabilnost genoma v času in prostoru. S pregledom

arhivskih vzorcev zadnjih dveh desetletij smo ugotovili pojavljanje fibropapilomatoze pri srnah na letni ravni, pri navadnem jelenu pa izredno redko.

ABSTRACT

Keywords: Deer – virology; orf virus – genetics; ecthyma, contagious; antibodies, viral – blood; papillomaviridae – genetics – classification; papillomavirus infection – virology – pathology; genome, viral; whole genome sequencing – methods; phylogeny

Contagious ecthyma is a disease caused by Orf virus, a member of the family *Poxviridae*, genus *Parapoxvirus*. In the doctoral dissertation, we describe the analysis of two genomes of Orf virus isolates in chamois (strain ORFV_82/13 and strain ORFV_12/17). Using next-generation sequencing (NGS), we were the first ones to identify nearly complete genome of Orf viruses in chamois. The analyses revealed a high degree of similarity to Orf virus found in sheep and goats. At the nucleotide sequence level, the genomes are 99.93 % identical to each other and differ from other Orf viruses from 7.61 % (sheep strain NZ2) to 11.62 % (goat strain NP). Phylogenetic analysis of genes in the central region has shown that chamois Orf viruses form a distinct phylogenetic group. In the doctoral dissertation, the presence of antibodies against Orf viruses by serum neutralization assay was used to determine the seroprevalence of chamois population with Orf virus. Forty serum samples from chamois were tested. Test results were negative for 38 samples, and two results could not be read due to the cytotoxic effect of the serum sample on the cell culture. By reviewing the archival samples of the last two decades, considering the data provided by hunting organisations and the experience of the Institute of Pathology, wild animals, fish and bees, we found cyclic occurrence of contagious ecthyma in chamois. Fibropapillomas are benign skin tumours caused by viruses of the *Papillomaviridae* family. The disease with pronounced clinical signs shows a tendency to spread among the roe deer population in Europe, whereas it is rarely observed in red deer. The dissertation describes cases of fibropapillomatosis in roe deer and red deer with a characteristic clinical and histopathological picture. NGS method was used to determine the nucleotide sequence of the whole genome of seven papillomaviruses (PV), namely the sixth PV strain in roe deer (CcaPV1 strain 31-16, CcaPV1 strain 32-16, CcaPV1 strain 37-14, CcaPV1 strain 63-15, CcaPV1 strain 103-16 and CcaPV1 strain 84-14) and one PV strain in red deer (CePV1v strain 64-14). Infections with the CcaPV1 type were confirmed in roe deer and with the CePV1v subtype in red deer. Comparison of the viral genomes with previously known genomes from NCBI GenBank showed high genetic stability of the genome in time and space. Reviewing archival

samples from the last two decades, it was found that fibropapillomatosis occurs annually in roe deer but extremely rarely in red deer.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK.....	5
ABSTRACT	7
KAZALO VSEBINE.....	9
KAZALO TABEL.....	13
KAZALO SLIK.....	15
SEZNAM OKRAJŠAV.....	17
1 UVOD.....	19
1.1 NAMEN DELA	20
1.2. HIPOTEZE	21
2 PREGLED LITERATURE	22
2.1 OPIS ŽIVALSKIH VRST	22
2.2 POKSVIRUSI IN BOLEZEN KUŽNI EKTIM	23
2.2.1 Klasifikacija poksvirusov	23
2.2.2 Zgradba in genom parapoksvirusov	26
2.2.3 Prenos in replikacija poksvirusov.....	27
2.2.4 Vpliv okolja na parapoksviruse	29
2.2.5 Geografska razširjenost in dovzetnost živalskih vrst na okužbe z virusi Orf in drugimi parapoksvirusi	29
2.2.6 Kužni ektim pri navadnem gamsu	30
2.2.7 Ukrepi in nadzor nad boleznijo pri gamsu.....	31
2.2.8 Prenos bolezni	31
2.2.9 Inkubacijska doba in klinična slika kužnega ektima	31
2.2.10 Imunski odziv na okužbe z virusom Orf	32

2.2.11 Patomorfološke in histopatološke značilnosti sprememb, značilnih za kužni ektim	34
2.2.12 Diagnostika kužnega ektima.....	35
2.2.13 Kužni ektim kot zoonoza.....	36
2.3 PAPILOMAVIRUSI IN FIBROPAPILOMATOZA	36
2.3.1 Klasifikacija papilomavirusov	36
2.3.1.1 Klasifikacija in filogenetska analiza predstavnikov rodu <i>Deltapapilomavirus</i>	38
2.3.1.2 Klasifikacija in filogenetska analiza predstavnikov rodu <i>Epsilonpapillomavirus</i>	40
2.3.2 Zgradba, genom in replikacija papilomavirusov	41
2.3.3 Vplivi okolja na papilomaviruse.....	43
2.3.4 Inkubacijska doba in klinična slika fibropapilomatoze	44
2.3.5 Patomorfološke in histopatološke značilnosti sprememb, značilnih za fibropapilomatozo.....	44
2.3.6 Imunski odziv živali na okužbo s papilomavirusi	45
2.3.7 Diagnostika fibropapilomatoze.....	45
2.3.8 Geografska razširjenost fibropapilomatoze pri prostoživečih cervidnih vrstah	46
2.3.9 Ukrepi in nadzor nad boleznijo pri srnah in jelenih	47
2.4 DIAGNOSTIČNE METODE.....	47
2.4.1 Sekvenciranje naslednje generacije	47
2.4.1.1 Sekvenciranje druge generacije	48
2.4.1.2 Priprava knjižnice za NGS	48
2.4.1.3 Tehnologija Illumina	48
2.4.1.4 Tehnologija Ion Torrent	49
2.4.2 Bioinformacijska analiza	50
3 MATERIALI IN METODE	52

3.1. VZORCI	52
3.1.1 Vzorci gamsov s klinično potrjeno sliko kužnega ektima.....	52
3.1.2 Vzorci srn in jelena s klinično potrjeno sliko fibropapilomatoze.....	56
3.2 POKSVIRUSI IN KUŽNI EKTIM	59
3.2.1 Določanje protiteles proti virusu Orf s serum nevtralizacijskim testom	59
3.2.2 Sekvenciranje celotnih genomov s tehnologijo Illumina	59
3.2.2.1 Priprava tkivnih suspenzij in izolacija virusa na celični kulturi.....	59
3.2.2.3 Sekvenciranje s tehnologijo Illumina	60
3.2.3 Bioinformacijska obdelava podatkov NGS	60
3.2.3.1 Nadzor kakovosti odčitkov	60
3.2.3.2 Sestavljanje genomov virusov Orf	60
3.2.3.3 Vrednotenje sestavljanja genomov virusov Orf in anotacija genomov	61
3.2.4 Poravnave nukleotidnih zaporedij genomov virusov Orf in analiza raznolikosti ...	61
3.2.5 Filogenetske analize	61
3.3 PAPILOMAVIRUSI IN FIBROPAPILOMATOZA	63
3.3.1 Sekvenciranje celotnih genomov s tehnologijo Ion Torrent.....	63
3.3.1.1 Izolacija genomske DNA iz vzorcev tkiv.....	63
3.3.1.2 Sekvenciranje s tehnologijo Ion Torrent	63
3.3.2 Bioinformacijska obdelava podatkov NGS	64
3.3.2.1 Nadzor kakovosti odčitkov	64
3.3.2.2 Sestavljanje genomov papilomavirusov	64
3.3.2.3 Vrednotenje sestavljanja genomov papilomavirusov in anotacija genomov ...	64
3.3.3 Poravnava nukleotidnih zaporedij genomov papilomavirusov in analiza raznolikosti	65
3.3.4 Filogenetske analize	65
3.3.5 Določanje prisotnosti virusne DNA z metodo PCR v arhivskih vzorcih	65

4 REZULTATI	66
4.1 Poksvirusi in kužni ektim	66
4.1.1 Patoanatomska preiskava.....	66
4.1.2 Histopatološka preiskava.....	68
4.1.3 Serum nevtralizacijski test za virus Orf.....	69
4.1.4 Sekvenciranje celotnih genomov in genomska analiza	71
4.1.5 Filogenetske analize	72
4.1.6 Pregled arhivskih podatkov	75
4.2. PAPILOMAVIRUSI IN FIBROPAPILOMATOZA	77
4.2.1 Patoanatomska preiskava.....	77
4.2.2 Histopatološka preiskava.....	78
4.2.3 Sekvenciranje celotnih genomov in genomska analiza	80
4.2.4 Genetska raznolikost gena L1	84
4.2.5 Filogenetska analiza	84
4.2.6 Pregled arhivskih podatkov	85
5 RAZPRAVA.....	89
5.1 POKSVIRUSI IN KUŽNI EKTIM PRI GAMSU.....	89
5.2 PAPILOMAVIRUSI IN PAPILOMATOZA PRI SRNI IN NAVADNEM JELENU ..	94
6 SKLEPI.....	98
7 POVZETEK	101
8 SUMMARY	102
9 ZAHVALE	104
10 LITERATURA	105
11 PRILOGE	105

KAZALO TABEL

Tabela 1: Podatkovni izpis o predstavnikih rodu <i>Parapoxvirus</i> o vrsti, izolatu, pristopni številki, razpoložljivi sekvenci in kratici virusa.	24
Table 1: Data display of genus <i>Parapoxvirus</i> members including species, isolate, accession number, available sequence, and virus abbreviation.	24
Tabela 2: Podatkovni izpis o predstavnikih rodu <i>Deltapapillomavirus</i> o vrsti, poimenovanju virusa, izolatu, pristopni številki, številki referenčne sekvence in kratici virusa.	39
Table 2: Data display of genus <i>Deltapapillomavirus</i> members including species, virus name, isolate, accession number, reference sequence number, available sequence, and virus abbreviation.	39
Tabela 3: Podatkovni izpis o predstavnikih rodu <i>Epsilonpapillomavirus</i> o vrsti, poimenovanju virusa, izolatu, pristopni številki, številki referenčne sekvence in kratici virusa.	41
Table 3: Data display of genus <i>Epsilonpapillomavirus</i> members including species, virus name, isolate, accession number, reference sequence number, available sequence, and virus abbreviation.	41
Tabela 4: Podatki o vzorcih vključenih v doktorsko nalogo s klinično sliko kužnega ektima.	53
Table 4: Data of samples with clinical picture of contagious ecthyma included in the doctoral dissertation.	53
Tabela 5: Podatki o vzorcih serumov gamsov, ki smo jih uporabili za SNT.	55
Table 5: Data of serum samples of chamois used for SNT.	55
Tabela 6: Podatki o vzorcih vključenih v doktorsko nalogo s klinično sliko fibropapilomatoze.	57
Table 6: Data of samples with fibropapillomatosis included in doctoral dissertation.	57
Tabela 7: Pregled virusnih sevov pridobljenih iz podatkovne zbirke NCBI GenBank uporabljenih za analizo raznolikosti in filogenetsko analizo virusov Orf pri gamsu.	62
Table 7: An overview of all viral isolates used for phylogenetic analysis of Orf virus in chamois.	62

Tabela 8: Rezultati SNT vzorcev serumov gamsov na prisotnost protiteles proti virusu Orf.	70
Table 8: Results of SNT of chamois samples against virus Orf antibodies.	70
Tabela 9: Rezultati sekvenciranja celotnih ORFV genomov in statistični povzetek o odčitkih.	71
Table 9: Results of the whole-genome sequencing of ORFV genomes and assembly statistics.	71
Tabela 10: Pregled podatkov arhivskih vzorcev za kužni ektim pri gamsu.	76
Table 10: Examination and overview of archival samples data for contagious ecthyma in chamois.	76
Tabela 11: Rezultati sekvenciranja celotnih PV genomov in statistični podatki o odčitkih. ..	82
Table 11: Results of the whole-genome sequencing of PV genomes and assembly statistics.	82
Tabela 12: Pregled podatkov arhivskih vzorcev in rezultat PCR za papilomatozo.	87
Table 12: Examination of archival samples and result of PCR for papillomatosis.	87

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogenetsko drevo predstavnikov družine <i>Poxviridae</i>	26
Figure 1: Phylogenetic relationships in the family <i>Poxviridae</i>	26
Slika 2: Shematični prikaz replikacije poksvirusov	28
Figure 2: Schematic representation of poxvirus replication.	28
Slika 3: Filogenetsko drevo predstavnikov rodu <i>Deltapapillomavirus</i>	40
Figure 3: Phylogenetic tree of members of the genus <i>Deltapapillomavirus</i>	40
Slika 4: Shematični prikaz delov epitela, kjer poteka razmnoževanje in sestavljanje govejega papilomavirusa.	43
Figure 4: Schematic representation of the parts of the epithelium layers where replication and assembly of bovine papillomavirus takes place.	43
Slika 5: Geografske lokacije vzorcev vključenih v doktorsko raziskavo.	54
Figure 5: Geographical locations of samples included in the doctoral dissertation.	54
Slika 6: Geografske lokacije srn in navadnih jelenov s fibropapilomatozo.	58
Figure 6: Geographical locations of roe deer and red deer with fibropapillomatosis.	58
Slika 7: Patoanatomska preiskava gamsov.	67
Figure 7: Pathoanatomical examination of chamoises	67
Slika 8: Histopatološka slika kužnega ektima pri gamsu.	68
Figure 8: Histopathologic findings of contagious ecthyma in chamois.	68
Slika 9: Primer rezultata pridobljenega serum nevtralizacijskega testa.	69
Figure 9: Example of the result obtained with serum virus neutralization assay	69
Slika 10: Shematski prikaz organizacije genoma izolata ORFV 82/12.	72
Figure 10: Schematic representation of the genome organization of ORFV 82/12 isolates. ..	72
Slika 11: Filogenetsko drevo virusnih izolatov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 ter 13 virusnih izolatov pridobljenih iz podatkovne zbirke NCBI GenBank.	74
Figure 11: Phylogenetic tree of viral isolates ORFV 82/12 and ORFV 12/17 and 13 virus isolates obtained from the NCBI GenBank database.	74

Slika 12: Patoanatomska preiskava živali s fibropapilomatozo.....	78
Figure 12: Pathoanatomical examination of animals with fibropapillomatosis.	78
Slika 13: Histopatološka slika fibropapilomatoze pri navadnem jelenu.....	80
Figure 13: Histopathologic findings of fibropapillomatosis in a red deer.....	80
Slika 14: Poravnava genomov PV pri srni in navadnem jelenu z referenčnim genomom CcaPV1 in genomov CePV1v s poudarkom na porazdelitvi nukleotidnih substitucij	83
Figure 14: Multiple alignments of roe and red deer PV genomes from this study compared to the reference CcaPV1 genome and CePV1v genomes, respectively, highlighting the distribution of nucleotide substitutions	83
Slika 15: Filogenetsko drevo NJ z evolucijskim modelom (T92 + G) združenih zaporedij genov E1, E2, L1 in L2.	85
Figure 15: NJ phylogenetic tree with the (T92+G) substitution model of the concatenated E1, E2, L1 and L2 gene sequences	85

SEZNAM OKRAJŠAV

AGID	agar gel imunodifuzijski test (angl. <i>agar gel immuno-diffusion test</i>)
bp	bazni par
BPV	goveji papilomavirus (angl. <i>bovine papillomavirus</i>)
CPE	citopatski učinek (angl. <i>cytopathic effect</i>)
DDBJ	DNA podatkovna banka Japonske (angl. <i>DNA databank of Japan</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	encimskoimunski test (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMBL	Evropski laboratorij za molekularno biologijo (angl. <i>The European Molecular Biology Laboratory</i>)
FIGO	Mednarodna zveza za ginekologijo in porodništvo (fra. <i>Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique</i>)
h.r.	histološke rezine
HPV	človeški papilomavirusi (angl. <i>human papillomaviruses</i>)
ICTV	Mednarodni komite za taksonomijo virusov (angl. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IFN- γ	interferona gama
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IPDRČ	Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele
ITR	območja terminalnih invertiranih ponovitev (angl. <i>Inverted terminal repeats</i>)
kbp	kilo bazni par
kDa	kilo Dalton
LAMP	izotermalni test (angl. <i>loop mediated isothermal amplification assay</i>)
LCR	nekodirajoče regulatorno področje (angl. <i>long control region</i>)
LD	lovsko družina
LPN	lovišče s posebnim namenom
ML	Filogenetski algoritem, ki temelji na računanju največje verjetnosti za določeno evolucijsko pot (angl. <i>maximum likelihood</i>).

mRNA	informacijska RNA (angl. <i>messenger RNA</i>)
NCBI	Nacionalni center za biotehnoške informacije (angl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
n.d.	Ni bilo delano.
NGS	sekvenciranje naslednje generacije (angl. <i>next-generation sequencing</i>)
OPV	ovčji papilomavirus
ORF	odprti bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i>)
ORFV	Orf virus
p.b.	parafinski bloki
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PV	papilomavirus
RCA	metoda krožnega pomnoževanja (angl. <i>rolling-circle amplification</i>)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>)
SNT	serum nevtralizacijski test
SOP	standardni operativni postopki
SSRs	mikrosatelitski markerji (angl. <i>simple sequence repeats</i>)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa
TNP	Triglavski narodni park
VEGF	vaskularni endotelijski rastni faktor (angl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VF	Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani
ZGS	Zavod za gozdove Slovenije

1 UVOD

Za Slovenijo je značilna izredno pestra in razmeroma dobro ohranjena narava. Po oceni Zavoda za gozdove Slovenije gozd porašča 58,3 % površine Slovenije (1). Na majhni površini ima veliko biotsko raznovrstnost, med drugim veliko število prostoživečih prežvekovalcev, med katerimi prevladujejo srne, navadni jelen in gams (2). Čeprav je v prosti naravi težje zaznati obolelo žival, pa primeri v Sloveniji kažejo, da se bolezni z različno etiologijo pri prostoživečih prežvekovalcih redno pojavljajo. V večini primerov potekajo okužbe asimptomatsko, nekatere pa so za lovce zelo evidentne, še posebej, če se pri klinični sliki pojavljajo redke in nenavadne spremembe na koži, ki so v naravnem okolju hitro opazne. V zadnjem desetletju je pri prostoživečih prežvekovalcih v Sloveniji opazen porast kliničnih primerov fibropapilomatoze pri srni ter ciklično pojavljanje primerov kužnega ektima pri gamsih. Prav zaradi nizke pojavnosti ter težje dostopnosti do materiala take bolezni redko diagnosticiramo (3).

Kužni ektim oziroma pustularni dermatitis povzroča virus Orf (ORFV), ki spada v družino *Poxviridae*, rod *Parapoxvirus*. Bolezen je uvrščena med zoonoze, kjer se opisuje tudi možen prenos ORFV na lovce ob stiku s trupli gamsov (4). Pri prostoživečih živalih v Evropi so bolezen ugotovili pri kozorogu (*Capra ibex*) (5), gamsu (*Rupicapra rupicapra*) (6), pirenejskem gamsu (*Rupicapra pyrenaica*) (7), navadnem jelenu (*Cervus elaphus*) (5) ter moškatnem govedu (*Ovibos moschatus*) (8). Bolezenski znaki pri obolelih živalih se kažejo v obliki sprememb na področju ustne votline in njene okolice, te so boleče in povzročajo neješčnost ter stradanje. Zaradi sprememb na vimenu samice predčasno zapustijo mladiče, medtem ko spremembe na okončinah privedejo do začasne šepavosti. Bolezen je običajno samoozdravljiva (9–13). Literature in podatkov o pojavnosti klinične slike in samem povzročitelju pri gamsih je izredno malo. Trenutno je v dostopni literaturi samo en opis filogenetske analize kratkega odseka virusnega genoma pri navadnem jelenu, gamsu ter kozorogu v Italiji (5).

Fibropapilomi so benigni tumorji kože, ki jih povzročajo virusi iz družine *Papillomaviridae*. Neoplastične spremembe se pri okuženi živali kažejo kot številni benigni tumorji, ki se večinoma pojavijo na področju vratu, glave, trebuha in okončin. Večji tumorji lahko tudi ulcerirajo. V redkih primerih lahko najdemo metastaze na pljučih. Ugotovili so jih pri okužbah z AaPV1 (*Deltapapillomavirus 1*) ter OvPV1 (*Deltapapillomavirus 3*) (3, 14, 15). Čeprav prenos papilomavirusov (PV) med prostoživečimi živalmi v naravi še ni čisto pojasnjen,

epidemiološke študije kažejo, da se PV prenašajo direktno skozi poškodovano kožo ali sluznico, preko okužene vegetacije in/ali preko hematofagnih insektov (16–18). Okužba lahko poteka tudi asimptomatsko (19, 20). Fibropapilomatoza je v naravi prisotna vse leto (21). Bolezen z izraženimi kliničnimi znaki kaže v Evropi tendenco širjenja med populacijo srn (16), medtem ko je pri navadnem jelenu opažena redko (22). Za filogenetsko in taksonomsko analizo se pri papilomavirusih preiskuje regijo L1. Taksonomski status papilomavirusnih tipov, podtipov in podtipskih različic temelji na tradicionalnem kriteriju, da se morajo nukleotidna zaporedja gena L1 razlikovati vsaj za 10 %, 2–10 % ali do 2 % (19).

Nov papilomavirusni tip se prepozna kot tak, če se nukleotidno zaporedje gena L1 razlikuje za več kot 10 % od najbližjega sorodnega papilomavirusnega tipa. Razlike med 2 in 10 % opredeljujejo podtip in razlike, manjše od 2 %, podtipsko različico. Tradicionalni papilomavirusni tipi znotraj vrste imajo med 71 in 89 % podobno nukleotidno zaporedje gena L1 (23). Večina raziskav za boljše razumevanje evolucije in klasifikacije papilomavirusov je bilo opravljenih na humanih papilomavirusih ter papilomavirusih pri domačih živalih (angl. *bovine papillomaviruses*, BPV) (24).

1.1 NAMEN DELA

Namen doktorske disertacije je bil določiti in analizirati nukleotidno zaporedje celotnega genoma virusa Orf pri gamsu, saj do sedaj celotni genom virusa Orf pri gamsu še ni bil določen. V raziskavo smo vključili tudi 40 vzorcev serumov gamsov za določanje protiteles proti virusu Orf s serum nevtralizacijskim testom, da bi ugotovili razširjenost okužbe z virusom Orf pri gamsih brez klinične slike.

Naš namen je bil tudi določiti nukleotidna zaporedja celotnih genomov papilomavirusov pri srni in navadnem jelenu ter jih primerjati med seboj in z virusnimi sevi iz drugih držav, ki smo jih pridobili iz podatkovne zbirke Nacionalnega centra za biotehnološke informacije (angl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI GenBank). Želeli smo določiti genotipe papilomavirusov in odkriti morebitne nove genotipske oziroma podtipske različice, ki krožijo v Sloveniji. V okviru naloge smo opravili analizo arhivskih vzorcev pojavljanja kužnega ektima in papilomatoze pri prostoživečih prežvekovalcih za več kot dve desetletji nazaj. V raziskavo smo vključili arhivske vzorce, pri katerih je bila postavljena diagnoza zgolj na osnovi klinične

in histopatološke slike, ter jih testirali z metodo PCR na prisotnost nukleinske kisline virusa Orf in papilomavirusov.

1.2. HIPOTEZE

Z raziskavo smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

- Na podlagi nukleotidnega zaporedja celotnega genoma virusa Orf pri gamsih nameravamo dokazati, da je ta najbolj podoben virusnim sevom Orf, ugotovljenim pri ovcah.
- V populaciji gamsov nameravamo s serum nevtralizacijskim testom dokazati prisotnost protiteles proti virusom Orf in oceniti stopnjo prekuženosti populacije.
- Kožne spremembe pri gamsih, značilne za bolezen kužni ektim, povzroča virus Orf.
- Spremembe na koži v obliki gobastih, pecljatih tumorjev pri srnah in jelenih v Sloveniji povzročajo vrstno specifični papilomavirusi iz rodu *Deltapapilomavirus*, in sicer pri srni genotip CcPV-1 ter pri jelenu genotip CePV-1.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 OPIS ŽIVALSKIH VRST

Navadni gams (*Rupicapra rupicapra*) spada v red *Artiodactyla*, podred *Ruminantia*, družino *Bovidae*, poddružino *Caprinae* in rod *Rupicapra* (25). V Sloveniji gams naseljuje predvsem območja alpskega in predalpskega sveta. Populacije gamsa imajo na teh območjih največjo gostoto in sklenjeno poselitev. Nekatere manjše kolonije gamsa najdemo tudi v osrednjem, južnem in vzhodnem delu Slovenije. Prilagojeni so življenju v strmem, kamnitem in skalnatem habitatu nad gozdno mejo (26). Živijo na nadmorski višini od 800 do 2.300 metrov, vendar z občutnim nihanjem med letom (27). Poleti se gamsi ponavadi zadržujejo nad gozdno mejo, pozimi se spuščajo nižje. Številne populacije gamsa vztrajajo tudi vse leto na visokogorskih pašnikih. Poseljujejo pas ruševja, v gorskem svetu živijo tudi v gozdovih. Na populacijsko dinamiko in sezonske migracije gamsov pomembno vplivata iskanje in razpoložljivost hrane. Gibanja populacij gamsov temeljijo na izmenični rabi gozdov in odprtih habitatov (26, 28). Ocenjevanje gostot populacij gamsa je še posebej oteženo zaradi značilnosti gorskih habitatov, ki so težko dostopni. Kljub temu ocenjujejo, da je najštevilčnejša populacija gamsov prisotna v Triglavskem narodnem parku (29).

Srna (*Capreolus capreolus*) spada v red *Artiodactyla*, podred *Ruminantia*, družino *Cervidae*, poddružino *Odocoileinae* in rod *Capreolus* (30). Srne so razširjene skoraj po vsej Evropi, vključno z zahodno Rusijo (31), ter v nekaterih državah izven Evrope (32). V Sloveniji so srne splošno razširjene in pogoste od morsko-obalnega območja do zgornje gozdne meje. Ocena populacije srne v Sloveniji znaša približno 110.000 osebkov (33). Letni odstrel srn zadnjih 18 let znaša med 30 do 34 tisoč (34). Srna se najbolje počuti v gozdovih z gosto podrastjo in v grmiščih. Najbolj ji ustreza mozaičen preplet travnikov, pašnikov in njiv z majhnimi gozdički, kjer ni prehudih zim. Čeprav zimo dobro prenaša, lahko utrpi veliko škodo zaradi pomanjkanja hrane. V tem stoletju se je srna prilagodila tudi življenju na odprtih poljih, zaradi urbanizacije pa se vse bolj seli v notranjost gozdov (26). Srna se vse leto zadržuje na enem in istem območju, navadno tam, kjer se je skotila. Populacijska gostota je do ene živali na 4 ha (29).

Navadni jelen (*Cervus elaphus*) spada v red *Artiodactyla*, podred *Ruminantia*, družino *Cervidae*, poddružino *Cervinae* in rod *Cervus* (35). Distribucija navadnega jelena sega od Evrope preko severne Afrike in Bližnjega vzhoda (32, 36–38). V Sloveniji je njegova številčnost ocenjena na 11.000 do 14.000 osebkov (39). Habitat navadnega jelena so predvsem gozdovi, od nižin do zgornje gozdne meje. Najbolj mu ustrezajo stičišča gozdov in odprtih obdelovalnih površin. V Sloveniji največ populacij navadnega jelena živi v dinarskih jelovo-bukovih gozdovih in njihovih spremenjenih, zlasti zasmrečenih sestojih. V alpskem in gorskem svetu živijo v mešanih in smrekovih gozdovih, v nižinski vzhodni Sloveniji ter tudi v poplavnih gozdovih (40). Navadni jelen je čredna žival. Imajo letna in zimska stanišča. Košute s teleti se družijo med sabo, medtem ko samci pozimi sestavljajo svoje trope ali so samotarji (26, 29). Populacija navadnega jelena je razširjena na približno 60 % površine države. Glavna populacijska jedra z ocenjenimi lokalnimi gostotami znašajo več kot 20 osebkov/km² na Kočevskem, Notranjskem, v Karavankah in na Pohorju (40).

2.2 POKSVIRUSI IN BOLEZEN KUŽNI EKTIM

2.2.1 Klasifikacija poksvirusov

Viruse iz družine *Poxviridae* delimo na dve poddružini: *Chordopoxvirinae* (poksvirusi vretenčarjev) in *Entomopoxvirinae* (poksvirusi insektov). Trenutno poddružino *Chordopoxvirinae* sestavlja 18 rodov: *Avi*-, *Capri*-, *Centa*-, *Cervidi*-, *Crocodylid*-, *Lepori*-, *Macropo*-, *Mollusci*-, *Mustel*-, *Ortho*-, *Oryzo*-, *Yata*-, *Pteropo*-, *Salmon*-, *Sciuri*-, *Sui*-, *Vespertilion*- in *Parapoxvirus* (**Slika 1**) (13). Glede na sestavo genoma se predstavniki poddružine *Chordopoxvirinae* delijo na tiste z visoko (> 60 %) ali nizko (~ 30–40 %) vsebnostjo gvanina in citozina (41). Večina rodov iz poddružine *Chordopoxvirinae* ima nizko vsebnost gvanina in citozina, izjema so vrste rodu *Parapoxvirus* in *Molluscipoxvirus* (13). V rod *Parapoxvirus* so trenutno uvrščeni: virus govejega papularnega stomatitisa, virus Orf, poksvirus navadnega jelena, virus govejih psevdooseptic in poksvirus sivega tjulnja (42) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Podatkovni izpis o predstavnikih rodu *Parapoxvirus* o vrsti, izolatu, pristopni številki, razpoložljivi sekvenci in kratici virusa (13)

Table 1: Data display of genus *Parapoxvirus* members including species, isolate, accession number, available sequence, and virus abbreviation (13)

Poimenovanje virusa	Izolat	Pristopna številka	Razpoložljivo nukleotidno zaporedje	Kratika virusa
Goveji papularni stomatitis virus	Bovine popular stomatitis virus BV-AR02	AY386265	Celotni genom	BPSV
Virus Orf	Orf virus OV-SA00	AY386264	Celotni genom	ORFV
	Orf virus NZ2	DQ184476	Celotni genom	
Poksvirus navadnega jelena	Parapoxvirus red deer/HL953	KM502564	Celotni genom	DPV
Virus govejih psevdoošepnic	Pseudocowpox virus VR634	GQ329670	Celotni genom	PCPV
Poksvirus sivega tjulnja	Seal parapoxvirus AFK76s1	KY382358	Celotni genom	GSEPV

Večina parapoksvirusnih izolatov izvira od kopitarjev in domačih rejnih živali (13). Genomi poksvirusov imajo na obeh koncih dolga območja terminalnih invertiranih ponovitev (angl. *Inverted terminal repeats*, ITR) (43, 44). V osrednji regiji genoma se nahajajo osrednji geni (angl. *core genes*), ki imajo pomembno vlogo pri replikaciji, translaciji in transkripciji. Terminalna regija je bolj variabilna in vsebuje t. i. robne gene, ki so specifični za posamezen virus ali se nanašajo na virusni tropizem (13).

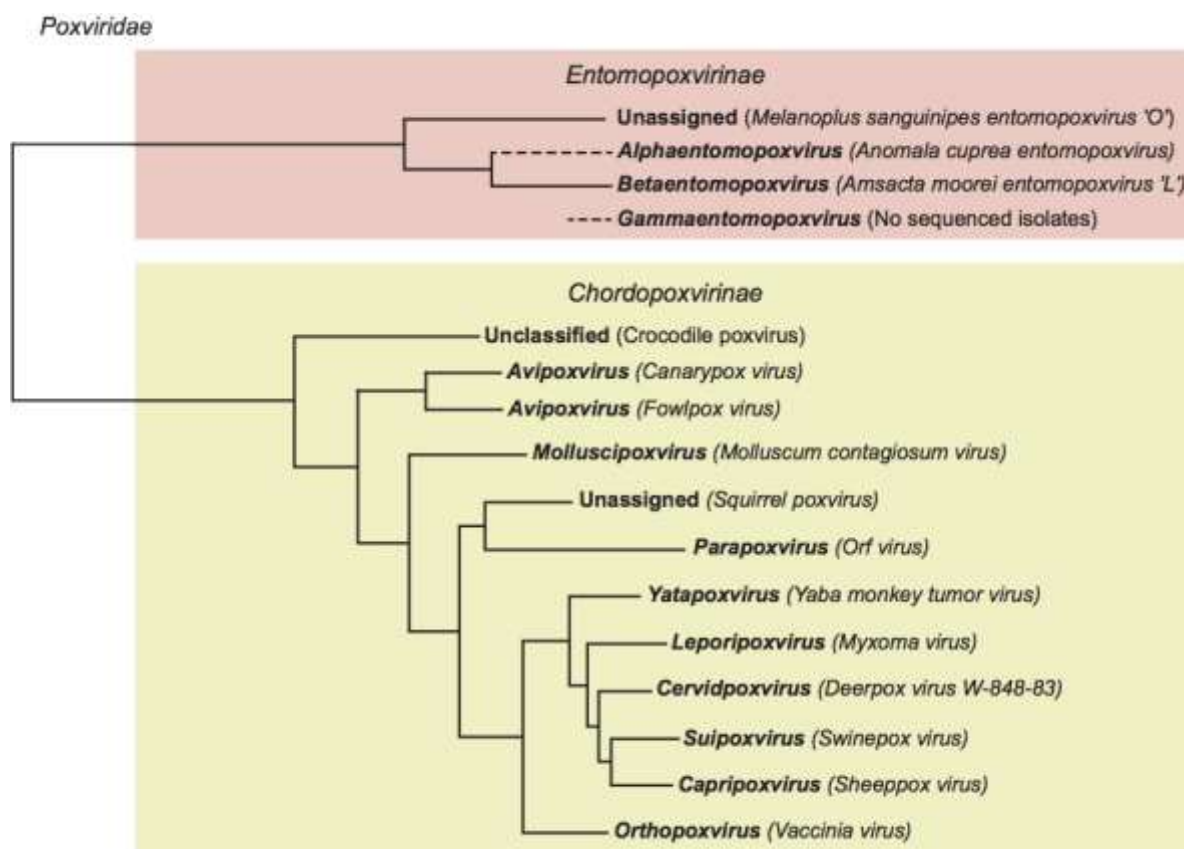
Osrednji geni so večinoma homologni in značilni za posamezne rodove. Za določanje in razlikovanje rodov ter ugotavljanje novih poksvirusov Mednarodni komite za taksonomijo virusov (angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) podaja nabor smernic:

- vrsta naravnega gostitelja – v nekaterih primerih je spekter gostiteljev zelo ozek, pri nekaterih zelo širok. Vendar na splošno velja, da je vrsta naravnega gostitelja odločujoč kriterij za klasifikacijo poksvirusov;

- filogenetska analiza – taksonomske skupine lahko v večini primerov razberemo po evolucijski zgodovini in sorodnosti skupin virusov;
- identičnost nukleotidnega zaporedja – izolati znotraj vrste imajo več kot 98-odstotno nukleotidno identičnost; stopnja identičnosti nukleotidnega zaporedja je pri večini poksvirusov običajno precej visoka, kar otežuje klasifikacijo zgolj na tem kriteriju;
- identičnosti aminokislinskega ali nukleotidnega zaporedja med specifičnimi, pogosto skupno deljenimi geni – zaporedni polimorfizmi v genih, kot sta hemaglutinin ali inkluzijski protein tipa A, kažejo na visoko stopnjo variacij, s pomočjo katere je mogoče poksviruse razlikovati;
- primerjava genetskega zapisa virusa – variabilnost genetskega zapisa in ohranjenosti genskih zaporedij med izolati poksvirusov je lahko prepoznavna značilnost;
- organizacija genoma – sintetična razmerja med geni lahko v nekaterih primerih služijo za taksonomsko razlikovanje;
- rastne značilnosti in obseg celičnih kultur različnih gostiteljev;
- značilnosti obolenj, ki jih poksvirusi povzročijo; obolevnost, smrtnost in druge značilnosti bolezni se lahko uporabijo za klasifikacijo povzročitelja;
- Serološka merila, vključno s serum nevtralizacijskim testom (SNT) in navzkrižno zaščito pri živalih (13, 45).

Pri parapoksvirusih se v terminalni regiji nahaja gen B2L, ki vsebuje 1.137 bp in kodira imunogeni protein, ki je velikosti približno 42 kDa. Med virusnimi izolati ORFV je gen B2L dobro ohranjen in ga uporabljamo za ugotavljanje, molekularno opredeljevanje in filogenetsko analizo ob različnih izbruhih bolezni kužnega ektima (46).

Mikrosatelitski markerji (angl. *Simple sequence repeats*, SSRs) ali mikrosateliti so kratka, ponovljiva nukleotidna zaporedja, ki so naključno razporejena po celotnem genomu evkariontov in prokariontov. Zaradi sprememb v številu kopij ponovljivih sekvenc, ki so posledica napak pri prepisovanju DNA, je dolžina mikrosatelitov zelo spremenljiva. Mikrosatelitski markerji predstavljajo potencialno orodje za lažjo in natančnejšo identifikacijo, analizo genetske raznolikosti in razumevanje evolucijskega statusa virusa Orf v prihodnosti (47).



Slika 1: Filogenetsko drevo predstavnikov družine *Poxviridae*. Prikaz filogenetskih razmerij temelji na poravnavi odčitkov aminokislinskega zaporedja 19 osrednjih poksvirusnih genov virusnih izolatov tipičnih predstavnikov posameznih rodov. Filogenetsko drevo ne vsebuje neklasificiranih virusov (13).

Figure 1: Phylogenetic relationships in the family *Poxviridae*. Phylogenetic relations are based upon aligned amino acid sequences from 19 conserved genes of virus isolates from representative species of each genus. The phylogenetic tree does not include unclassified viruses (13).

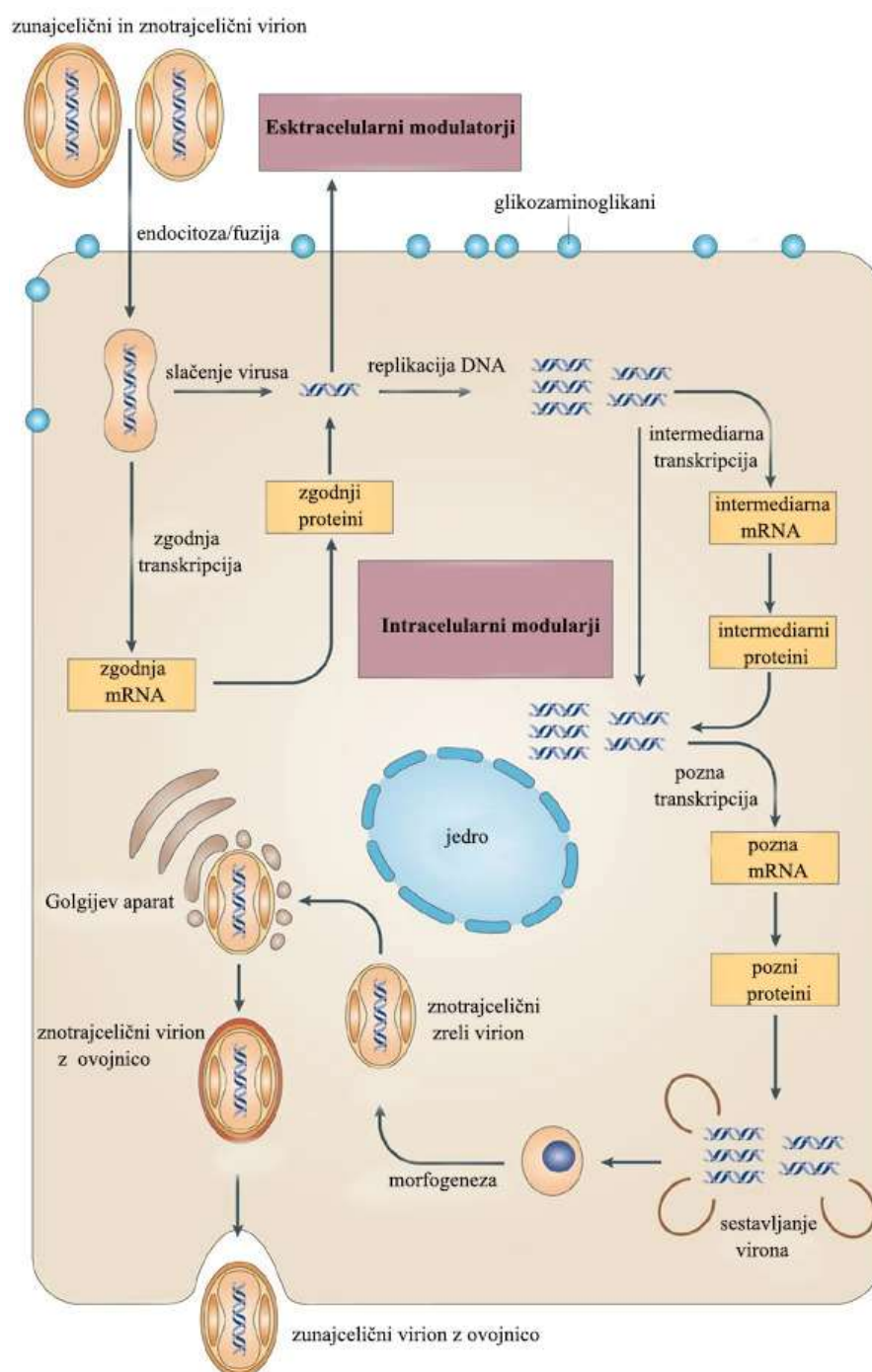
2.2.2 Zgradba in genom parapoksvirusov

Za vrste iz rodu *Parapoxvirus* je značilen virusni delec ovalne oblike, velikosti 220–300 x 140–170 nm, ki ima na površini filamente. Virusi imajo dvojno vijačnico DNA, dolžine 130–150 kbp; vsebnost gvanina in citozina znaša 64 % (13, 42, 48). Genomi poksvirusov imajo sposobnost kodiranja od 150 do 300 proteinov, od tega jih je 100 v samem virionu. Večina predstavnikov parapoksvirusov kaže obsežno navzkrižno hibridizacijo DNA (hibridizacija DNA, ki je z nukleotidno sekvenco manj kot 100 % komplementarna) in serološko navzkrižno reaktivnost. Navzkrižna hibridizacija in gensko mapiranje nakazujeta na obsežno divergenco med posameznimi predstavniki rodu. V nasprotju s preostalimi DNA virusi poksvirusi kodirajo vse encime, ki so potrebni za transkripcijo in replikacijo (10, 13, 42, 48).

2.2.3 Prenos in replikacija poksvirusov

Prenos poksvirusov med živalmi je lahko direkten ali indirekten skozi poškodovano kožo (12, 13, 42, 49). V naravnih razmerah virus običajno prodre skozi manjše poškodbe kože. V laboratorijskih razmerah pri sobni temperaturi preživi v suhih krastah tudi do 15 let. V krastah zunaj telesa lahko virus preživi nekaj mesecev (11, 12, 21, 50–52).

Do vstopa viriona v celice bazalne plasti epidermisa ali ustne sluznice pride s pomočjo endocitoze ali fuzije. Kateri receptorji sodelujejo pri vstopu viriona v celico, do sedaj ni znano (53). Domnevno naj bi imeli pomembno vlogo pri tem procesu različni kemokinski receptorji (42). Do prepisovanja virusne DNA pride zelo hitro po aktivaciji zgodnjih genov, ki nosijo zapise za encime, udeležene pri podvajanju DNA. Virusna polimeraza RNA omogoči zgodnjo transkripcijo genoma. Prepisovanje v mRNA poteka znotraj virusne sredice. Po vstopu virusa v celico nastanejo tudi beljakovine, ki omogočijo osvoboditev nukleinske kisline od nukleokapside. S podvajanjem DNA se začne tudi aktivacija preostalih genov. Sestavljanje virionov poteka v citoplazmi. Po vstopu virusa v Golgijev aparat se začne postopek zorenja in pridobivanja membrane virusa. V okuženih celicah nastaja veliko število nezrelih virionov, ki postanejo kužni šele potem, ko se sprostijo s celično lizo. Od zgodnjih endosomskih delcev pridobijo še drugo ovojnico. Delci nato potujejo s pomočjo mikrotubulov na celično membrano, kjer se zlijejo in tvorijo celici pridružene virione. Polimerizacija aktinskih filamentov omogoča neposredni prehod virionov v sosednje celice. V okolje se sprostijo z brstenjem, eksocitozo ali lizo celice (53) (**Slika 2**). Poksvirusno replikacijo DNA lahko zaznamo že dve uri po okužbi dovzetnega gostitelja. Posebnost okužb z virusi iz poddružine *Chordopoxvirinae* je njihova sposobnost kolonizacije in replikacije do visokih titrov v koži, kjer povzročijo patološke spremembe. To kaže tropizem poksvirusov do epidermalnih keratinocitov, kjer povzroči nastanek papul, pustul, vezikul in krast (12, 13, 42, 45, 48, 49).



Slika 2: Shematični prikaz replikacije poksvirusov (54)

Figure 2: Schematic representation of poxvirus replication (54)

2.2.4 Vpliv okolja na parapoksviruse

Virusi iz rodu *Parapoxvirus* so odporni na izsuševanje in ostanejo infektivni v krastah vsaj štiri mesece. V laboratorijskih pogojih virusi ohranijo svojo infektivnost tudi več let. Ultravijolično svetloba ali segrevanje pri 56 °C za 1 uro inaktivirajo viruse (48).

2.2.5 Geografska razširjenost in dovzetnost živalskih vrst na okužbe z virusi Orf in drugimi parapoksvirusi

Kužni ektim je bolezen, ki se pogosto pojavlja pri ovcah in kozah po vsem svetu. Bolezen se pogosteje pojavlja v državah, ki imajo dobro razvito ovčjerejo in kozjerejo (12, 55, 56). Širjenje okužb in vztrajna prisotnost povzročitelja v čredi povezujejo s kratkotrajno imunostjo na ponovno okužbo in rezistentno naravo virusnih delcev na dejavnike okolja. Z ORFV se primarno okužijo živali, ki so mlajše od enega leta starosti. Incidenca v čredi lahko znaša tudi do 90 %, vendar je umrljivost nizka. Okužba se v čredi hitro širi preko stika z okuženimi živalmi ali preko krast. Virus lahko dlje časa preživi tudi v kronično okuženih živalih (57). Bolezen so ugotovili v Evropi, na Bližnjem vzhodu, v ZDA, Afriki, Aziji, Južni Ameriki, Kanadi, na Novi Zelandiji in v Avstraliji (42, 49, 51, 56, 58). V Sloveniji sta o izbruhu kužnega ektima pri ovcah prva poročala Železnik in Gregorović leta 1979 (59). Iz kožne spremembe uplenjenega kozoroga je bil leta 1983 s pomočjo elektronskega mikroskopa izoliran in potrjen virus Orf (60). O izbruhu parapoksvirusnih okužb pri severnih jelenih (*Rangifer tarandus*) so poročali na Finskem in Norveškem (61, 62). Med letoma 1992 in 1993 je na Finskem zaradi okužbe s parapoksvirusi poginilo približno 400 živali in 2.800 jih je kazalo klinične znake bolezni. Od takrat dalje redno poročajo o sporadičnih primerih bolezni (62). Leta 2004 so poročali o parapoksvirusnih okužbah, ki so se pojavile pri severnih jelenih na Norveškem. Genomska analiza virusnih izolatov je pokazala, da je povzročitelj okužb najverjetneje virus Orf. Potencialni izvor okužbe naj bi bile črede ovc in koz, s katerimi so si delili pašnike, preko človeka in opreme (61, 63, 64). Kužni ektim so v Evropi ugotovili pri navadnem gamsu, pirenejskem gamsu, kozorogu ter moškatnem govedu (11, 12, 58). Horner in sodelavci poročajo o prvem primeru izbruha kužnega ektima na Novi Zelandiji pri gojenem navadnem jelenu (*Cervus elaphus*) (65). Eksperimentalno so okužili tudi druge vrste jelenjadi, ki so pokazale le blage simptome bolezni. Hujša oblika bolezni se razvije zlasti pri mlajših živalih, pri katerih je

obolevnost tudi do 100 %, vendar je umrljivost nizka, če ni prisotnih dodatnih bakterijskih in glivičnih okužb. Virus so ugotovili tako pri obolelih kot tudi pri klinično zdravih živalih (49).

2.2.6 Kužni ektim pri navadnem gamsu

Literature in podatkov o pojavnosti klinične slike in samem povzročitelju pri gamsu je izredno malo. Marco in sodelavci so v sklopu epidemiološke študije o borderski bolezni pri pirenejskem gamsu (*Rupicapra pyrenaica*) v Španiji ugotovili en primer kužnega ektima (1/158) (7). Scagliarini in sodelavci opisujejo prisotnost novozelandskega parapoksvirusa pri navadnem jelenu in prisotnost virusa ORF pri gamsu in kozorogu v parku Stevio v italijanskih Alpah (5). Veternik in Zadnik poročata o štirih primerih pojava kužnega ektima v Sloveniji leta 2011 pri navadnih gamsih (*Rupicapra rupicapra*), ki so bili zaradi vidnih telesnih sprememb uplenjeni v LPN Kozorog Kamnik. Vzorci so bili poslani na diagnostično preiskavo na Nacionalni veterinarski inštitut, ki je potrdil prisotnost virusa Orf. Avtorja menita, da se kužni ektim v Sloveniji pojavlja endemično pri ovcah in kozah ter da je najverjetnejši način okužbe gamsov preko stika z ovcami na paši (66). Valentinčič verjetno opisuje pojav kužnega ektima pri gamsih in kozorogih v Sloveniji kot posledico prenaseljenosti že v sedemdesetih in osemdesetih letih, kar pa so takrat uvrščali med papilomatozna obolenja zaradi nerazvite diagnostike (67). Leta 2014 Kitchen in sodelavci poročajo o primeru okužbe z virusom Orf pri lovcu na avstrijskem Tirolskem, ki je bil v stiku z uplenjenim okuženim gamsom. Posledično so izvedli serološko testiranje 16 vzorcev krvi uplenjenih gamsov ter ugotovili prisotnost protiteles proti virusu Orf pri 3 vzorcih. Do prenosa okužbe z virusom Orf naj bi med ovcami in gamsi na visokogorskih pašnikih prihajalo sporadično v poletnih mesecih (4). Leta 2014 Huemer in sodelavci nadaljujejo njihovo študijo ter ugotavljajo seroprevalenco virusa Orf v populacijah gamsov na območju avstrijsko-italijanske meje. Na avstrijski strani Alp so bili serološko pozitivni štirje od 17 primerov s severne Tirolske ter štirje od 42 primerov na italijanski strani iz province Bolzano. To je prva študija, v kateri so ugotavljali prisotnost protiteles proti virusu Orf pri prostoživečih živalih na območju Alp ter izpostavlja prostoživeče prežvekovalce, vključno z navadnimi gamsi, kot možen rezervoar za okužbe z virusom Orf pri domačih živalih (6).

2.2.7 Ukrepi in nadzor nad boleznijo pri gamsu

Izbruh bolezni lahko povzroči občutno zmanjšanje populacije živali ter spremembo v starostni strukturi populacije (49, 57, 68). Huje prizadete živali se odstreljajo, ker specifičnega zdravljenja ni. Umaknejo se solnice, ki lahko predstavljajo vir virusa. Ker so za izbruhe bolezni pri prostoživečih živalih lahko odgovorne tudi domače živali, se priporoča, da se jih pred izpustom na pašnik klinično pregleda (68). Nosilci virusa so tudi subklinično okužene živali, zaradi česar je ugotavljanje prisotnosti takih živali precej težavno (12, 58). O prevalenci bolezni, zlasti pri prostoživečih živalih, je tako pri nas kot v tujini znanega dokaj malo; veterinarji, lovci in kmetje bolezen prepoznajo, vendar zaradi nezadostne diagnostike ni mogoče ustvariti zanesljive epidemiološke slike bolezni (9, 12, 49).

2.2.8 Prenos bolezni

Prenos virusa Orf je lahko direkten (stik z okuženo živaljo) ali indirektno (npr. preko solnic) (11, 12, 50–52). O primerih kužnega ektima najpogosteje poročajo v paritveni sezoni, ko so živali v tesnejšem stiku, pozimi, ko se živali hranijo na krmiščih, ter v času lovne dobe, ko lovci podrobneje spremljajo zdravstveno stanje živali (52). Ob slabših prehranskih možnostih ali padcu odpornosti, ki jo izzove stres, lahko subklinična oblika bolezni preide v klinično obliko (48, 49, 58).

2.2.9 Inkubacijska doba in klinična slika kužnega ektima

Pri živalih inkubacijska doba traja približno dva do tri dni. Značilne spremembe, ki se pojavijo pri kužnem ektimu, so papule, pustule, vezikule in kraste na področju ustne votline, nosu, ušes in v okolici oči (48, 49, 52, 55). Ugotovitve pri histopatološki preiskavi sprememb kože lahko zajemajo pustularni dermatitis s proliferacijo kožnih celic, hiperkeratozo, degeneracijo keratinocitov, v katerih se nahajajo eozinofilne inkluzije, vezikule, pustule, majhne abscese in razjede v zgornjih plasteh kože, ki so prekrivane s krastami (9, 12, 42). Spremembe se lahko pojavijo tudi v sami ustni votlini (trdo nebo, jezik, dlesen), na okončinah (spodnji deli nog, svitek), vimenu, koži spolnih organov in požiralniku. Občasno so spremembe ugotovljene tudi v vampu, kapici, pljučih, srcu in spodnjem delu prebavil (68, 69). Pri težjem poteku bolezni se

lahko razvijejo cvetačaste bradavice, ki sčasoma tudi ulcerirajo. Na nastalih razjedah so pogosto prisotne tudi ličinke muh. Spremembe, ki nastanejo na področju ustne votline in ustne sluznice, so zelo boleče, zaradi česar žival zavrača hrano in posledično hujša. Pri obsežnejših proliferativnih spremembah na okončinah se pojavi začasno šepanje. Zaradi bolečih sprememb na vimenu lahko samica odžene mladiče. Pri enostavnem poteku bolezni žival ozdravi v enem do štirih tednih. Pri živalih, ki so bolezen prebolele, imunost traja do devet mesecev, po tem času je možna ponovna okužba. Ob ponovni okužbi je potek bolezni krajši in blag, kožne spremembe so manjše in maloštevilne (10, 12, 49, 52).

2.2.10 Imunski odziv na okužbe z virusom Orf

Pri okužbi z virusom Orf naj bi imel pomembno vlogo celični imunski odziv, medtem ko je vloga protiteles še dokaj nejasna. Razumevanje mehanizmov delovanja imunosti pri ORFV je zapleteno, ker je imunost kratkotrajna tako pri naravnih kot tudi pri eksperimentalnih okužbah. ORFV so sposobni ponovne okužbe gostitelja, pri čemer so lezije takrat manjše in izginejo hitreje, vendar je vloga humoralne imunosti pri tem še vedno nepojasnjena. Nekateri avtorji menijo, da protitelesa nimajo pomembnejše vloge pri imunski zaščiti ali okrevanju. Zgodnje študije iz leta 1923 so pokazale, da serum imuniziranih živalih ni deloval zaščitno (57). Prav tako so kasneje dokazali, da kolostrum imuniziranih živali ne ščiti mladičev (70–72). Drugi avtorji pravijo, da ni nobene povezave med titrom protiteles in resnostjo razvoja lezij. V eksperimentalni študiji so dokazali, da serološko pozitivna jagnjeta niso bila zaščitena pred ponovno okužbo (73). Spet drugi avtorji poudarjajo pomembnost protiteles. Lloyd pojasnjuje, da jagnjeta niso bila zaščitena pred okužbo v študiji, ki sta jo izvedla Buddle in Pulford, ker kolostrum ni vseboval IgG2, ampak le IgG1 (70, 74).

Vnetni in imunski odziv pri okužbah z ORFV so preučevali tudi s histološkimi pregledi tkivnih rezin in z ugotavljanjem vrste celic, ki so infiltrirale lezije (75–78). Ugotovili so, da je do kopičenja nevtrofilnih granulocitov prišlo v prvih 24 urah po okužbi ter nato še četrti dan po okužbi, kar je sovpadalo s pojavom virusnega antigena v epidermisu (75, 76). S pojavom virusnega antigena v epidermisu je prišlo tudi do kopičenja mastocitov. V odmirajočem dermisu in vnetih dlačnih foliklih je prišlo do akumulacije dendritičnih celic, ki so izražale veliko število molekul MHC razreda II. Dendritične celice naj bi oblikovale zaščitno bariero in bi lahko

sodelovale pri imunskem odzivu ali celjenju rane. V imunskem odzivu na okužbo niso dokazali Langerhansovih celic (78). Prav tako so bili prisotni različni tipi limfocitov T, vključno celice T pomagalk CD4⁺ in citotoksične celice T CD8⁺. Anderson in sodelavci so dokazali, da do največje akumulacije dendritičnih celic in celic T pomagalk CD4⁺ pride v prvih osmih dneh po okužbi. Koncentracija celic T pomagalk CD4⁺ je največja v papilarni plasti dermisa. Celice T CD8⁺ so opazili po celotnem dermisu in tudi v epidermisu blizu vdora virusa v kožo. Raziskave o vlogi citotoksičnih celic T CD8⁺ pri okužbah z virusom Orf kažejo, da celice sicer migrirajo na mesto okužbe, vendar so ujete pod ORFV lezijami ter nimajo dostopa do celic, ki so okužene z virusom. Kljub prisotnosti citotoksičnih celic T CD8⁺ se je virus lahko repliciral več dni. Limfociti B so bili omejeni na retikularno plast dermisa (79).

Dinamiko lokalnega imunskega odziva na okužbo z ORFV so ugotavljali s preučevanjem celic in topnih mediatorjev pri drenaži aferentne (dovodne) in eferentne (odvodne) limfe z mesta okužbe (80, 81). Pridobljena imunost na antigen, ki vstopi skozi kožo, se začne v perifernih bezgavkah. Preko aferentnih mezigovnic antigen predstavitvene celice (dendritične celice) prenesejo antigen do bezgavk. Periferne bezgavke proizvedejo protitelo in citotoksične celice T, ki potujejo po eferentnih mezigovnicah in migrirajo do mesta okužbe. Hkrati limfociti T migrirajo iz krvi do mesta okužbe ter se aktivirajo. Študije, opravljene na ovcah, so pokazale, da je lokalni imunski odziv na okužbo z ORFV pri ponovno okuženih živalih predstavljal dvofazni odziv limfatičnih celic (celice T pomagalk CD4⁺ in citotoksične celice T CD8⁺, limfociti B in dendritične celice) (81). Rezultati študije kažejo, da je bila največja koncentracija limfocitov T CD4⁺ pri ponovno okuženih ovcah v aferentni limfi in je dosegla vrhunec 4. in 12. dan po okužbi (82). Do podobnih spoznanj so prišli tudi pri spremljanju produkcije granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajočega faktorja, interleukina 1 (IL-1), IL-8, IL-2 in interferona gama (IFN- γ) v limfatičnih celicah iz aferentne limfe, pridobljene ob različnih časovnih intervalih po okužbi. Raziskava je prav tako pokazala, da se pri ponovno okuženih živalih razvije močnejši imunski spomin ob izpostavitvi inaktiviranemu ORFV, kar je oblika zakasnele oblike hipersenzitivnosti (70). Z analizo citokinov v ORFV okuženem tkivu so ugotovili, da gre predvsem za Th1 – citotoksični imunski odziv. Celice, ki so izločale dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- α), so bile epidermalne celice, celice vaskularnega endotelija in nekarakteristične celice z morfologijo limfocitov. Ob ponovni okužbi živali se je število teh celic hitreje povečalo. Celice z ekspresijo mRNA za IFN- γ so bile zaznane šele ob ponovni

okužbi živali. Študije opravljenih raziskav na ovcah kažejo, da živali proizvedejo normalen protivirusni imunski in vnetni odgovor na ORFV, čeprav se lahko ponovno okužijo. Ob ponovni okužbi živali je imunski spomin hitrejši (79).

2.2.11 Patomorfološke in histopatološke značilnosti sprememb, značilnih za kužni ektim

Patologija parapoksvirusnih okužb pri sesalcih je načeloma omejena na epitelij in ustno sluznico. Do vdora virusa običajno pride skozi poškodovano kožo, kjer se pojavijo tudi spremembe v obliki pustul in krast (65, 83). Dokazov o sistemskem širjenju parapoksvirusov je zelo malo (84). Pri ljudeh opisujejo, da so okužbe s poksvirusi lahko omejene ali sistemske. Potek okužbe je odvisen od vrste gostitelja, tipa virusa in načina vstopa virusa v telo. Ko virus vstopi v telo, pride do replikacije v regionalnih bezgavkah, od koder se v obliki primarne viremije razširi v makrofagni sistem po vsem telesu. Replikacija v makrofagnem sistemu vodi do sekundarne viremije ter pojava kliničnih znakov bolezni (53).

Stopnje razvoja lezij pri parapoksvirusu potekajo v šestih stopnjah: makule, papule, vezikule, pustule, kraste in ozdravitev. Okužba se začne kot rdečina in oteklina na mestu, kjer je prišlo do inokulacije virusa in pojavom majhnih vezikul v 24 urah. Med razvojem bolezni se lezije zaradi obsežne infiltracije nevtrofilnih granulocitov preoblikujejo v pustule. Kasneje se lahko posamezne manjše lezije združijo v večje ter tvorijo kraste. Pod krastami dermis postane edematozen in proliferativen, kar daje lezijam granulomatozen videz. Pokanje in odstop krast lahko privedeta do pojava krvavega izcedka. Do ozdravitve običajno pride v štirih do šestih tednih (85).

Pri okužbah z ORFV pri ovcah in kozah lezije najpogosteje nastanejo okoli smrčka in ustne votline (48, 84). ORFV lezije so običajno benigne, lahko pa do zapletov privedejo sekundarne okužbe z bakterijami ali glivami. Pri parapoksvirusnih okužbah navadnega jelena se spremembe običajno pojavijo na smrčku in obrazu, poročajo pa tudi o lezijah na rogovju, prekitem z mahom. Okužbe s parapoksvirusi imajo lahko pri teletih navadnega jelena bistveno težji potek. Lezije se lahko pojavijo tudi drugje po telesu in prekrijejo tudi med 60 in 90 % telesne površine teleta (65). Na Finskem so pri severnem jelenu zabeležili erozije, papule, pustule in ulkuse tudi v sami ustni votlini (62, 63).

Benigne lezije se običajno najprej pojavijo v okolici ustne votline in gobca ter se razširijo na ustno sluznico, jezik, očesni vek, okončine (svitek), vime pri samicah in koži spolnih organov. Razvoj poksvirusnih lezij je naslednji: (i) makule, (ii) papule, (iii) vezikule, (iv) pustule, (v) kraste in (vi) brazgotine. Faza trajanja vezikul je relativno kratka pri kužnemu ektimu, klinično prevladujejo razjede s krastami. Možne so lahko tudi sekundarne infekcije razjed z bakterijami vrste *Cochliomyia hominivorax*, *Fusobacterium necrophorum* in *Dermatophilus congolensis*. Redko se lezije razširijo tudi na prebavni in dihalni trakt, kjer povzročijo gastroenteritis in bronhopnevmonijo (69).

Histopatološko lahko opazimo epidermalno hiperplazijo, pri kateri epidermis v globino pošilja podaljške, ki se med seboj povezujejo in oblikujejo mrežasto strukturo. Prisotni so lahko tudi intraepidermalni mikroabscesi. V *stratum spinosum* epidermisa so keratinociti otekli (hidropična sprememba, balonska degeneracija) in vakuolizirani (multilokulirane intraepidermalne vezikule, retikularna degeneracija). Debele kraste tvorijo ortokeratotična in parakeratotična hiperkeratoza, beljakovinska tekočina, degenerirani nevtrofilci in bakterije. Novo proliferirajoči keratinociti v zunanjem delu *stratum spinosumu* epidermisa predstavljajo tarčno skupino celic za okužbo s parapoksvirusom. Bazofilna citoplazma v oteklih keratinocitih sovpada s proliferacijo poliribosomov in replikacijo virusa. Bazofilna intracitoplazmatska inkluzijska telesa lahko vidimo 36 ur po okužbi. Po 72 urah lahko že opazimo keratinocite z eozinofilnimi intracitoplazemskimi vključki, s piknotičnim jedrom, z izrazitimi hidropskimi spremembami (balonska degeneracija) in velike multilokulirane intraepidermalne vezikule (retikularna degeneracija). Približno 55 ur po okužbi lahko v *stratum basale* epidermisa opazimo številne mitoze. Tretji dan po okužbi je epitel 3–4-krat debelejši. Pogosto lahko opazimo tudi psevdokarcinomatozno hiperplazijo. V dermisu opazimo površinski edem, vaskularno proliferacijo in dilatacijo ter perivaskularni mononuklearni infiltrat (69).

2.2.12 Diagnostika kužnega ektima

Bolezen najpogosteje diagnosticiramo na podlagi izražene klinične slike pri prizadeti živali s karakterističnimi lezijami, patoanatomske preiskave in z določanjem povzročitelja. Dokazovanje virusnih delcev povzročitelja z elektronskim mikroskopom je nadomestila metoda verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), s katero ugotavljamo

prisotnost virusne DNA (86, 87). Za hitro detekcijo ORFV Tsai in sodelavci opisujejo tudi uporabo metode zankasto izotermično pomnoževanje (angl. *loop mediated isothermal amplification*, LAMP assay) na podlagi oligonukleotidnih začetnikov (88). Yirrel in sodelavci opisujejo uporabo serumskih antigenih testov za oceno celične imunosti okuženih živali, vendar so ugotovili, da med prisotnostjo protiteles ni močne korelacije, na podlagi katere bi bilo mogoče oceniti imunski status živali (89). Prav tako nekateri avtorji opisujejo tudi uporabo SNT kot metodo za ugotavljanje razširjenosti okužb s kužnim ektimom pri živalih (12, 48, 90). Nekateri avtorji opisujejo tudi uporabo encimskoimunskega testa (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) in agar gel imunodifuzijskega testa (angl. *agar gel immunodiffusion test*, AGID) za ugotavljanje protiteles proti parapoksvirusom pri prostoživečih živalih (91–93).

2.2.13 Kužni ektim kot zoonoza

Kužni ektim uvrščamo med zoonoze; zdravstvene težave povzroči zlasti pri imunsko oslabeledih osebah s poškodbami na koži (49, 55). Ogrožene skupine ljudi so predvsem kmetje, veterinarji, lovci, mesarji in osebe, ki delajo z obolelimi živalmi in okuženim materialom (4, 49, 52). Kužni ektim ima velik zoonotski potencial, zato sta zelo pomembni ustrezna zaščita in higiena rok (4, 9, 10, 94, 95). V Sloveniji ni uradnih podatkov o okužbah s poksvirusi in parapoksvirusi. Po podatkih Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani je vsako leto potrjenih nekaj primerov okužb s poksvirusi predvsem pri rejcih živali (53).

2.3 PAPILOMAVIRUSI IN FIBROPAPILOMATOZA

2.3.1 Klasifikacija papilomavirusov

Papilomavirusi predstavljajo veliko skupino virusov, ki jih uvrščamo v družino *Papillomaviridae*. Nadalje jih delimo v dve poddružini: *Firstpapillomavirinae* in *Secondpapillomavirinae*. Med *Firstpapillomavirinae* trenutno uvrščamo 52 rodov, medtem ko med *Secondpapillomavirinae* uvrščamo le en rod (19, 22, 96). Posamezni rodovi papilomavirusov in predstavniki znotraj rodu imajo pogosto enake sorodne gostitelje, biološke lastnosti in povzročajo podobna obolenja (96, 97).

Znotraj posameznega rodu se papilomavirusi delijo na posamezne vrste. Trenutno je poznanih več kot 133 vrst posameznih papilomavirusov znotraj 52 rodov. Od papilomavirusov znotraj različnih vrst lahko pričakujemo, da bodo imeli enake ali sorodne gostitelje in podobne biološke lastnosti (96, 97).

Znotraj posamezne vrste se papilomavirusi delijo na posamezne genotipe, ki jih označujemo z znanstvenim imenom gostitelja. Trenutno je klasificiranih približno 500 posameznih genotipov papilomavirusov, vključno s 175 genotipi pri živalskih vrstah. Papilomavirusi so bili odkriti pri praktično vsaki preiskovani živalski vrsti (96, 97).

Tradicionalna klasifikacija papilomavirusov temelji na podlagi skladnosti ali razlikovanja celotnih nukleotidnih zaporedij gena L1 in topologije filogenetskih dreves. Virusi različnih poddružin imajo manj kot 45 % podobnost v nukleotidnem zaporedju gena L1 in virusi različnih rodov manj kot 70 % podobnosti. Viruse, ki imajo manj kot 70-odstotno podobnost, uvrščamo v različne vrste, ter viruse, ki imajo manj kot 90-odstotne podobnosti, v različne genotipe (23). Kljub navidezno preprosti klasifikacijski shemi papilomavirusov se v praksi pogosto izkaže, da se posamezni virusi prekrivajo med različnimi rodovi in vrstami, kar dodatno otežuje klasifikacijo. V izogib tej težavi se papilomavirusi naprej razvrščajo še glede na vrsto gostitelja in vrsto lezij, ki jih povzročajo pri tem gostitelju. Ker okužba papilomavirusov poteka skozi sluznico ali kožni epitel, v humani medicini človeške papilomaviruse (angl. *human papillomaviruses*, HPV) delijo na sluznični ali kožni genotip. Kljub temu da papilomavirusi izkazujejo podoben ali celo enak tropizem do kože in sluznice tudi pri živalih, ta vrsta klasifikacije v veterinarski medicini še ni v uporabi (19, 96). V humani medicini papilomaviruse klasificirajo tudi na podlagi verjetnosti, ali bo povzročil rakavo obolenje ali ne – klasifikacija FIGO (fra. *Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique*, FIGO) (98).

Trenutna klasifikacija vseh papilomavirusov temelji na primerjavi celotnih nukleotidnih zaporedij gena L1.

Za potrebe doktorske naloge se bomo omejili le na rodova *Deltapapilomavirus* in *Epsilonpapillomavirus*.

2.3.1.1 Klasifikacija in filogenetska analiza predstavnikov rodu *Deltapapillomavirus*

Za predstavnike rodu *Deltapapillomavirus* je značilno, da pri gostiteljih, ki spadajo v red sodoprstih kopitarjev (*Artiodactyla*), povzročajo fibropapilomatozo. Možen je tudi prenos med posameznimi vrstami gostiteljev, kjer povzroča nastanek novotvorb na koži, sarkoidov. Protein E5, ki se nahaja med poznim in zgodnjim področjem, izraža transformirajoče lastnosti (96).

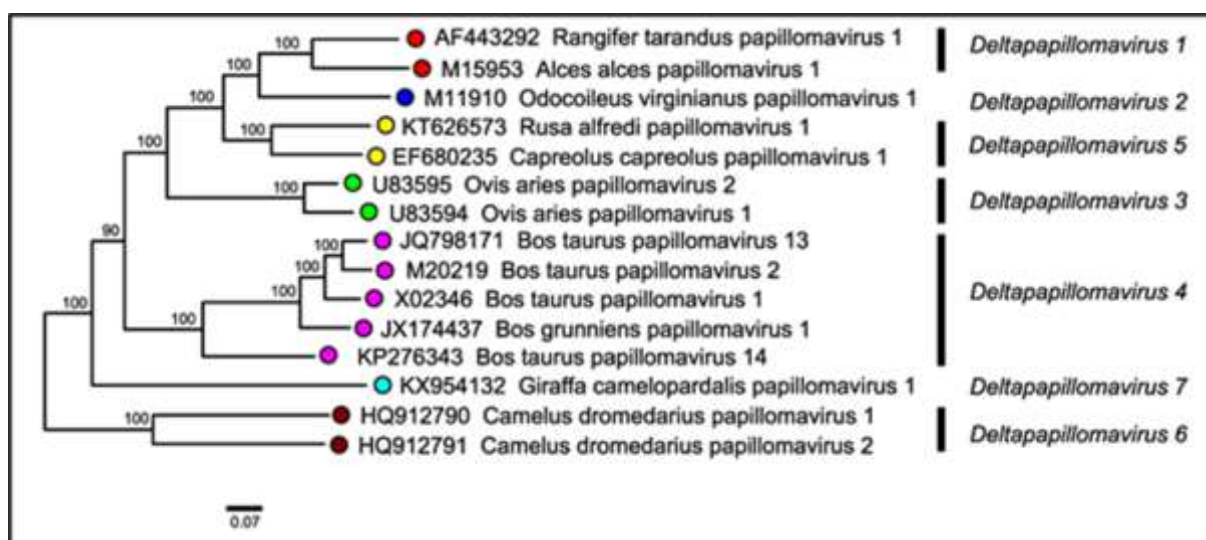
Danes v rod *Deltapapillomavirus* uvrščamo sedem vrst virusov, in sicer *Deltapapillomavirus 1* (papilomavirus evropskega losa (*Alces alces*) – AaPV1 in papilomavirus severnega jelena (*Rangifer tarandus*) – RtPV1), *Deltapapillomavirus 2* (»deer papilomavirus« (DPV), izoliran pri belorepem jelenu (*Odocoileus virginianus*) in mulastem jelenu (*Odocoileus hemionus*)), *Deltapapillomavirus 3* (papilomavirus ovc – OPV1 in OPV2), *Deltapapillomavirus 4* (papilomavirus goveda – BPV1 in BPV2), *Deltapapillomavirus 5* (papilomavirus srne (*Capreolus capreolus*) – CcPV1, papilomavirus enogrbe kamele (*Camelus dromedarius*) – CdPV1 in CdPV2 in papilomavirus navadnega jelena (*Cervus elaphus*) – CePV1. OvPV1 in AaPV1 občasno povzročata pljučno fibromatozo. Papilomavirus, ki bolezen povzroča pri navadnem jelenu, je zelo soroden virusu pri srni (96, 99).

Predstavniki rodu in njihova filogenetska analiza so povzeti v **Tabeli 2** in **Sliki 3**.

Tabela 2: Podatkovni izpis o predstavnikih rodu *Deltapapillomavirus* o vrsti, poimenovanju virusa, izolatu, pristopni številki, številki referenčne sekvence in kratici virusa (96)

Table 2: Data display of genus *Deltapapillomavirus* members including species, virus name, isolate, accession number, reference sequence number, available sequence, and virus abbreviation (96)

Vrsta	Poimenovanj e virusa	Izolat	Pristopna številka	Številka referenčne sekvence	Razpoložljivo nukleotidno zaporedje	Kratica virusa
<i>Deltapapillomavirus 1</i>	<i>Alces alces</i> <i>papillomavirus 1</i>		M15953	NC_001524	Celotni genom	AaPV1
<i>Deltapapillomavirus 1</i>	<i>Rangifer tarandus</i> <i>papillomavirus 1</i>		AF443292		Celotni genom	RtPV1
<i>Deltapapillomavirus 2</i>	<i>Odocoileus</i> <i>virginianus</i> <i>papillomavirus 1</i>		M11910	NC_001523	Celotni genom	OvPV1
<i>Deltapapillomavirus 3</i>	<i>Ovis aries</i> <i>papillomavirus 1</i>		U83594	NC_001789	Celotni genom	OaPV1
<i>Deltapapillomavirus 3</i>	<i>Ovis aries</i> <i>papillomavirus 2</i>		U83595		Celotni genom	OaPV2
<i>Deltapapillomavirus 4</i>	<i>Bos taurus</i> <i>papillomavirus 1</i>		X02346	NC_001522	Celotni genom	BPV1
<i>Deltapapillomavirus 4</i>	<i>Bos taurus</i> <i>papillomavirus 13</i>		JQ798171		Celotni genom	BPV13
<i>Deltapapillomavirus 4</i>	<i>Bos grunniens</i> <i>papillomavirus 1</i>	QH-1	JX174437		Celotni genom	BgPV1
<i>Deltapapillomavirus 4</i>	<i>Bos taurus</i> <i>papillomavirus 14</i>	CGKnose 1	KP276343		Celotni genom	BPV14
<i>Deltapapillomavirus 4</i>	<i>Bos taurus</i> <i>papillomavirus 2</i>		M20219		Celotni genom	BPV2
<i>Deltapapillomavirus 5</i>	<i>Capreolus</i> <i>capreolus</i> <i>papillomavirus 1</i>		EF680235	NC_011051	Celotni genom	CcaPV1
<i>Deltapapillomavirus 5</i>	<i>Rusa alfredi</i> <i>papillomavirus 1</i>	DE1641-14	KT626573		Celotni genom	RalPV1
<i>Deltapapillomavirus 6</i>	<i>Camelus</i> <i>dromedarius</i> <i>papillomavirus 1</i>		HQ912790	NC_015267	Celotni genom	CdPV1
<i>Deltapapillomavirus 6</i>	<i>Camelus</i> <i>dromedarius</i> <i>papillomavirus 2</i>		HQ912791		Celotni genom	CdPCV2
<i>Deltapapillomavirus 7</i>	<i>Giraffa</i> <i>camelopardalis</i> <i>papillomavirus 1</i>	GC2011	KX954132	NC_039036	Celotni genom	GcPV1



Slika 3: Filogenetsko drevo predstavnikov rodu *Deltapapillomavirus*. Nukleotidna zaporedja E1, E2, L2 in L1 343 izolatov papiloma virusa, vključno s predstavniki vseh vrst in rodov iz družine *Papillomaviridae*, so bila poravnana kot aminokislinska zaporedja z uporabo program MUSCLE v7.221 (100). JModeltest2 (101) je bil uporabljen za določitev optimalnega evolucijskega modela (GTR + I + G) za združena nukleotidna zaporedja. Za določitev največje verjetnosti evolucijske poti (angl. *maximum likelihood*, ML) je bil ustvarjen z uporabo RAXML MPI v8.2.9 (102), ki je uporabil model substitucije GTR. Po izdelavi filogenetskega drevesa je bilo izolirano poddrevo, ki ustreza rodu *Deltapapillomavirus*. Konice vej so označene z imeni virusov in s pristopno številko; vozlišča so označena z vrednostjo metode vezanja (96).

Figure 3: Phylogenetic tree of members of the genus *Deltapapillomavirus*. The E1, E2, L2, and L1 nucleotide sequences of 343 papillomavirus isolates including representatives of all species and genera within the *Papillomaviridae* family were aligned as amino acid sequences using MUSCLE v7.221 (100). JModeltest2 (101) was used to determine the optimal model of evolution (GTR + I + G) for the concatenated nucleotide sequences. Maximum likelihood (ML) trees were constructed using RAXML MPI v8.2.9 (102) implementing the GTR substitution model. ML bootstrap analysis used the autoMRE-based stopping criterion in RAXML MPI v8.2.9. Following tree construction, the subtree corresponding to the genus *Deltapapillomavirus* was isolated. Tips are labelled with virus names and accession numbers; nodes are labelled with bootstrap support values (96).

2.3.1.2 Klasifikacija in filogenetska analiza predstavnikov rodu *Epsilonpapillomavirus*

Za predstavnike rodu *Epsilonpapillomavirus* so značilne okužbe, povezane z nastankom kožnih papilomov pri kopitarjih (96). Predstavniki rodu so povzeti v **Tabeli 3**.

Tabela 3: Podatkovni izpis o predstavnikih rodu *Epsilonpapillomavirus* o vrsti, poimenovanju virusa, izolatu, pristopni številki, številki referenčne sekvence in kratici virusa (96)

Table 3: Data display of genus *Epsilonpapillomavirus* members including species, virus name, isolate, accession number, reference sequence number, available sequence, and virus abbreviation (96)

Vrsta	Poimenovanje virusa	Izolat	Pristopna številka	Številka referenčne sekvence	Razpoložljivo nukleotidno zaporedje	Kratika virusa
<i>Epsilonpapillomavirus 1</i>	<i>Bos taurus papillomavirus 5</i>		AF457465	NC_004195	Celotni genom	BPV5
<i>Epsilonpapillomavirus 1</i>	<i>Bos taurus papillomavirus 8</i>	BAPV1	DQ098913		Celotni genom	BPV8
<i>Epsilonpapillomavirus 2</i>	<i>Cervus elaphus papillomavirus 1</i>	BernieDPV	KU350625	NC_030151	Celotni genom	CePV1

2.3.2 Zgradba, genom in replikacija papilomavirusov

Papilomavirusi so velika skupina virusov z obsežno genetsko raznolikostjo. Do danes so opisali 112 živalskih PV genomov, vključno z genomi virusov, ki so bili izolirani pri cervidnih vrstah in ki jih uvrščamo v rod *Deltapapillomavirus* (17). Prvo in edino karakterizacijo CcPV-1 so opravili Erdélyi in sodelavci, ki so prvi pokazali povezavo povzročitelja z nastankom fibropapilomatoze pri srni (103). Scagliarini in sodelavci so bili prvi, ki so objavili celotni genom PV (CePV-1) pri navadnem jelenu, pri katerem so bili izraženi klinični znaki (22).

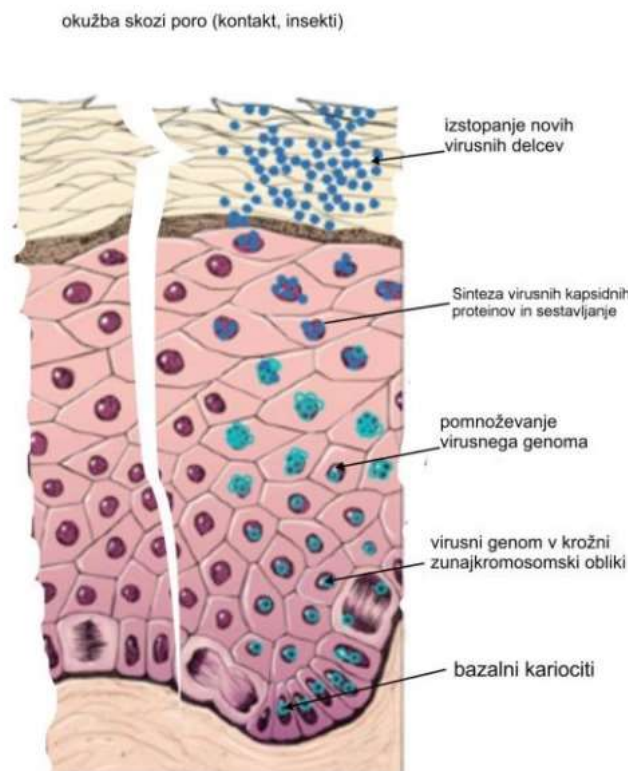
PV so okrogli DNA virusi brez ovojnice, premera 45–55 nm. Virusna kapsida je zgrajena iz 360 kopij proteina L1, ki so razporejene v 72 pentamer, in približno 12 kopij proteina L2. Vsaka kapsida vsebuje eno kopijo virusne DNA. Uvrščamo jih v skupino virusov z dvojnovijačnim DNA s krožnim genomom (6.800–8.400 bp), ki kodirajo dva strukturna proteina in osem nestrukturnih, velikosti od 7 do 73 kDa (3, 19, 22, 23, 96, 97, 104–109).

Dolžina genomov posameznih papilomavirusov se prav tako razlikuje in znaša od 5.748 do 8.607 bp. Odvisno od posameznega tipa papilomavirusa genom kodira 6–9 proteinov. DNA PV se deli na: (i) zgodnje področje E (angl. *early*); (ii) pozno področje L (angl. *late*) in (iii) nekodirajoče regulatorno področje LCR (angl. *long control region*). Zgodnje in pozno področje sestavlja do 10 odprtih bralnih okvirjev (angl. *open reading frame*, ORF) oziroma genov. Proteini E so nestrukturni proteini, ki imajo pomembno regulatorno in replikacijsko vlogo.

Protein E1 je virusna DNA helikaza in odgovorna za odvijanje dvovijačne DNA. Glavna naloga proteina E2 je nadzor nad replikacijskim ciklom virusa. Replikacija papilomavirusov je zelo podobno koordinirana z replikacijo in diferenciacijo epitelnih celic. Pomembno vlogo imajo tudi proteini E5, E6 in E7, ki spremenijo regulacijo epitelnih celic in povečajo replikacijski potencial papilomavirusov. Ker omenjeni proteini povzročijo celično diferenciacijo in lahko posledično zaradi tega pride do neoplastične transformacije celic, jih pogosto imenujemo tudi »virusni onkoproteini«. Pri veliki večini papilomavirusov protein E7 najpomembneje vpliva na regulacijo celic epitela. Domnevno E4 predstavlja pozne strukturne proteine in se veže na specifične strukture citoskeleta. Nekodirajoče področje LCR se nahaja med genoma L1 in E6 (96).

Do vdora papilomavirusov v organizem pride skozi poškodovano kožo ali sluznico. Virus se razmnožuje predvsem v jedru epitelnih celic kože in sluznice (110, 111). Za virus BPV so dovzetne predvsem bazalne celice večvrstnega ploščatega epitela (111). Ključno vlogo pri vezavi virusa na gostiteljsko celico naj bi imeli heparan-sulfatni protoglikani (HSPG) na bazalni membrani in površini epitelnih celic (110, 111). Na začetni stopnji okužbe se virus veže na celične receptorje ter s pomočjo endocitoze vstopi v celico. V lizosomu virus potuje do jedra celice, kjer se nato virusna kapsida odpre ter strukturni proteini L2 prenesejo virusno DNA v jedra bazalnih celic. Virusni genom se podvaja v bazalnih celicah. Do slačenja virusa pride v citoplazmi celice, nato sledi vstop virusne DNA v jedro celice. Najprej pride do transkripcije na eni verigi DNA, kjer se prepisejo zgodnji geni v mRNA. Po translaciji nastanejo zgodnji proteini. V bazalnih celicah kože poteka razmnoževanje virusne nukleinske kisline, tvorba kapsidnih proteinov pa poteka v diferenciranih keratocitih. Virusno pomnoževanje je odvisno od diferenciacije celic kože. Prepisovanje virusnega genoma delimo na zgodnjo in pozno fazo. V celičnem jedru poteka prepis s polimerazo RNA II. V zgodnji fazi pride do prepisa enega dela verige DNA, v pozni fazi pa še prepisa drugega dela verige. Novonastala molekula mRNA se razcepi na veliki in mali fragment T. Proteinska molekula, nastala iz fragmenta T mRNA, se veže s celičnimi proteini p53 in Rb, kar omogoči celicam vstop v fazo S. Protein p53 se veže na verigo DNA in prekine sintezo mRNA. Sledi podvojevanje virusne DNA. Sledita prepis poznih mRNA ter sinteza proteinov L1 in L2. Proteini se akumulirajo v jedru celic. V času celične proliferacije nekateri virusni proteini spodbujajo celico k stalnemu podvajanju in posledično nastane sloj celic, ki vsebujejo virusno DNA. Ker je izražanje virusnih beljakovin v

tem času omejeno, virus ni izpostavljen imunskemu sistemu oziroma ne pride do imunskega odgovora okužene živali. Sinteza virusnih proteinov in zorenje virusa potekata v keratocitih. Prve klinično opazne spremembe se pojavijo štiri do šest tednov po okužbi (111) (**Slika 4**).



Slika 4: Shematični prikaz delov epitela, kjer poteka razmnoževanje in sestavljanje govejega papilomavirusa (111)

Figure 4: Schematic representation of the parts of the epithelium layers where replication and assembly of bovine papillomavirus takes place (111)

2.3.3 Vplivi okolja na papilomaviruse

Papilomavirusi so odporni na različne vplive okolja in na lipidna topila, detergente ter nizek pH. Razmeroma dobro so odporni tudi na vročino in sušenje. V okolju izven gostitelja lahko preživijo določen čas, ki pa ni znan. Uničita jih ultravijolična svetloba in visoka temperatura (96).

2.3.4 Inkubacijska doba in klinična slika fibropapilomatoze

Po okužbi se spremembe pojavijo v dveh do treh tednih. Karfijolaste in gobaste spremembe po koži so naključno razporejene po vsem telesu, pogostejše se pojavljajo okoli oči, po vratu, obrazu in prednjih okončinah, izjemoma pa spremembe najdemo tudi na notranjih organih (18, 21, 99). Pojavijo se lahko posamično ali jih je več ter so različnih oblik in velikosti; njihov premer je lahko tudi do 17 centimetrov (99). Pogosto so kožni tumorji tudi pigmentirani. Obolele živali običajno niso prizadete, razen če so tumorji izjemno veliki ali ko so razporejeni tako, da povzročajo težave pri vidu, hranjenju ali gibanju živali. Okužba je običajno samoomejujoča. Po približno dveh mesecih ali v nekaterih primerih tudi po več letih v 75 do 85 % pride do regresije novotvorb in razvoja imunosti pred ponovnimi okužbami (21, 99, 108). V redkih primerih se lahko iz benignih tumorjev kože razvijejo ploščatocelični karcinom, adenoskvamozni karcinom ali karcinom lojnic, ki posledično povzročijo pogin živali (18).

2.3.5 Patomorfološke in histopatološke značilnosti sprememb, značilnih za fibropapilomatozo

Deltapapilomavirusi so skoraj izključno omejeni na ploščati epitelij in vezivno tkivo kože. Razen pljučne fibromatoze virusi ne povzročajo sprememb v drugih organih (99). Patomorfološke spremembe običajno zajemajo gobaste, pecljate in okrogle ter temno pigmentirane tvorbe. Pri manjših spremembah je površina gladka, pri večjih pa pogosto erodirana in vedno brezdlačna, medtem ko je notranjost čvrste konsistence in slaninastega videza (belkasto sive barve). Histopatološka preiskava pokaže, da je glavna masa tumorja locirana v retikularni plasti kože. Tumor sestavljajo skupine proliferajočih fibroblastov, lociranih v kompaktni masi kolagenih vlaken. V epidermisu so opazni znaki zadebelitve večskladnega ploščatega epitela, ki se v nižje ležeče vezivo širi z dolgimi in ozkimi med seboj povezanimi izrastki. Opazni sta tudi parakeratoza in hiperkeratoza (18). Na mestu vstopa v kožo virus namreč povzroči spremembo v delovanju epitelnih bazalnih celic v vrhnjici kože (*epidermis*), kar se kasneje prenese na njeno zrnato plast (*stratum granulosum*). Citoplazma povečanih keratinocitov in jedra so vakuolizirana (99).

2.3.6 Imunski odziv živali na okužbo s papilomavirusi

Imunski odgovor na okužbo z BPV pri govedu je v primerjavi z večino preostalih virusov nenavadno slab in počasen, kar nakazuje na to, da so BPV evolucijsko dodobra razvili ustrezne mehanizme, s katerimi se uspešno izmikajo imunskemu odgovoru. Titer protiteles proti BPV je zelo nizek ali sploh nezaznaven kljub prisotnosti klinično zaznavnih neoplastičnih sprememb, ki aktivno proizvajajo visoke titre virusa. Slaba humoralna imunost velja za vse vrste BPV, ne glede na genotip ali mesto vdora virusa v organizem. Vzrok za slab imunski odziv gostitelja na vdor virusa je, da je replikacija virusa omejena na epitel, kjer virus ne pride v stik s celicami imunskega sistema. Pri pašnih živalih z ulceriranimi in s krvavečimi neoplastičnimi spremembami so ugotovili višje titre protiteles proti BPV kot pri drugih okuženih živalih, kar potrjuje, da virusni antigeni pridejo v stik z imunskimi celicami le, če je fibropapilom poškodovan ali zaradi drugega nepoznanega vzroka (112). V eksperimentalnih razmerah so pri nekaterih živalih v poznejših fazah okužbe opazili šibek odziv limfocitov T in B na kapsidne proteine in protein E7 (113, 114). Podoben kronološki potek humoralne in celične imunosti so opazili tudi pri ljudeh s HPV, kar dodatno potrjuje nezmožnost gostiteljskega imunskega odziva na zgođen in učinkovit imunski odgovor (115). Med regresijo fibropapilomov BPV-4 pride do akumulacije aktiviranih limfocitov v dermisu pod fibropapilomom. Pod epitelom pride do akumulacije limfocitov CD4+, medtem ko v bazalnem sloju in keratinocitih prevladujejo limfociti CD8+ (116). Vloga posameznih podtipov limfocitov pri regresiji fibropapilomov še ni pojasnjena. Podobno distribucijo limfocitov CD4+ in CD8+ so opazili tudi pri ljudeh z genitalnimi bradavicami, ki jih povzroča HPV (115). Čeprav je imunski odziv na okužbo s papilomavirusom slab, se pri imunizaciji živali s papilomavirusnimi beljakovinami sproži hiter in dolgotrajen imunski odziv. To spoznanje je privedlo tudi do razvoja prvih cepiv pri živalih (112).

2.3.7 Diagnostika fibropapilomatoze

Za diagnostiko fibropapilomatoze najpogosteje zadoščajo značilni klinični znaki, patoanatomska in histopatološka preiskava (18). Papilomavirusov ne moremo rutinsko namnožiti na *in vitro* tkivni kulturi. Diagnostične metode so zato usmerjene k dokazovanju virusne DNA ali antigena pri osebkih s prisotnimi kliničnimi znaki ali tkivnih vzorcih. Za

dokazovanje papilomavirusov pri cervidnih vrstah se najpogosteje uporablja metoda PCR za dokazovanje virusne DNA. Za ugotavljanje novih vrst papilomavirusov in za določanje nukleotidnih zaporedij celotnih genomov se lahko uporablja tudi metoda krožnega pomnoževanja (angl. *rolling-circle amplification*, RCA) (99). *In situ* lahko virusno DNA ali antigen v epitelu kožnega tumorja dokažemo z DNA hibridizacijo ali imunohistokemijo (3). Za hitro diagnostiko povzročitelja se lahko uporabi tudi elektronsko mikroskopiranje (117).

2.3.8 Geografska razširjenost fibropapilomatoze pri prostoživečih cervidnih vrstah

Fibropapilomatoza se pojavlja po celem svetu, pri srnah in jelenih se pojavlja v Evropi in Severni Ameriki (18, 21, 99). Najbolj poznan in najbolj razširjen je DPV, ki lahko povzroča kožno in pljučno fibromatozo pri belorepem jelenu in mulastem jelenu. Fibropapilomi so bili ugotovljeni tudi pri drugih vrstah, kot so severni jelen, navadni jelen, srna in los. Bolezen pri srni pogosteje prizadene starejše živali, medtem ko pri navadnem in belorepem jelenu prizadene predvsem mlajše živali. Papilomavirusi so epiteliotropni, visoko tkivno in gostiteljsko specifični in se redko prenašajo med vrstami (18, 99, 108). Čeprav naj bi bili PV strogo vrstno specifični, pa so opisani primeri, pri katerih je prišlo do navzkrižne okužbe (106, 118–121). Leta 2016 so dokazali navzkrižno okužbo z BPV tipa 1 in 2 (rod *Xipapillomavirus*) pri navidezno zdravem navadnem jelenu. Do preskoka je lahko prišlo samostojno ali v kombinaciji z *Deltapapillomavirus* tipa 1 in 2. To dokazuje, da je navadni jelen lahko potencialni rezervoar za papilomaviruse in posledično lahko pride tudi do okužb domačih prežvekovalcev, če pride z njimi v stik (20). S stališča mlečne in mesne proizvodnje ima to lahko negativne ekonomske posledice po celem svetu (121). Munday in sodelavci poročajo o primeru okužbe navadnega jelena s papilomavirusom CePV-2 iz rodu *Epsilonpapillomavirus* na Novi Zelandiji (107).

Večina PV iz rodu *Deltapapillomavirus* je vrstno specifičnih (20, 103, 105–107, 118, 121–123). Prenos virusa še ni popolnoma znan, verjetno gre za stik okužene živali z živaljo, ki ima poškodovano kožo, ali za prenos ob stiku poškodovane kože z okuženim materialom. Virusni delci morajo prodreti skozi zgornje plasti epidermisa, da pride do okužbe. Domnevno tudi naravni vedenjski vzorci živali, kot so zbiranje in zadrževanje v čredi, markiranje z rogovjem ter boji med samci, pripomorejo k virusnemu širjenju. To domnevo podpirajo tipične lokacije sprememb na koži, kot so glava, vrat, okončine in področje trebuha. V epidemiologiji

fibropapilomatoze pri navadnem jelenu in srni naj bi morda pomembno vlogo vektorjev imeli tudi členonožci (npr. krvosesne žuželke), vendar ta hipoteza še ni dokončno potrjena (99).

Podatki o incidenci in karakteristiki papilomavirusov pri srni in navadnem jelenu so redki in skopi. Okužbe s PV pri srni (CcPV1) se pojavljajo endemsko na Madžarskem, v Avstriji, Hrvaški (3) in na Slovaškem (16). Kocsner poroča, da se prevalenca PV okužb na endemičnih področjih giblje med 0,20 in 1,1 % (124). O širjenju fibropapilomatoze pri srni poročajo iz vseh držav, kjer so bolezen ugotovili (3, 16).

O sporadičnih primerih fibropapilomatoze pri navadnem jelenu poročajo iz Španije, Francije, Anglije, Avstrije (104) in Italije (22, 99). Bolezen je prisotna tudi v Sloveniji (14).

2.3.9 Ukrepi in nadzor nad boleznijo pri srnah in jelenih

Nadzor nad boleznijo prostoživečih jelenov in srn se ne izvaja (14). Selektivni odstrel živali z vidnimi spremembami na koži in zmanjševanje gostote dovzetnih živali se lahko izvajata kot pomožna ukrepa, vendar je rezultat negotov. Izdelava cepiva iz sprememb in njegova uporaba pri okuženih jelenih sta možen ukrep pri gojenem jelenu. Ker so virusi vrstno specifični, ne predstavljajo nevarnosti za človeka (14, 99).

2.4 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE IN BIOINFORMATSKA ANALIZA

2.4.1 Sekvenciranje naslednje generacije

Sekvenciranje naslednje generacije (angl. *next-generation sequencing*, NGS) je tehnologija, ki omogoča masovno in vzporedno določanje nukleotidnega zaporedja fragmentov DNA (sekvenciranje) (125–127). NGS se uporablja v različne diagnostične in raziskovalne namene, kot so sekvenciranje genoma, eksoma, transkriptoma, določanje metilacijskega profila DNA ter za namen tarčnega sekvenciranja (128, 129). Tehnologijo NGS delimo na: (i) sekvenciranje druge generacije, kjer sekvenciramo kratke, klonalno namnožene fragmente DNA, ter (ii) sekvenciranje tretje generacije, kjer sekvenciramo posamezne dolge fragmente DNA (130). Rezultate NGS obdelamo s pomočjo posebnih bioinformatških programov, ki jih izberemo

glede na namen raziskave, aplikativnost, usposobljenost raziskovalca in računalniške infrastrukture (131, 132). Glavni kriteriji izbora NGS metode so: (i) vrsta vzorca, (ii) globina sekvenciranja (kolikokrat bo določen fragment DNA prebran med sekvenciranjem), (iii) priprava vzorca za sekvenciranje in (iv) izbire načina sekvenciranja (kratki ali dolgi fragmenti) (126, 130, 133).

2.4.1.1 Sekvenciranje druge generacije

Tehnologija sekvenciranja druge generacije nam omogoča masovno vzporedno sekvenciranje kratkih (100–500 bp), klonalno namnoženih fragmentov DNA. Za klonalno namnoževanje fragmentov uporabljamo metodo PCR. Vse tehnologije NGS druge generacije so sestavljene iz: (i) priprave knjižnice DNA; (ii) pomnoževanja knjižnice in nastajanja klonalnih skupkov ter (iii) masivnega paralelnega sekvenciranja (126). Obstaja več različnih platform za sekvenciranje druge generacije, kot so Roche 454 (F. Hoffmann-La Roche, Švica), Illumina (Illumina, ZDA), SOLiD (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, ZDA) (134). Trenutno vodilni tehnologiji na tržišču sta Illumina in Ion Torrent. Ker obe temeljita na sekvenciranju DNA z DNA polimerazo, ju označujemo kot sekvenciranje s sintezo. Illumina in Ion Torrent imata na voljo več različnih sistemov za sekvenciranje oziroma sekvenatorjev glede na namen dela in raziskovanja. Obe tehnologiji sta zanesljivi in cenovno sprejemljivi (126, 134).

2.4.1.2 Priprava knjižnice za NGS

Priprava knjižnice predstavlja ključni korak pri sekvenciranju druge generacije. Knjižnica predstavlja nabor kratkih, klonalno namnoženih fragmentov DNA (insertov), ki imajo na vsakem koncu DNA vezan oligonukleotid z znanim zaporedjem (adapter). Adapterja omogočata vezavo matične DNA na trdno površino in vezavo DNA – polimeraze na matično DNA. K adapterjema je običajno priključen še en oligonukleotid z znanim zaporedjem (angl. *barcode*) (127).

2.4.1.3 Tehnologija Illumina

Illumina uporablja tehnologijo klonalne pomnožitve DNA knjižnice preko mostičkov (angl. *bridge amplification*) ter sekvenciranje s sintezo. Omogoča sekvenciranje kratkih fragmentov

DNA med 75 in 300 bp. Na površini pretočne celice (angl. *flow cell*) se nahajata dve vrsti oligonukleotidov. Vsaka matrična DNA vsebuje zaporedje nukleotidov, ki ustreza točno enemu od začetnih oligonukleotidov na pretočni celici. Na njenem nasprotnem koncu je zaporedje, ki je drugemu začetnemu oligonukleotidu na pretočni celici obratno komplementarno. Na pretočno celico se hibridizirajo le tisti konci DNA, ki so komplementarni pritrjenim oligonukleotidom. Do pomnoževanja DNA pride s pomočjo encimov in reagentov, ki po kanalčkih pritečejo v pretočno celico. DNA polimeraza sproži podaljševanje oligonukleotidov ter tako nastane obratno komplementarna kopija originalne matrice. Ta se pritrdi na površino pretočne celice, originalna matrica se odplakne. Vsak prosti konec na novo nastale pritrjene verige DNA je komplementaren drugemu začetnemu oligonukleotidu na pretočni celici in se lahko nanj hibridizira. Polimeraza začne podaljševati oligonukleotid in nastane produkt, ki ima dve vijačnici. Ta produkt nato denaturiramo, da nastaneta dve ločeni verigi, ki ponovno hibridizirata na pritrjene oligonukleotide. Postopek se ponavlja in posledično nastanejo skupki po približno 1.000 kopij DNA. Kopije izvirajo iz ene same originalne matrice in jih zato poimenujemo kot klonalne (135, 136). Skupki so matrica, pri katerih se uporabljajo fluorescentno označeni deoksinukleotidi z reverzibilno vezanim zaključnim zaporedjem (terminatorjem). To omogoči, da se na zaporedje, ki ga določamo, veže samo en komplementaren nukleotid. Laserji vzbudijo fluorofor na vgrajenem nukleotidu in ga po prehodu svetlobe skozi več filtrov prepoznajo. Sekvenciranje se ponavlja v ciklih. Tehnologija Illumina omogoča sekvenciranje fragmentov DNA z enega konca (angl. *single-read sequencing*) in sekvenciranje fragmentov z obeh koncev (angl. *paired-end sequencing*). Sledi analiza odčitkov s pomočjo bioinformatičnih programov (136–138).

2.4.1.4 Tehnologija Ion Torrent

Tehnologija Ion Torrent omogoča sekvenciranje kratkih fragmentov DNA (100–600 bp). Temelji na klonalnem namnoževanju fragmentov DNA z emPCR, ki poteka na površini nanokroglic (angl. *Ion Sphere Particles*). Nanokroglice se nanese na površino polprevodnega čipa z jamicami na način, da ima vsaka jamica po eno kroglico. Sledi postopno sekvenciranje vzorcev, ki temelji na zaznavanju spremembe pH, do katere pride zaradi sprostitve vodikovega protona. Polprevodni čip spremembo pH pretvori v direktno kemično informacijo dodanih nukleotidov (A, C, T, G). Ob vsakem ciklu sekvenciranja k matrični DNA dodajamo posamične

nativne deoksinukleotide iste identitete. Sledita spiranje nevgrajenih deoksinukleotidov ter dodatek novih. Če je v matrični verigi DNA niz enakih nukleotidov, se vgradijo vsi komplementarni deoksinukleotidi, kar povzroči večjo spremembo električne napetosti. Prednost tehnologije Ion Torrent je, da ni potreben detektor za zaznavanje fluorescence, kar pomeni hitrejši postopek, manjšo velikost platforme ter nižje stroške (134, 137, 139).

2.4.2 Bioinformatika analiza

Bioinformatika je relativno mlada disciplina, ki združuje matematiko, informatiko in biologijo ter služi kot orodje za reševanje raziskovalnih bioloških vprašanj. Bistvene komponente bioinformatike predstavljajo: razvoj programske opreme in algoritmov ter analiza in interpretacija bioloških podatkov. Za bioinformatiko analizo potrebujemo ustrezno računalniško znanje ter poznavanje različnih računalniških jezikov. Danes je na spletu dostopna ogromna količina podatkovnih baz ter bioinformatičnih orodij, ki so raziskovalcem v pomoč pri njihovem vsakdanjem delu. Podatkovne baze lahko v osnovi razdelimo v dve kategoriji: primarne in sekundarne. Primarne podatkovne baze hranijo originalne podatke o sekvencah. Sem spadajo podatkovne baze, kot so NCBI GenBank, Evropski laboratorij za molekularno biologijo (angl. *European Molecular Biology Laboratory*, EMBL) in DNA podatkovna banka Japonske (angl. *DNA databank of Japan*, DDBJ). Sekundarne podatkovne baze vsebujejo sekvence, ki izvirajo iz podatkov primarnih podatkovnih baz. Primeri takšnih baz so PROSITE, PRINTS and InterPro. Naštete sekundarne baze vsebujejo podatke o sekvenčnih vzorcih in različnih družinah beljakovin (140).

Skupaj z napredkom NGS tehnologij se je razvila tudi bioinformatika, ki ponuja različne možnosti vrednotenja in obdelave pridobljenih podatkov. Na voljo sta dva različna pristopa sestavljanja nukleotidnih zaporedij; eden je prileganje odčitkov na referenčno zaporedje, drugi pa je sestavljanje odčitkov *de novo*. Prileganje odčitkov na referenčno zaporedje se uporablja za genome z že obstoječo sekvenco ali za genom, podoben genomu drugega organizma, ki pa že ima sestavljeno sekvenco ter ga lahko uporabimo kot referenčni genom. Metoda *de novo* se uporablja za nove genome, ki predhodno niso bili sekvencirani in niso podobni genomom, ki so že bili sekvencirani (132, 141, 142). Na kvaliteto sekvenc lahko vplivajo artefakti v zaporedju, kot so napačna identifikacija vgrajenega nukleotida, odčitki slabše kvalitete, indel-i

ter kontaminacija z adapterji. S pomočjo bioinformatičnih programov in orodji lahko filtriramo in odstranimo te odčitke, ki bi lahko zmotili nadaljnjo obdelavo in analizo (143). Pred uporabo bioinformatičnih programov za sestavljanje odčitkov je pomembno, da poznamo dolžino zaporedij, ki jih orodja za anotacijo potrebujejo za identifikacijo genskih regij ali taksonomsko razvrstitev (132, 141, 142).

3 MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

3.1.1 Vzorci gamsov s klinično potrjeno sliko kužnega ektima

Za določanje nukleotidnega zaporedja celotnih genomov virusov Orf pri gamsih smo v raziskavo vključili vzorca dveh gamsov s klinično sliko kužnega ektima iz leta 2013 in 2017, pri katerih so z metodo PCR predhodno že dokazali prisotnost virusov Orf (**Tabela 4**; primera pod zaporednima številka 6 in 7).

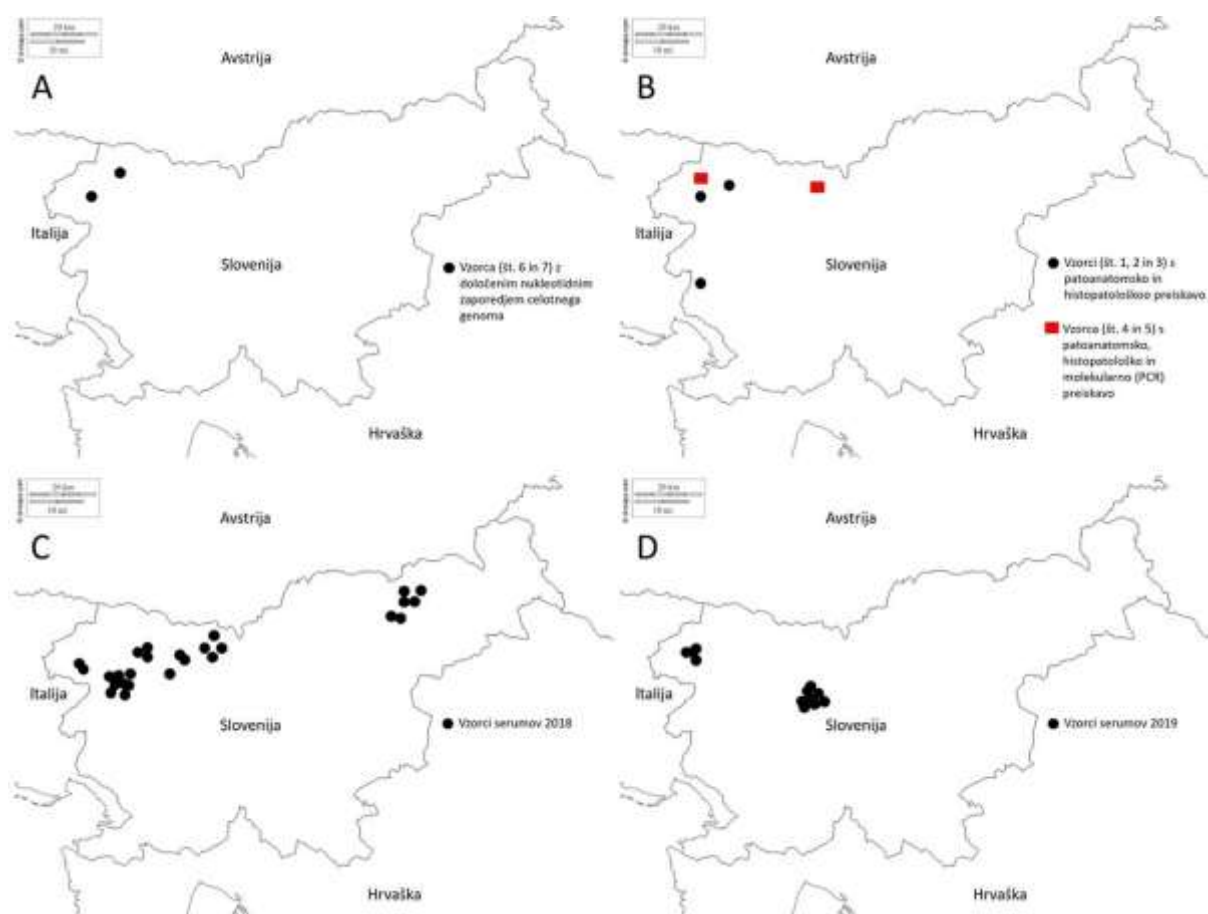
V okviru preiskave arhivskih podatkov smo v raziskavo vključili še pet vzorcev iz različnih časovnih obdobj (**Tabela 4**; primeri pod zaporednimi številkami 1, 2, 3, 4 in 5), ki so bili zabeleženi in opisani v arhivu Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele (IPDRČ) na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani (VF). Vzorci so bili odvzeti na IPDRČ pri truplih, ki izhajajo iz rednega letnega odvzema ali izrednega odvzema iz narave izven lovne dobe zaradi prisotnih klinično znakov bolezni po odredbi lovskega inšpektorja. Lokacije odvzetih živali iz narave, ki so bile vzorčene, so prikazane na **Sliki 5a** in **Sliki 5b**. Starost gamsov so določili lovci oziroma lovska komisija na podlagi prirastnih kolobarjev rogljev. Nadaljnje preiskave smo izvajali na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Tabela 4: Podatki o vzorcih, vključenih v doktorsko nalogo, s klinično sliko kužnega ektima

Table 4: *Data of samples with clinical picture of contagious ecthyma included in the doctoral dissertation*

Zaporedna številka	Vzorec	Leto	Živalska vrsta	Spol	Starost	Lovišče
1.	291/01	2001	navadni gams	samec	4 mesece	LD Soča
2.	100/06	2006	navadni gams	samec	1 leto	LD Gorica
3.	65/07	2007	navadni gams	samica	8 mesecev	TNP
4.	37/11 PP 653/11	2011	navadni gams	samica	1 leto	LD Bovec
5.	40/11 PP688/11	2011	navadni gams	samec	2 leti	LPN Kozorog
6.	82/13 PP758/13	2013	navadni gams	samec	7 let	LD Soča
7.	12/17 PP193/17	2017	navadni gams	samica	6 mesecev	TNP

V raziskavo smo vključili 40 vzorcev serumov gamsov za določanje protiteles proti virusu Orf s SNT za ugotavljanje razširjenost okužbe z virusom Orf pri gamsih brez klinično izražene slike. Vzorci so bili odvzeti pri rednem letnem odvzemu (**Tabela 5** in **Slika 5c** ter **Slika 5d**) ter dostavljeni znotraj 24 ur na izpostavo Nacionalnega veterinarskega inštituta Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani ali IPDRČ. Vzorce so pobrali lovci, ki so bili predhodno izobraženi in opremljeni s sterilnimi kompleti za vzorčenje.



Slika 5: Geografske lokacije vzorcev, vključenih v doktorsko raziskavo (A – vzorca (št. 6 in 7) z določenim nukleotidnim zaporedjem celotnega genoma (črni krog); B – vzorci (št. 1, 2 in 3) s patoanatomsko in histopatološko preiskavo (črn krog) ter vzorci (št. 4 in 5) s patoanatomsko, histopatološko in z molekularno (PCR) preiskavo (rdeč kvadrat); C – vzorci serumov 2018 (črn krog); D – vzorci serumov 2019 (črn krog).

Figure 5: Geographical locations of samples included in the doctoral dissertation (A – samples (Nos. 6 and 7) with determined nucleotide sequence of the whole genome (black circle); B – samples (Nos. 1, 2 and 3) with pathoanatomical and histopathological examination (black circle) and samples (Nos. 4 and 5) with pathoanatomical, histopathological and molecular (PCR) examination (red square); C – serum samples 2018 (black circle); D – serum samples 2019 (black circle).

Tabela 5: Podatki o vzorcih serumov gamsov, ki smo jih uporabili za SNT

Table 5: Data of serum samples of chamois used for SNT

Leto	Mesec	Lovišče	Spol	Starost (v letih)
2018	avgust	LPN Prodi Razor	samec	6
2018	avgust	TNP Mojstrana	samec	1
2018	avgust	LD Bled	samica	1
2018	september	LD Bohinjska Bela	samec	manj kot 1 leto
2018	september	LD Pohorje	samica	5
2018	september	LPN Prodi Razor	samec	1
2018	september	TNP Mojstrana	samec	manj kot 1 leto
2018	september	LPN Prodi Razor	samec	6
2018	september	LPN Prodi Razor	samica	manj kot 1 leto
2018	oktober	LPN Kozorog	samec	1
2018	november	LPN Kozorog	samica	2
2018	november	LD Ruše	samec	2
2018	november	LPN Pohorje	samica	6
2018	november	LPN Pohorje	samec	manj kot 1 leto
2018	november	LPN Kozorog	samec	manj kot 1 leto
2018	november	LD Kobarid	samec	3
2018	november	LPN Pohorje	samica	1
2018	november	LD Ruše	samica	2
2018	november	LPN Kozorog	samica	2
2018	november	LD Bled	samec	2
2018	december	LD Kobarid	samica	2
2018	november	TNP Mojstrana	samec	manj kot 1 leto
2018	januar	LPN Prodi Razor	samec	2
2018	januar	LD Volče	samec	manj kot 1 leto
2018	januar	LD Volče	samica	manj kot 1 leto
2018	avgust	TNP Mojstrana	samec	2
2018	november	LD Ruše	samica	1
2018	december	LD Ljubinj	samec	3
2019	oktober	LD Poljane	samec	2
2019	oktober	LD Poljane	samica	9
2019	oktober	LD Poljane	samec	2
2019	oktober	LD Poljane	samica	manj kot 1 leto
2019	oktober	LD Poljane	samec	3
2019	november	LD Poljane	samec	manj kot 1 leto
2019	december	LD Poljane	samec	8
2019	december	LD Poljane	samec	1
2019	december	LD Čezsoča	samec	9
2019	avgust	LD Čezsoča	samec	1
2019	avgust	LD Čezsoča	samec	2
2019	avgust	LD Čezsoča	samec	2

3.1.2 Vzorci srn in jelena s klinično potrjeno sliko fibropapilomatoze

Za določanje nukleotidnega zaporedja celotnih genomov papilomavirusov pri srnah in jelenu smo v raziskavo vključili šest vzorcev srn in en vzorec navadnega jelena z izraženo klinično sliko fibropapilomatoze (**Tabela 6**; primeri pod zaporednimi številkami 9 do 15). Vzorci so bili odvzeti med letoma 2014 in 2016 pri rednem letnem odvzemu ali pri izrednem odvzemu iz narave zaradi prisotnih kliničnih znakov bolezni po odredbi lovskega inšpektorja (**Slika 6**).

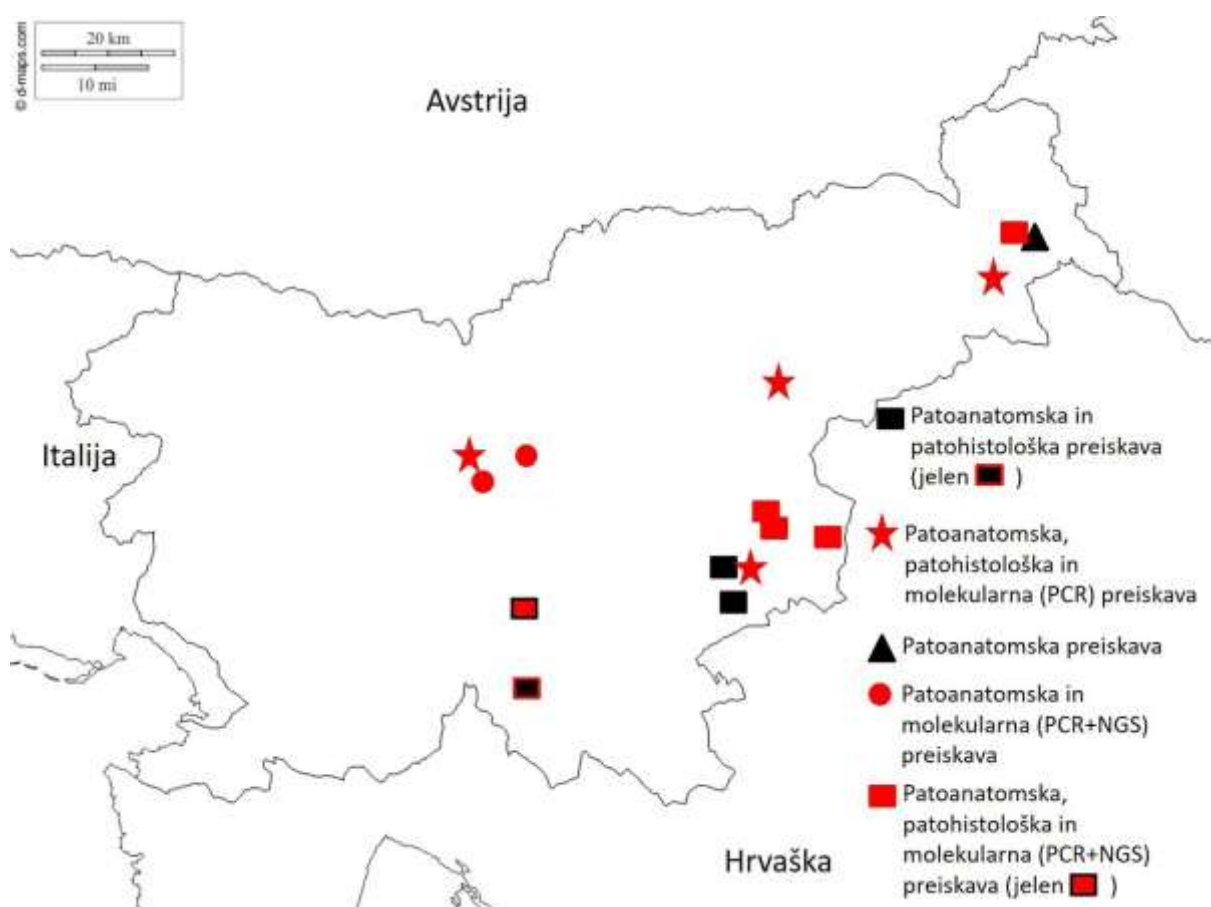
V okviru preiskave arhivskih podatkov smo v raziskavo vključili še sedem vzorcev srn in en vzorec jelena iz različnih časovnih obdobj (**Tabela 6**; primeri pod zaporednimi številkami 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 8).

Živalska vrsta, starost, spol in leto odvzema vzorca so predstavljeni v **Tabeli 6**. Oceno starosti uplenjenih parkljarjev so določili na podlagi izraščenosti in obrabljenosti zobovja. Starost je potrdila tudi pooblaščen komisija lovcev med obveznim letnim preverjanjem uplenjenih parkljarjev (144). Trupla vseh uplenjenih srn in neoplastično spremembo pri navadnem jelenu so lovci poslali na nadaljnje diagnostične preiskave na IPDRČ ter Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo VF, kjer so izvedli raztelesbo in pri nekaterih vzorcih histopatološko preiskavo.

Tabela 6: Podatki o vzorcih, vključenih v doktorsko nalogo, s klinično sliko fibropapilomatoze

Table 6: Data of samples with fibropapillomatosis included in doctoral dissertation

Zaporedna številka	Vzorec	Leto	Živalska vrsta	Starost	Spol	Lovišče
1.	67/98 PP859/98	1998	srna	4 leta	samec	LD Kostanjevica
2.	147/00 PP171/00	2000	srna	2 leti	samica	LD Veliki Podlog
3.	195/03 PP1015/03	2003	jelen	7 mesecev	samec	LPN Medved
4.	34/07 PP558/07	2007	srna	1 leto	samica	LD Pšata
5.	58/08 PP800/08	2008	srna	8 let	samec	LD Šentjur
6.	31/10 PP466/10	2010	srna	starejša žival	samica	LD Ivanjkovci
7.	34/11 PP667/11	2011	srna	1 leto	samica	LD Raka
8.	54/12	2012	srna	4 leta	samica	LPN Fazan
9.	37/14	2014	srna	2 leti	samec	LD Domžale
10.	63/15	2015	srna	6 let	samica	LD Brezovica
11.	84/14 PP 1/15	2014	srna	3 leta	samec	LD Videm
12.	31/16 PP765/16	2016	srna	6 let	samec	LPN Fazan
13.	32/16 PP777/16	2016	srna	3 leta	samec	LD Globoko
14.	103/16 PP2205/16	2016	srna	5 let	samica	LD Videm
15.	64/16 PP1568/16	2016	jelen	1 leto	samica	LD Velike Lašče



Slika 6: Geografske lokacije srn in navadnih jelenov s fibropapilomatozo. Vzorci s patoanatomsko in histopatološko preiskavo (srna – črn kvadrat; jelen – z rdečo obrobljen črn kvadrat), vzorci s patoanatomsko, histopatološko in z molekularno (PCR) preiskavo (srna – rdeča zvezda), vzorci s patoanatomsko preiskavo (srna – črn trikotnik), vzorci s patoanatomsko in molekularno (PCR+NGS) preiskavo (srna – rdeč krog), vzorci s patoanatomsko, histopatološko in z molekularno (PCR+NGS) preiskavo (srna – rdeč kvadrat; jelen – s črno obrobljen rdeč kvadrat).

Figure 6: Geographical locations of roe deer and red deer with fibropapillomatosis. Samples with pathoanatomical and histopathological examination (roe deer - black square; red deer - with red bordered black square), samples with pathoanatomical, histopathological and molecular (PCR) examination (roe deer - red star), samples with pathoanatomical examination (roe deer - black triangle) samples with pathoanatomical and molecular (PCR + NGS) examination (roe deer - red circle), samples with pathoanatomical, histopathological molecular (PCR + NGS) examination (roe deer - red square; red deer - with black bordered red square).

3.2 POKSVIRUSI IN KUŽNI EKTIM

3.2.1 Določanje protiteles proti virusu Orf s serum nevtralizacijskim testom

Za ugotavljanje prisotnosti protiteles proti virusu Orf pri gamsih smo uporabili SNT, v katerega smo vključili 40 vzorcev serumov gamsov. Iz zamrznjenih suspenzij virusa smo v gojišču za celice pripravili delovno razredčino. Vzorce serumov smo inaktivirali pri temperaturi 56 °C za 30 minut. Virusni titer smo določili s predhodno titracijo na celični kulturi. V 96-jamične mikroplošče smo odpipetirali po 25 µl gojišča za celice. V prvo jamico smo odpipetirali 25 µl preiskovanega seruma in prenašali po 25 µl iz jamice v jamico, da smo dobili razredčine od 1 : 2 do 1 : 1024. V vse jamice smo dodali po 25 µl delovne razredčine virusa (25 TCID₅₀) in mikroploščo 1 uro inkubirali pri temperaturi 37 °C. V vse jamice smo dodali po 50 µl suspenzije tripsinizirane celične linije Turbinal Bovine 89-307/27. V SNT smo vključili kontrolo celic in kontrolo titra delovne razredčine virusa. Inkubacija je trajala 7 dni pri temperaturi 37 °C.

3.2.2 Sekvenciranje celotnih genomov virusov Orf z metodo NGS

S tehnologijo Illumina smo sekvencirali dva genoma izolatov virusov Orf (**Tabela 4**; primera pod zaporednima številka 6 in 7).

3.2.2.1 Priprava tkivnih suspenzij in izolacija virusa na celični kulturi

Vzorci tkiv so bili do izvedbe preiskav ustrezno shranjeni pri temperaturi –70 °C. Pripravili smo suspenzije tkivnih vzorcev, in sicer smo 1 cm³ tkiva dodali 9 ml reagenta RPMI medium 1640 (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Suspenzije smo homogenizirali in centrifugirali pri 2000 g 10 min. Izvedli smo izolacijo virusa na celični kulturi. Na 24 ur star sloj celične kulture TB na 96-jamični mikrotitrski plošči za celične kulture smo odpipetirali 50 µl tkivnega supernatanta. Pomnoževanje virusa smo določili na podlagi nastanka citopatskega učinka (CPE). Po 48 urah, ko je bil CPE približno 80 %, smo celice zamrznili.

3.2.2.2 Izolacija genomske DNA virusnih izolatov

Supernatant celične kulture smo uporabili za izolacijo genomske DNA z uporabo DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca. Prisotnost virusne

DNA v supernatantu celične kulture smo potrdili z metodo PCR z začetnimi oligonukleotidi ORF 045F (5' CCT ACT TCT CGG AGT TCA GC 3') in ORF 024R (5' GCA GCA CTT CTC CTC GTA G 3') z uporabo protokola, ki ga opisuje Kottaridi s sodelavci (145). Produkte PCR smo analizirali z elektroforezo v 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Vsebnost genomske DNA smo določili s fluorimetrom Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in z uporabo kompleta kemikalij Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca.

3.2.2.3 Sekvenciranje s tehnologijo Illumina

Sekvenciranje s tehnologijo Illumina so izvedli v sekvencijskem centru Source BioScience (Nottingham, Združeno kraljestvo). Genomsko DNA so mehansko fragmentirali z ultrasonikatorjem Bioruptor (Diagenode, Belgija) in s kompletom NEBNext Ultra II DNA library prep kit (New England Biolabs, ZDA) pripravili knjižnice NGS. Na aparaturi Bioanalyzer 2100 (Agilent, ZDA) so izvedli nadzor kakovosti knjižnic in s fluorimetrom Qubit™ 3.0 izmerili koncentracijo knjižnic. Sekvenciranje knjižnic z obeh koncev (2 × 150 bp) so izvedli na sistemu NextSeq 500 (Illumina, ZDA).

3.2.2.4 Bioinformatična obdelava podatkov NGS

Za bioinformatične analize smo uporabili različna orodja, ki so dostopna znotraj programske opreme Geneious Prime (Biomatters Ltd., Nova Zelandija).

3.2.2.5 Nadzor kakovosti odčitkov

Za bioinformatično analizo smo uporabili odčitke (angl. *reads*) v formatu FASTQ. Z orodjem BBduk v. 38.37 (146) smo najprej odstranili odčitke ali dele odčitkov slabe kakovosti (vrednost Phred ali vrednost $Q < 20$) in ostanke adapterjev ter kot najkrajšo dolžino odčitka določili 35 nt.

3.2.2.6 Sestavljanje genomov virusov Orf

Za sestavljanje genomov virusov Orf smo uporabili prileganje odčitkov na referenčni genom in sestavljanje odčitkov *de novo*. Odčitke smo sestavljali *de novo* z uporabo orodja SPAdes v3.13.0 in pri tem uporabili parametra *-careful* in *-k 21,33,55,67,77* (147). Za prileganje

odčitkov na referenčni genom smo uporabili orodje Geneious Read Mapper (148) s privzetimi parametri in pri tem kot referenčni genom uporabili genom virusa Orf s pristopno številko AY386263.

3.2.2.7 Vrednotenje sestavljanja genomov virusov Orf in anotacija genomov

Pravilnost sestavljenih zaporedij smo ovrednotili tako, da smo na sestavljena zaporedja genomov poravnali izhodiščne odčitke, pri čemer so morala biti pokrita vsa mesta posameznega zaporedja. Na podlagi teh poravnav smo določili tudi povprečno pokritost posameznega sestavljenega zaporedja. Sestavljenim genomom smo določili vsebnost posameznih baz. Nato smo v posameznem sestavljenem genomu določili zaporedje genov (anotacija). Zaporedja genov smo določili s pristopom prenosa anotacij. Najprej smo določili odprte bralne okvire s programsko opremo Geneious Prime (149), nato smo zaporedja sestavljenih genomov s programom MAFFT v.7.450 (150) poravnali z zaporedji genomov, dostopnih v podatkovni zbirki NCBI GenBank, jih primerjali med seboj in prenesli relevantne anotacije z več kot 45-odstotno podobnostjo.

3.2.2.8 Poravnave nukleotidnih zaporedij genomov virusov Orf in analiza raznolikosti

Za analizo raznolikosti celotnih genomov smo nukleotidna zaporedja sestavljenih genomov Orf (ORFV 82/13 in ORFV 12/17) in genomov, pridobljenih iz podatkovne zbirke NCBI GenBank (**Tabela 7**), poravnali s programom MAFFT v.7.450 (150). Na podlagi poravnave smo določili odstotek identičnosti med posameznimi novo sestavljenimi genomi in med novo sestavljenimi genomi ter genomi, pridobljenimi iz podatkovne zbirke NCBI GenBank.

3.2.2.9 Filogenetske analize

Za filogenetske analize smo uporabili gene osrednje regije (od gena 009 do 101) in gene terminalne regije (od gena 102 do 134) virusov Orf, kot so že opisali Li in sodelavci (151). Iz podatkovne zbirke NCBI GenBank smo pridobili vse dostopne genome virusov ovčjih in kozjih sevov Orf (**Tabela 7**). Virusov govejih psevdoosepnih in govejega pustularnega stomatitisa smo uporabili kot zunanjo skupino sekvenc. Najprej smo nukleotidna zaporedja genov vseh virusnih genomov, ki smo jih uporabili za filogenetske primerjave, izvozili, jih združili in s programom MAFFT v.7.450 (150) izvedli poravnave nukleotidnih zaporedij. Nato smo s programom

MEGA v.7.0.21 z uporabo metode združevanja sosedov (angl. *Neighbor-Joining*) (152) ter evolucijskim modelom Tajima-Nei (151) izdelali filogenetska drevesa. Z metodo samovzorčenja (angl. *bootstrapping*) s 1000 ponovitvami smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves.

Tabela 7: Pregled virusnih sevov, pridobljenih iz podatkovne zbirke NCBI GenBank, uporabljenih za analizo raznolikosti in filogenetsko analizo virusov Orf pri gamsu

Table 7: An overview of all viral isolates used for phylogenetic analysis of Orf virus in chamois

Pristopna številka	Oznaka virusnega seva	Leto izolacije virusnega seva	Velikost genoma (bp)	Država izvora	Gostitelj
KP010354	GO	2018	139.866	Kitajska	koza
KP010353	YX	2015	138.231	Kitajska	koza
KP010355	NP	2015	132.111	Kitajska	koza
KP010356	SJ1	2015	139.112	Kitajska	koza
AY386264	OV-SA00	2004	139.962	ZDA	koza
MG712417	SY17	2016	140.413	Kitajska	ovca
KF234407	NA1/11	2015	137.080	Kitajska	ovca
DQ184476	NZ2	2006	137.820	Nova Zelandija	ovca
KF837136	B029	1996	134.104	Nemčija	človek * (prenos okužbe z ovce)
AY386263	OVIA82	2004	137.241	ZDA	ovca

* Virus je bil izoliran pri človeku, vendar gre za ovčji sev, saj se je človek okužil od ovc (153). V nadaljevanju besedila smo sev opredelili kot ovčji sev.

* The virus was isolated in human but nevertheless it is a sheep strain since a human got infected from a sheep (153). In the following text, we defined this strain as a sheep strain.

3.3 PAPILOMAVIRUSI IN FIBROPAPILOMATOZA

3.3.1 Sekvenciranje celotnih genomov papilomavirusov z metodo NGS

S tehnologijo Ion Torrent smo sekvencirali 7 genomov papilomavirusov (**Tabela 6**; primeri pod zaporednimi številkami 9 do 15).

3.3.1.1 Izolacija genomske DNA iz vzorcev tkiv

Vzorci tkiv so bili do izvedbe preiskav ustrezno shranjeni pri temperaturi -70°C . Za pripravo suspenzij tkivnih vzorcev smo 1 cm^3 tkiva dodali 9 ml reagenta RPMI medium 1640 (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Suspenzije smo homogenizirali in centrifugirali pri 2000 g 10 min. Supernatant smo uporabili za izolacijo genomske DNA z uporabo komercialnega kompleta kemikalij DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca.

3.3.1.2 Sekvenciranje s tehnologijo Ion Torrent

Sekvenciranje smo izvedli na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Protokol od fragmentacije DNA do sekvenciranja smo povzeli po Prešernovi nalogi, v kateri ga opisuje Čivnik (154). V nadaljevanju je opisan le povzetek protokola. Najprej smo izvedli fragmentacijo izolirane genomske DNA z aparaturom Covaris® M220 Focused-ultrasonicator™ (Covaris, ZDA). Uporabili smo parametre, ki omogočajo pripravo fragmentov, velikosti 400 bp. Fragmentirano DNA smo očistili in koncentrirali z magnetnimi kroglicami Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter, ZDA) ter jo uporabili za pripravo knjižnice NGS. Za popravilo koncev ter vezavo adapterjev in črtnih kod smo po navodilih proizvajalca uporabili komplet reagentov GeneRead™ DNA Library L Prep Kit (Qiagen, Nemčija). Za čiščenje v postopku priprave knjižnic NGS in za izbiro fragmentov želene velikosti smo uporabili magnetne kroglice Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter, ZDA). Koncentracijo knjižnic smo opredelili s kompletom QIAseq Library Quant AssayKit (Qiagen, Nemčija) ter fluorometrom Qubit 3.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalcev. Knjižnice smo redčili do koncentracije 25 pM in vezali na kroglice Ion Sphere Particles (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Obogatitev polnih kroglic (kroglic z matrično DNA) in klonalno namnožitev knjižnic na površini kroglic smo izvedli na

aparaturah Ion OneTouch ES (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in Ion OneTouch 2 (Thermo Fisher Scientific, ZDA) s pomočjo reagentov Ion PGMTM Hi-QTM View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca. Knjižnice smo nanegli na čip Ion 318 Chip v2 (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in jih sekvencirali na platformi Ion PGMTM (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Pri tem smo uporabili komplet Ion PGMTM Hi-QTM ViewSequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA).

3.3.1.3 Bioinformatična obdelava podatkov NGS

Za bioinformatične analize smo uporabili različna orodja, ki so dostopna znotraj programske opreme Geneious Prime (Biomatters Ltd., Nova Zelandija).

3.3.1.4 Nadzor kakovosti odčitkov

Kvaliteto pridobljenih očitkov smo ocenili s programskim orodjem Ion Torrent Suite v.5.6.0. (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Za bioinformatično analizo smo uporabili odčitke (angl. *reads*) v formatu FASTQ. Z orodjem BBDuk v. 38.37 (146) smo najprej odstranili odčitke ali dele odčitkov slabe kakovosti (vrednost Phred ali vrednost $Q < 20$) in ostanke adapterjev ter kot najkrajšo dolžino odčitka določili 35 nt.

3.3.1.5 Sestavljanje genomov papilomavirusov

Za sestavljanje genomov papilomavirusov smo uporabili prileganje odčitkov na referenčni genom. Uporabili smo orodje Geneious s privzetimi parametri in pri tem kot referenčni genom uporabili genoma papilomavirusov s pristopnima številka NC_011051 in JQ74428.

3.3.1.6 Vrednotenje sestavljanja genomov papilomavirusov in anotacija genomov

Pravilnost sestavljenih zaporedij smo ovrednotili tako, da smo na sestavljena zaporedja genomov poravnali izhodiščne odčitke, pri čemer so morala biti pokrita vsa mesta posameznega zaporedja. Na podlagi teh poravnav smo določili tudi povprečno pokritost posameznega sestavljenega zaporedja. Sestavljenim genomom smo določili vsebnost posameznih baz. Nato smo v posameznem sestavljenem genomu določili zaporedje genov (anotacija). Zaporedja genov smo določili s pristopom prenosa anotacij. Najprej smo določili odprte bralne okvire s programsko opremo Geneious Prime, nato smo zaporedja sestavljenih genomov s programom

MAFFT v.7.450 (150) poravnali z zaporedji genomov CcaPV1 in CePV1 in jih primerjali med seboj ter prenesli relevantne anotacije z več kot 90-odstotno podobnostjo.

3.3.1.7 Poravnava nukleotidnih zaporedij genomov papilomavirusov in analiza raznolikosti

Za analizo raznolikosti celotnih genomov smo nukleotidna zaporedja sestavljenih genomov in genomov iz podatkovne zbirke NCBI GenBank CcaPV1 (NC_011051) ter CePV1 (JQ744282 in MN985322) poravnali s programom MAFFT v.7.450 (150). Na podlagi poravnave smo določili odstotek identičnosti med posameznimi novo sestavljenimi genomi in med novo sestavljenimi genomi ter genomi CcaPV1 (NC_011051) in CePV1 (JQ744282 in MN985322).

3.3.1.8 Filogenetske analize

Za potrebe filogenetske primerjave smo iz podatkovne zbirke NCBI GenBank pridobili genome virusov rodu *Deltapapillomavirus*. HPV smo uporabili kot zunanjo skupino sekvenc. Najprej smo izvozili nukleotidna zaporedja genov E1, E2, L1 in L2 vseh virusnih genomov, ki smo jih uporabili za filogenetske primerjave, jih združili in s programom MAFFT v.7.450 (150) izvedli poravnave nukleotidnih zaporedij. Filogenetsko drevo smo izdelali s programom MEGA v.7.0.21 z uporabo metode združevanja sosedov (angl. *Neighbor-Joining*) (152) ter z evolucijskim modelom Tamura 3 s parametrom gama (T92 + G) (155). Z metodo samovzorčenja (angl. *bootstrapping*) s 1000 ponovitvami smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves.

3.3.2 Določanje prisotnosti virusne DNA z metodo PCR v arhivskih vzorcih

Genomsko DNA iz arhivskih vzorcev (parafinske rezine) smo izolirali po postopku, opisanem v poglavju »3.3.1.1 Izolacija genomske DNA iz vzorcev tkiv«. Za določanje prisotnosti nukleinske kisline papilomavirusov smo uporabili PCR z začetnimi oligonukleotidi CanPVf (5' CTT CCT GAW CCT AAY MAK TTT GC 3') in FAP64 (5' CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC 3') z uporabo protokola, ki ga opisujejo Forslund s sodelavci ter Lange in sodelavci (156, 157). Produkta PCR smo analizirali z elektroforezo v 1,8-odstotnem agaroznem gelu.

4 REZULTATI

4.1 Poksvirusi in kužni ektim

4.1.1 Patoanatomska preiskava

Analiza podatkov patoanatomske preiskave je bila opravljena pri vseh sedmih živalih z izraženo klinično sliko, ki smo jih preiskovali v nalogi. Spremembe in ugotovitve patoanatomskih preiskav so bile med seboj zelo podobne, zato v nadaljevanju opisujemo le spremembe, ki se nanašajo na vzorca 82/13 in 12/17 (**Tabela 4**; vzorca pod zaporednima številčkama 6 in 7).

Pri raztelesbi gamsov so bile ugotovljene proliferativne, brezdlačne, temno pigmentirane kožne spremembe okoli oči, na smrčku ter na distalnih delih okončin. Spremembe so bile pretežno v obliki papul, pustul, razjed in krast. Žival je bila močno shirana. V prebavnem in respiratornem traktu ni bilo vidnih patoloških sprememb (**Slika 7**).



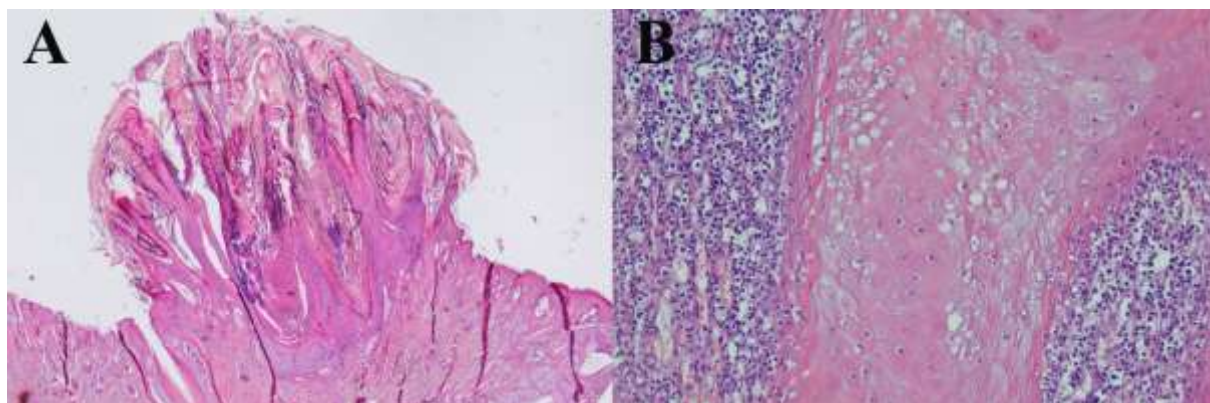
Slika 7: Patoanatomska preiskava gamsov. (A in B) Proliferativne, brezdladne, temno pigmentirane kožne spremembe na smrčku in okoli oči. (C in D) Klinični znaki kužnega ektima, prisotni v sami ustni votlini obolele živali. (E) Klinični znaki, prisotni na proksimalnem delu okončine in prsnega koša. (F) Kožne spremembe na distalnem delu prednje okončine (svitek) (Vir: IPDRČ, avtorja: Gorazd Vengušt in Diana Žele Vengušt).

Figure 7: Pathoanatomical examination of chamoises (A and B) Proliferative, hairless, dark pigmented skin lesions on the muzzle and around the eyes. (C and D) Clinical signs of contagious ecthyma present in the oral cavity of the infected animal. (E) Clinical signs present on the proximal limb and thorax. (F) Skin lesions on the distal part of the limb (coronary border) (Source: IPDRČ, authors: Gorazd Vengušt and Diana Žele Vengušt).

4.1.2 Histopatološka preiskava

Analiza podatkov histopatoloških preiskav je bila opravljena pri štirih živalih z izraženo klinično sliko, ki smo jih preiskovali v nalogi (**Tabela 10**; primeri pod zaporednimi števkami 4 do 7). Pri arhivskih vzorcih med letoma 2001 in 2007 (**Tabela 10**; primeri pod zaporednima števkama 1 do 3) histopatološka preiskava ni bila opravljena. Spremembe in ugotovitve histopatološke preiskave so bile med seboj zelo podobne, zato v nadaljevanju opisujemo le spremembe, ki se nanašajo na vzorca številka 82/13 (PP758/13) in 12/17 (PP193/17) (**Tabela 4**; vzorca pod zaporednima števkama 6 in 7).

S histopatološko preiskavo sprememb so bila ugotovljena različno velika področja zmerno do močno iregularno hiperplastičnega in močno parakeratotično ali ortokeratotično hiperplastičnega epitela. Ponekod so spremembe pokrite s serocelularno krasto, zgrajeno iz degeneriranih nevtrofilnih granulocitov, eozinofilnega eksudata in keratina. Multifokalno so v epidermisu majhna do zmerno velika področja balonske degeneracije epitelnih celic in področja s številnimi keratohialinimi granulami (**Slika 8**). Multifokalno so v površinskih plasteh epidermisa majhne pustule, močno napolnjene z nevtrofilnimi granulociti. Površinski in srednji dermis v opisanih področjih sta zmerno do gosto infiltrirana predvsem z limfociti, makrofagi in s posameznimi nevtrofilnimi granulociti, ponekod je površinski dermis blago do zmerno edematozen.

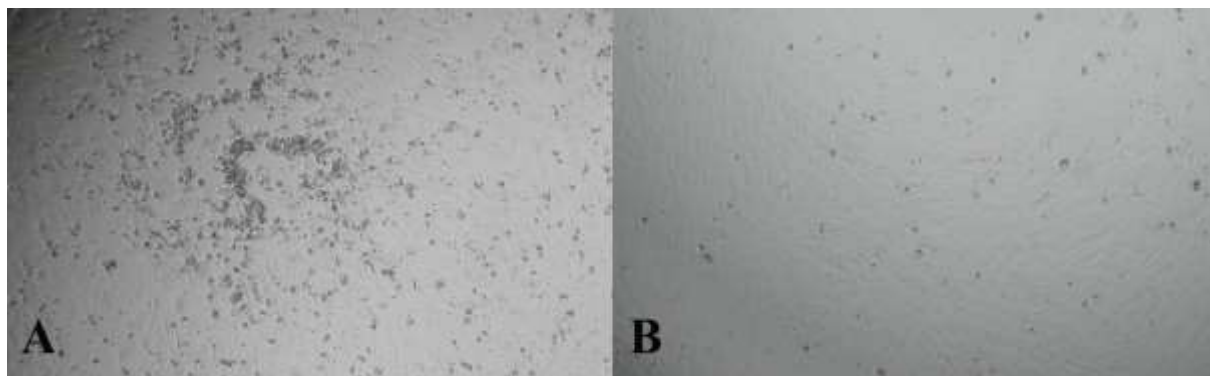


Slika 8: Histopatološka slika kužnega ektima pri gamsu. (A) Zmerno iregularno hiperplastičen ter močno parakeratotično in ortokeratotično hiperkeratotičen epidermis. (B) Balonska degeneracija keratinocitov. Površinski dermis je gosto infiltriran predvsem z limfociti in makrofagi.

Figure 8: Histopathologic findings of contagious ecthyma in chamois. (A) Moderate epidermal hyperplasia and marked orthokeratotic and parakeratotic hyperkeratosis. (B) Ballooning degeneration of keratinocytes. Dense infiltration of superficial dermis with lymphocytes and macrophages.

4.1.3 Serum nevtralizacijski test za virus Orf

Pregledali smo 40 vzorcev serumov gamsov na prisotnost protiteles proti virusu Orf. Rezultate smo ocenjevali glede na prisotnost CPE pod svetlobnim mikroskopom. Protitelesa v vzorcu seruma so prisotna, če na sloju celic ne opazimo CPE oziroma če je 100 % celičnega sloja intaktnega, ne glede na razredčino seruma. Če na sloju celic opazimo CPE, to nakazuje na odsotnost protiteles v vzorcu seruma in rezultat se interpretira kot negativen (**Slika 9**). Od 40 vzorcev, ki smo jih vključili v SNT, je bilo 38 vzorcev negativnih na prisotnost protiteles proti virusu Orf. Pri dveh vzorcih rezultatov testa nismo mogli odčitati zaradi citotoksičnega učinka vzorca seruma na celično kulturo. Rezultati celotnega SNT so prikazani v **Tabeli 8**.



Slika 9: Primer rezultata pridobljenega serum nevtralizacijskega testa. (A) Citopatski učinek na celično kulturo. (B) Negativna kontrola celic.

Figure 9: Example of the result obtained with serum virus neutralization assay. Cytopathogenic effect in a cell culture. (B) Negative cell control.

Tabela 8: Rezultati SNT vzorcev serumov gamsov na prisotnost protiteles proti virusu Orf

Table 8: Results of SNT of chamois samples against virus Orf antibodies

Leto	Mesec	Lovišče	Spol	Starost (v letih)	Rezultat SNT
2018	avgust	LPN Prodi Razor	samec	6	neg.
2018	avgust	TNP Mojstrana	samec	1	neg.
2018	avgust	LD Bled	samica	1	neg.
2018	september	LD Bohinjska Bela	samec	manj kot 1 leto	neg.
2018	september	LD Pohorje	samica	5	neg.
2018	september	LPN Prodi Razor	samec	1	neg.
2018	september	TNP Mojstrana	samec	manj kot 1 leto	neg.
2018	september	LPN Prodi Razor	samec	6	neg.
2018	september	LPN Prodi Razor	samica	manj kot 1 leto	neg.
2018	oktober	LPN Kozorog	samec	1	neg.
2018	november	LPN Kozorog	samica	2	neg.
2018	november	LD Ruše	samec	2	neg.
2018	november	LPN Pohorje	samica	6	citotoksičen učinek
2018	november	LPN Pohorje	samec	manj kot 1 leto	neg.
2018	november	LPN Kozorog	samec	manj kot 1 leto	neg.
2018	november	LD Kobarid	samec	3	neg.
2018	november	LPN Pohorje	samica	1	neg.
2018	november	LD Ruše	samica	2	citotoksičen učinek
2018	november	LPN Kozorog	samica	2	neg.
2018	november	LD Bled	samec	2	neg.
2018	december	LD Kobarid	samica	2	neg.
2018	november	TNP Mojstrana	samec	manj kot 1 leto	neg.
2018	januar	LPN Prodi Razor	samec	2	neg.
2018	januar	LD Volče	samec	manj kot 1 leto	neg.
2018	januar	LD Volče	samica	manj kot 1 leto	neg.
2018	avgust	TNP Mojstrana	samec	2	neg.
2018	november	LD Ruše	samica	1	neg.
2018	december	LD Ljubinj	samec	3	neg.
2019	oktober	LD Poljane	samec	2	neg.
2019	oktober	LD Poljane	samica	9	neg.
2019	oktober	LD Poljane	samec	2	neg.
2019	oktober	LD Poljane	samica	manj kot 1 leto	neg.
2019	oktober	LD Poljane	samec	3	neg.
2019	november	LD Poljane	samec	manj kot 1 leto	neg.
2019	december	LD Poljane	samec	8	neg.
2019	december	LD Poljane	samec	1	neg.
2019	december	LD Čezsoča	samec	9	neg.
2019	avgust	LD Čezsoča	samec	1	neg.
2019	avgust	LD Čezsoča	samec	2	neg.
2019	avgust	LD Čezsoča	samec	2	neg.

4.1.4 Sekvenciranje celotnih genomov in genomska analiza

S tehnologijo Illumina smo določili skoraj celotno nukleotidno zaporedje genomov (angl. *nearly complete genome*) dveh izolatov virusov Orf pri gamsih (ORFV 82/13 in ORFV 12/17) s celovito opravljeno diagnostiko (patoanatomska in histopatološka preiskava, PCR ter NGS).

Nukleotidnih zaporedij obeh skrajnih koncev genomov nismo uspeli določiti. Rezultati NGS in rezultati sestavljanja odčitkov za določitev celotnih genomov so predstavljeni v **Tabeli 9**. Nukleotidni zaporedji obeh preiskovanih genomov v formatu GenBank so na voljo preko internetne povezave: ORFV 12/17 (<https://drive.google.com/file/d/1WTHhM6boFrrqFjJhPzXOFZASLPq0N8Yu/view>) in ORFV 82/13 (<https://drive.google.com/file/d/17oF9Ic2DHYjSk7qFTuDhCqH-5IC54IDU/view>).

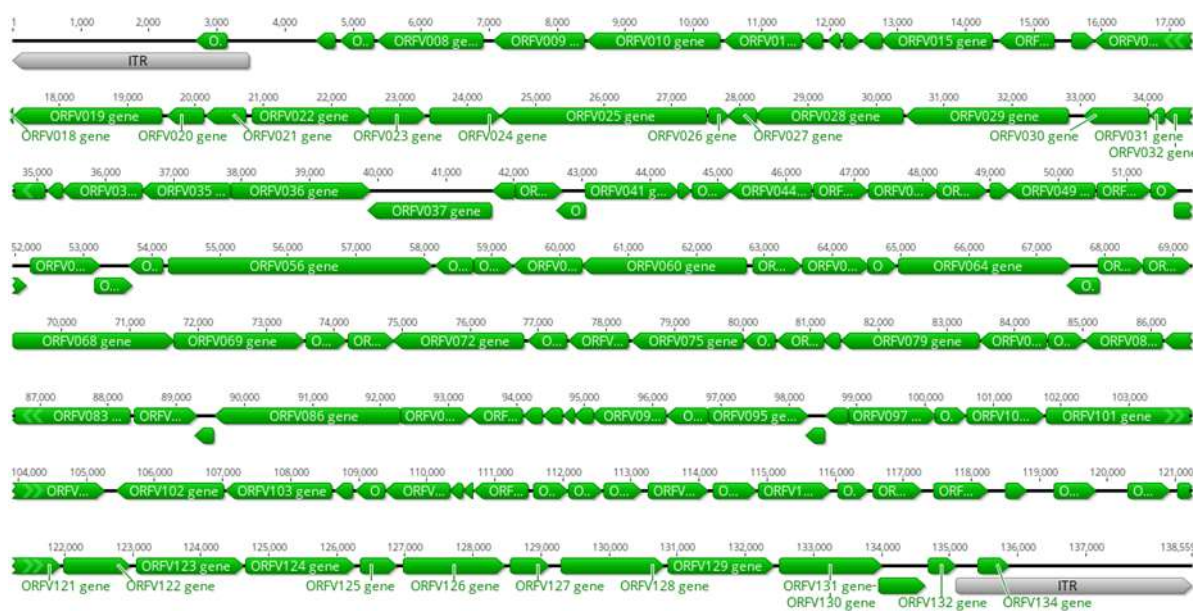
Tabela 9: Rezultati sekvenciranja celotnih ORFV genomov in statistični povzetek o odčitkih

Table 9: Results of the whole-genome sequencing of ORFV genomes and assembly statistics

Virusni izolat	Število vseh odčitkov	Število odčitkov, ki so se prilegali na genom	Povprečna dolžina odčitkov, ki so se prilegali na genom
ORFV 82/13	2.721.802	23.672	150
ORFV 12/17	739.860	13.594	150

Genom ORFV 82/13 je bil dolg 138.559 bp, vsebnost gvanina in citozina je bila 64,8 %. ORFV 12/17 je imel genom dolg 138.459 bp, vsebnost gvanina in citozina je bila 64,2 %. V vsakem izmed obeh genomov smo določili 131 genov. Na obeh koncih genomov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 smo določili ITR dolžine približno 3.460 bp (**Slika 10**). Na podlagi poravnave nukleotidnih zaporedij celotnih genomov smo ugotovili, da se seva ORFV 82/13 in ORFV 12/17 med seboj razlikujeta v 16 nukleotidnih zamenjavah (99,93-odstotna podobnost). Na nivoju celotnih genomov sta se seva gamsov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 od ovčjih in kozjih sevov virusov Orf, ki so na voljo v podatkovni zbirki NCBI GenBank, razlikovala od 7,61 % (ovčji sev NZ2, pristopna številka DQ184476) do 11,62 % (kozji sev NP, pristopna številka KP010355).

Poravnava nukleotidnih zaporedij genomov ORFV 12/17 in ORFV 82/13 ter genomov ovčjih in kozjih sevov virusov Orf, pridobljenih iz podatkovne zbirke NCBI GenBank, je pokazala, da preiskovana genoma v primerjavi s preostalimi genomi ne vsebujeta gena ORF002. Prav tako tega gena ne vsebujeta genoma ovčjih virusnih sevov KF837136.1 ter MG712417.1. Genoma AY386264 in AY386263 ne vsebujeta gena ORFV12.5. Poravnava nukleotidnih zaporedij preiskovanih genomov virusov Orf je pokazala tudi, da genoma AY386263 in AY386264 ne vsebujeta gena ORFV107.5 in da genom KP010355 ne vsebuje genov ORFV114, ORFV115 in ORFV116. Genoma KP010355 in KP010356 ne vsebujeta genov ORFV117, ORFV118 in ORFV119. Genom KP010355 ne vsebuje gena ORFV120. Genoma KP010355 in KF837136.1 ne vsebujeta gena ORFV134.



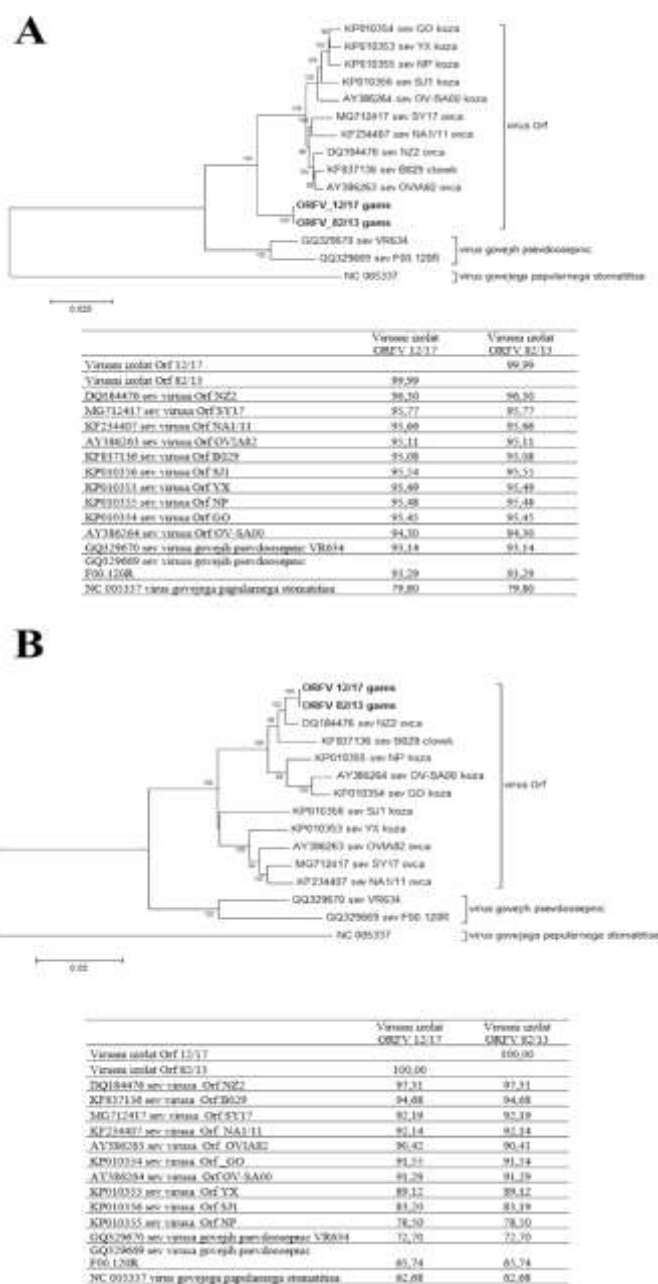
Slika 10: Shematski prikaz organizacije genoma izolata ORFV 82/12. Genom izolata ORFV 12/17 ima enako organizacijo.

Figure 10: Schematic representation of the genome organization of ORFV 82/12 isolates. The genome of the ORFV 12/17 isolate has the same organization.

4.1.5 Filogenetske analize

Za filogenetske analize smo uporabili gene osrednje regije (od gena 009 do gena 101) in gene terminalne regije (od gena 102 do gena 134). V analizo smo vključili seva ORFV 82/13 in ORFV 12/17 pri gamsih ter 13 sevov virusov, pridobljenih iz podatkovne zbirke NCBI GenBank, od katerih je bilo 10 ovčjih in kozjih sevov virusov Orf, 2 seva virusov govejih

psevdoosepnic in 1 sev virusa govejega papularnega stomatitisa. Na podlagi poravnave nukleotidnih zaporedij genov osrednje regije in genov terminalne regije smo določili genetske razdalje oziroma podobnosti nukleotidnih zaporedij med preiskovanimi genomi virusov in izdelali filogenetski drevesi. Na filogenetskem drevesu genov osrednje regije sta virusa Orf pri gamsih (ORFV 82/13 in ORFV 12/17) tvorila svojo filogenetsko podskupino. V tej regiji so svojo filogenetsko podskupino tvorili tudi virusi Orf pri ovcah in kozah (**Slika 11a**). V tabeli na **Sliki 11a** so zbrani rezultati primerjav podobnosti nukleotidnega zaporedja genov osrednje regije sevov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 s sevi, pridobljenimi iz podatkovne zbirke NCBI GenBank. Podobnost nukleotidnega zaporedja genov osrednje regije med sevoma gamsov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 je bila 99,99-odstotna. V primerjavi z ovčjimi in kozjimi sevi Orf sta bila seva gamsov najbolj podobna ovčjim sevom (od 95,08 do 96,3-odstotna podobnost), medtem ko je bila podobnost med sevi gamsov in sevi koz od 94,30 do 95,55-odstotna. Na filogenetskem drevesu genov terminalne regije virusi Orf niso tvorili filogenetskih podskupin glede na živalsko vrsto (**Slika 11b**). V tabeli na **Sliki 11b** so zbrani rezultati primerjav podobnosti nukleotidnega zaporedja genov terminalne regije sevov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 s sevi, pridobljenimi iz podatkovne zbirke NCBI GenBank. Podobnost nukleotidnega zaporedja genov terminalne regije med sevoma gamsov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 je bila 100-odstotna. Filogenetska analiza genov terminalne regije je pokazala, da sta seva Orf pri gamsih najbolj podobna ovčjemu sevu NZ2 z Nove Zelandije (97,31-odstotna podobnost). Podobnost sevov Orf pri gamsih s preostalimi ovčjimi sevi Orf je bila od 90,42 do 94,68-odstotna, medtem ko je bila podobnost med sevi Orf pri gamsih in sevi Orf pri kozah od 78,50 do 91,55-odstotna.



Slika 11: Filogenetsko drevo virusnih izolatov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 ter 13 virusnih izolatov, pridobljenih iz podatkovne zbirke NCBI GenBank. Filogenetski drevesi sta izdelani s programom MEGA v.7.0.21 z uporabo metode združevanja sosedov (angl. *Neighbor-Joining*) ter modelom Tajima-Nei. Uporabili smo še metodo samovezjanja s 1000 ponovitvami. Preiskovana virusna izolata ORFV sta označena krepko. **(A)** prikazuje filogenetsko drevo nukleotidnega zaporedja genov osrednje regije genoma ter genetske razdalje ter **(B)** prikazuje filogenetsko drevo nukleotidnega zaporedja genov terminalne regije in genetske razdalje.

Figure 11: Phylogenetic tree of viral isolates ORFV 82/12 and ORFV 12/17 and 13 virus isolates obtained from the NCBI GenBank database. Phylogenetic trees were constructed using MEGA v.7.0.21, using a neighbor-joining method and Tajima-Nei model. We used a Bootstrap method with 1000 repetitions. The investigated ORFV isolates are in bold. **(A)** shows the phylogenetic tree nucleotide sequence of the core genes in the central region of the genome and genetic distance; **(B)** shows the phylogenetic tree of the nucleotide sequence of the genes in the terminal region and genetic distances.

4.1.6 Pregled podatkov arhivskih vzorcev

Pregledali smo podatke arhivskih vzorcev od leta 2001 do 2017. Ugotavljamo ciklično pojavnost kužnega ektima pri gamsih. V okviru preiskave arhivskih podatkov smo pri treh primerih kužnega ektima gamsov ugotovili postavitev diagnoze na osnovi klinične, patoanatomske in histopatološke slike (**Tabela 10**; vzorci pod zaporedno številko 1, 2 in 3). Testiranja z metodo PCR nismo mogli izvesti, ker histoloških rezin ni bilo več na voljo. Pri dveh primerih diagnoza temelji na osnovi klinične, patoanatomske in histopatološke slike ter molekularne preiskave (PCR) (**Tabela 10**; vzorca pod zaporednima številka 4 in 5). Pri vzorcih pod zaporednima številka 6 in 7 (**Tabela 10**) je bila diagnoza postavljena na osnovi klinične, patoanatomske in histopatološke slike ter z molekularno preiskavo (PCR in NGS).

Tabela 10: Pregled podatkov arhivskih vzorcev za kužni ektim pri gamsu

Table 10: Examination and overview of archival samples data for contagious ecthyma in chamois

Zaporedna številka	Vzorec	Leto	Živalska vrsta	Spol	Starost	Lovišče	Diagnostične metode	PCR
1.	291/01	2001	navadni gams	samec	4 mesece	LD Soča	Patoanatomska in histopatološka preiskava	n.d.
2.	100/06	2006	navadni gams	samec	1 leto	LD Gorica	Patoanatomska in histopatološka preiskava	n.d.
3.	65/07	2007	navadni gams	samica	8 mesecev	TNP	Patoanatomska in histopatološka preiskava	n.d.
4.	37/11	2011	navadni gams	samica	1 leto	LD Bovec	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR) preiskava	poz.
5.	40/11	2011	navadni gams	samec	2 leti	LPN Kozorog	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR) preiskava	poz.
6.	82/13	2013	navadni gams	samec	7 let	LD Soča	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR+NGS) preiskava *	poz.
7.	12/17	2017	navadni gams	samica	6 mesecev	TNP	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR+NGS) preiskava *	poz.

(*) – NGS je bil opravljen v okviru doktorske naloge.

n.d.– Ni bilo delano.

(*) – NGS was performed as part of a doctoral dissertation.

n.d.–was not performed.

4.2. PAPILOMAVIRUSI IN FIBROPAPILOMATOZA

4.2.1 Patoanatomska preiskava

Analiza podatkov patoanatomskih preiskav je bila opravljena pri 15 živalih z izraženo klinično sliko, ki smo jih preiskovali v nalogi. Spremembe in ugotovitve patoanatomskih preiskav so bile med seboj zelo podobne, zato v nadaljevanju opisujemo le spremembe, ki se nanašajo na vzorca 64/16 (PP1568/16) ter 103/16 (PP2205/16) (**Tabela 6**; vzorca pod zaporednima številka 14 in 15).

Pri patoanatomskih preiskavah vseh srn so bile ugotovljene številne čvrste, okrogle, pretežno neodlakane, temno pigmentirane in pogosto erodirane tvorbe, ki so bile v večji meri locirane na področju glave, vratu in okončin. Število sprememb pri posamezni srni je bilo različno; pri posameznih živalih je bilo ugotovljenih od 4 do 16 tvorbo. Tvorbe so se razlikovale po velikosti in so merile v premeru od 1 do 14 cm (**Slika 12**). Pri jelenu je bilo število tumorjev manjše, omejeni pa so bili predvsem na področje dimelj. Tumorji so bili čvrsti, pigmentirani, neodlakani in cvetačastega videza. Na rezni ploskvi so bili tumorji kompaktni, površina reznih ploskev je bila sijoča in belkaste barve.



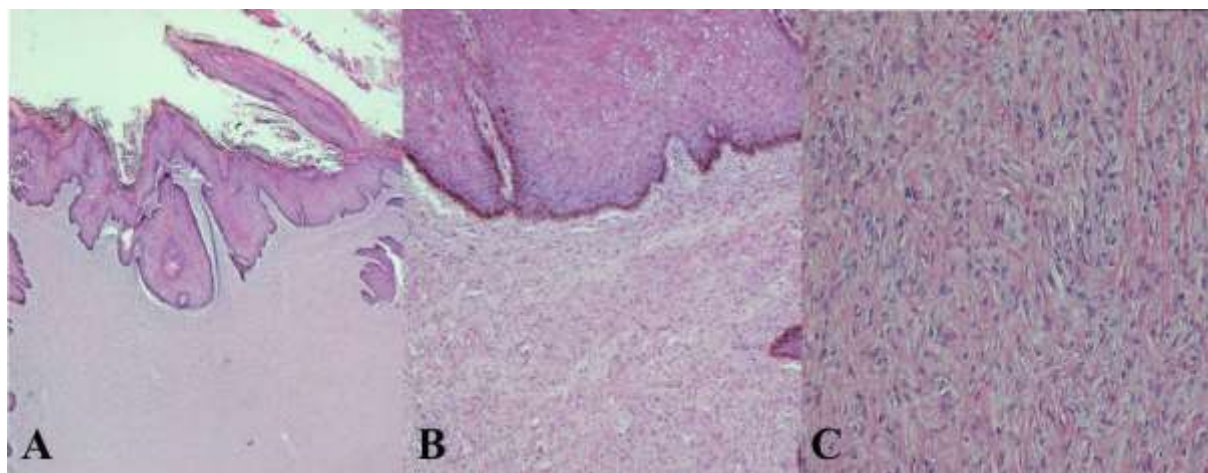
Slika 12: Patoanatomska preiskava živali s fibropapilomatozo. (A) Makroskopske lezije fibropapilomov različnih velikosti, ki se nahajajo na glavi in okončinah okužene srne. (B) Makroskopski izgled fibropapiloma na področju dimelj pri okuženem navadnem jelenu. (C) Pecljat, okrogel, čvrst, erodiran in brezdlačen fibropapilom pri srni. (D) Okrogel, čvrst in odlakan fibropapilom pri srni. (E) Velik ulceriran fibropapilom pri srni. (F) Rezna ploskev fibropapiloma; površina reznih ploskev je bela, kompaktna in slaninastega videza. (G) Fibropapilom pri navadnem jelenu ima cvetačasto obliko, površina je brezdlačna in pigmentirana. (H) Rezna ploskev fibropapiloma pri navadnem jelenu. Površina je kompaktna, sijoča in slaninastega videza. Na zunanji površini ima izrazito papilarno strukturo (Vir: IPDRČ, avtorja: Gorazd Vengušt in Diana Žele Vengušt).

Figure 12: Pathoanatomical examination of animals with fibropapillomatosis. (A) Macroscopic lesions of fibropapillomas of various sizes localised on the head and extremities of an infected roe deer. (B) Macroscopic lesion of solitary fibropapilloma of an infected red deer in the groin area. (C) Pedunculated, round, firm, pigmented, eroded and hairless fibropapillomas of a roe deer. (D) Round, firm and hairy fibropapilloma of a roe deer. (E) Large, ulcerated fibropapilloma of a roe deer. (F) Cut surface of a roe deer fibropapilloma with a compact, shiny, and white appearance of the firm connective tissue. (G) Fibropapilloma of a red deer showing a cauliflower-like mass and a hairless and pigmented surface. (H) Cut surface of a red deer fibropapilloma with a compact, shiny, and white appearance of the firm connective tissue and a pronounced papillary structure of the external surface. (Source: IPDRČ, authors: Gorazd Vengušt and Diana Žele Vengušt).

4.2.2 Histopatološka preiskava

Analizo podatkov histopatoloških preiskav je bila opravljena pri 12 živalih z izraženo klinično sliko, ki smo jih preiskovali v nalogi (**Tabela 12**; primeri pod zaporednimi številkami 1 do 7 in 11 do 15). Pri vzorcih pod zaporednimi številkami 8 do 10 (**Tabela 12**) histopatološka preiskava ni bila opravljena. Spremembe in ugotovitve histopatološke preiskave so bile med seboj zelo podobne, zato v nadaljevanju opisujemo le spremembe, ki se nanašajo na vzorec 64/16 (PP1568/16) (**Tabela 12**; vzorec pod zaporedno številko 15).

S histopatološko preiskavo so bile ugotovljene benigne eksofitične novotvorbe kože, pokrite z zmerno do močno iregularno hiperplastičnim in ortokeratotično hiperkeratotičnim, ponekod hiperpigmentiranim večskladnim ploščatim poroženevajočim epitelom. Zmerno število epitelnih celic ima v citoplazmi številna keratohialina zrnca, majhno do zmerno število epitelnih celic je povečanih in ima sivo rožnato, drobno zrnato citoplazmo (koilociti). V dermisu pod hiperplastičnim epitelom se razrašča kompaktno vezivno tkivo, zgrajeno iz številnih novotvorbnihih celic, podobnih fibroblastom, med katerimi so tanki trakovi kolagenih vlaken. Mitotični indeks je nizek, v povprečju z manj kot eno mitozo na polje 400-kratne povečave. Krvne in limfne žile so brez posebnosti, brez znakov invazije tumorskih celic (**Slika 13**). Ugotovljene histopatološke spremembe v povezavi s klinično sliko so patognomonične za fibropapilomatozo.



Slika 13: Histopatološka slika fibropapilomatoze pri navadnem jelenu. (A) Tvorba, zgrajena iz kompaktne vezivnega tkiva in pokrita z močno iregularno hiperplastičnim in blago ortokeratotično hiperkeratotičnim epitelom. (B) Hiperpigmentacija epitela. (C) Proliferacija fibroblastov, med katerimi so tanki trakovi kolagenih vlaken.

Figure 13: Histopathologic findings of fibropapillomatosis in a red deer. (A) Mass, composed of dense connective tissue and covered with markedly hyperplastic epithelium expressing mild orthokeratotic hyperkeratosis. (B) Epithelial hyperpigmentation. (C) Proliferation of fibroblasts supported by a collagenous matrix.

4.2.3 Sekvenciranje celotnih genomov in genomska analiza

Z metodo NGS smo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov šestih PV pri srnah in enega PV pri navadnem jelenu. Rezultati NGS in sestavljanja odčitkov za določitev celotnih genomov so predstavljeni v **Tabeli 11**. Nukleotidno zaporedje vseh genomov PV pri srnah je bilo dolgo 8.032 bp, medtem ko je bilo nukleotidno zaporedje genoma PV pri navadnem jelenu dolgo 8.009 bp. Organizacija genomov vseh preiskovanih PV je bila skladna z organizacijo genomov PV, pridobljenih iz podatkovne zbirke NCBI GenBank (CcaPV1 (NC_011051) ter CePV1v (JQ744282)). Nukleotidna zaporedja genomov so bila vnesena v podatkovno zbirko NCBI GenBank pod pristopnimi številkami: MT755964 (CePV1v sev 64-14), MT774138 (CcaPV1 sev 31-16), MT774139 (CcaPV1 sev 32-16), MT774140 (CcaPV1 sev 37-14), MT774141 (CcaPV1 sev 63-15), MT774142 (CcaPV1 sev 103-16) in MT774143 (CcaPV1 sev 84-14).

Analiza poravnave nukleotidnih zaporedij celotnih genomov PV pri srnah iz naše raziskave in referenčnega genoma CcaPV1 (NC_011051) je pokazala, da je pet genomov PV pri srni CcaPV1-1 (sevi 31-16, 32-16, 103-16, 63-15 in 37-14) med seboj 100-odstotno identičnih in se razlikujejo od referenčnega PV genoma CcaPV1 v zgolj štirih nukleotidnih zamenjavah (99,5-

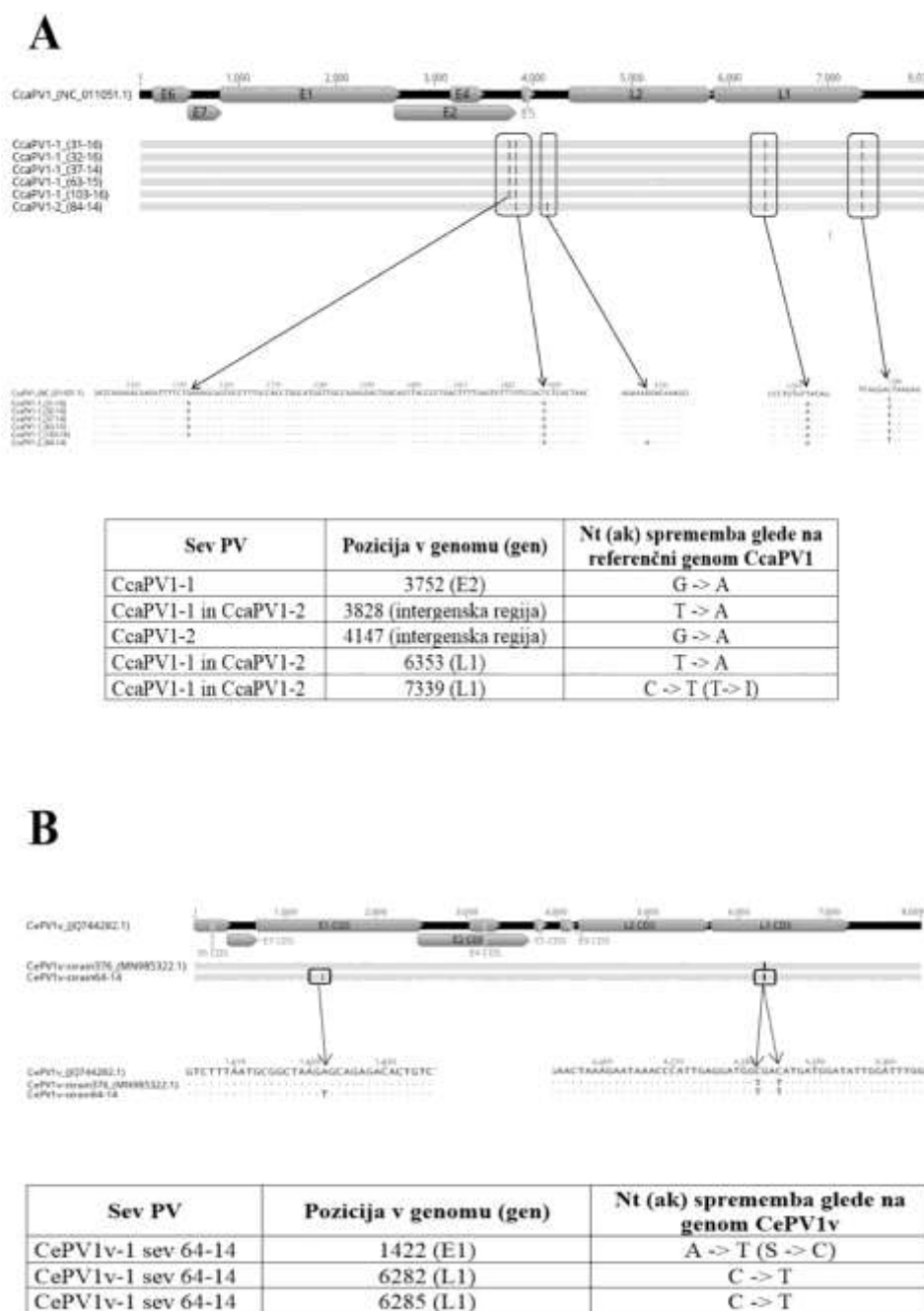
odstotna podobnost). Tri nukleotidne zamenjave so se nahajale v kodirajočih regijah znotraj genov E2 in L1 (ena znotraj gena E2 in dve znotraj gena L1). Dve nukleotidni zamenjavi, ena v genu E2 in ena v genu L1 na genomski poziciji 6.353, sta bili sinonimni; ena nukleotidna zamenjava v genu L1 na genomski poziciji 7.339 pa je bila asinonimna. En PV genom srne (CcaPV1-2 (84-14)) se je razlikoval od preostalih petih CcaPV1-1 genomov srne v dveh nukleotidnih zamenjavah, od katerih se je ena nahajala v kodirajoči regiji na genu E2, kar ima za posledico sinonimno zamenjavo. V primerjavi z referenčnim genomom CcaPV1 se je genom CcaPV1-2 (84-14) razlikoval v štirih nukleotidnih zamenjavah (99,95-odstotna podobnost). Dve nukleotidni zamenjavi sta se nahajali znotraj kodirajoče regije na genu L1. Ena nukleotidna zamenjava na genomski poziciji 5.353 je bila sinonimna in ena nukleotidna zamenjava na genomski poziciji 7.339 je bila asinonimna (**Slika 14a**).

Genom PV pri navadnem jelenu CePV1v (64-14) smo poravnali z genomoma CePV1v (JQ744282 in MN985322). Analiza poravnave je pokazala, da se genom CePV1v (64-14) od genoma CePV1v (JQ744282) razlikuje v treh nukleotidnih zamenjavah (99,96-odstotna podobnost). Nukleotidne zamenjave so se nahajale znotraj kodirajočih regij na genu E1 in L1, ena asinonimna nukleotidna zamenjava na genu E1 na genomski poziciji 1.422 in dve sinonimni nukleotidni zamenjavi na genu L1 na genomski poziciji 6.282 in 6.285 (**Slika 14b**). Genom CePV1v (64-14) se je od genoma CePV1v_strain376 (MN985322) razlikoval v eni asinonimni nukleotidni zamenjavi (99,99-odstotna podobnost) na genu E1 (**Slika 14b**).

Tabela 11: Rezultati sekvenciranja celotnih PV genomov in statistični podatki o odčitkih

Table 11: Results of the whole-genome sequencing of PV genomes and assembly statistics

PV sev	Število vseh odčitkov	Število odčitkov,	Povprečna dolžina
		ki so se prilegali na sestavljen genom	odčitkov, ki so se prilegali na sestavljeno genom
CcaPV1-1 (31-16)	197.354	312	326
CcaPV1-1 (32-16)	229.894	737	302
CcaPV1-1 (103-16)	206.940	1.519	279
CcaPV1-1 (63-15)	213.479	241	309
CcaPV-1 (37-14)	254.725	380	292
CcaPV1-2 (84-14)	317.345	636	278
CePV1v-1 (64-16)	2.867.278	10.010	282



Slika 14: Poravnava genomov PV pri srni (A) in navadnem jelenu (B) z referenčnim genomom CcaPV1 in genomom CePV1v s poudarkom na porazdelitvi nukleotidnih substitucij, ki so podrobno opisane v tabelah (nt: nukleotid, ak: aminokislina).

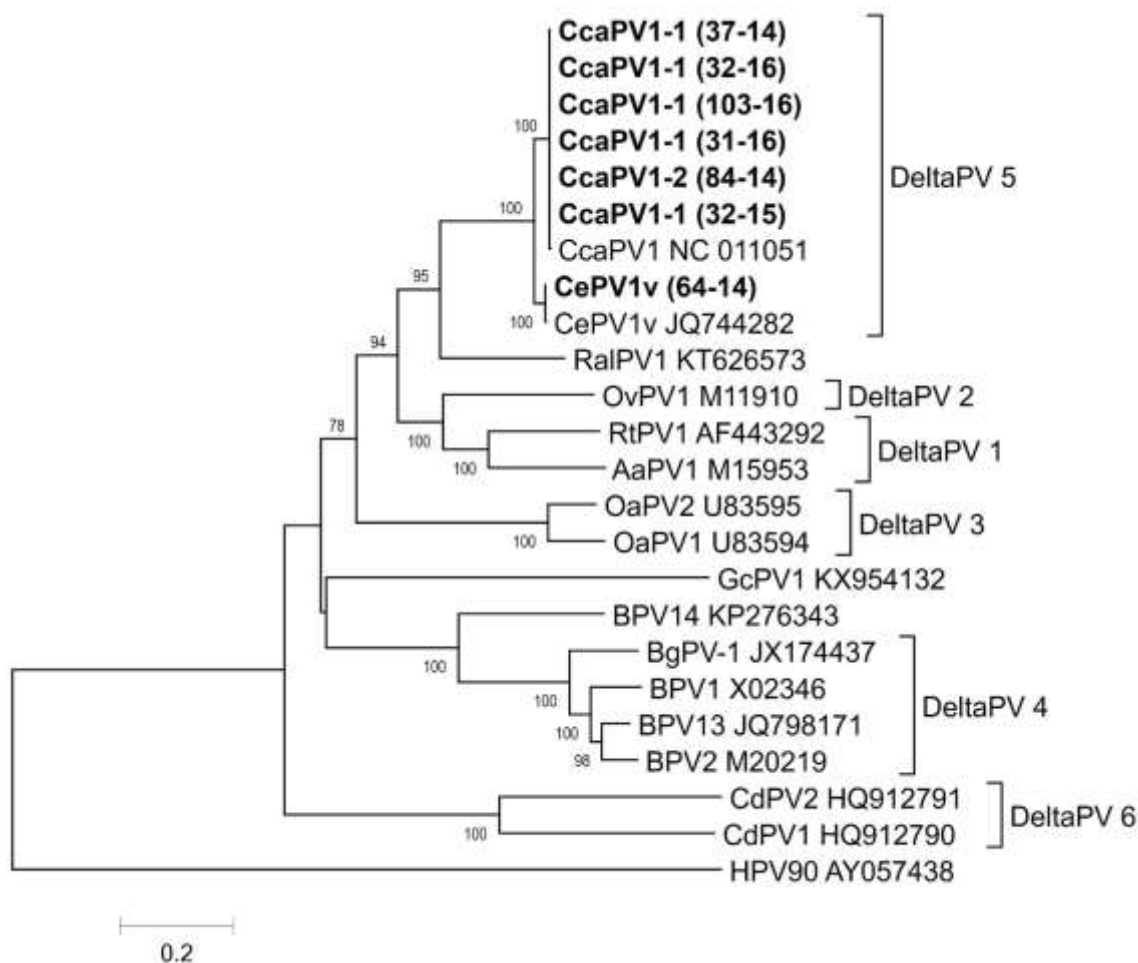
Figure 14: Multiple alignments of roe (A) and red deer (B) PV genomes from this study compared to the reference CcaPV1 genome and CePV1v genomes, respectively, highlighting the distribution of nucleotide substitutions, which are described in detail in the tables. Nt: nucleotide, aa: amino acid.

4.2.4 Genetska raznolikost gena L1

Klasifikacija PV temelji na analizi poravnave nukleotidnih zaporedij gena L1. Analiza poravnave nukleotidnih zaporedij gena L1 je pokazala, da PV pri srni pripadajo tipu CcaPV1, pri navadnem jelenu pa tipu CePV1v. Nukleotidno zaporedje gena L1 se je pri vseh šestih PV srn od referenčnega genoma CcaPV1 razlikovalo za 0,13 %. Nukleotidno zaporedje gena L1 se je pri PV navadnega jelena od genoma CePV1v (JQ744282) razlikovalo za 0,13 %. Na podlagi primerjave genetskih razdalj v genu L1 lahko preiskovane PV seve pri srnah opredelimo v dve novi podtipskih različici CcaPV1, in sicer CcaPV1-1 (sevi 31-16, 32-16, 103-16, 63-15 in 37-14) in CcaPV1-2 (sev 84-14). Prav tako lahko preiskovani PV sev pri navadnem jelenu opredelimo kot novo podtipsko različico CePV1, in sicer CePV1v-1 (sev 64-14).

4.2.5 Filogenetska analiza

Filogenetska analiza je potrdila, da PV pri srni in navadnem jelenu, ki smo jih vključili v raziskavo, spadajo v vrsto *Deltapapillomavirus 5*. Pri srnah smo ugotovili prisotnost tipa CcaPV1, pri navadnem jelenu pa tipa CePV1v (**Slika 15**).



Slika 15: Filogenetsko drevo NJ z evolucijskim modelom (T92 + G) združenih zaporedij genov E1, E2, L1 in L2. Zanesljivost filogenetskega drevesa smo ocenili z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. Vrednosti samovzorčenja pod 70 niso prikazane. Slovenski sevi PV so označeni odebeljeno.

Figure 15: NJ phylogenetic tree with the (T92+G) substitution model of the concatenated E1, E2, L1 and L2 gene sequences. Statistical support for the phylogenetic tree was evaluated by bootstrapping based on 1000 repetitions. Bootstrap values lower than 70 are not shown. The Slovenian PV strains are indicated in bold.

4.2.6 Pregled podatkov arhivskih vzorcev

Pregledali smo podatke arhivskih vzorcev papilomatoze pri srni in navadnem jelenu od leta 1998 do danes. Ugotavljamo, da se papilomatoza pri srni pojavlja ves čas in je prisotna v vzhodni Sloveniji in vzhodnemu delu osrednje Slovenije (**Slika 6**), medtem ko se pri navadnem jelenu pojavlja zelo redko. Oba zabeležena primera sta bila ugotovljena v južni Sloveniji (LPN Medved leta 2003 in LD Velike Lašče leta 2016). Med letoma 2007 in 2011 (**Tabela 12**, primeri pod zaporednimi številkami 4, 5, 6 in 7) diagnostika bolezni temelji na klinični sliki in

histopatološki preiskavi. Pri omenjenih vzorcih so bili na voljo tudi parafinski bloki (p.b.), na katerih pa so bili rezultati PCR testa kljub preizkušeni metodi (opisani v poglavju »3.3.2 Določanje prisotnosti virusne DNA z metodo PCR v arhivskih vzorcih«) negativni. Sklepamo, da je razlog v starosti parafinskih blokov. **Tabela 12** prikazuje pregled podatkov arhivskih vzorcev.

V okviru preiskave arhivskih podatkov smo ugotovili pri treh primerih fibropapilomatoze postavitev diagnoze na osnovi patoanatomske in histopatološke slike (**Tabela 12**; primeri pod zaporednimi številkami 1, 2 in 3), pri štirih primerih na osnovi patoanatomske in histopatološke slike in so bili v arhivu na razpolago tudi vzorci za možnost testiranja s PCR (**Tabela 12**; primeri pod zaporednimi številkami 4, 5, 6 in 7), v enem primeru je bila postavljena diagnoza samo na osnovi patoanatomske slike (**Tabela 12**; primer pod zaporedno številko 8). Pri primerih od 9 do 15 je postavitev diagnoze temeljila na osnovi patoanatomske in histopatološke slike ter molekularnih preiskav (PCR in NGS).

Tabela 12: Pregled podatkov arhivskih vzorcev in rezultat PCR za papilomatozo

Table 12: Examination of archival samples and result of PCR for papillomatosis

Zaporedna številka	Vzorec	Leto	Živalska vrsta	Starost	Spol	Lovišče	Način diagnostike	PCR
1.	67/98 PP859/98	1998	srna	4 leta	samec	LD Kostanjevica	Patoanatomska in histopatološka preiskava	n.d.
2.	147/00 PP171/00	2000	srna	2 leti	samica	LD Veliki Podlog	Patoanatomska in histopatološka preiskava	n.d.
3.	195/03 PP1015/03	2003	jelen	7 mesecev	samec	LPN Medved	Patoanatomska in histopatološka preiskava	n.d.
4.	34/07 PP558/07	2007	srna	1 leto	samica	LD Pšata	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR) preiskava *	neg.
5.	58/08 PP800/08	2008	srna	8 let	samec	LD Šentjur	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR) preiskava *	neg.
6.	31/10 PP466/10	2010	srna	starejša žival	samica	LD Ivanjkovci	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR) preiskava *	neg.
7.	34/11 PP667/11	2011	srna	1 leto	samica	LD Raka	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR) preiskava *	neg.
8.	54/12	2012	srna	4 leta	samica	LPN Fazan	Patoanatomska preiskava	n.d.

9.	37/14	2014	srna	2 leti	samec	LD Domžale	Patoanatomska in molekularna (PCR+NGS) preiskava **	poz.
10.	63/15	2015	srna	6 let	samica	LD Brezovica	Patoanatomska in molekularna (PCR+NGS) preiskava **	poz.
11.	84/14 PP 1/15	2014	srna	3 leta	samec	LD Videm	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR+NGS) preiskava **	poz.
12.	31/16 PP765/16	2016	srna	6 let	samec	LPN Fazan	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR+NGS) preiskava **	poz.
13.	32/16 PP777/16	2016	srna	3 leta	samec	LD Globoko	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR+NGS) preiskava **	poz.
14.	103/16 PP2205/16	2016	srna	5 let	samica	LD Videm	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR+NGS) preiskava **	poz.
15.	64/16 PP1568/16	2016	jelen	1 leto	samica	LD Velike Lašče	Patoanatomska, histopatološka in molekularna (PCR+NGS) preiskava **	poz.

(*) – PCR preiskava je bila opravljena v okviru doktorske naloge iz rezin vzorcev parafinskih blokov.

(**) – NGS je bil opravljen v okviru doktorske naloge.

n.d. – Ni bilo delano.

(*) – The PCR testing was performed as part of a doctoral dissertation from sample slices of paraffin blocks.

(**) – NGS was performed as part of doctoral dissertation.

n.d. – was not performed.

5 RAZPRAVA

5.1 POKSVIRUSI IN KUŽNI EKTIM PRI GAMSU

Za predstavnike družine *Poxviridae* je značilno, da proteini predstavljajo 90 % teže virusnega delca. Odvisno od vrste genomi poksvirusov kodirajo med 150 in 300 proteinov. V virusnem delcu najdemo približno 100 proteinov. Virusni delci vsebujejo številne encime, ki sodelujejo pri transkripciji DNA ali modifikaciji proteinov ali aminokislin. Virusni delci z ovojnico vsebujejo polipeptide v lipidnem dvosloju, ki obkrožajo virusni delec. Proteini, ki se nahajajo v osrednjem delu virusnega genoma, so odgovorni za virusno replikacijo, medtem ko so proteini, ki se nahajajo bolj v terminalnem območju genoma, vpleteni v imunski odgovor gostitelja (13, 158). Osrednji del genoma ORFV vsebuje homologne gene virusa vakcinije (rod *Orthopoxvirus*), ki so vpleteni v replikacijo in transkripcijo genoma, gene, odgovorne za strukturo in morfogenezo virusa, in homologne proteine, ki so vgrajeni v membrano virusa. Posebnost ORFV osrednjega dela genoma je odsotnost dveh genov VACV D9R in VACV F15R, ki sta značilna za vse predstavnike poddružine *Chordopoxvirinae*. Terminalni del genoma parapoksvirusov predstavlja približno 20 % celotnega genoma. Tu najdemo gene, ki jih povezujejo s patogenezo in z virulenco (159, 160). Primerjava predvidenih proteinskih zaporedij treh v celoti sekvenciranih izolatov ORFV (NZ2, pristopna številka DQ184476; SA00, pristopna številka AY386264; IA82, pristopna številka AY386263) je pokazala določeno stopnjo medizolatne sekvenčne variacije, ki niso značilne za poddružino *Chordopoxvirinae*. Povprečna predvidena podobnost aminokislinskega zaporedja najbolj variabilnih genov izolatov NZ2, SA00 in IA82 je bila le 80-odstotna. Večine teh genov ne najdemo pri preostalih poksvirusih in imajo še neznano vlogo (161). Pri ORFV najdemo dva proteina, ki sta ortologa ovojničnim glikoproteinom vseh poksvirusov sesalcev. To sta proteina A33R in A34R. Protein A33R je tarča nevtralizacijskih protiteles, kar bi lahko pomenilo, da medizolatne variacije predstavljajo »pobegle mutante« in omogočajo ORFV ponovne okužbe živali, ki so bolezen že prebolele. Prav tako domnevajo, da imajo nekatere variacije med izolati ORFV proteinov pomembno vlogo pri vrstni specifičnosti gostitelja (161). Parapoksvirusi nimajo nekaterih genov, ki so ohranjeni pri večini predstavnikov poddružine *Chordopoxvirinae* in imajo vlogo pri metabolizmu nukleotidov. Pri parapoksvirusih tudi ne najdemo Ser/Thr

protein kinaze, inhibitorja serinskih proteaz in kelch podobnega gena (angl. *Kelch-like gene*), ki so odgovorni za vnetni odgovor gostitelja, apoptozo, aktivacijo komplementa in koagulacijo (162). Pri pasažah virusa na celični kulturi je ORFV podvržen prerazporeditvi terminalnega dela genoma. Podobne prerazporeditve terminalnega dela genoma so opazili tudi pri drugih poksvirusih. Pri virusnih izolatih ORFV, ki so bili podvrženi večjemu številu pasaž na celični kulturi, so opazili večja ITR območja na genomu ter podvojitev ali izgubo določenih genov (163).

V Sloveniji smo z metodo PCR in s sekvenciranjem kratkega odseka virusnega genoma že dokazali prisotnost virusov ORF pri gamsih s kužnim ektimom ter ugotovili, da so ti sevi v 391 bp dolgem odseku genoma najpodobnejši virusnemu sevu ORF, ugotovljenem pri ovcah. Rezultati sekvenciranja virusnih izolatov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 s tehnologijo Illumina so pokazali, da je genom ORFV 82/13 dolg 138.559 bp, medtem ko je genom ORFV 12/17 dolg 138.459 bp. Vsebnost gvanina in citozina je bila pri ORFV 82/13 64,8 %, pri ORFV 12/17 pa 64,2 %. Vsak izmed obeh genomov je sestavljen iz 131 genov, kar je značilno za predstavnike virusov Orf. Na obeh koncih genoma smo ugotovili območji terminalnih invertiranih ponovitev dolžine približno 3.460 bp. Osrednje regije virusa ORFV pri gamsih so tvorile svojo filogenetsko podskupino na filogenetskem drevesu, prav tako so tvorile svojo filogenetsko podskupino ORFV pri ovcah in kozah, medtem ko terminalne regije virusa ORFV niso tvorile filogenetske podskupine glede na živalsko vrsto. Na podlagi filogenetske analize smo ugotovili, da so preiskovani virusni izolati najbolj podobni ovčjim in kozjim sevom. Na nivoju celotnega genoma se ORFV 82/13 in ORFV 12/17 od drugih virusov Orf razlikujeta od 7,61 % za ovčji sev NZ2 do 11,62 % za kozji sev NP. Glede na rezultate filogenetske analize sklepamo, da ne gre za iste ovčje in kozje seve, saj so osrednje regije preiskovanih virusnih izolatov virusa Orf pri gamsu tvorile svojo filogenetsko podskupino, prav tako so jo tvorili tudi ovčji in kozji sevi. Trenutno je v bazi NCBI GenBank na voljo premajhno število nukleotidnih zaporedij celih genomov virusnih sevov virusa Orf pri gamsih, da bi lahko izvedli ustrezno primerjavo. Če bi želeli dokazati, da gre za enake seve kot pri ovcah in kozah, bi morali določiti nt zaporedje tudi ovčjim in kozjim sevom, ki se pojavljajo v Sloveniji, ter jih primerjati z zaporedji pri gamsih. Ovčje in kozje seve, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, smo povzeli po članku Li in sodelavcev ter izvirajo iz Kitajske, z Nove Zelandije, iz Združenih držav Amerike in Nemčije (151). Iz NCBI GenBank smo pridobili vse dostopne genome virusov ovčjih in

kozjih sevov Orf. Prav tako je mogoče, da se v Sloveniji pojavljajo drugačni ovčji in kozji sevi, kot so evidentirani v genski banki NCBI GenBank, in so dejansko enaki kot pri gamsih, vendar tega na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo trditi. Za podrobnejšo analizo in primerjavo genomov virusnih izolatov gamsov, ovc in koz bi bile potrebne nadaljnje raziskave, ki presegajo obseg in namen naše raziskave.

Do prenosa kužnega ektima pri gamsih bi lahko prišlo tudi na paši, kjer si domači prežvekovalci in gamsi delijo habitat, kot poročata Veternik in Zadnik (66). Rezultati filogenetskih analiz, opravljenih v tej raziskavi, kažejo, da so virusni izolati pri gamsih in ovcah ter kozah sicer podobni, vendar na filogenetskem drevesu tvorijo svoje podskupine. Za potrditev te domneve bi bile potrebne nadaljnje raziskave genomov ovčjih in kozjih sevov virusov Orf, ki se pojavljajo v Sloveniji. Prav tako je mogoče, da se bolezen v populaciji gamsov pojavlja pogostejše, kot kažejo naši rezultati. Novih vzorcev, ki bi to potrjevali, v času raziskave nismo prejeli. Slednje je lahko posledica dobre ozaveščenosti lovcev na območjih, kjer se bolezen pojavlja. Ti bolezenske znake kužnega ektima prepoznajo in se jim ne zdi potrebno, da bi pošiljali vzorce v dodatne preiskave.

Za ugotavljanje stopnje prekuženosti populacije gamsov z virusom Orf smo uporabili SNT za dokazovanje prisotnosti protiteles proti virusu Orf. Testirali smo 40 vzorcev serumov gamsov. Rezultati testa so bili pri 38 vzorcih negativni, pri 2 vzorcih pa je bil ugotovljen citotoksičen učinek na celično kulturo in rezultata ni bilo mogoče odčitati. Vzorci serumov gamsov, ki smo jih vključili v SNT, so bili odvzeti od navidezno zdravih živalih pri rednem odstrelu na območjih, kjer se kužni ektim pri gamsih pojavlja, in sicer v Triglavskem narodnem parku z okolico in na območju Kamniško-Savinjskih Alp. Kri je bila odvzeta ob čiščenju trupa uplenjene živali iz srca v skladu z navodili in medicinskimi pripomočki, s katerimi smo opremili lovce (**Priloga 1**). V SNT nismo vključili serumov gamsov, pri katerih je bila izražena klinična slika. Razlog je logistične narave, saj sta trupli obeh živali s kliničnimi znaki od odstrela do prihoda na IPDRČ VF potovali dva dni oziroma tri. V tem času je prišlo do hemolize krvnih vzorcev, zaradi česar sta bila vzorca neuporabna za laboratorijsko preiskavo. Diagnostika in serološko spremljanje stanja bolezni pri prostoživečih živalih sta izredno težka in podvržena številnim nepredvidljivim dejavnikom (vstopnemu mestu projektila, času odvzema vzorca po odstrelu, čistosti odvzema vzorca, psihični in fizični utrujenosti lovca, transportu vzorca ...). Vsak vzorec, ki smo ga dobili in je bil primeren za nadaljnjo diagnostiko, je bil za nas

neprecenljive vrednosti. Prav zaradi težav z zbiranjem vzorcev, predvsem visokogorskih vrst prežvekovalcev, je v dostopni literaturi zelo malo raziskav s področja serološkega monitoringa bolezni pri prostoživečih živalih (5, 6).

Pri okužbi z virusom Orf je pri imunskem odzivu zelo pomembna celična imunost, ki je večinoma omejena na mesto vdora virusa ter periferne bezgavke (80, 81). Prav tako pride do nastanka protiteles, vendar v zelo nizkih titrih, ki so težje zaznavni ali sploh niso zaznavni s SNT (90, 164). Na podlagi tega lahko pojasnimo, zakaj v preiskovanih vzorcih seruma nismo ugotovili prisotnosti nevtralizacijskih protiteles. Vsi testirani vzorci serumov gamsov s SNT so bili negativni. Vikøren in sodelavci so v svoji raziskavi prišli do podobnih rezultatov pri preučevanju kužnega ektima s SNT pri moškatnem govedu (8). Rezultate SNT pojasnjujejo s šibkim imunskim odzivom živali med izbruhom bolezni in po njem. Prav tako ne izključujejo možnosti, da so bili vzorci krvi obolelih živali pridobljeni pred serokonverzijo (8). O nizkih titrih nevtralizacijskih protiteles poročajo tudi Zarnke in sodelavci pri moškatnem govedu na Aljaski (90). Haig in sodelavci (81) glede na rezultate svoje raziskave sklepajo, da virus preko imunomodulatornih proteinov vpliva na imunski sistem gostitelja z vsaj kratkotrajno inhibicijo njegovega imunskega odgovora na infekcijo. Prisotnost virusnih imunomodulatorjev bi pojasnila tudi relativno nizko vrednost številnih citokinov v aferentni limfi med samo infekcijo z virusom v celicah epidermisa, kljub temu da so epidermalne celice iz sprememb med okužbo sposobne proizvesti citokine v celični kulturi. Glede na to, da se je pri primarnih infekcijah virus določeno obdobje sposoben replicirati pred zadostnim imunskim odgovorom gostitelja ter s proizvodnjo vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) še poveča število tarčnih celic, prav tako lahko proizvede veliko količino imunomodulatornih proteinov še pred zadostnim imunskim odgovorom gostitelja (81).

Največje populacije gamsa naseljujejo predvsem severozahodni del Slovenije na območjih Triglavskega narodnega parka ter Kamniško-Savinjskih Alp. Z vidika zdravstvenega stanja se v populaciji gamsov pojavljata predvsem dve bolezni, ki pomembno vplivata na velikost populacije. To sta garjavost, ki jo povzroča zunanji zajedavec *Sarcoptes scabiei* var. *rupicaprae* (165), in kužna gamsja slepota, ki jo najverjetneje povzročajo mikoplazme (166). Garje se pojavijo predvsem v večjih in gostejših populacijah, kar privede do etoloških, reprodukcijskih in prehranskih motenj. Podobne ugotovitve za pojav kužnega ektima opisuje že leta 1981 Valentinčič (67). Iz arhiva IPDRČ je razvidno, da so garje v Sloveniji prisotne vsako leto že

več desetletij, medtem ko kužna slepota ni bila ugotovljena že več kot dve desetletji. Podobno kot garje se redno pojavlja tudi kužni ektim, ki pa ima glede na naš pregled arhiva ciklično pojavljanje oziroma bolezni ne zaznavamo vsako leto. V nasprotju z garjami, ki se pojavljajo v obliki epizootije, se kužni ektim pojavlja sporadično, zlasti v zimskem času.

Pojav kužnega ektima povezujejo s telesno odpornostjo živali ter stresom, ki je predvsem posledica poseganja človeka v naravni habitat živali (87, 167–169). Do izbruha bolezni pride, ko se življenjske razmere poslabšajo in se naravno ravnovesje znotraj populacije poruši. Prevelike populacije, pomanjkanje hrane, klimatske spremembe in stres, ki ga povzroča prisotnost ljudi, pomembno pripomorejo k pojavu bolezni (48, 49, 58, 168). Vse več raziskav kaže tudi na pomemben vpliv sprememb vegetacije na številčnost populacij prostoživečih živali, med drugim tudi gamsa (168). Številna bolezenska stanja in opisane spremembe ne povzročijo neposrednega pogina živali, vendar pa toliko oslabijo organizem, da odprejo možnost vdora drugim boleznim v populacijo, med drugim tudi kužnemu ektimu (170). Obdobju pojava kužnega ektima pri domačih in prostoživečih prežvekovalcih bi bilo v prihodnje treba posvetiti več pozornosti, saj je verjetno prav takrat največja možnost prenosa povzročitelja med živalmi iste vrste znotraj populacije in med živalmi različnih vrst. Hkrati pa je takrat tudi večja možnost ugotavljanja virusa ter sorodnosti virusa med vrstami. Kot smo že omenili, je prav pridobivanje ustreznega materiala tista šibka točka, ki trenutno onemogoča podrobnejšo analizo kužnega ektima.

Iz arhiva IPDRČ je razvidno, da je bil prvi primer kužnega ektima pri gamsu ugotovljen leta 2001. Verjetno pa se je bolezen pojavljala že prej in je bila klasificirana kot papilomatoza. Leta 2006 in leta 2007 je bil ugotovljen po en primer, leta 2011 dva primera ter v letih 2013 in 2017 po en primer kužnega ektima pri gamsu. Pri primerih iz let 2001, 2006 in 2007 je bila diagnoza postavljena na podlagi klinične slike ter patoanatomske in histopatološke slike. Parafinskih blokov za morebitne nadaljnje molekularne preiskave ni bilo na voljo. Pri dveh primerih iz leta 2011 je bil prvič opravljen tudi PCR test za dokazovanje nukleinske kisline virusov Orf iz histoloških rezin, ki je bil v obeh primerih pozitiven. Iz vzorcev kužnega ektima gamsov iz leta 2013 in leta 2017 smo diagnozo bolezni na podlagi klinične slike, patoanatomske preiskave in histopatološke preiskav potrdili s PCR in tudi določili celotna genoma izolatov virusov Orf. Čeprav sta klinična slika in histopatološka slika za bolezen značilni, je za dokončno potrditev diagnoze kužnega ektima vedno potrebna preiskava s PCR.

5.2 PAPILOMAVIRUSI IN PAPILOMATOZA PRI SRNI IN NAVADNEM JELENU

Kljub široki razširjenosti srne in navadnega jelena po celotni evropski celini in širše najdemo v znanstveni literaturi le skope podatke o razširjenosti PV in genetski spremenljivosti PV genomov pri omenjenih živalskih vrstah. Prvi primer fibropapilomatoze pri prostoživeči srni v Evropi je opisal Kocsner na Madžarskem v zgodnjih šestdesetih letih prejšnjega stoletja (124). Edino karakterizacijo celotnega genoma virusa pri srni tipa CcaPV-1, ki je pripadal rodu *Deltapapillomavirus 5*, so opravili Erdélyi in sodelavci leta 2008 (103). Erdélyi leta 2010 opisuje endemsko porazdelitev fibropapilomatoze pri srni in nizko prevalenco bolezni, ki je omejena na Panonsko kotlino (122). Kasneje so primere fibropapilomatoze pri srni klinično in histopatološko diagnosticirali tudi v Srbiji (171) in na Hrvaškem (172), medtem ko so pojav bolezni na Češkem (173) in Slovaškem (16) potrdili s pomočjo metode PCR.

O fibropapilomatozi pri navadnem jelenu poročajo iz Italije, Španije, Francije, Anglije, Avstrije, Madžarske in Portugalske (22, 122, 174, 175). Scagliarini in sodelavci so leta 2013 prvi izvedli karakterizacijo celotnega genoma PV (CePV-1v) pri navadnem jelenu, ki je spadal v rod *Deltapapillomavirus 5* (22). Nedavno so Gallina in sodelavci opisali dva celotna genoma CePV-1v pri navadnem jelenu v Italiji, ki sta bila 100-odstotno identična (175).

V naši nalogi opisujemo primere fibropapilomatoze pri srni ($n = 6$) in navadnem jelenu ($n = 1$), vključno s celotnim genomskim sekvenciranjem PV vseh vzorcev, ki so bili poslani na IPDRČ VF od leta 2014. Neoplastične spremembe pri vseh sedmih vzorcih so bile diagnosticirane kot fibropapilomatoza na podlagi klinične slike, patoanatomske preiskave in opravljene histopatologije, kar ustreza rezultatom v preteklosti opravljenih raziskav v Evropi (3, 16, 22, 104, 122, 175). S pomočjo metode PCR smo DNA PV zaznali v vseh sedmih tkivnih vzorcih. Velikost in število neoplastičnih sprememb kot tudi patoanatomska in histopatološka slika preiskovanih primerkov so se ujemali s preteklimi opisi in študijami PV pri srni in navadnem jelenu. Na podlagi tega lahko sklepamo, da so čvrste, okrogle, pigmentirane, običajno neodlakane in erodirane ali ulcerirane spremembe značilne za fibropapilomatozo, ki je posledica okužbe s CcaPV1 (*Deltapapillomavirus 5*) pri srni. Nahajajo se lahko kjerkoli na trupu. Medtem ko so pri navadnem jelenu za fibropapilomatozo značilne okrogle (cvetačastega videza), pigmentirane in brezdlačne lezije, ki so posledica okužbe s CePV1v

(*Deltapapillomavirus* 5). Lezije se nahajajo predvsem na notranji strani zadnjih okončin in trebušnem področju. Iz preteklih poročil je razvidno, da se bolezen pri srni pojavi predvsem pri starejših osebkih, medtem ko se pri navadnem jelenu bolezen manifestira predvsem pri mlajših osebkih (3, 16, 104, 173). Do podobnih zaključkov smo prišli po analizi arhivskih vzorcev tudi v naši nalogi. Arhivska poročila o diagnostiki vzorcev, ki so jih poslali na pregled na VF slovenski lovci in jih opisali kot fibropapilomatozo pri srni in navadnem jelenu, nakazujejo, da je bila bolezen v vzhodnih delih Slovenije prisotna že od leta 1996. Ker so se prvi klinični primeri bolezni pojavili na meji med Slovenijo in Madžarsko, sklepamo, da se je okužba prenesla iz Madžarske. Do leta 2014 je diagnostika fibropapilomatoze v Sloveniji slonela zgolj na patoanatomski in histopatološki preiskavi, po tem obdobju se za dokazovanje okužb s PV pri srni in navadnem jelenu uporablja tudi PCR. V Evropi so fibropapilomatozo pri jelenu do danes potrdili v Veliki Britaniji (176, 177), Španiji (178), Italiji (22), Avstriji (104), Franciji (104), na Madžarskem (104) in Portugalskem (174).

Velikost populacije srne v Sloveniji je ocenjena približno na 110.000 osebkov (33, 39). Številčnost ali gostota populacije srne je večja na nižinskih območjih osrednje in vzhodne Slovenije (29). Vsi potrjeni primeri fibropapilomatoze v Sloveniji so izhajali s teh območij. Podobno opažajo tudi Rajsčý in sodelavci, ki menijo, da je pojavnost fibropapilomatoze večja v loviščih z večjo gostoto populacije srn (16). Okužbe srn s PV se v Sloveniji pojavljajo sporadično in ne endemsko, kot je značilno za Madžarsko (3) ali Slovaško (16).

Velikost populacije navadnega jelena v Sloveniji je ocenjena približno na od 11.000 do 14.000 osebkov (33, 39). Do danes sta bila v Sloveniji potrjena dva primera fibropapilomatoze pri navadnem jelenu. Diagnostika vzorca iz leta 2003 temelji na klinični sliki, patoanatomski preiskavi in histopatologiji, medtem ko je bila pri vzorcu iz leta 2016 poleg omenjenih preiskav diagnoza potrjena tudi z molekularno preiskavo. Zdi se, da se fibropapilomatoza pri navadnem jelenu v Sloveniji pojavlja izredno redko. Podobno o nizki pojavnosti primerov virusnih fibropapilomov pri navadnem jelenu poročajo iz različnih evropskih državah (22, 104, 174), kar kaže na izredno nizko stopnjo prenosa PV med živalmi znotraj populacije. Sporadično pojavljanje je nekoliko nenavadno, saj je jelen čredna žival, zato bi pričakovali pogostejše prenose bolezni med živalmi. Ravno nasprotno opažajo nekoliko večjo pojavnost fibropapilomatoze pri srni, ki pa je samotarka. Razlog za to je verjetno veliko število živali v evropskem prostoru, med drugim tudi v Sloveniji. Glavni vzrok za manjšo pojavnost

fibropapilomatoze pri navadnem jelenu je verjetno tudi manjše število fibropapilomov na koži in njihova majhnost v primerjavi s klinično sliko pri srni, kar je težje opaziti oziroma med lovci ne spodbudi potrebe po pošiljanju sprememb v preiskavo.

Na podlagi arhivskih podatkov IPDRČ je mogoče razbrati, da se bolezen pri srni zelo počasi širi iz vzhodnih delov v osrednji del Slovenije. V zahodnem delu Slovenije bolezen še ni bila opažena. Nenavaden je pojav obeh primerov v južni Sloveniji (območje Kočevja) pri navadnem jelenu. Na Madžarskem je prisotnost papilomatoze pri navadnem jelenu potrjena (104). Prav zaradi omenjenega bi pričakovali pojav bolezni ob madžarski meji, kjer poteka vsakodnevna migracija jelenjadi čez mejo. Na Hrvaškem Farkaš in sodelavci opisujejo fibropapilomatozo samo pri srni, medtem ko podatkov o fibropapilomatozi pri navadnem jelenu ni (172). To pa ne pomeni, da bolezen ni prišla k nam prav iz Hrvaške oziroma krajev v bližini južne meje.

PV imajo sicer počasno, a presenetljivo evolucijsko sposobnost. Splošno prepričanje o evolucijskem mehanizmu PV govori o zelo nizki stopnji mutacij, vrstni specifičnosti in kodivergenci z gostitelji (19, 23, 179, 180). Novejše raziskave predlagajo alternativne mehanizme, ki ženejo evolucijo PV, kot so prenos med vrstami, rekombinacije in filogenetske neskladnosti med virusi in njihovimi gostitelji (179–183). Splošni zaključki o evoluciji PV so morda še vedno nejasni in špekulativni, saj je znanje o pestrosti predvsem nehumanih vrst PV omejeno (105, 180, 181). Goveji tip BPV-1 in BPV-2, s katerima se običajno okuži govedo, sta primer prenosa povzročitelja ne samo med bližnjimi sorodnimi vrstami živali, ampak tudi med bolj oddaljenimi sorodnimi vrstami. S tipoma BPV-1 in BPV-2 se lahko okužijo tudi bizoni (*Bison bison*), bivoli (*Bubalus bubalis*), jak (*Bos grunniens*), žirafe (*Giraffa camelopardalis*), tapirji (*Tapirus*), črna grivasta antilopa (*Hippotragus niger*), konji (*Equus caballus*), osli (*Equus asinus*) in navadni jelen (*Cervus elaphus*) (22, 174, 184, 185). Domnevi, da je gonilna sila trenutne PV raznolikosti zgolj kodivergenca virus-gostitelj, nasprotujejo novejše raziskave, ki opisujejo okužbe daljno sorodnih vrst PV z istimi gostitelji, kar se pokaže na filogenetskem drevesu kot neskladje med virusi in njihovimi gostitelji (180–183). V naši študiji smo opazili zelo majhno variabilnost med genomoma tipa CcaPV1 (99,95-odstotna identičnost celotnega genoma v primerjavi s sekvencami, pridobljenimi iz NCBI GenBank) in različico genoma tipa CePV1 (99,96–99,99-odstotna identičnost celotnega genoma v primerjavi s sekvencami, pridobljenimi iz NCBI GenBank). Pet od šestih genomov CcaPV1 je bilo 100-odstotno identičnih. O podobnih rezultatih poročajo tudi Gallina in sodelavci, ki opisujejo dva 100-

odstotno identična genoma CePV1v (175). Ta ugotovitev je v skladu s splošno sprejetim evolucijskim mehanizmom PV in potrjuje zelo nizko stopnjo mutacij pri teh virusih (19, 23, 179, 180). Srna je v Sloveniji najbolj razširjena prostoživeča cervidna vrsta, ki poseljuje območja vse od obalne regije do zgornje gozdne meje. Najdemo jo v gozdovih in v okolici kmetijskih obdelovalnih površin ter tudi na odprtih poljih (26). Navadni jelen poseljuje bistveno manjša in prostorsko bolj izolirana območja. Najdemo ga tudi na območjih izven gozdov, kot so travniki in kmetijska polja, ki mu predstavljajo pomemben vir hrane (29). Ker si prostoživeče cervidne vrste delijo isti habitat kot domače pašne živali, je prenos nalezljivih povzročiteljev, tudi PV, med njimi povsem mogoč. Tako bi pri preiskovanih prostoživečih cervidnih vrstah lahko pričakovali tudi okužbe s tipom BPV, kar je bilo pri jelenu že opisano (20, 174). Kljub temu pri preiskovanih osebkih s fibropapilomatozo nismo zaznali koinfekcij z drugimi tipi PV, kar je v skladu s tradicionalnim evolucijskim prepričanjem o vrstni specifičnosti PV.

Obseg študij, ki preučuje prisotnost PV pri prostoživečih gostiteljih, je omejen (24, 105, 181), zato predstavlja vrzel v poznavanju evolucije in raznolikosti PV pri prostoživečih živalih. Primerjava PV L1 ORF sekvenc s sekvencami, pridobljenimi iz NCBI GenBank, pri srni kaže na nizko variabilnost (0,13 %), kar po de Villiersu in sodelavci spada v kategorijo < 2 % raznolikosti sekvenc (23). Sekvence bi na podlagi tega lahko opredelili kot CcaPV1 podtipsko različico. Do podobnih rezultatov smo prišli tudi pri PV L1 ORF sekvencah pri navadnem jelenu in bi jih prav tako lahko opredelili kot podtipsko različico CePV1v.

6 SKLEPI

Hipotezo »Na podlagi nukleotidnega zaporedja celotnega genoma virusa Orf pri gamsih nameravamo dokazati, da je ta najbolj podoben virusnim sevom Orf, ugotovljenih pri ovcah« **smo potrdili.**

- Z metodo NGS (Illumina) smo prvi določili dva skoraj celotna genoma (angl. *nearly complete genome*) ORFV 82/13 in ORFV 12/17 virusov Orf pri gamsih.
- Analiza poravnave nukleotidnih zaporedij celotnih genomov virusov Orf je pokazala, da se seva iz vzorcev gamsov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 med seboj razlikujeta v 16 nukleotidnih zamenjavah (99,93-odstotna podobnost). Na nivoju celotnih genomov sta se seva gamsov ORFV 82/13 in ORFV 12/17 od ovčjih in kozjih sevov virusov Orf, ki so na voljo v podatkovni zbirki NCBI GenBank, razlikovala od 7,61 % (ovčji sev NZ2, pristopna številka DQ184476) do 11,62 % (kozji sev NP, pristopna številka KP010355).
- Filogenetska analiza je pokazala, da virusa Orf pri gamsih ORFV 82/13 in ORFV 12/17 na filogenetskem drevesu osrednje regije (od gena 009 do 101) tvorita svojo filogenetsko podskupino. Na filogenetskem drevesu genov terminalne regije virusi Orf niso tvorili filogenetskih podskupin glede na živalsko vrsto.

Hipoteze »V populaciji gamsov nameravamo s serum nevtralizacijskim testom dokazati prisotnost protiteles proti virusom Orf in oceniti stopnjo prekuženosti populacije« **nismo potrdili.**

- S serum nevtralizacijskim testom prisotnosti protiteles proti virusu Orf v vzorcih serumov gamsov nismo dokazali.

Hipotezo »Kožne spremembe pri gamsih, značilne za bolezen kužni ektim, povzroča virus Orf« **smo potrdili.**

- Na podlagi pregleda arhivski podatkov smo ugotovili ciklično pojavljanje kužnega ektima pri gamsih v zadnjih dveh desetletjih. Pri gamsu je prvi opisan primer kužnega ektima na podlagi patoanatomske in histopatološke preiskave leta 2001, sledili so še primeri v letih 2006, 2007, 2011, 2013 in 2017.

- Diagnoza kužnega ektima pri gamsu, postavljena na podlagi značilne klinične, patoanatomske in histopatološke slike, je bila z uporabo metode PCR potrjena že pred to študijo v dveh primerih kužnega ektima iz leta 2011 in v dveh primerih iz leta 2013 (ORFV 82/13) in 2017 (ORFV 12/17). S pregledom arhivskih podatkov smo ugotovili še tri primere kužnega ektima v letih 2001, 2006 in 2007, pri katerih je bila diagnoza postavljena na podlagi klinične, patoanatomske in histopatološke slike, vendar ni bilo na voljo vzorcev za diagnostiko z metodo PCR, zato v teh primerih diagnoze kužnega ektima z molekularnimi metodami nismo mogli potrditi.

Hipotezo »Spremembe na koži v obliki gobastih, pecljatih tumorjev pri srnah in jelenih v Sloveniji povzročajo vrstno specifični papilomavirusi iz rodu *Deltapapilomavirus*, in sicer pri srni genotip CcPV-1 ter pri jelenu genotip CePV-1« **smo potrdili**.

- Z metodo NGS (Ion Torrent) smo določili nukleotidna zaporedja celotnih genomov šestih PV pri srni (CcaPV1 sev 37-14, CcaPV1 sev 84-14, CcaPV1 sev 31-16, CcaPV1 sev 32-16, CcaPV1 sev 63-15 in CcaPV1 sev 103-16) in enega PV pri navadnem jelenu (CePV1v sev 64-14).
- Nukleotidno zaporedje gena L1 se je pri vseh šestih PV srne od referenčnega genoma CcaPV1 razlikovalo za 0,13 %. Nukleotidno zaporedje gena L1 se je pri PV navadnega jelena od genoma CePV1v (JQ744282) razlikovalo za 0,13 %. Na podlagi primerjave genetskih razdalj v genu L1 lahko preiskovane PV seve pri srni opredelimo v dve novi podtipski različici CcaPV1, in sicer CcaPV1-1 (sevi 31-16, 32-16, 103-16, 63-15 in 37-14) in CcaPV1-2 (sev 84-14). Prav tako lahko preiskovani PV sev pri navadnem jelenu opredelimo kot novo podtipsko različico CePV1, in sicer CePV1v-1 (sev 64-14).

Druge ugotovitve:

- Na podlagi pregleda arhivski podatkov od leta 1998 do danes smo ugotovili, da se papilomatoza pri srni pojavlja ves čas in je prisotna v vzhodni Sloveniji in vzhodnem delu osrednje Slovenije, medtem ko se pri navadnem jelenu pojavlja zelo redko. Trenutno poznana primera sta vezana na južno Slovenijo, in sicer na območje Kočevja.

- Na podlagi arhivskih podatkov, ki so zajemali klinično sliko, patoanatomske in histopatološke preiskave, ki se je ujemala tudi z opisi tujih raziskovalcev, lahko sklepamo, da so ugotovljene klinične spremembe in spremembe, ugotovljene z omenjenimi preiskavami, značilne tako za kužni ektim pri gamsih kot tudi za papilomatozo pri srni in navadnem jelenu.

7 POVZETEK

Virusi iz družine *Poxviridae* spadajo med največje znane viruse predvsem zaradi bolezni, ki so jo povzročali pri ljudeh. V veterinarski medicini je poznan predvsem rod *Parapoxvirus*, kamor uvrščamo tudi povzročitelja kužnega ektima ali pustularnega dermatitisa. Bolezen je zelo nalezljiva in prizadene kožo domačih in prostoživečih živali. Bolezen uvrščamo med zoonoze. Človek se običajno okuži ob stiku z okuženo živaljo ali pa z mesom okužene živali. Kljub temu imamo v Sloveniji malo okužb z virusom Orf na letni ravni. Bolezen je samoomejujoča in običajno izzveni v nekaj tednih, če ne pride do zapletov. Pri gamsih se klinični znaki bolezni kažejo v obliki bolečih sprememb, ki se pojavijo predvsem na področju ustne votline, vimena in okončin. V Evropi so bolezen diagnosticirali pri številnih vrstah prostoživečih prežvekovalcev, vendar je podatkov o povzročitelju in pojavnosti malo.

V nalogi smo s pomočjo NGS sekvencirali skoraj celotna genoma virusa Orf pri gamsih in ugotovili, da so najbolj podobni virusnim sevom Orf pri ovcah. Za nadaljnjo analizo in ugotavljanje izvora bi bile potrebne dodatne preiskave in primerjave.

Do vdora virusa Orf v telo živali običajno pride z neposrednim stikom, imunski odgovor pa poteka večinoma lokalno in je omejen na periferne bezgavke, kar je po našem mnenju lahko vzrok, da nismo uspeli dokazati prisotnosti specifičnih protiteles s SNT v preiskovanih vzorcih.

S pregledom arhivskih podatkov smo ugotovili še tri primere kužnega ektima v letih 2001, 2006 in 2007, pri katerih je bila diagnoza postavljena na podlagi klinične, patoanatomske in histopatološke slike, vendar ni bilo na voljo vzorcev za diagnostiko s PCR, zato v teh primerih diagnoze kužnega ektima z molekularnimi metodami nismo mogli potrditi.

V študiji opisujemo primere fibropapilomatoze pri srni in navadnem jelenu, pri katerih je prišlo do klinične manifestacije bolezni, ki je značilna za okužbe s PV. V vseh primerih je bila prisotna PV DNA, ki smo jo potrdili z metodo PCR, čemur je sledilo sekvenciranje delnega gena L1 po Sangerju. Iz vseh preiskovanih vzorcev smo s pomočjo NGS določili celotne PV genome, ki so razkrili okužbe s podtipsko različico CcaPV-1 pri srni in podtipsko različico CePV1v pri navadnem jelenu. Primerjava sekvenc celotnih genomov tipa CcaPV1 in varianto tipa CePV1v je že na voljo v podatkovni bazi NCBI GenBank. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko rečemo, da PV izkazuje veliko genetsko stabilnost v času in prostoru.

8 SUMMARY

Viruses from the family Poxviridae are among the most known viruses, especially because of the diseases they caused in human medicine. In veterinary medicine, the genus *Parapoxvirus* is best known and also includes the virus of contagious ecthyma or pustular dermatitis. The disease is highly contagious and affects the skin of domestic and wild animals. The disease is classified as a zoonosis. Humans usually become infected by contact with an infected animal or by handling the meat of an infected animal. Nevertheless, in Slovenia we have only a few infections with the Orf virus on an annual basis. The disease is self-limiting and usually resolves within a few weeks if there are no complications. In chamois, the clinical signs of the disease are manifested in the form of painful lesions, which occur mainly in the oral cavity area, udder, and limbs. In Europe, the disease has been diagnosed in many wild ruminants species but data on the causative agent and incidence are scarce.

In the doctoral dissertation, we sequenced almost the entire genome of the Orf virus in chamois with the help of NGS and found that they are most similar to the Orf virus strains found in sheep. Further investigations and comparisons would be needed for further analysis and identification.

Invasion of the Orf virus into the animal host occurs by direct contact, the immune response is mostly local and is limited to peripheral lymph nodes which is why we were not able to detect the presence of specific antibodies with SNT in the samples.

By reviewing the archival data, we identified three additional cases of contagious ecthyma from 2001, 2006, and 2007 that were diagnosed based on the clinical, pathoanatomic, and histopathologic picture. No samples were available for diagnosis by PCR, so that in these cases the diagnosis of contagious ecthyma could not be confirmed by molecular methods.

The study describes fibropapillomatosis cases in roe deer and red deer with clinical manifestations that are typical of infection with PVs. In all cases, the presence of PV DNA was confirmed using PCR, followed by Sanger sequencing of the partial L1 gene. The complete PV genomes were determined in all the investigated samples using NGS, revealing infections of roe deer with the CcaPV1-type and red deer with the CePV1v-type variant. A comparison of the complete CcaPV1-type and CePV1v-type variant genome sequences reported here to

already available complete genome sequences available in NCBI GenBank revealed their great genetic stability over time and space.

9 ZAHVALE

Najlepša hvala Univerzi v Ljubljani ter Ministrstvu za izobraževanje, znanost in šport Republike Slovenije za financiranje doktorskega študija.

Mentorju izr. prof. dr. Gorazdu Venguštu in somentorici znan. sod. dr. Urški Kuhar sem hvaležen za vso pomoč, vodenje, strokovnost, nasvete, potrpežljivost in spodbudo pri izdelavi naloge.

Za temeljit pregled doktorske disertacije in nasvete se zahvaljujem članom strokovne komisije: prof. dr. Petru Hostniku, doc. dr. Urški Jamnikar Ciglencečki ter prof. dr. sc. Zdravku Janickemu.

Zahvaljujem se za naklonjenost in pomoč, ki sem je bil deležen pri osebju Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele in Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Zahvala gre tudi Lovski zvezi Slovenije in programski skupini P4-0092 za finančno podporo nalogi.

Zahvaljujem se tudi vsem lovskim družinam, ki so vestno pošiljale vzorce za doktorsko nalogo in veterinarskim ambulantam za shranjevanje vzorcev.

Za pregled referenc in literature se zahvaljujem mag. Brigiti Gresc Smole.

Za lektoriranje doktorske naloge se zahvaljujem gospe Marjani Jus.

Gospe Biljani Grubišić se zahvaljujem za angažiranost in pomoč pri urejanju birokratskih zadev.

Hvala mami in očetu, sestrici Urški in Brini za podporo, razumevanje in potrpežljivost pri izdelavi naloge. Urška, ti si na vrsti.

Iskrena hvala moji Kristini, ki je vedno verjela vame, me spodbujala in mi nudila podporo.

Hvala Matjažu in Romani, Žanu, Maruši in Uli, Urbanu in Tei, Nejcu in Piki za spodbudo in razumevanje.

10 LITERATURA

1. ZGS. Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2019 [Online]. Ljubljana : Zavod za gozdove Slovenije, marec 2020: 3 str. http://www.zgs.si/fileadmin/zgs/main/img/PDF/LETNA_POROCILA/2019_Porocilo_o_gozdovih.pdf (17. junij 2020)
2. Hlad B, Škoberne P, Orožen Adamič M, et al. Pregled stanja biotske raznovrstnosti in krajinske pestrosti v Sloveniji [Online]. Ljubljana : Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije, Agencija RS za okolje, 2002: 13 str. https://www.arso.gov.si/narava/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/biotska_raznovrstnost2.pdf (2. april 2019)
3. Erdélyi K, Dencso L, Lehoczki R, et al. Endemic papillomavirus infection of roe deer (*Capreolus capreolus*). Vet Microbiol 2009; 138(1/2): 20–6.
4. Kitchen M, Müller H, Zobl A, Windisch A, Romani N, Huemer H. Orf virus infection in a hunter in western Austria, presumably transmitted by game. Acta Derm Venereol 2014; 94(2): 212–4.
5. Scagliarini A, Vaccari F, Turrini F, Bianchi A, Cordioli P, Lavazza A. Parapoxvirus infections of red deer, Italy. Emerg Infect Dis 2011; 17(4): 684–7.
6. Huemer HP, Zobl A, Windisch A, et al. Serological evidence for parapoxvirus infection in chamois from the Tyrol regions of Austria and Italy. Vet Ital 2014; 50(3): 233–6.
7. Marco I, Rosell R, Cabezón O, et al. Epidemiological study of border disease virus infection in southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). Vet Microbiol 2008; 127(1/2): 29–38.
8. Vikøren T, Lillehaug A, Akerstedt J, Bretten T, Haugum M, Tryland M. A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-ranging musk ox (*Ovibos moschatus*) population in Norway. Vet Microbiol 2008; 127(1/2): 10–20.
9. Shakespeare M. Zoonoses. 2nd ed. London : Pharmaceutical Press, 2009: 61–107.

10. Nandi S, De UK, Chowdhury S. Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep: a global perspective. *Small Rumin Res* 2011; 96(2): 73–82.
11. James SB. Children's zoo medicine: zoonoses. In: Miller RE, Fowler M, eds. *Fowler's zoo and wild animal medicine: current therapy*. Vol. 7. St. Louis : Saunders, 2012: 115–24.
12. Vikøren T. Contagious ecthyma. In: Gavier-Widén D, Duff JP, Meredith A, eds. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Oxford : Blackwell Publishing, 2012: 191–209.
13. Skinner MA, Buller RM, Damon IK, et al. Poxviridae. In: ICTV 9th report on virus taxonomy. Leiden : International Committee on Taxonomy of Virus, 2011. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/74/poxviridae (1. maj 2019)
14. Vengušt G, Žele D. Bolezni prostoživečih živali: bakterijske, virusne in glivične bolezni: učbenik za študente veterinarske medicine. Ljubljana : Veterinarska fakulteta, 2013: 127–30.
15. Sundberg JP, Nielsen SW. Deer fibroma: a review. *Can Vet J* 1981; 22(12): 385–8.
16. Rajský D, Rajský M, Garaj P, et al. Emergence and expansion of roe deer (*Capreolus capreolus*) fibropapillomatosis in Slovakia. *Eur J Wildl Res* 2016; 62(1): 43–9.
17. Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology* 2013; 445(1/2): 213–23.
18. Sundberg JP, Van Ranst M, Jenson AB. Papillomavirus infections. In: Williams ESC, Barker IK, eds. *Infectious diseases of wild mammals*. 3rd ed. Ames : Iowa State University Press, 2001: 223–31.
19. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401(1): 70–9.
20. Savini F, Dal Molin E, Gallina L, Casà G, Scagliarini A. Papillomavirus in healthy skin and mucosa of wild ruminants in the Italian alps. *J Wildl Dis* 2016; 52(1): 82–7.

21. Miller MJR, Dawson RD, Schwantje H. Manual of common diseases and parasites of wildlife in Northern British Columbia. 2nd ed. Vancouver : University of Northern British Columbia, 2014: 151–3.
22. Scagliarini A, Gallina L, Battilani M, et al. *Cervus elaphus* papillomavirus (CePV1): new insights on viral evolution in deer. Vet Microbiol 2013; 165(3/4): 252–9.
23. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004; 324(1): 17–27.
24. Frias-De-Diego A, Jara M, Escobar LE. Papillomavirus in wildlife. Front Ecol Evol 2019; 7: e406. DOI: 10.3389/fevo.2019.00406 (2. december 2020)
25. Gunderson D. *Rupicapra rupicapra* chamois [Online]. Animal Diversity Web. Ann Arbor : University of Michigan, 2003: https://animaldiversity.org/accounts/Rupicapra_rupicapra/ (6. junij 2019)
26. Hafner M. Varovanje in urejanje življenjskega okolja divjadi. Ljubljana : Lovska zveza Slovenije, 2014: 149–81. (Zlatorogova knjižnica, 38)
27. Flajšman K, Fležar U, Pokorny B, Jerina K. Pregled metod za določanje številčnosti prostoživečih parkljarjev. Acta Silvae Ligni 2019; 118: 13–27.
28. Mehle J. Gams (*Rupicapra rupicapra* L.). In: Leskovic B, Pičulin I, Ambrožič L, eds. Divjad in lovstvo. Ljubljana : Lovska zveza Slovenije, 2012: 517–22.
29. Stergar M, Jonožovič M, Jerina K. Območja razširjenosti in relativne gostote avtohtonih vrst parkljarjev v sloveniji. Gozd Vestn 2009; 67(9): 367–80.
30. Jacques K. *Capreolus capreolus* western roe deer. [Online] Animal Diversity Web. Ann Arbor : University of Michigan, 2000: https://animaldiversity.org/accounts/Capreolus_capreolus/ (7. junij 2020)
31. Stubble M. *Capreolus capreolus*. In: Mitchell-Jone AJ, Bogdanowicz W, Krystufek B, Reijnders PJH, Spitzenberger F, Stubbe C, et al., eds. The atlas of European mammals (Poyser natural history). London : Academic Press, 1999: 400–1.

32. Wilson DE, Ruff S. The Smithsonian book of North American mammals. Mammal 2000; 81(2): 621–2.
33. Jerina K, Stergar M, Videmšek U, Kobler A, Pokorny B, Jelenko Turinek I. Prostorska razširjenost, vitalnost in populacijska dinamika prostoživečih vrst parkljarjev v Sloveniji: preučevanje vplivov okoljskih in vrstno-specifičnih dejavnikov ter napovedovanje razvojnih trendov. [Online] Ljubljana : Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Biotehniška fakulteta, 2010: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=126038> (13. oktober 2019)
34. SI-STAT Podatkovna baza. Odstrel divjadi (število), Slovenija, letno: Srnjad, 2002–2019 [Online]. Ljubljana : Statistični urad Republike Slovenije, 2021.
<https://pxweb.stat.si/SiStatData/pxweb/sl/Data/-/1673150S.PX/> (19. avgust 2021)
35. Senseman R. *Cervus elaphus* elk (Also: red deer; wapiti). [Online] Animal Diversity Web. Ann Arbor : University of Michigan 2002:
https://animaldiversity.org/accounts/Cervus_elaphus/ (8. junij 2020)
36. Hoffmann RS. The mammals of the palaearctic region: a taxonomic review. Mammal 1979; 60(3): 656–7.
37. Koubek P, Zima J. *Cervus elaphus*. In: Mitchell-Jone AJ, Bogdanowicz W, Krystufek B, Reijnders PJH, Spitzenberger F, Stubbe C, et al., eds. The atlas of European mammals (Poyser natural history). London : Academic Press, 1999: 388–9.
38. Livet J. Hoofed mammals. In: Wilson DE, Mittermeier RA, eds. Handbook of the mammals of the world. Vol. 2. Barcelona : Lynx Edicions, 2012: 621–3.
39. Adamič M, Jerina K. Ungulates and their management in Slovenia. In: Apollonio M, Andersen R, Putman R, eds. European ungulates and their management in the 21st century. Cambridge : Cambridge University Press, 2010: 507–27.
40. Stergar M. Modeliranje habitatov prostoživečih parkljarjev v Sloveniji. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, 2017. Doktorska disertacija
41. Li Y, Meyer H, Zhao H, Damon IK. GC content-based pan-pox universal PCR assays for poxvirus detection. J Clin Microbiol 2010; 48(1): 268–76.

42. Delhon GA. Poxviridae. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. *Fenner's veterinary virology*. 5th ed. Boston : Academic Press; 2017: 157–74.
43. Baroudy BM, Venkatesan S, Moss B. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 1982; 28(2): 315–24.
44. Lefkowitz EJ, Wang C, Upton C. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res* 2006; 117(1): 105–18.
45. Abergel C, Allander T, Alonso C, et al. Family - Poxviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. *Virus taxonomy*. San Diego : Elsevier, 2012: 291–309.
46. Zhang K, Liu Y, Kong H, Shang Y, Liu X. Comparison and phylogenetic analysis based on the B2L gene of orf virus from goats and sheep in China during 2009–2011. *Arch Virol* 2014; 159(6): 1475–9.
47. Sahu BP, Majee P, Singh RR, Sahoo A, Nayak D. Comparative analysis, distribution, and characterization of microsatellites in orf virus genome. *Sci Rep* 2020; 10(1): e13852. DOI: 10.13852/s41598-020-70634-6 (1. maj 2021)
48. Haig D, Mercer AA. Parapoxviruses. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, eds. *Encyclopedia of virology*. 3rd ed. Oxford : Academic Press, 2008: 57–63.
49. Robinson AJ, Kerr PJ. Poxvirus infections. In: Williams ES, Barker IK, eds. *Infectious diseases of wild mammals*. 3rd ed. Ames : Iowa State University Press, 2001: 179–201.
50. Wobeser GA. *Essentials of disease in wild animals*. Ames : Wiley-Blackwell, 2006: 105–23.
51. Kumar R, Trivedi D, Bhatt P, et al. Contagious pustular dermatitis (orf disease) – epidemiology, diagnosis, control and public health concerns. *Adv Anim Vet Sci* 2015; 3: 649–76.
52. Miller MJR, Dawson RD, Schwantje H. *Manual of common diseases and parasites of wildlife in Northern British Columbia*. 2nd ed. Vancouver : University of Northern British Columbia, 2014: 64–6.

53. Petrovec M. Poksvirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana : Medicinski razgledi, 2011: 31–9.
54. McFadden G. Poxvirus tropism. Nat Rev Microbiol 2005; 3(3): 201–13.
55. Roberson JR, Baird AN, Pugh DG. Diseases of the integumentary system. In: Pugh DG, Baird AN, eds. Sheep and goat medicine. 2nd ed. St. Louis : Saunders, 2012: 256–90.
56. Spyrou V, Valiakos G. Orf virus infection in sheep or goats. Vet Microbiol 2015; 181(1/2): 178–82.
57. Fleming SB, Mercer AA. Genus *Parapoxvirus*. In: Mercer AA, Schmidt A, Weber O, eds. Poxviruses. Basel : Birkhäuser Verlag, 2007: 127–65.
58. Friederichs S, Krebs S, Blum H, Lang H, Büttner M. Parapoxvirus (PPV) of red deer reveals subclinical infection and confirms a unique species. J Gen Virol 2015; 96(6): 1446–62.
59. Gregorović V. Bolezni in zdravstveno varstvo prežvekovalcev: skripta. Del 2, Infekcijske bolezni in bolezni vimena Ljubljana : VTOZD za veterinarstvo, Biotehniška fakulteta, 1988.
60. Veternik D. Kužni ektim (KE) pri gamsih. Lovec 2013; 96(1): 12–4.
61. Tryland M, Josefsen TD, Oksanen A, Aschfalk A. Parapoxvirus infection in Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). Vet Rec 2001; 149(13): 394–5.
62. Büttner M, von Einem C, McInnes C, Oksanen A. Klinik und Diagnostik einer schweren Parapocken-Epidemie beim Rentier in Finnland. Tierarztl Prax 1995; 23(6): 614–8.
63. Tikkanen MK, McInnes CJ, Mercer AA, et al. Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox virus. J Gen Virol 2004; 85(Pt 6): 1413–8.
64. Klein J, Tryland M. Characterisation of parapoxviruses isolated from Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). Virol J 2005; 2: e79. DOI: 10.1186/1743-422X-2-79

65. Horner GW, Robinson AJ, Hunter R, Cox BT, Smith R. Parapoxvirus infections in New Zealand farmed red deer (*Cervus elaphus*). N Z Vet J 1987; 35(4): 41–5.
66. Veternik D, Zadnik T. Contagious ecthyma (orf) in chamois. In: XIII Middle European Buiatrics Congress, Belgrade, 2013. Belgrade : Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade and Serbian Buiatrics Association, 2013: 556–62.
67. Valentinčič S. Bolezni divjadi. Ljubljana : Lovska zveza Slovenije, 1981: 52–4. (Zlatorogova knjižnica, 12)
68. Vengušt G, Žele D. Bolezni prostoživečih živali: bakterijske, virusne in glivične bolezni: učbenik za študente veterinarske medicine. Ljubljana : Veterinarska fakulteta, 2013: 119–22.
69. JPC. Contagious ecthyma [Online]. Silver Spring : The Joint Pathology Center, 2019. https://www.askjpc.org/vspo/show_page.php?id=MzlKNUNzZmlHaGFpY0lNQXRPZWVUUT09 (18. junij 2020)
70. Buddle BM, Pulford HD. Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. Vet Microbiol 1984; 9(6): 515–22.
71. Robinson AJ, Mercer AA. Orf virus and vaccinia virus do not cross-protect sheep. Arch Virol 1988; 101(3): 255–9.
72. Mercer AA, Yirrell DL, Reid HW, Robinson AJ. Lack of cross-protection between vaccinia virus and orf virus in hysterectomy-procured, barrier-maintained lambs. Vet Microbiol 1994; 41(4): 373–82.
73. McKeever DJ, Reid HW, Inglis NF, Herring AJ. A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. Vet Microbiol 1987; 15(3): 229–41.
74. Lloyd JB. A study of the immune response of sheep to orf virus. Sydney: Department of Veterinary Pathology, University of Sydney, 1996. Ph.D. Thesis
75. Jenkinson DM, McEwan PE, Onwuka SK, et al. The pathological changes and polymorphonuclear and mast cell responses in the skin of specific pathogen-free lambs following primary and secondary challenge with orf virus. Vet Dermatol 1990; 1(3): 139–50.

76. Jenkinson DM, McEwan PE, Onwuka SK, et al. The polymorphonuclear and mast cell responses in ovine skin infected with orf virus. *Vet Dermatol* 1990; 1(2): 71–7.
77. Jenkinson DM, Hutchison G, Reid HW. The B and T cell responses to orf virus infection of ovine skin. *Vet Dermatol* 1992; 3(2): 57–64.
78. Jenkinson DM, Hutchison G, Onwuka SK, Reid HW. Changes in the MHC class II+ dendritic cell population of ovine skin in response to orf virus infection. *Vet Dermatol* 1991; 2(1): 1–9.
79. Anderson IE, Reid HW, Nettleton PF, McInnes CJ, Haig DM. Detection of cellular cytokine mRNA expression during orf virus infection in sheep: differential interferon-gamma mRNA expression by cells in primary versus reinfection skin lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 83(3/4): 161–76.
80. Yirrell DL, Reid HW, Norval M, Entrican G, Miller HR. Response of efferent lymph and popliteal lymph node to epidermal infection of sheep with orf virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 28(3/4): 219–35.
81. Haig DM, McInnes CJ. Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res* 2002; 88(1/2): 3–16.
82. Haig D, Deane D, Percival A, et al. The cytokine response of afferent lymph following orf virus reinfection of sheep. *Vet Dermatol* 1996; 7(1): 11–20.
83. Büttner M, Rziha HJ. Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002; 49(1): 7–16.
84. Robinson AJ. Parapoxviruses: their biology and potevtial as recombinant vaccines. In: Binns MM, Smith BGL, eds. *Recombinant poxvirus*. Boca Raton : CRC Press, 1992: 285–327.
85. Abu Elzein EM, Housawi FM. Severe long-lasting contagious ecthyma infection in a goat's kid. *Zentralbl Veterinarmed B* 1997; 44(9): 561–4.
86. Delano ML, Mischler SA, Underwood WJ. Biology and diseases of ruminants: sheep, goats, and cattle. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. *Laboratory animal medicine*. 2nd ed. Burlington : Academic Press, 2002: 519–614.

87. Underwood WJ, Blauwiekel R, Delano ML, Gillesby R, Mischler SA, Schoell A. Biology and diseases of ruminants (sheep, goats, and cattle). In: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, eds. *Laboratory animal medicine*. 3rd ed. Boston : Academic Press, 2015: 623–94.
88. Tsai SM, Chan KW, Hsu WL, Chang TJ, Wong ML, Wang CY. Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of orf virus. *J Virol Methods* 2009; 157(2): 200–4.
89. Yirrell DL, Reid HW, Norval M, Howie SEM. Immune response of lambs to experimental infection with orf virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 22(4): 321–32.
90. Zarnke RL, Dieterich RA, Neiland KA, Ranglack G. Serologic and experimental investigations of contagious ecthyma in Alaska. *J Wildl Dis* 1983; 19(3): 170–4.
91. Inoshima Y, Shimizu S, Minamoto N, Hirai K, Sentsui H. Use of protein AG in an enzyme-linked immunosorbent assay for screening for antibodies against parapoxvirus in wild animals in Japan. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(3): 388–91.
92. Inoshima Y, Yamamoto Y, Takahashi T, et al. Serological survey of parapoxvirus infection in wild ruminants in Japan in 1996–9. *Epidemiol Infect* 2001; 126(1): 153–6.
93. Chi X, Zeng X, Hao W, et al. Heterogeneity among orf virus isolates from goats in Fujian Province, Southern China. *PLoS One* 2013; 8(10): e66958. DOI:10.1371/journal.pone.0066958
94. Walzer C. Diseases of chamois. In: Fowler ME, Miller RE, eds. *Zoo and wild animal medicine: current therapy*. 6th ed. St. Louis : Saunders, 2008: 408–15.
95. Mark R, Buller L. Poxviruses. In: Cohen J, Opal SM, Powderly WG, eds. *Infectious diseases*. 3rd ed. London : Mosby, 2010: 1577–82.
96. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, et al. ICTV virus taxonomy profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol* 2018; 99(8): 989–90.
97. Munday JS. Animal papillomaviruses (Papillomaviridae). In: Bamford DH, Zuckerman M, eds. *Encyclopedia of virology*. 4th ed. Oxford : Academic Press, 2021: 79–91.

98. Rajaram S, Maheshwari A, Srivastava A. Staging for vaginal cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015; 29(6): 822–32.
99. Erdélyi K, Eatwell K. Papillomavirus and polyomavirus infections. In: Gavner-Widén D, Duff PJP, Meredith A, eds. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Oxford : Blackwell Publishing, 2012: 225–33.
100. Edgar RC. Muscle: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 2004; 5: e113. DOI: 10.1186/1471-2105-5-113
101. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 2012; 9(8): 772. DOI: 10.1038/nmeth.2109
102. Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 2006; 22(21): 2688–90.
103. Erdélyi K, Bálint A, Dencso L, Dán A, Ursu K. Characterisation of the first complete genome sequence of the roe deer (*Capreolus capreolus*) papillomavirus. *Virus Res* 2008; 135(2): 307–11.
104. Erdélyi K, Gál J, Sugár L, et al. Papillomavirus-associated fibropapillomas of red deer (*Cervus elaphus*). *Acta Vet Hung* 2009; 57(2): 337–44.
105. Gottschling M, Stamatakis A, Nindl I, Stockfleth E, Alonso A, Bravo IG. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Mol Biol Evol* 2007; 24(5): 1242–58.
106. Munday JS. Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. *Vet Pathol* 2014; 51(6): 1063–75.
107. Munday JS, Vaatstra BL, Dunowska M, Laurie RE, Hills S. Genomic characterization of a novel epsilonpapillomavirus associated with pigmented papillomas in a red deer (*Cervus elaphus*). *Virus Genes* 2016; 52(5): 633–9.
108. Munday J, Pesavento P. Papillomaviridae and Polyomaviridae. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. *Fenner's veterinary virology*. 5th ed. Boston : Academic Press, 2017: 229–43.

109. Ramsauer AS, Kubacki J, Welle M, et al. Detection and characterization of okapi (*Okapia johnstoni*)-specific papillomavirus type 1 (OjPV1). *Vet Microbiol* 2018; 223: 113–8.
110. Kocjan BJ, Poljak M. Papilomavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija*. 1. ponatis. Ljubljana : Medicinski razgledi, 2015: 41–60.
111. Hostnik P. Izbrana poglavja iz veterinarske virologije : učbenik za študente veterinarske medicine. Ljubljana : Zobozdravstvena ordinacija, Hribar Hostnik Andreja, 2013: 31–9.
112. Campo MS. Papillomavirus and disease in humans and animals. *Vet Comp Oncol* 2003; 1(1): 3–14.
113. Chandrachud LM, O'Neil BW, Jarrett WF, Grindlay GJ, McGarvie GM, Campo MS. Humoral immune response to the E7 protein of bovine papillomavirus type 4 and identification of B-cell epitopes. *Virology* 1994; 200(1): 98–104.
114. McGarvie GM, Grindlay GJ, Chandrachud LM, O'Neil BW, Jarrett WF, Campo MS. T cell responses to BPV-4 E7 during infection and mapping of T cell epitopes. *Virology* 1995; 206(1): 504–10.
115. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1): 59–65.
116. Knowles G, O'Neil BW, Campo MS. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol* 1996; 70(12): 8451–8.
117. Catroxo MHB, Martins AMCRPF. Veterinary diagnostic using transmission electron microscopy. [Online] In: *The transmission electron microscope: theory and applications*. London : IntechOpen, 2015. DOI: 10.5772/61125 (20. junij 2019)
118. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 2002; 89(2): 249–61.
119. Munday JS, Hanlon EM, Howe L, Squires RA, French AF. Feline cutaneous viral papilloma associated with human papillomavirus type 9. *Vet Pathol* 2007; 44(6): 924–7.
120. Borzacchiello G, Roperto F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res* 2008; 39(5): e45. DOI: 10.1051/vetres:2008022

121. Daudt C, Da Silva FRC, Lunardi M, et al. Papillomaviruses in ruminants: an update. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(5): 1381–95.
122. Erdélyi K. Fibropapillomatosis of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Hungary: PhD dissertation. Gödöllő, Hungary : Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, 2010.
123. Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RA, et al. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the *Deltapapillomavirus* genus. *Vet Microbiol* 2013; 162(1): 207–13.
124. Kocsner T. Skin fibromatosis of roe deer: M. Sc. Thesis. Budapest : University of Veterinary Sciences, 2001.
125. Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol* 2012; 93(Pt 9): 1853–68.
126. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of next-generation sequencing technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 2018; 122(1): e59. DOI: 10.1002/cpmb.59
127. Papić B. Ugotavljanje značilnosti epidemioloških povezav med izolati bakterije *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije: doktorska disertacija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2020.
128. Berlec A, Štrukelj B. Nova generacija tehnik določanje nukleotidnega zaporedja: korak k osebni medicini. *Farm Vestn* 2010; 61(4): 203–8.
129. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med* 2019; 16(1): 4–10.
130. Płoski R. Next generation sequencing: general information about the technology, possibilities, and limitations. In: Demkow U, Płoski R, eds. *Clinical applications for next-generation sequencing*. Boston : Academic Press, 2016: 1–18.
131. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016; 17(6): 333–51.

132. Stawinski P, Sachidanandam R, Chojnicka I, Płoski R. Basic bioinformatic analyses of ngs data. In: Demkow U, Płoski R, eds. Clinical applications for next-generation sequencing. Boston : Academic Press, 2016: 19–37.
133. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics* 2016; 107(1): 1–8.
134. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: e251364. DOI: 10.1155/2012/251364
135. Bronner IF, Quail MA, Turner DJ, Swerdlow H. Improved protocols for illumina sequencing. *Curr Protoc Hum Genet* 2013; 79: 18.2.1–42.
136. Illumina. Illumina sequencing technology: highest data accuracy, simple workflow, and a broad range of applications. [Online] San Diego : Illumina, 2010. https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf (21. junij 2019)
137. Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina Miseq sequencers. *BMC Genomics* 2012; 13: e341. DOI: 10.1186/1471-2164-13-341
138. Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian J Microbiol* 2016; 56(4): 394–404.
139. Thermo Fisher Scientific. Ion torrent next-generation sequencing. [Online] Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2021. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/brands/ion-torrent.html> (22. junij 2019)
140. Zhang SY, Liu SL. Bioinformatics. In: Maloy S, Hughes K, eds. *Brenner's encyclopedia of genetics*. 2nd ed. San Diego : Academic Press, 2013: 338–40.
141. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics: a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp* 2012; 2(1): e3. DOI: 10.1186/2042-5783-2-3
142. Zepeda Mendoza ML, Sicheritz-Pontén T, Gilbert MT. Environmental genes and genomes: understanding the differences and challenges in the approaches and software for their analyses. *Brief Bioinform* 2015; 16(5): 745–58.

143. Pabinger S, Dander A, Fischer M, et al. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. *Brief Bioinform* 2014; 15(2): 256–78.
144. Flajšman K, Jerina K, Pokorny B. Age-related effects of body mass on fertility and litter size in roe deer. *PLoS One* 2017; 12(4): e0175579. DOI: 10.1371/journal.pone.0175579
145. Kottaridi C, Nomikou K, Lelli R, Markoulatos P, Mangana O. Laboratory diagnosis of contagious ecthyma: comparison of different PCR protocols with virus isolation in cell culture. *J Virol Methods* 2006; 134(1-2): 119–24.
146. Bushnell B, Rood J, Singer E. BBMerge - accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS One* 2017; 12(10): e0185056. DOI: 10.1371/journal.pone.0185056
147. 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.
148. Kearse M, Sturrock S, Meintjes P. The Geneious 6.0.3 read mapper [Online]. Auckland : Biomatters, 2012. <https://assets.geneious.com/documentation/geneious/GeneiousReadMapper.pdf> (18. avgust 2021)
149. Biomatters. Geneious Prime. [Online] Auckland : Biomatters, 2021. <https://www.geneious.com/prime/> (4. avgust 2021)
150. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(14): 3059–66.
151. Li W, Hao W, Peng Y, et al. Comparative genomic sequence analysis of chinese orf virus strain na1/11 with other parapoxviruses. *Arch Virol* 2015; 160(1): 253–66.
152. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4(4): 406–25.
153. Friederichs S, Krebs S, Blum H, et al. Comparative and retrospective molecular analysis of parapoxvirus (PPV) isolates. *Virus Res* 2014; 181: 11–21.
154. Čivnik V. Določitev celotnih genomov astrovirusov pri snah: Prešernova naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2019.

155. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol* 1992; 9(4): 678–87.
156. Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Göran Hansson B. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 1999; 80(Pt 9): 2437–43.
157. Lange CE, Tobler K, Brandes K, et al. Canine inverted papillomas associated with DNA of four different papillomaviruses. *Vet Dermatol* 2010; 21(3): 287–91.
158. Knowles DP. Poxviridae. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. *Fenner's veterinary virology*. 4th ed. San Diego : Academic Press, 2011: 151–65.
159. Upton C, Slack S, Hunter AL, Ehlers A, Roper RL. Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *J Virol* 2003; 77(13): 7590–600.
160. Gubser C, Hué S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt 1): 105–17.
161. Mercer AA, Ueda N, Friederichs SM, et al. Comparative analysis of genome sequences of three isolates of orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus Res* 2006; 116(1/2): 146–58.
162. Delhon G, Tulman ER, Afonso CL, et al. Genomes of the parapoxviruses orf virus and bovine papular stomatitis virus. *J Virol* 2004; 78(1): 168–77.
163. Fleming SB, Lyttle DJ, Sullivan JT, Mercer AA, Robinson AJ. Genomic analysis of a transposition-deletion variant of orf virus reveals a 3.3 kbp region of non-essential DNA. *J Gen Virol* 1995; 76(Pt 12): 2969–78.
164. Haig DM, Mercer AA. Ovine diseases. *Orf*. *Vet Res* 1998; 29(3/4): 311–26.
165. Turchetto S, Obber F, Rossi L, et al. Sarcoptic mange in wild caprinae of the Alps: could pathology help in filling the gaps in knowledge? *Front Vet Sci* 2020; 7: e193. DOI: 10.3389/fvets.2020.00193
166. Gelormini G, Gauthier D, Vilei EM, Crampe JP, Frey J, Ryser-Degiorgis MP. Infectious keratoconjunctivitis in wild caprinae: merging field observations and molecular analyses sheds

light on factors shaping outbreak dynamics. BMC Vet Res 2017; 13(1): e67. DOI: 10.1186/s12917-017-0972-0

167. Medveš A. Gamsja garjavost v triglavski populaciji gamsa (*Rupicapra rupicapra l.*): diplomsko delo. Ljubljana : [A. Medveš], 2010.

168. Krofel M, Luštrik R, Stergar M, Jerina K. Habitat use of Alpine chamois (*Rupicapra rupicapra*) in Triglav National Park. In: Vranješ M, Škornik I, Santi S, Cost M, eds. Climate change and management of protected areas: studies on biodiversity, visitor flows and energy efficiency. Portorož : Soline, pridelava soli; Bled : Triglav National Park, 2013: 1–13.

169. Sadiq MA, Abba Y, Jesse FFA, et al. Severe persistent case of contagious ecthyma (Orf) in goats. J Anim Health Prod 2017; 5(1): e24–8. DOI: 10.14737/journal.jahp/2017/5.1.24.28

170. Hing S, Narayan EJ, Thompson RCA, Godfrey SS. The relationship between physiological stress and wildlife disease: consequences for health and conservation. Wildl Res 2016; 43(1): 51–60.

171. Kureljušić B, Savić B, Pavlović I. Fibromatosis of the roe deer (*Capreolus capreolus*). In: 2nd International symposium on hunting. Modern aspects of sustainable management of game population: proceedings. Zemun-Belgrade, Serbia : Faculty of agriculture, 2012: 110–2.

172. Farkaš F, Konjević D, Grabarević Ž, Janicki Z, Slavica A, Sabočanec R. Roe deer (*Capreolus capreolus*) warts - fibromas, papillomas or fibropapillomas. Acta Clin Croat 2012; 51(1): 179.

173. Král J, Band'ouchová H, Brichta J, et al. Papillomavirus infection of roe deer in the Czech Republic and fibropapilloma-associated levels of metallothionein, zinc, and oxidative stress. Acta Vet Brno 2015; 84(2): 105–11.

174. Garces A, Pires I, Savini F, Scagliarini A, Gallina L. Cutaneous fibropapilloma in a red deer (*Cervus elaphus*) associated with *Cervus elaphus* papillomavirus in Portugal. J Wildl Dis 2020; 56(3): 636–9.

175. Gallina L, Savini F, Casà G, et al. Epitheliotropic infections in wildlife ruminants from the Central Alps and Stelvio National Park. Front Vet Sci 2020; 7: e229. DOI: 10.3389/fvets.2020.00229

176. McDiarmid A. Some disorders of wild deer in the United Kingdom. *Vet Rec* 1975; 97(1): 6–9.
177. Moar MH, Jarrett WF. A cutaneous fibropapilloma from a red deer (*Cervus elaphus*) associated with a papillomavirus. *Intervirology* 1985; 24(2): 108–18.
178. Pérez J, García PM, Mozos E, Astorga R, Borge C, Arenas A. Fibropapiloma múltiple en un ciervo rojo (*Cervus elaphus*). *Informacion Veterinaria* 2002; 236: 43–6.
179. Bravo IG, de Sanjosé S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol* 2010; 18(10): 432–8.
180. Van Doorslaer K. Evolution of the *Papillomaviridae*. *Virology* 2013; 445(1/2): 11–20.
181. Gottschling M, Göker M, Stamatakis A, Bininda-Emonds OR, Nindl I, Bravo IG. Quantifying the phylodynamic forces driving papillomavirus evolution. *Mol Biol Evol* 2011; 28(7): 2101–13.
182. Murahwa AT, Nindo F, Onywera H, Meiring TL, Martin DP, Williamson AL. Evolutionary dynamics of ten novel Gamma-PVS: insights from phylogenetic incongruence, recombination and phylodynamic analyses. *BMC Genomics* 2019; 20(1): e368. DOI: 10.1186/s12864-019-5735-9
183. Murahwa AT, Tshabalala M, Williamson AL. Recombination between high-risk human papillomaviruses and non-human primate papillomaviruses: evidence of ancient host switching among alphapapillomaviruses. *J Mol Evol* 2020; 88(5): 453–62.
184. Bocaneti F, Altamura G, Corteggio A, Velescu E, Roperto F, Borzacchiello G. Bovine papillomavirus: new insights into an old disease. *Transbound Emerg Dis* 2016; 63(1): 14–23.
185. Gil da Costa RM, Peleteiro MC, Pires MA, DiMaio D. An update on canine, feline and bovine papillomaviruses. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64(5): 1371–79.

11 PRILOGE

Priloga 1: Spremni dopis in navodila vzorčenja, ki so bili poslani lovskim družinam

Supplementary data 1: Cover letter with and sampling instructions, which were sent to hunting organisations

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Inštitut za patologijo, divjad, rbe in ebebe
Enota za zdravstveno varstvo in gojitev divjadi, eebel in akvakultur
Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana



Ugotavljanje prisotnosti razliinih virusov pri prostoživieih prežvekovalcih v Sloveniji

V zadnjih letih smo priča pojavu številnih novih vrst virusnih bolezni pri živalih in ljudeh, ki jih do sedaj v Evropi in Sloveniji nismo poznali. Nekatere med njimi so zoonoze, druge lahko povzročajo večje ekonomske škode pri domačih prežvekovalcih ali pa lahko prizadenejo eno ali več prostoživieih živali iste ali različnih vrst. V Sloveniji smo se v letu 2010 prvič srečali z virusom hepatitisa E, leta 2013 z virusom Schmallenberg, leta 2014 z virusom Zahodnega Nila ter v letu 2015 z boleznijo modrikastega jezika. Pri posameznih vzorcih prostoživieih prežvekovalcev smo v Sloveniji že ugotovili prisotnost papilomavirusov in parapox virusov z izraženo klinično sliko na koži pri obolelih živalih. Številne nove virusne bolezni so že prisotne v Evropi ali pa so na njenih mejah in le vprašanje časa je, kdaj se bomo z njimi srečali tudi v Sloveniji. Podatkov o rezervoarjih omenjenih virusov skoraj ni, enako ni veliko znanega ali se lahko, in na kakšen način, prenašajo med domačimi in prostoživieimi živalmi. Prav zaradi aktualnosti področja smo se na veterinarski fakulteti odločili opraviti raziskavo o prisotnosti pomembnejših vrst virusov pri prostoživieih prežvekovalcih. To bo prva tovrstna preiskava v Sloveniji. Z rezultati bomo skušali pridobiti podatke o prisotnosti in razširjenosti omenjenih virusov pri prostoživieih prežvekovalcih v Sloveniji in ugotoviti vlogo teh živali pri ohranjanju in morebitnemu prenosu virusov na človeka ter možnosti izmenjave virusov z domačimi prežvekovalci. V ta namen bomo pri smjadi, jelenjadi, gamsu, kozorogu in muflonu skušali s pomočjo lovcev zbrati čim več vzorcev. Vzorci, ki bi jih želeli zbrati in analizirati so kri, košček vranice, jeter in pljuče, zadnji del črevesa ter košček novotvorbe na koži, v kolikor je prisotna.

Ker lahko nalogo izpeljemo samo z zadostnim številom vzorcev omenjenih vrst, zaprašamo vse lovce za pomoč pri zbiranju vzorcev in se v ta namen že v naprej zahvaljujemo za sodelovanje. Zbiranje vzorcev bo potekalo 9. mesecev. Za potrebe vzorčenja se bo med lovce razdelilo paketke, ki vsebujejo vse potrebno za vzorčenje (brizga, igla, 2 epruveti, dve vrečki, dopis).

Paketke vam bomo poslali po pošti. V kolikor želite dodatna pojasnila oz. želite imeti izobraževanje o vzorčenju se bomo z veseljem odzvali.

Pri vzorčenju in oddaji vzorca veljajo isti napotki, kot jih izvajamo pri vzorcih divjih prašičev. V poštev pridejo vse kategorije živali s poudarkom na starejših živalih.

- **Vzorčenje:**
 1. Kri – 2 epruveti
 2. Vranica, jeter, pljuča, kožna novotvorba (vse velikost oreha) – vrečka 1
 3. Zadnji del debelega črevesa (10 – 15 cm) – vrečka 2

}

vrečka 3
- 4. Podatki o vzorcu, ki jih potrebujemo: LD, vrsta, spol in starost živali

- **Oddaja in manipulacija z vzorcem:**
Veterinarska fakulteta (VF) - sprejemnica, izpostave Nacionalnega veterinarskega inštituta, Veterinarska postaja Kočevje

Vzorec ne sme zamrzniti!!

- **Izvajalci naloge na VF:**
V kolikor imate kakršno koli vprašanje v zvezi z vzorčenjem nas prosim pokličite.
Izr. prof. dr. Gorazd Venguš (tel.: 040221109)
Doc. dr. Diana Žele (tel.: 051614420)
Kmetec Jernej, dr. vet. med. (tel.: 031 388 026)



Kri – srce ali velike žile
(2 x epruveta) - vrečka 3 +
organi (1)+ črevo (2)



Kos vranice – vrečka 1



Kos jeter - vrečka 1



Kos pljuč - vrečka 1



Debelo črevo – vidni del (10 – 15
cm) (del z blatom) - vrečka 2