

# Filogenetska analiza izolata poliomavirusa iz nekoliko uzgoja papiga u Republici Hrvatskoj

---

Jajac, Andrija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:425011>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Andrija Jajac

**Filogenetska analiza izolata poliomavirusa iz nekoliko uzgoja  
papiga u Republici Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

II.

## **ZAVOD ZA BOLESTI PERADI SA KLINIKOM**

**Predstojnik:** izv.prof. dr.sc. Željko Gottstein

**Mentor:** izv.prof. dr.sc. Željko Gottstein

### **Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. izv.prof. dr.sc. Danijela Horvatek Tomić
2. dr.sc. Liča Lozica, dr. med. vet.
3. izv.prof. dr.sc. Željko Gottstein
4. prof. dr.sc. Ljubo Barbić, zamjena

## ZAHVALA

Od srca zahvaljujem svome mentoru izv.prof. dr.sc. Željku Gottsteinu, asistentici dr.sc. Liči Lozici, dr. med. vet. i asistentici Sunčici Sertić, dr. med. vet. na ukazanoj prilici za ovaj zanimljivi istraživački rad. Hvala za svo strpljivo pomaganje, savjetovanje, na stručnosti i profesionalnosti tokom cijele izrade ovog rada kao i na toplom, ugodnom, kolegijalnom, ali i povrh svega prijateljskom pristupu. Također, hvala na Vašem uloženom vrijednom vremenu za vrijeme izrade ovog diplomskog rada te se najiskrenije nadam da će se naši kontakti nastaviti i da će rasti nakon završenog Veterinarskog fakulteta.

Veliko hvala mojoj obitelji, na potpori u bilo kakvom obliku, na ljubavi, podršci, na savjetima, pomaganju i činjenju mene samog sve većim čovjekom iz dana u dan tokom cijelog trajanja svoga studija. Bez obitelji ne bih uspio niti u bilo kojem slučaju, ne bi bilo moguće niti upisati fakultet, a kamoli ga uspješno završiti.

Zahvala i dobrom Bogu na danom zdravlju, danoj snazi, upornosti, revnosti i providnosti da se ovaj zahtjevnij studij završi i privede kraju.

## **POPIS KRATICA**

A- adenin

APV- Avian polyomavirus

Bp- base pair

C- citozin

DNA- deoksiribonukleinska kiselina

G- guanin

NCBI- National Center for Biotechnology Information

PCR- lančana reakcija polimeraze

T- timin

μL- mikrolitar

USDA- United States Department of Agriculture

VP1- virusni protein 1

## **POPIS TABLICA I SLIKA**

Tablica 1. Opis izolata polyomavirusa korištenih u istraživanju.

Slika 1. Prikaz filogenetskog stabla nakon provedenih analiza, sekvence označene crvenom bojom su iz uzgoja A, a iz uzgoja B plavom bojom.

**SADRŽAJ**

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 2. HIPOTEZE I CILJEVI.....                                 | 3  |
| 3. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....        | 4  |
| 3.1. Biološka svojstva poliomavirusa.....                  | 4  |
| 3.2 Patogeneza i tijek zaraze poliomavirusom .....         | 4  |
| 3.3. Genomska svojstva poliomavirusa.....                  | 6  |
| 3.4. Zaraza poliomavirusom u različitim vrsta papiga ..... | 7  |
| 3.5. Metode dokaza i tipizacije poliomavirusa.....         | 8  |
| 3.6. Cijepljenje i kontrola zaraze poliomavirusom.....     | 9  |
| 3.7. Prevencija u trgovinama kućnih ljubimaca .....        | 10 |
| 4. MATERIJALI I METODE .....                               | 10 |
| 4.1. Uzorci .....  | 10 |
| 4.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....              | 11 |
| 4.3. Gel elektroforeza .....                               | 12 |
| 4.4. Izolacija i pročišćavanje odsječaka DNK.....          | 12 |
| 4.5. Filogenetska analiza .....                            | 12 |
| 5. REZULTATI.....  | 12 |
| 6. RASPRAVA.....   | 14 |
| 7. ZAKLJUČCI .....   | 15 |
| 8. LITERATURA.....   | 16 |
| 9. SAŽETAK.....  | 19 |
| 10. SUMMARY .....  | 20 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....  | 21 |

## 1. UVOD

Ptičji poliomavirus jedan je od najznačajnijih virusnih patogena kaveznih ptica te svake godine uzrokuje znatne ekonomske gubitke za uzgajivače ptica i vlasnike trgovina za kućne ljubimce (PHALEN, 1998.; ZHENG KOU i sur., 2008.). Poliomavirus je nađen u mnogim zemljama svijeta sugerirajući široku svjetsku raširenost ovog virusa (JOHNE i MULLER, 2007.). Uzročnik ove kontagiozne zaraze je DNA virus, dvostruke uzvojnice, porodice *Polyomaviridae* (PADZIL i sur., 2017.). Glavni virusni protein virusa je virusni protein jedan (VP1), a ostali virusni proteini su virusni protein dva (VP2), virusni protein tri (VP3) i virusni protein četiri (VP4) (ADIGUZEL i sur., 2020.; KATOH i sur., 2009.).

Porodica *Polyomaviridae* kategorizirana je kao virus grupe 1 u Baltimore klasifikacijskom sustavu budući da sadrži dvolančani DNK genom (PADZIL i sur., 2017.). Godine 2015. taksonomija, koju je objavio Međunarodni odbor za taksonomiju virusa, dokumentirala je 73 vrste unutar ove porodice u okviru četiri roda (*Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Deltapolyomavirus* i *Gammapolyomavirus*). APV je svrstan u rod *Gammapolyomavirus* ili *Avipolyomavirus* (JOHNE i sur., 2011.). Bolest je dio sindroma koji se naziva francusko mitarenje (engl. french moult) zbog promjena na perju (JOHNE i sur., 2011.).

Od njihovog prvog otkrivanja 1981. godine, poznato je da poliomavirusi ptica uzrokuju akutne i kronične bolesti kod nekoliko vrsta ptica (PADZIL i sur., 2017.). Poliomavirusna bolest papiga uzrokovana ptičjim poliomavirusom (APV) je zarazna bolest koju karakterizira visoka stopa smrtnosti kod mladih ptica dok kod odraslih jedinki većinom dolazi u obliku latentne tj. asimptomatske bolesti (JOHNE i MUELLER, 2007.). Poliomavirus uzrokuje smrtonosne multisistemske bolesti kod mnogobrojnih vrsta papiga (JOHNE i MULLER, 2003.). Najrazornije epidemije ove bolesti događaju se u velikim komercijalnim uzgojima gdje se ptice drže u volijerama s desecima ili stotinama slobodno živućih ptica. Stopa smrtnosti mladunaca često je visoka i može se približiti 100% kada se virus prvi put unese u volijeru (PHALEN, 1998.). Statistika pokazuje da je zaraza ovim virusom u ptica u skloništima i centrima za spašavanje mnogo veća nego u veterinarskim klinikama ili u prirodnoj okolini (PADZIL i sur., 2017.).

Pogođena mladunčad papiga pokazuje najveću stopu mortaliteta između 15. i 19. dana života. Kod odraslih papiga smrt može nastupiti u dobi od 20 do 140 dana, a većina smrtnosti nastupi



u dobi između 20. i 56. dana (ROY i sur., 2004.). Smrtnost papiga zaraženih poliomavirusom je povezana s dobi, vrstom papige i pojavom sekundarnih zaraza kao što su peritonitis, mikotični ventrikulitis i klamidioza (ADIGUZEL i sur., 2020.). Mladunci u zatočeništvu u dobi od 1 tjedna do 5 mjeseci su najosjetljiviji te imaju stopu smrtnosti do 100% (HSU i sur., 2006.; TOMASEK i sur., 2007.). Bolest kljuna i perja i infekcija ptičjim poliomavirusom virusne su bolesti koje često mogu zahvatiti papige koje se drže u zatočeništvu i većim uzgojima koji su blizu jedni drugima, pa se virus puno lakše širi unutar populacije (BERT i sur., 2005.). Visoka smrtnost mladunčadi nimfa (*Nymphicus hollandicus*) proučavana je u rasplodnom jatu egzotičnih ptica u središnjoj Slovačkoj, pokazujući da su svi mladunci u pogođenim gnijezdima 14 rasplodnih odraslih jedinki uginuli u dobi od 1 tjedna starosti (TOMASEK i sur., 2007.). Prema JOHNE i MULLER (1998.) poliomavirusi mogu izazvati akutnu smrt bez prethodni simptoma. Ipak u većini slučajeva, ptice zaražene APV-om pokazivale su vidljive kliničke simptome kao što su bljedilo, letargija, nedostatak apetita, anoreksije, potkožna krvarenja, regurgitacija, ataksija i odgođeno pražnjenje voljke nakon čega nastupa smrt s voljkom i probavnim sustavom punim neprobavljene hrane (PARRISH, 2011.). Infekcija u mladim tigrima također rezultira generaliziranom pojavom bolesti kao što je ascites diskoloracija kože, hepatomegalija i splenomegalija. Mladunčad koja preživi oboljenje često ima distrofično perje (ROY i sur., 2004.). Zaražene ptice mogu izlučivati virus izmetom do 6 mjeseci (PARRISH, 2011.). Činjenica da virus može mjesecima ostati u izmetu povećava mogućnost zaraze mladunčadi ili nedavno pristiglih ptica (JOHNE i sur., 2007.). Visoka prevalencija zaraze i širenje virusa kod papiga je trajala više od 18 mjeseci zbog moguće otpornosti domaćina na poliomavirus (TOMASEK i sur., 2007.). Klinički vidljiva zaraza APV-om se javlja kod mladunčadi, većina odraslih ptica može djelovati kao asimptomatski prijenosnik APV-a drugim osjetljivim pticama oko sebe (PADZIL i sur., 2017.).

Dijagnoza ove bolesti se izvodi na temelju anamneze, kliničkih i patohistoloških nalaza kao i različitih metoda molekularne dijagnostike npr. lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR). Potrebno je pretražiti uzorke krvi i obriske kloake kao i uzorke tkiva organa postmortalno (PADZIL i sur., 2017.). Trenutno stanje poliomavirusa u cijelom svijetu nije u potpunosti poznato te se kao reference koriste samo studije bolesti u nekoliko zemalja s tim da ih je nekoliko provedeno zajedno s virusom bolesti kljuna i perja (BERT i sur., 2005.).

## **2. HIPOTEZE I CILJEVI**

Hipoteza ovog istraživanja je da će rezultati analize uzoraka poliomavirusa pokazati filogensku srodnost s obzirom na njihovo porijeklo.

Cilj ovog istraživanja je filogenetskom analizom sekvenci specifično umnoženih odsječaka genoma utvrditi njihovu međusobnu srodnost kao i srodnost sa sojevima iz međunarodnih baza genoma, poput NCBI baze.

### **3. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Biološka svojstva poliomavirusa**

Biologija ovog virusa je složena i zbog toga su veterinari i ornitolozi često vrlo zbunjeni oko toga kako najbolje spriječiti ovu virusnu zarazu kada se suoče s njom, te kako minimizirati njen utjecaj. Ptičji poliomavirus otkriven 1980.-ih godina i zaražava različite vrste papiga (PHALEN, 1998.). Virus je otporan na vanjske utjecaje. Poliomavirusi su poznati kao uzročnici tumora (JOHNE i MULLER, 2007.). Visoka patogenost ptičjih poliomavirusa u suprotnosti je s bezopasnim perzistentnim zarazama koje intenzivno proučavani poliomavirusi sisavaca tipa majmuskog virusa 40 (SV 40) obično uzrokuju kod svojih imunokompromitiranih domaćina (JOHNE i MUELLER, 2007.). Virus je uspio transformirati stanice zametka hrčka *in vitro*, što je tipična značajka poliomavirusa (LEHN i MUELLER, 1986.). Nakon zaraze papiga ptičjim poliomavirusom, on se može otkriti u gotovo svim organima. Poliomavirus, koji ima sposobnost replikacije u velikom broju organa, u suprotnosti je s poliomavirusima sisavaca, koji obično pokazuju jasan tkivni tropizam (PADZIL i sur., 2017.). Općenito, smatra se da je sposobnost poliomavirusa ptica da unište veliki broj stanica u zaraženom organizmu uzrok teške bolesti. Indukcija apoptoze pridonosi njihovoj patogenosti, te može olakšati učinkovito oslobađanje virusa iz zaraženih stanica u odsutnosti primarnog upalnog odgovora, što dovodi do učinkovitog širenja virusa kroz cijeli organizam (JOHNE i MUELLER 2007.). Iz ovih nalaza zaključuje se da je zarazna bolest virusne etiologije i identična je bolesti tigrice koja se obično naziva "francusko mitarenje" (WYLIE i PASS, 1987.). Virus predstavlja prvog ptičjeg člana obitelji poliomavirusa. Za razliku od poliomavirusa sisavaca, ovaj virus pokazuje jedinstvena biološka svojstva. Može izazvati akutnu bolest s različitim organskim manifestacijama kod oboljelih ptica (ROTT i sur., 1988.).

#### **3.2 Patogeneza i tijek zaraze poliomavirusom**

Poliomavirus uzrokuje vrlo kontagioznu virusnu bolest primarno mladih papiga. Ptičja poliomavirusna bolest je među najčešćim virusnim bolestima pripitomljenih egzotičnih ptica. Nakon zaraze, virus se može otkriti u gotovo svim organima te ima sposobnost replikacije u velikom broju stanica, što je u suprotnosti s poliomavirusima sisavaca, koji obično pokazuju jasan tkivni tropizam (ROY i sur., 2004.). Smatra se da je sposobnost poliomavirusa ptica da unište veliki broj stanica u zaraženom organizmu uzrok teške bolesti. Prema ovoj hipotezi, multisistemska akutna bolest uzrokovana je destrukcijom više organa papiga zaraženih

poliomavirusom, a edemi i krvarenja u bubrezima uzrokovani su destrukcijom endotelne stanice (JOHNE i MULLER, 2003.). Virus se obilno izlučuje izmetom i detritusom kože i perja i do 6 mjeseci nakon zaraze, nakon čega postupno nestaje nakon postizanja spolne zrelosti. Odrasle jedinke su u pravilu latentno zaražene, te šire virus u okoliš, te su odgovorne za postojanost, prijenos i širenje virusa na druge jedinke. Virus se obično unosi ingestijom i inhalacijom izmeta, prašine, aerosolom te hranjenjem potomstva, budući se može naći u voljci. Moguć je i vertikalni prijenos virusa rasplodnim jajima. Inkubacija traje do dva tjedna (ROY i sur., 2004.). Poliomavirusna bolest je dominantna u mladunčadi određene dobi i određenih vrsta papiga kao što su are, plemenite papige, jandaje, agapornisi, aleksandri i tigrice, dok su nimfe, loriji, amazone i krunte papige manje prijemljive (KATOH i sur., 2009.). Ako mlade ptice prežive akutnu fazu, nastaju simetrične distrofične promjene na primarnom i repnom perju poznate kao francusko mitarenje, te gubitak perja na leđima i abdomenu. Zahvaćena mladunčad tigrica najčešće ugiba između 15. i 19. dana života, dok starije papige ugibaju između 20. i 40. dana života (BUCK i sur., 2016). Ova virusna zaraza u mladunčadi rezultira generaliziranim zarazom karakteriziranom ascitesom, diskoloracijom kože, hepatomegalijom i splenomegalijom (JOHNE i MULLER, 2003.). Ptice obično naglo ugibaju sa obilnim krvarenjima i neprobavljenom hranom u probavnom sustavu. Kod većih vrsta papiga pojavljuju se depresija, anoreksija, gubitak tjelesne mase, odgođeno pražnjenje voljke, regurgitacija, proljev, dehidracija, potkožna krvarenja, anoreksija i paraliza, nakon čega uginu. U kroničnim slučajevima, ptice gube na težini i pojavljuju se intermitentna anoreksija, poliurija te rekurentne bakterijske i gljivične infekcije. Hepatomegalija i splenomegalija bile su stalno prisutne u svim slučajevima.. Krvarenja na srcu uočena su u 50% slučajeva. Prisutnost generaliziranih krvarenja je česta. Patohistološki, u mnogobrojnim organima su vidljive i bazofilne intranuklearne inkluzije. Nalazi pokazuju da ako su inkluzije eozinofilne nuklearne i postoji minimalna ili nikakva nekroza, malo je vjerojatno da će se čestice virusa pokazati unutar njih (PASS, 2008.). Patohistološki, promjene prisutne u svim slučajevima bile su nekroza hepatocita s nuklearnom karioreksijom ili kariolizom i nekroza slezene s povećanjem retikuloendotelne stanice (PARRISH, 2011.). Otprilike polovica svih pregledanih ptica ima teški nekrotizirajući glomerulitis, takve su se lezije smatrale pretpostavljenom dijagnozom zaraze papiga virusom. Bazofilna intranuklearna inkluzijska tjelešca bila su prisutna u različitim organima, iako su dominantna u slezeni i glomerularnim stanicama (JOHNE i MUELLER, 2007.). To ukazuje da je virus pantropan i da oštećuje imunološki sustav uništavajući limfne organe. Povremeno su pluća bila djelomično konsolidirana. Upala zračnih vrećica i septikemija primijećeni su u nekim slučajevima kao rezultat istodobne zaraze bakterijama. Neke su ptice imale lezije u

Fabricijevoj burzi, crijevu i gušterači. Dijelovi burze imali su velik broj malih piknotičkih duboko bazofilnih stanica razbacanih posvuda (PHALEN, 1998.). Konvencionalno, pretpostavljena dijagnoza APV zaraze postavlja se na temelju patohistološke pretrage i nalaza inkluzijskih tjelešaca u različitim organima. Ali za potvrdu dijagnoze važno je izolirati, identificirati i karakterizirati virus. Dijagnoza temeljena na patohistološkoj pretrazi također se može potvrditi PCR-om i u tkivu fiksiranom formalinom (ROY i sur., 2004.).

### 3.3. Genomska svojstva poliomavirusa

Slučajno otkriće virusa mišjeg poliomavirusa prije gotovo 50 godina otvorilo je eksperimentalni sustav jedinstven po mogućnostima za istraživanje interakcija između virusa i domaćina koje dovode do razvoja tumora. Opsežna istraživanja virusa u kulturi tkiva omogućila su detaljno razumijevanje njegove genetike i molekularne biologije. Poznavanje virusa kao transformirajućeg agensa u kulturi sada se može testirati na životinjama gdje su više tipova stanica mete za tumorogenu konverziju i gdje različiti čimbenici domaćina, imunološki i neimunološki, dolaze do izražaja (BENJAMIN, 2001.). Virus ptičjeg poliomavirusa (APV) posjeduje kružnu, dvolančanu DNK koja kodira glavni strukturni virusni protein 1 (VP1) i manje strukturne proteine VP2, VP3 i VP4. Virus je iz obitelji *Polyomaviridae* i roda *Avipolyomavirus*. To je virus bez ovojnice s ikozaedralnom virusnom kapsidom koja sadrži kružnu dvolančanu DNK, veličine genoma od 4981 bp. DNK ima kovalentno zatvorene krajeve i vezana je sa staničnim histonima u superzamotanom obliku. Ikozaedarska virusna kapsida ima T=7 simetriju, promjera oko 40-45 nm i sastoji se od 72 pentamera (JOHNE i MUELLER, 2007; STOLL i sur., 1993.). Svi do sada analizirani virusi pokazuju vrlo blisku genomsku povezanost, a postoji samo jedan genotip i jedan serotip (JOHNE i MUELLER, 2007.). Geni poliomavirusa mogu se kategorizirati u dvije regije; ranu regiju koja kodira tumorski (T) antigen i kasnu regiju koja kodira strukturne proteine. Tumorski antigen kodiran u ranim genima APV-a odgovoran je za replikaciju virusnog genoma kao i za transformaciju stanice domaćina (AN i sur., 2012.). Ekspresija kasne regije složena je s dvije navodne promotorske regije, zajedno s alternativnim i djelomičnim svojstvima vezanja (PADZIL i sur., 2017.). Posebna karakteristika ptičjih poliomavirusa iz drugih skupina unutar roda je prisutnost VP4. Uzvodno od VP2 kodirajuće regije u ptičjim poliomavirusima prisutan je dodatni ORF koji kodira VP4 (HALAMI i sur., 2010.). Ekspresija V4 povezana je s indukcijom apoptoze stanica domaćina. Porodica *Polyomaviridae* kategorizirana je kao virus skupine 1 u Baltimore klasifikacijskom sustavu budući da sadrži dvolančane genome DNK. Godine 2015. taksonomija

koju je objavio Međunarodni odbor za taksonomiju virusa dokumentirala je 73 vrste unutar ove porodice u okviru četiri roda (*Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Deltapolyomavirus* i *Gammapolyomavirus*). Ptičji poliomavirus je svrstan u rod *Gammapolyomavirus* ili *Avipolyomavirus*. Obitelj *Polyomaviridae* sastoji se od različitih poliomavirusa koji zaražavaju mnoge vrste kao što su ljudi, majmuni, štakori, hrčci i mnoge vrste ptica uglavnom u interakciji specifičnoj za domaćina (PADZIL i sur., 2017.). Na temelju analize sekvenci genoma utvrđeno je da se ptičji poliomavirusi odvajaju neovisno od onih kod sisavaca (PARRISH, 2011.). Čini se da su poliomavirusi akumulirali genetsku promjenu izuzetno sporim kumulativnim dugoročnim tempom, u obrascu koji je u skladu s modelom divergencije unutar domaćina. Kvalitativne usporedbe filogenetskih stabala sugeriraju pojavu rekombinacije koja uključuje daleko srodne vrste poliomavirusa. Zapanjujuća razlika između poliomavirusa i papilomavirusa je mnogo veći broj poznatih vrsta papilomavirusa (BUCK i sur., 2016.).

### **3.4. Zaraza poliomavirusom u različitim vrsta papiga**

Od zaraze ptičjeg poliomavirusa oboljevaju gotovo isključivo mlade jedinke. Najosjetljivije vrste su are, plemenite papige, jandaje, agapornisi, aleksandri i tigrice. U tigrica, bolest i uginuće ograničeni su na mladunčad dobi između 10 i 25 dana. U tigrice, bolest i uginuće ograničeni su na mladunčad dobi između 10. i 25. dana (ROY i sur., 2004.). Uzgajivači tigrica prvi put uoče ovaj problem u svojim jatima kada se naglo poveća broj uginule mladunčadi u gnijezdu. Najčešće, mlade ptice doživljavaju skraćeni tijek bolesti (JOHNE i MULLER, 2007.)

Mladunci i mlade odrasle ptice također su važni izvori virusa za druge ptice kada dođe do kontakta na izložbama ptica ili u trgovinama kućnih ljubimaca. Većina mladunaca konura izloženih zarazi u dobi do šest tjedana, razvit će bolest i uginuti. U ptica starijih od šest tjedana, virus uzrokuje subkliničku asimptomatsku zarazu. Takve zaraze najbolje se otkrivaju testiranjem krvi na DNK virusa. Izlučivanje virusa može se očekivati 4 do 8 tjedana kod većine ptica (PHALEN, 1998.).

Are su osjetljive na poliomavirus do dobi otprilike 14. tjedna, nakon čega je zaraza latentna. Zaraza inače zdravih papiga vrste edela koje se gnijezde uzrokovat će njihovo uginuće ako su mlađe od 14 tjedana. U nedavnoj studiji otkriveno je da su mladunci kakadua, koji su bili izloženi virusu u dobi mlađoj od 3 tjedna, razvili abnormalno distrofično perje. Ove su ptice pokazivale znakove sistemske bolesti, a zatim su se oporavile uz potpurnu terapiju. Starije ptice i druge vrste kakadua ostale su klinički zdrave, iako su se gotovo sve zarazile. Izlučivanje

virusa, kako je utvrđeno analizom briseva kloake, trajalo je 8 do 10 tjedana. Virus se mogao dokazati u krvi sve do prestanka izlučivanja (PADZIL i sur., 2017). Kao i kod tigrice, ova se bolest javlja kod ptica koje se gnijezde, a inkluzijska tijela mogu se naći u više organa. Za razliku od tigrice, ptice do 1 godine starosti također mogu biti pogođene (PHALEN, 1998.).

### **3.5. Metode dokaza i tipizacije poliomavirusa**

Načini na koje se može dokazati zaraza kod ptica su serologija i pretraga krvi i briseva kloake na DNK virusa. Metode dijagnostike uključuju zaživotnu pretragu uzoraka krvi i obriske kloake PCR metodom, te izdvajanje virusa iz organa životinja postmortalno (PHALEN, 1998.). Dijagnostika ove virusne bolesti je značajna za implementaciju kontrolnih mjera i za očuvanje područja slobodnih od ove zaraze. PCR metoda je korisna za dokaz i potvrdu dijagnoze ptičje poliomaviroze (JOHNE i MUELLER, 2007.). Konvencionalno, pretpostavljena dijagnoza APV infekcije postavlja se na temelju simptoma, patohistološke pretrage i detekcije inkluzijskih tjelešaca u različitim organima. Ali za potvrdu dijagnoze važno je izolirati i identificirati virus (PADZIL i sur., 2017.).

Serologija je ispitivanje krvi (plazme ili seruma) na antitijela koja su stvorena specifično protiv virusa. Ako je ptica zaražena APV-om i preživi, razvit će antitijela na virus. Koncentracije protutijela rastu vrlo brzo i 4 do 6 tjedana nakon infekcije dosežu maksimalne koncentracije. Protutijela na APV mogu se otkriti u krvi mjesecima, čak i godinama nakon zaraze, ovisno o vrsti (PHALEN, 1998.; PADZIL i sur., 2017.). Pozitivan titar antitijela kod nimfe znači da je bila zaražena u zadnjih 6 mjeseci i da ova ptica može širiti virus. Ako ptica ima antitijela, onda znamo da je zaražena virusom, ali ne znamo izlučuje li ptica virus. Ako je ptica nedavno zaražena, onda vjerojatno širi virus. Test koji koristi većina istraživača je test neutralizacije virusa. Ovaj test mjeri i IgG i IgM i vrlo je precizan (PHALEN 1998.).

PCR test je postao iznimno važan alat za dijagnosticiranje i kontrolu zaraznih bolesti. Osjetljivost ovog testa jedna je od njegovih najvećih prednosti, kao i jedna od njegovih najvećih slabosti. Potencijalni problem s ovom analizom je da će čak i najmanja kontaminacija uzorka, bilo na mjestu uzimanja ili u laboratoriju, rezultirati time da negativni uzorak postane pozitivan. Stoga, ako se testira više ptica, vrlo lako može doći do kontaminacije uzorka podrijetlom od negativne ptice prašinom perja ili osušenim izmetom podrijetlom od pozitivne ptice (PHALEN, 1998.).

Prikupljanje odgovarajućih uzoraka i organa ovisi o tijeku bolesti i distribuciji virusa u tkivima. Stoga se preporuča koristiti uzorke jetre, srca i slezene za dijagnozu poliomavirusne infekcije PCR-om. Pretpostavljena dijagnoza temeljena na histopatologiji također se može potvrditi PCR-om iz tkiva fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin, što je jednostavan, brz i prilagodljiv test za potvrdu zaraze (ROY i sur., 2004.).

### **3.6. Cijepljenje i kontrola zaraze poliomavirusom**

Nakon otkrića ptičjeg poliomavirusa, pokušaji pronalaska efikasnog cjepiva protiv virusa nisu završili uspjehom zbog prisutnosti subkliničke zaraze i akutno oboljelih ptica nositelja te različitih čestih mutacija (RITCHIE i sur., 1992.). Nedostatak znanja o patofiziologiji zaraze također je utjecao na otkriće cjepiva. Posljedično, pozitivne incidencije virusa u mnogim studijama označavaju širenje ovog virusa diljem svijeta. To je rezultiralo znatnim ekonomskim gubicima za uzgajivače i vlasnike trgovina za kućne ljubimce svake godine. Stoga zahtjevi za sprječavanjem virusne zaraze i minimiziranjem njezina utjecaja brzo rastu (PADZIL i sur., 2017.). Metoda neutralizacije virusa kao i imunodifuzija korištene su za utvrđivanje anti-poliomavirusnih protutijela u papiga od 1980-ih te je procijenjeno nekoliko tipova konvencionalnih pomoćnih sredstava kako bi se identificirao njihov učinak na imunogenost inaktiviranog APV-a, što uključuje Equimune, E-3, Acemannan i mineralno ulje (RITCHIE i sur., 1992.). Međutim, utvrđeno je da adjuvansi uzrokuju mišićnu nekrozu, a cjepiva s uljnim adjuvansima povezana su sa smrću tretiranih jedinki (RITCHIE i sur., 1992.). Predloženo je da je uvođenje inaktiviranog poliomavirusa cjepiva od strane Biomune Company (SAD) bilo iznimno važno za zaustavljanje izbijanja APV bolesti u 9 uzgoja papiga (PHALEN, 1998; RITCHIE i sur., 1992.). Sigurnost inaktiviranog cjepiva protiv ptičjeg poliomavirusa procijenjena je na 1823 papige, u više od 80 vrsta (RITCHIE i sur., 1992.).

Kako bi ih se pravilno zaštitilo, moraju se cijepiti dva puta, počevši najmanje 4 tjedna prije izlaganja drugim pticama. Trgovine pticama, izložbe ptica i susreti klubova ptica potencijalna su mjesta za prijenos APV-a (PHALEN, 1998.).

Svaka volijera mora biti jedinstvena po svom sastavu ptica i upravljanju. To je neophodno za uzgoj i ponovno naseljavanje, kao i za programe kontroliranog izvoza (HERRERA i sur. 2001.). Dokaz virusa temelji se na serologiji i PCR-u koji su skupa, ali efikasna metoda ako se pravilno primjenjuje zajedno s karantenskim i higijenskim mjerama. Preporučuje se da se u valionicima



provedu sveobuhvatna higijenska strategija, protokoli probira, cijepljenje i duge karantene kako bi se spriječila poliomavirusna bolest (ADIGUZEL i sur., 2020.; ALTAN i sur., 2016.).

Ako se nimfe, agapornisi i tigrice uzgajaju, svaku od tih ptica treba testirati na APV zarazu. Tigrice se mogu testirati serološki, agapornisi i korelije PCR-om uzorka krvi. Uzgajivače papiga treba snažno poticati da uzgajaju samo vlastite mlade i da ne donose mlade iz drugih izvora na svoje imanje (HERRERA i sur. 2001.). U idealnom slučaju, ptice se ne bi trebale micati iz volijere, izlagati drugim pticama i vraćati u volijeru. Ako se to namjerava učiniti, tada se ptice koje se vraćaju moraju staviti u karantenu i testirati. Ako će ptice biti premještene iz volijere, a zatim natrag u nju, moraju biti stari 9 tjedana ili stariji i cijepljeni dva puta u 4. tjednu i 2 tjedna prije nego što napuste volijeru (PHALEN, 1998.). Kontrola prometa u volijeri treba biti takva da APV ima ograničenu mogućnost širenja od odraslih ptica do mladunaca. Sve nove ptice koje ulaze u volijeru moraju biti stavljene u karantenu i testirane PCR metodom (PHALEN, 1998.).

### **3.7. Prevencija u trgovinama kućnih ljubimaca**

Trgovina za kućne ljubimce i uzgajivačnice papiga su jedna je od najčešćih mjesta gdje dolazi do izbijanja poliomavirusa. Većina trgovina nabavlja svoje ptice iz više izvora, prodaju tigrice, agapornise, nimfe i sl. Upravo su te 3 vrste koje će najvjerojatnije širiti virus, a mnoge će trgovine nabaviti navedene vrste dok su još mladunci (PHALEN, 1998.). Najlakši i najbolji način za sprječavanje ove bolesti u trgovini za kućne ljubimce je kupnja samo odbijene mladunčadi. Te će ptice biti dovoljno stare da u slučaju zaraze poliomavirusom, neće razviti klinički vidljivu bolest. Ako se kupuju neodbijeni mladunci, trebaju se uzgajati izvan trgovine dok se ne odbiju. Ako mladunci moraju biti u trgovini, trebaju biti odvojeni od svih ostalih ptica i treba biti određena osoba koja će se brinuti o njima i koja neće doći u kontakt sa drugim vrstama prijemljivim ili potencijalno zaraženim vrstama. Cijepljenje može biti od pomoći kod ara i edela imuniziranih u dobi od 5. i 7. tjedana, ako se ne donesu u trgovinu prije nego što navrše 9 tjedana (HERRERA i sur. 2001.; PHALEN, 1998.).

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Uzorci**

U istraživanju su korišteni uzorci iz arhive Zavoda za bolesti peradi s klinikom, prethodno izdvojeni iz uginulih ptica kućnih ljubimaca. Uginule ptice dostavljene su na patomorfološku

pretragu i uzorkovanje u svrhu utvrđivanja uzroka uginuća. Iz unutarnjih organa izdvojena je ukupna DNK korištenjem kita GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, SAD), prema uputama proizvođača. Uzorci su pretraženi na ptičji poliomavirus prema protokolu Roy i sur. (2004.). Podrijetlo uzoraka opisano je u Tablici 1.

Tablica 1. Opis izolata polyomavirusa korištenih u istraživanju.

| Uzorak | Uzgoj | Ptica  |   |       | Organ   |
|--------|-------|--------|---|-------|---------|
|        |       | Oznaka | Vrsta   | Dob   |         |
| 8      | A     | 1      | modrožuta ara<br>( <i>Ara ararauna</i> )      | 2 mj. | slezena |
| 9      | A     | 1      | modrožuta ara<br>( <i>Ara ararauna</i> )      | 2 mj. | jetra   |
| 10     | A     | 2      | modrožuta ara<br>( <i>Ara ararauna</i> )      | 2 mj. | jetra   |
| P2     | B     | 3      | tigrica<br>( <i>Melopsittacus undulatus</i> ) | 2 tj. | jetra   |
| P3     | B     | 4      | tigrica<br>( <i>Melopsittacus undulatus</i> ) | 2 tj. | jetra   |

#### 4.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

U svakoj PCR reakciji korištene su specifične uzvodne (F: 5' CTT ATG TGG GAG GCT GTC AGT GTT 3') i nizvodne (R: 5' TAC TGA AATAGC GTG GTA GGC CTC 3') početnice dizajnirane prema sekvenci VP1 gena. Reakcijska smjesa sastojala se od 25 µl GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, SAD), 2.1 µl svake početnice, 5 µl DNK i 15.8 µl vode slobodne od nukleaza (Promega, Madison, SAD), te je ukupan volumen iznosio 50 µl. PCR je izveden prema protokolu Roy i sur. (2004.): aktivacija na 95°C 5 min, zatim 40 ciklusa: denaturacija na 95°C 45 sek, vezanje na 58°C 45 sek i elongacija na 72°C kroz 45 sek.

### **4.3. Gel elektroforeza**

Dobiveni PCR produkti vizualizirani su na 1.5%-tnom agaroznom gelu (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, SAD) primjenom Midori Green Advance boje (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Njemačka). Razdvajanje se izvodilo 45 minuta na 75 V i 30 mA, te je očekivana veličina umnožaka bila 550 pb.

### **4.4. Izolacija i pročišćavanje odsječaka DNK**

Izolacija i pročišćavanje DNK odsječaka iz agaroznog gela izvedeno je korištenjem ReliaPrep™ DNA Clean-up Concentration System (Promega, Madison, SAD) kita, prema uputama proizvođača. Koncentracija DNK u svakom uzorku određena je pomoću BioDrop uređaja (Biodrop Ltd., Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), nakon čega su uzorci poslani na sekvenciranje Sangerovom (dideoksi) metodom (Macrogen Inc., Amsterdam, Nizozemska).

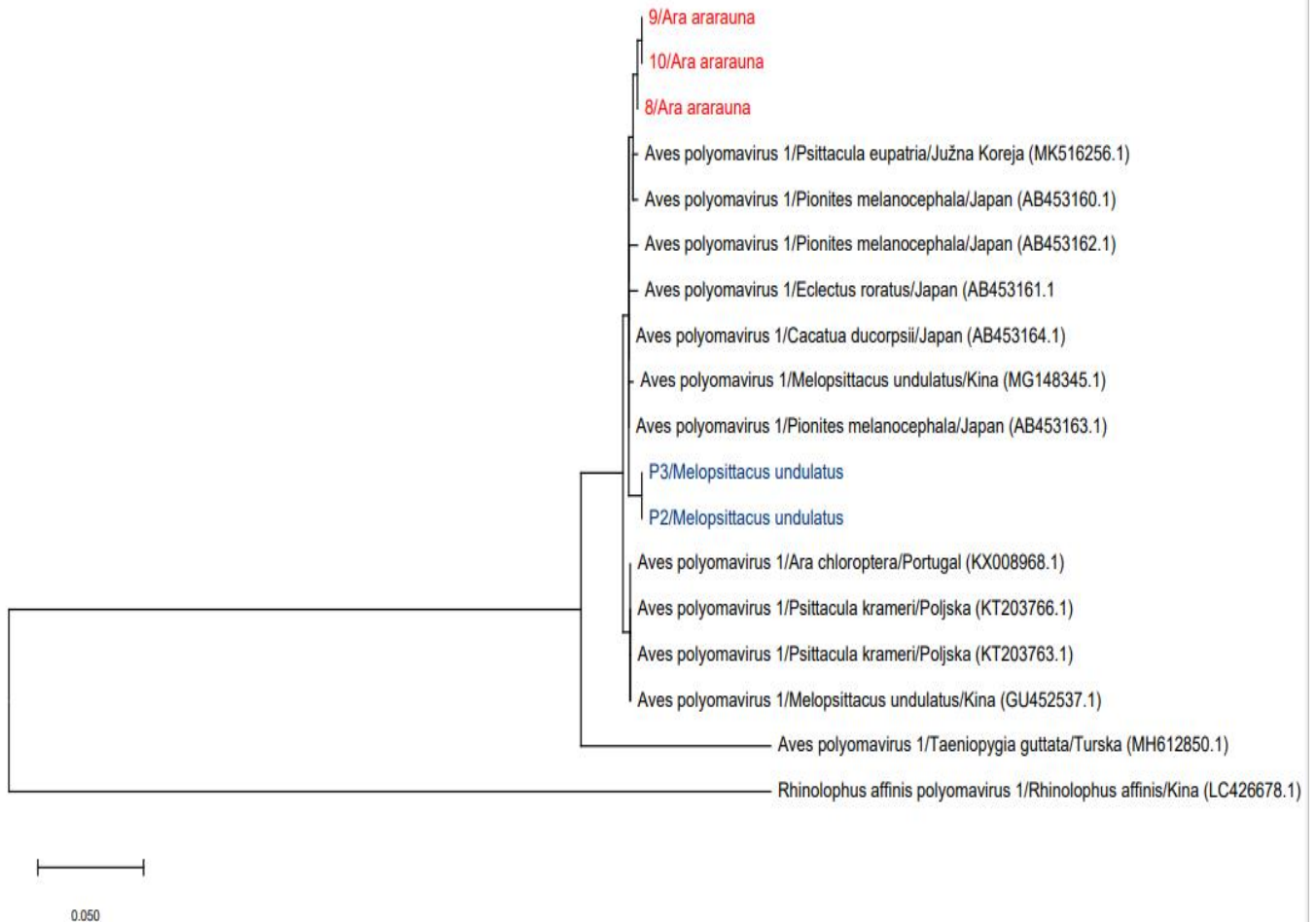
### **4.5. Filogenetska analiza**

Sekvence odsječaka VP1 analizirane su korištenjem programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3. (HALL, 1999.) i Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) 10.0.5. (KUMAR i sur., 2018.). Filogenetska analiza sekvenci izvedena je Maximum Likelihood metodom i Kimura 2-parameter modelom (KIMURA, 1980.). Sekvence dostupne u bazi podataka GenBank - National Center for Biotechnology Information (NCBI), s oznakama AB453160, AB453161, AB453162, AB453163, AB453164, GU452537, KT203763, KT203766, KX008968, MG148345, MH612850 i MK516256 korištene su za izradu filogenetskog stabla, te je sekvenca polyomavirusa izdvojenog iz srednjeg potkovnjaka (LC426678) korištena kao vanjska grupa.

## **5. REZULTATI**

Filogenetska analiza je pokazala određeni stupanj heterogenosti s obzirom na porijeklo, ali ne i s obzirom na vrstu ptice (Slika 1). Može se vidjeti sličnost između pretraživanih uzoraka iz

istih uzgoja, ali isto tako su pretraživani uzorci smješteni na zasebnim filogenetskim granama u odnosu na ostale sojeve uključene u analizu. Uzorci 9 i 10 su smješteni na istoj filogenetskoj grani, što ukazuje na visok stupanj podudarnosti (99.81%) na temelju analiziranih sekvenci.



Slika 1. Prikaz filogenetskog stabla nakon provedenih analiza, sekvence označene crvenom bojom su iz uzgoja A, a iz uzgoja B plavom bojom.

Iako su uzorci 8 i 9 izdvojeni iz različitih organa iste jedinke i njihova podudarnost temeljem BLAST analize je iznosila 99.8%, rezultati ukazuju na nešto veću genetsku razliku. Očekivano, podudarnost uzoraka 8 i 10 je još manja (99.61%), dok između uzoraka iz različitih uzgoja iznosi 98.28-98.86%.

Uzorci P2 i P3 iste tigrice i istog organa jetre pokazuju također određeni veći stupanj varijabilnosti (98,43%).

Prema filogenetskoj analizi, vidljivo je da su pretraživani uzorci 8, 9, 10, P2 i P3 sličniji sojevima APV 1 iz Južne Koreje, Japana i Kine nego li onim sojevima iz Portugala, Poljske te zasebnog soja iz Kine, vidljivo na Slici 1.

## 6. RASPRAVA

Nakon zaraze papiga ptičjim poliomavirusom, virus se može otkriti u gotovo svim organima. Metode dijagnostike uključuju zaživotnu pretragu uzoraka krvi i obriske kloake PCR metodom te izdvajanje virusa iz organa uginuli životinja. Lančana reakcija polimerazom je korisna za dokaz i potvrdu dijagnoze ptičje poliomaviroze (PHALEN, 1998.). Filogenetska analiza nam služi za proučavanje i vizualiziranje evolucijske prošlosti sekvenci specifično umnoženih odsječaka genoma i određivanje srodstvenih odnosa između proučavanih sekvenci.

Prema rezultatima istraživanja Zheng Kou i sur. (2008.), u kojem su postmortalno uzeti uzroci tkiva jetre od 34 tigrice sa tipičnim simptomima zaraze poliomavirusom u kineskom okrugu Yunmeng 2004. godine, filogenetska analiza je pokazala da je sličnost sekvence genoma u istraživanju i ostalih šest sekvenci ptičjeg poliomavirusa dostupnih u GenBank-u bila više od 99%, a evolucijske udaljenosti u filogenetskom stablu bile su vrlo kratke (0,005), što sugerira da je APV u Kini ima isti genotip kao poliomavirus u drugim regijama.

U studiji Hsu i sur. (2006.), u kojem je ispitivano 165 papiga u 22 roda iz privatnog uzgoja, kojima su uzeti uzorci perja, izmeta ili postmortalno organa i klinički zdravih i onih sa simptomima zaraze sa APV, filogenetska analiza pokazala je da svi tajvanski i strani sojevi pripadaju istoj skupini poliomavirusa. Provedena je analiza sekvence VP1 i određen je identitet fragmenta VP1 u rasponu između 97,5% i 100%, te je filogenetska analiza potvrdila veliku sličnost svih sekvenci.

U istraživanju provedenom u Kini 2011., Zhuang i sur. su dokazali definirano grupiranje u srodne genetske klastere ili loze, pokazujući blisku vezu s ptičjim vrstama iz kojih su izolirani u rasponu od 83% do 95%.

Adiguzel i sur. (2020.) u svom istraživanju su analizirali 113 nasumce odabranih uzoraka svježeg izmeta od naizgled zdravih papiga te analizirali PCR metodom. Pozitivni uzorci sekvencirani su Sanger metodom te je generirano filogenetsko stablo, temeljeno na genima

APV-VP1, te pokazuje njihovu blisku povezanost s drugim pozitivnim sekvencama iz raznih zemalja, što ukazuje na rasprostranjenost pojave ovih zaraza poliomavirusom u Turskoj.

U usporedbi sa svim gore navedeni istraživanjima, rezultati analize uzoraka poliomavirusa u ovom istraživanju pokazali su očekivanu srodnost s obzirom na njihovo porijeklo. Kao i u istraživanju Adiguzela i sur. (2020.), u ovom istraživanju se također ukazuje na visoku srodnost s obzirom na porijeklo naših uzoraka.

Mogli bismo se složiti da kao i u rezultatima studije Adiguzela i sur. (2020.), filogenetska analiza pokazuje da se ova bolest može prenijeti preko uvezenih ptica iz inozemstva, što postupak rane dijagnostike, posebice PCR-om, čini snažnom preventivnom mjerom za očuvanje zdravlja papiga u uzgojima.

Rezultati ovog istraživanja bitni su za monitoring raznolikosti poliomavirusa u Hrvatskoj. Takav monitoring bi trebalo vršiti u uzgojima i trgovinama gdje i jesu najčešća žarišta poliomavirusnih zaraza. Na taj se način može kontrolirati da li virus postaje virulentniji i kakve mutacije se događaju. Dodatna istraživanja će omogućiti bolji uvid u srodnost te moguće poslužiti u kontroli bolesti primjenom cjepiva. Srodnost izolata iz istih uzgoja potvrđuje da se virus u njima brzo i lako širi.

Ono što je uočeno kao specifičnost obrađenih rezultata je pojava varijabilnosti sojeva ptičjeg poliomavirusa u istom domaćinu, u istom ili različitim organima, jetri i slezeni. Daljnjim pregledom dostupne literature, teško možemo pronaći sličan podatak vezan za ovakav rezultat istraživanja, jer autori često navode da većinom postoji jedan genotip i jedan isti fenotip poliomavirusa koji zaražava domaćina. No ipak, razlika može biti i posljedica samog sekvenciranja i grešaka koje su pri njemu nastale. Također, primjena korištenih računalnih programa za obradu sekvenci, uslijed promjena na nekoj ključnoj bazi može dovesti do smještanja na dodatnu granu, što se i može vidjeti na Slici 1 kod uzoraka 8, 9 i 10, uz manju promjenu u postotku u odnosu na uzorke P2 i P3, kod kojih je ta razlika i veća.

## **7. ZAKLJUČCI**

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće: Jedan od značajnih rezultata je pojava varijacija u izolatima iz iste jedinice, u istim i različitim organima, jetri i slezeni, što do sada nije opisano kod poliomavirusa. Također, filogenetska analiza pokazuje određeni stupanj heterogenosti s obzirom na porijeklo sojeva, ali ne i s obzirom na vrstu ptice. Uz navedeno,

može se vidjeti i visoka razina sličnosti između uzoraka iz istih uzgoja, kao i da su naši ispitivani uzorci na istim granama s izolatima podrijetlom iz Azije, ali na zasebnim granama u odnosu na sojeve podrijetlom iz Europe.

## **8. LITERATURA**

1. ADIGUZEL M.C., M.O. TIMURKAN, S. CENGIZ (2022): Investigation and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from companion birds in eastern Turkey. J Vet Res 64, 495-501

2. AN, P., M.T. SAENZ ROBLES, J.M. PIPAS (2012): Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annual review of microbiology* 66, 213–36.
3. BENJAMIN, T. L (2001): Polyoma virus: old findings and new challenges. *Virology* 289, 167–173.
4. BERT, E., L. TOMASSONE, C. PECCATI, M. G. NAVARETE, S. C. SOLA (2005): Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J. Vet. Med B* 52, 64–68.
5. BUCK C.B, K. VAN DOORSLAER, A. PERETTI, E.M. GEOGHEGAN, M.J. TISZA, P. AN, JP KATZ, JM PIPAS, A.A.MCBRIDE, A.C. CAMUS, A.J. MCDERMOTT, J.A. DILL, E. DELWART, T.F. NG, K. FARKAS, C. AUSTIN, S. KRABERG, W. DAVISON, D.V. PASTRANA, A. VARSANI (2016): The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathog.* 12(4)
6. DOLZ, G., J. SHELEBY ELIAS., J.J ROMERO ZU, B. VARGAS LEITON, G. GUTIERREZ ESPELETA, K. MADRIZ ORDE (2013): Prevalence of psittacine beak and feather disease virus and avian polyomavirus in captivity psittacines from Costa Rica. *Open Journal of Veterinary Medicine* 3(1), 240-245.
7. HALAMI, M., G. DORRESTEIN, P. COUTEEL, G. HECKEL, H. MULLER, R. JOHNE (2010): Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. *Journal of General Virology* 91(12), 3016-3022.
8. HALL, T. A. (1999): Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 40, 95-98.
9. HERRERA, I., S. R. KHAN, E. F. KALETA, H. MUELLER, G. DOLZ, and U. NEUMANN (2001): Serological status for *Chlamydia psittaci*, Newcastle disease virus, avian polyoma virus, and Pacheco disease virus in scarlet macaws (*Ara macao*) kept in captivity in Costa Rica. *J. Vet. Med. B* 48, 721–726.
10. HSU, C. M., C. Y. KO, H. J. TSAIA (2006): Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in Taiwan, *Avian Dis.* 50, 348–353.
11. JOHNE, R., H. MUELLER (1998): Avian polyomavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Arch. Virol.* 143, 1501–1512.
12. JOHNE, R., H. MUELLER (2003): The genome of goose hemorrhagic polyomavirus (GHPV), a new member of the proposed subgenus Avipolyomavirus. *Virology* 308, 291–302.



13. JOHNE, R., G. PAUL, D. ENDERLEIN, T. STAHL, C. GRUND, and H. MUELLER (2007): Avian polyomavirus mutants with deletions in the VP4-encoding region show deficiencies in capsid assembly, virus release and have reduced infectivity in chicken. *J. Gen. Virol.* 88, 823–830.
14. JOHNE R, H. MULLER (2007). Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *J Virol* 81, 11554–9.
15. JOHNE R., C.B. BUCK, T. ALLANDER, W.J. ATWOOD, R.L. GARCEA, M.J. IMPERIALE (2011): Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol* 156, 1627–34
16. KATOH H, K. OHYA, Y. UNE, T. YAMAGUCHI, H. FUKUSHI (2009): Molecular characterization of avian polyomavirus isolated from psittacine birds based on the whole genome sequence analysis. *Vet Microbiol* 138(1–2), 69–77.
17. KIMURA, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
18. KUMAR, S., G. STECHER, M. LI, C. KNYAZ, K. TAMURA (2018): MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549.
19. LEHN H, H. MULLER (1986): Cloning and characterization of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology* 151(2), 362-70.
20. LITERAK, I., B. SMID, L. DUBSKA, L. BRYNDZA, L. VALICEK (2006): An outbreak of the polyomavirus infection in budgerigars and cockatiels in Slovakia, including a genome analysis of an avian polyomavirus isolate. *Avian Dis.* 50, 120–123.
21. PADZIL, F., A. R. MARIATULQABTIAH, J. ABU (2017): Avian polyomavirus: A recent update. *J. Vet. Malaysia* 29 (2), 9-13.
22. PARRISH, C. R. (2011): Papillomaviridae and Polyomaviridae. In Maclachlan, N. J., Dubovi, E. J. And Fenner, F.: *Fenner’s Veterinary Virology*, 213-223.
23. PASS, D. A (1987): Inclusion bodies and hepatopathies in Psittacines. *Avian Pathol.* 16, 581–597.
24. PHALEN, D. (1998.): Avian polyomavirus: My thoughts. *AFA Watchbird* 25, 28-39.
25. RITCHIE B.W., F.D NIAGRO, K.S. LATIMER, W.L. STEFFENS, D. PESTI, R.P. CAMOAGNOLI, P.D. LUKERT (1992): Antibody response to and maternal immunity from an experimental psittacine beak and feather disease vaccine. *Am J Vet Res* 53(9), 1512-8.

26. ROTT O., M. KROEGER, H. MUELLER, G. HOBOM (1988): The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology* 165(1), 74-86.
27. ROY, P., A. S. DHILLON, L. LAUERMAN, H. L. SHIVAPRASAD (2004): Detection of avian polyomavirus infection by polymerase chain reaction using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Avian Dis.* 48(2), 400-404.
28. STOLL R., D. LUO, B. KOUWENHOVEN, G. HOBOM, H. MULLER (1993): Molecular and biological characteristics of avian polyomaviruses: isolates from different species of birds indicate that avian polyomaviruses form a distinct subgenus within the polyomavirus genus. *J Gen Virol* 74 ( Pt 2), 229-37.
29. TOMASEK, O., O. KUBICEK, V. TUKAC (2007). Unusual fatal avian polyomavirus infection in nestling cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) detected by nested polymerase chain reaction. *Veterinarni Medicina* 52(5), 193–201.
30. WYLIE S.L., D.A. PASS (1987): Experimental reproduction of psittacine beak and feather disease/French Molt. *Avian Pathol* 16(2), 269-81.
31. ZHENG K., Z. ZHANG, C. SHENGLIANG, F. ZHAOJUN, T. SHUANG, Z. LIN, L. TIANXIAN (2008): Molecular characterizations of avian polyomavirus isolated from budgerigar in China. *Avian Dis* 53, 451-454.
32. ZHUANG Q., J. CHEN, M.H. MUSHTAQ, J. CHEN, S. LIU, G. HOU (2011): Prevalence and genetic characterization of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus isolated from budgerigars in Mainland China. *Arch Virol* 157(1), 53–61.

## 9. SAŽETAK

Ptičji poliomavirus jedan je od najznačajnijih virusnih patogena kaveznih ptica te svake godine rezultira znatnim ekonomskim gubicima za uzgajivače i vlasnike trgovina za kućne ljubimce. Najrazornije epidemije bolesti događaju se u velikim komercijalnim uzgojima tigrica gdje se ptice uzgajaju u volijerama s desecima ili stotinama slobodno držanih ptica. I mladi i odrasli primjerci tigrica osjetljivi su na zarazu. Stopa smrtnosti mladunaca često je visoka i može se približiti 100% kada se virus prvi put unese u volijeru. Uzročnik je DNK virus iz porodice

*Polyomaviridae*, roda *Polyomavirus*. Cilj ovog istraživanja bio je filogenetskom analizom sekvenci specifično umnoženih odsječaka genoma utvrditi njihovu međusobnu srodnost kao i srodnost sa sojevima iz međunarodnih baza genoma poput NCBI baze. U istraživanju su korišteni uzorci iz arhive Zavoda za bolesti peradi s klinikom, prethodno izdvojeni iz uginulih ptica kućnih ljubimaca. Iz unutarnjih organa izdvojena je ukupna DNK, umnožena PCR metodom korištenjem specifičnih početnica, nakon čega su umnoženi isječci sekvencirani Sanger metodom u svrhu provedbe filogenetske analize. Filogenetska analiza je pokazala određeni stupanj heterogenosti s obzirom na porijeklo, ali ne i s obzirom na vrstu ptice i sam uzgoj. Utvrđen je slučaj pojave varijacija dvaju izolata ptičjeg poliomavirusa u istom domaćinu, u njegova dva organa, jetri i slezeni, koji se djelomično razlikuju, što nije opisano u dosadašnjoj literaturi.

Ključne riječi: papige, *Polyomavirus*, PCR, sekvenciranje, filogenetska analiza

## 10. SUMMARY

### **Phylogenetic analysis of *Polyomavirus* isolates from several parrot breeders in Republic of Croatia**

Avian polyomavirus is one of the most important viral pathogens of caged birds which every year results in significant economic losses for bird breeders and pet store owners. The most devastating disease outbreaks occur in large commercial aviaries of the budgerigar species where the birds are raised in large volieres with dozens or hundreds of free-flying birds. Both young and adult specimens of budgerigars are susceptible to infection. The mortality rate of hatchlings is often high and can approach 100% when the virus is first introduced into the aviary. The causative agent is a DNA virus from the family *Polyomaviridae*, genus *Polyomavirus*. The goal of this research is to determine the similarity of the investigated strains and compare them with the online available strains from international genome databases such as the NCBI database through phylogenetic analysis of the sequences of specifically amplified segments of the genome. In this research, we used archived samples from Department of Poultry Diseases with Clinic, previously isolated from the carcasses of pet birds. Total DNA was extracted from internal organs and amplified through PCR using specific primers. Afterwards, the amplified PCR products were sequenced using Sanger method to perform phylogenetic analysis. The phylogenetic analysis showed a certain degree of heterogeneity with respect to origin of the isolates, but not with respect to the bird species and breeder. According to the available literature, this was the first case where two phylogenetically distinct APV strains were isolated from two organs, liver and spleen, of the same host.

Key words: parrots, *Polyomavirus*, PCR, sequencing, phylogenetic analysis

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen 5. rujna 1997. godine u Šibeniku, Republika Hrvatska. Srednju Medicinsko-kemijsku školu u Šibeniku završio je 2016. godine. Upisao je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2016. godine. Stručno-terensku praksu odradio je u Šibeniku 2022., u Veterinarskoj ambulanti „More“ pod mentorstvom dr. Ivice Ukića i dr. Emila Ofnera, gdje od 2019. godine radi u obliku ljetne studentske prakse.

