

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Molekulare Charakterisierung von Parapockenviren
mittels Gesamtgenomanalyse**

von Schirin Josefa Friederichs
aus München

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Oberschleißheim
Mentor: Prof. Dr. Mathias Büttner

Gedruckt mit Genehmigung der tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger
Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Meinem Vater

» *Somewhere, something incredible is waiting to be known.* «

Carl Segan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XV
Abbildungsverzeichnis	XVI
I EINLEITUNG	17
II LITERATURÜBERSICHT	19
1 Parapockenviren - Einführung und Bedeutung.....	19
1.1 Viruscharakteristika	20
1.1.1. Virusaufbau und Replikation	20
1.1.2. Virusgenom.....	23
1.1.3. Virulenzfaktoren	24
1.1.4. Immunstimulation durch Parapockenviren.....	31
2 Epidemiologie der Parapockenvirusinfektion.....	33
3 Parapockenviren bei Nutz- und Wildtieren.....	34
3.1. Parapockenviren bei Nutztieren.....	34
3.1.1. Parapockenviren bei Schaf und Ziege	34
3.1.2. Parapockenviren beim Rind.....	36
3.2. Parapockenviren bei Wildtieren	37
4 Parapockenviren beim Menschen	39
5 Diagnostik der Parapockenvirusinfektion.....	41
5.1. Erregernachweis	42
5.1.1. Virusisolation in Zellkultur.....	42
5.1.2. Elektronenmikroskopie	43
5.2. Serologische Nachweismethoden	44
5.2.1. Western Blot	44
5.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	45
5.2.3. Immunfluoreszenz- und Immunperoxidasetest.....	45
5.3. Virusgenomnachweis.....	46
5.3.1. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und DNA-Hybridisierung	46
5.3.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	47
5.3.3. Molekulare Virusspeziescharakterisierung.....	48
III PUBLIKATIONEN	50
1 Publikation 1	50
2 Publikation 2	62

IV	DISKUSSION	80
1	Parapockenvirus-Nachweis mittels Pan-Parapockenvirus-PCR	80
1.1.	Detektion unterschiedlicher Parapockenvirusspezies	80
1.2.	Speziesdifferenzierung mittels phylogenetischer Analyse der DNA aus PCR-Fragmenten	81
1.3.	Molekulare Epidemiologie humaner Parapockenvirus- infektionen	82
2	Gesamtgenomanalyse von Parapockenviren.....	83
2.1.	Vergleich eines korrespondierenden ORFV-Paares von Schaf und Mensch.....	85
2.2.	Molekulare Charakterisierung eines Parapockenvirus-Isolates vom Rotwild aus Deutschland	87
3	Phylogenetische Beziehung der vier Parapockenvirusspezies.....	88
4	Epidemiologie der Parapockenvirusinfektion beim deutschen Rotwild..	90
5	Ausblick	92
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	94
VI	SUMMARY	96
VII	LITERATURVERZEICHNIS	98
VIII	ANHANG	117
IX	DANKSAGUNG	121

Abkürzungsverzeichnis

ACC#	accession number
ANK	ankyrin
APC	anaphase-promoting complex
BHV	Bovine herpesvirus
bp	base pair(s)
BPSV	Bovine papular stomatitis virus
BTV	Bluetongue virus
BVDV	Bovine viral diarrhea virus
BWA	Burrows-Wheeler Aligner
CBP	chemokine binding protein
CEV	cell-associated enveloped virus
CPD	contagious pustular dermatitis
CPE	cytopathic effect
CPV	Crocodilepox virus
DNA	deoxyribonucleic acid
ds	double-stranded
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie, Elektronenmikroskop
EEV	extracellular enveloped virus
EV	enveloped virus
GAG	glykosaminoglykane
GATU	Genome Annotation Transfer Utility
GIF	GM-CSF / IL2 inhibitory factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IEV	intracellular enveloped virus
IFNR	interferon resistance
IL	interleukin
IMV	intracellular mature virus
INDEL	insertion or deletion of bases
ITR	inverted terminal repeats
kbp	kilo base pair(s)
mAb	monoclonal antibody
MKS	Maul- und Klauenseuche
MOCV	Molluscum contagiosum virus
MV	mature virus
n/a	not available
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	next generation sequencing

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ORF	open reading frame
ORFV	Orf virus
PACR	poxvirus anaphase-promoting complex regulator
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCPV	Pseudocowpox virus
p.i.	post infectionem
PIND-ORF	paramunity inducer ORF
PKR	protein kinase RNA-activated
PPV	parapoxvirus
PVNZ	Parapoxvirus of red deer in New Zealand
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	ribonucleic acid
SNP	single nucleotide polymorphism
SQPV	Squirrelpox virus
ss	single-stranded
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
VACV	Vaccinia virus
VEGF	vascular endothelial growth factor
vIL	viral interleukin
vVEGF	viral vascular endothelial growth factor
VIR	virus interferon resistance

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Parapockenviren ...	118
Tabelle 2 Nachträglich definierte ORFs in der Sequenz von ORFV B029	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Abläufe während der Pockenvirusinfektion einer Zelle.....	23
Abbildung 2 Zytopathischer Effekt der Parapockenviren in Zellkultur	43
Abbildung 3 Klinische Ausprägung der Infektion mit dem Parapockenvirus B015 (Schaf) und B029 (Mensch).	85
Abbildung 4 Phylogenetischer Stammbaum (<i>maximum likelihood tree</i>) ausgewählter Pockenviren.....	89
Abbildung 5 Phylogenetischer Stammbaum (<i>maximum likelihood tree</i>) der Parapockenviren.....	90

I EINLEITUNG

Parapockenviren (PPV) sind oftmals unterschätzte Infektionserreger. Sie verursachen nicht nur bei unseren Hauswiederkäuern, sondern auch bei verschiedensten Wildtieren und dem Menschen pustulöse Dermatitiden, die in ihrer klinischen Ausprägung von mild bis gravierend reichen. Wenngleich die Infektion in der Regel gutartig und selbstlimitierend verläuft, so können massive Krankheitsausbrüche, insbesondere unter Schafen, doch zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten führen. Daneben haben sich in den letzten Jahren Berichte über besonders schwere und chronische Krankheitsverläufe gehäuft, die in einer Vielzahl der Fälle schließlich zum Tod der betroffenen Tiere führten (Abu & Housawi, 2009; de la Concha-Bermejillo *et al.*, 2003; Abu Elzein & Housawi, 1997; Gumbrell & McGregor, 1997; Guo *et al.*, 2003; Jeckel *et al.*, 2011; Mazur & Machado, 1989; Ndikuwera *et al.*, 1992; Okada *et al.*, 1987; Scagliarini *et al.*, 2011; Yeruham *et al.*, 1994). Auch der Mensch kann, sofern seine Immunkompetenz eingeschränkt ist, beispielsweise durch die Einnahme von Immunsuppressiva oder in Zusammenhang mit einer Chemotherapie, schwer erkranken (Ara *et al.*, 2008; Ballanger *et al.*, 2006; Gurel *et al.*, 2002; Hunskaar, 1986; Rørdam *et al.*, 2013; Savage & Black, 1972). Neue potentielle Infektionsquellen für Mensch und Tier ergeben sich aus dem Nachweis von Parapockenviren bei Wildtieren. Im europäischen Raum haben sich Gämsen, Steinböcke, Rothirsche, Rentiere und Seehunde empfänglich gezeigt (Huemer *et al.*, 2014; Klein & Tryland, 2005; Müller *et al.*, 2003; Scagliarini *et al.*, 2011; Tikkanen *et al.*, 2004).

Ogleich bereits seit Langem bekannt ist, dass die Parapockenvirusinfektion eine Zoonose ist, wurde die Beziehung zwischen dem Virus im Wiederkäuerwirt und dem Menschen bisher kaum untersucht. So war es ein Ziel dieser Arbeit, die Möglichkeit einer Rückverfolgung humaner Parapockenvirus-Isolate zum virusübertragenden Tier mittels selbstentwickelter speziesdifferenzierender PCR-Protokolle zu verifizieren. Gleichzeitig sollte über die Sequenzierung eines korrespondierenden Viruspaars von Schaf (B015) und Mensch (B029) und dessen vergleichende molekulare Charakterisierung auf Gesamtgenomebene geklärt werden, inwieweit das Virus nach dem Wechsel der Wirtsspezies genomischen Veränderungen unterworfen ist.

1987 wurde erstmals über ein Parapockenvirus bei neuseeländischem Rotwild berichtet (Horner *et al.*, 1987). Dieses erwies sich einige Jahre später anhand vergleichender

Restriktionsprofil- und DNA-Hybridisierungs-Analysen als Vertreter einer eigenständigen Parapockenvirusspezies (Robinson & Mercer, 1995). Die Beprobung von Rothirschen im bayerischen Alpenraum im Rahmen eines Wildtier-Monitorings sollte Aufschluss darüber geben, ob das Virus auch unter deutschem Rotwild zu finden ist. Nach der erfolgreichen Isolierung eines Parapockenvirus in Zellkultur konnte die gewonnene DNA mittels *next generation sequencing* (NGS) sequenziert werden. Dies ermöglichte erstmals die umfassende und vergleichende genomische Charakterisierung eines Parapockenvirus vom Rotwild.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Parapockenviren - Einführung und Bedeutung

In der Taxonomie der Viren werden die Parapockenviren in die Familie der *Poxviridae* eingeordnet und zählen damit zu den größten und komplexesten aller Viren. Innerhalb der Virusfamilie wiederum werden die Pockenviren in zwei Subfamilien unterteilt: die Pockenviren der Insekten (*Entomopoxvirinae*) und die der Wirbeltiere (*Chordopoxvirinae*). Unter letztgenannten bilden die Parapockenviren neben neun weiteren ein eigenständiges Genus, welches nach derzeitigem Stand des Internationalen Komitees für Virustaxonomie (ICTV) vier Spezies umfasst (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012). Hierzu zählt das Orf Virus (ORFV) als Prototyp-Spezies, das bei Schafen und Ziegen den sog. „Lippengrind“ verursacht, während bei Rindern das Bovine Papuläre Stomatitis Virus (BPSV, auch Parapoxvirus bovis 1) sowie das Pseudokuhpocken Virus (PCPV, auch Parapoxvirus bovis 2 oder Paravaccinia Virus) von Bedeutung sind. Erst kürzlich wurde mit dem Parapockenvirus des Rotwildes in Neuseeland (PVNZ) die vierte Spezies etabliert.

Das durch Parapockenviren hervorgerufene Krankheitsbild einer lokalen pustulären Dermatitis ist prinzipiell bereits seit mehreren Jahrhunderten bekannt. Erste schriftliche Aufzeichnungen zum Auftreten der Erkrankung bei Schafen stammen aus dem Jahre 1787 (Steeb, 1787). Auch Edward Jenner fiel bereits im 19. Jahrhundert auf, dass es unterschiedliche ätiologische Agenzien als Verursacher der Euterpocken beim Rind geben muss. Denn während die Infektion mit echten Kuhpocken („*true Cow Pox*“; *Vaccinia Virus*) zu einem anhaltenden Schutz des Menschen gegen die gefährlichen Menschenpocken führte, hatte eine Infektion mit den falschen Kuhpocken („*spurious Cow Pox*“; Pseudokuhpocken Virus) keinerlei Schutzwirkung (Jenner, 1863). Eine Erklärung dieser Beobachtung liefert aus moderner Sicht die fehlende Kreuzimmunität zwischen Ortho- und Parapockenviren. Ebenfalls seit mehr als 100 Jahren bekannt ist die Tatsache, dass Parapockenviren auf den Menschen übertragen werden können (Hansen, 1879). Dies bedingt, dass Parapockenviren zu den Zoonose-Erregern gehören. Die Infektion des Menschen gilt als Berufskrankheit und betrifft insbesondere alle Personengruppen mit intensivem Kontakt zu Hauswiederkäuern.

Bei Schaf, Ziege und Rind ist die Parapockenvirusinfektion heutzutage vordergründig wegen ökonomischer Einbußen in Zusammenhang mit größeren Herdenausbrüchen von Bedeutung. Neben anderen Pockenviruspezies, speziell dem Vaccinia Virus (VACV), sind die Parapockenviren überdies von besonderem Interesse, weil sie sich zur Herstellung von rekombinantem Virus bzw. von Vektorvakzinen eignen. Bedingt durch ihre besonderen Eigenschaften sind Pockenviren hierzu prädestiniert: sie besitzen ein großes DNA-Genom mit nicht essentiellen Bereichen, die zur Insertion und Expression von Fremdgenen gut geeignet sind. Darüber hinaus sind gerade die Parapockenviren in ihrem Wirtsspektrum sehr beschränkt und nicht in der Lage sich systemisch zu verbreiten, was die Sicherheit in der Anwendung erhöht. Dennoch wirken sie gleichzeitig auch in nicht permissiven Wirten stark immunstimulierend (Büttner & Rziha, 2002; Haig & Mercer, 2008).

1.1 Viruscharakteristika

1.1.1. Virusaufbau und Replikation

Das Parapocken-Virion nimmt unter den Pockenviren eine morphologische Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu vielen anderen Familienvertretern erscheint es nicht typisch „ziegelsteinförmig“, mit einer unregelmäßigen Anordnung der Oberflächenproteine, sondern zeichnet sich durch eine ovoide Form und seine charakteristisch regelmäßige Oberflächenstruktur aus (Nagington *et al.*, 1964). Tubuläre Proteinfilamente, die in spiralgem Verlauf in die äußere Membran eingelagert sind, ergeben unter dem Elektronenmikroskop das unverkennbare Erscheinungsbild des Virions, das an ein Wollknäuel oder einen Bienenkorb erinnert. Die unversehrte Form dieser Partikel bezeichnet man auch als M (Maulbeeren, *mulberry*)-Form. Dringen beim Negativkontrastierungsverfahren schwermetallhaltige Salze (z.B. Uranlyacetat) in das Virion ein, scheint es von einer feinen Hülle umgeben und nimmt so die C (kapsuläre, *capsulated*)-Form an (Binns & Smith, 1992). Mit einer Größe von durchschnittlich 260x160 nm ist das Parapocken-Virion außerdem etwas kleiner als beispielsweise das Vaccinia-Viruspartikel (ca. 300x240 nm) (Abdussalam & Cosslett, 1957; Nagington *et al.*, 1962; Nagington & Horne, 1962). Die individuelle Morphologie des Parapocken-Virions ermöglicht seine unkomplizierte Abgrenzung zu anderen Vertretern der Familie.

Allen Pockenviren gemeinsam hingegen ist ihr komplexer Aufbau, der sich grundsätzlich von dem anderer Viren unterscheidet. Im Inneren befindet sich ein bikonkaves Core, welches die virale DNA sowie assoziierte Proteine (= Nukleokapsid oder Nukleoprotein-Komplex) beherbergt. Zu beiden Seiten des Cores liegen in dessen Einziehungen zwei linsenförmige Lateralkörper, über deren Funktion bisher noch Unklarheit besteht. Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei diesem klassischen Erscheinungsbild der Pockenviren möglicherweise um Dehydratationsartefakte im Zusammenhang mit der Präparation für die Elektronenmikroskopie handeln könnte (Dubochet *et al.*, 1994). Neuere Arbeiten haben dies jedoch teilweise bereits widerlegt (Spehner *et al.*, 2004).

Ungeachtet der Tatsache, dass es sich um DNA-Viren handelt, findet die Replikation der Pocken- und somit auch der Parapockenviren ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle statt (Robinson & Balassu, 1981; Thomas *et al.*, 1980). Diese Besonderheit erklärt sich durch eine weitgehend viruseigene Replikationsmaschinerie mit Proteinen, die für die Zellkern-unabhängige Transkription und Replikation des Virusgenoms benötigt werden und die von viraler DNA selbst kodiert werden. Die intrazytoplasmatische Parapocken-Virusvermehrung hinterlässt allerdings - in Form feiner filamentöser Veränderungen - auch Spuren im Zellkern (Pospischil & Bachmann, 1980).

Ein neuer Infektionszyklus (schematische Darstellung siehe Abbildung 1) wird durch das Anheften eines infektiösen Viruspartikels (IMV- oder EEV-Partikel) initiiert. Bisher ist kein spezifischer adsorptionsvermittelnder Zellrezeptor bekannt, vielmehr spielen offenbar verschiedene Virusproteine sowie Glykosaminoglykane (GAG) auf der Oberfläche der Zielzelle eine wichtige Rolle (McFadden, 2005). Unter Verlust seiner Membranhüllen wird das Virus in die Zelle aufgenommen, wobei gleichzeitig die Freisetzung des Cores erfolgt (*initial uncoating*) ❶. Dieses wird über Mikrotubuli weiter ins Innere der Zelle, in den perinukleären Bereich, transportiert ❷. Es verfügt über ein vollständiges System zur Transkription früher Gene (engl. *early genes*), sodass deren Transkription frühzeitig eingeleitet werden kann ❸. Zu den Produkten früher Gene zählen unter anderem immunmodulatorische Proteine, Replikations- und Transkriptionsfaktoren. Mit der Entlassung des Nukleoprotein-Komplexes aus dem Core ins Zytoplasma (*secondary uncoating*) ❹, wird die frühe Phase der Transkription beendet und die Replikation des Virusgenoms (in Form eines Konkatemers) beginnt ❺.

Die Synthese neuer viraler DNA wird beim Parapockenvirus erst verhältnismäßig spät eingeleitet (ca. 4-8 Stunden post infectionem (p.i.)) (Robinson & Balassu, 1981; Thomas *et al.*, 1980), erfolgt beim Vaccinia Virus dagegen schon 1-2 Stunden p.i. (Esteban & Holowczak, 1977). Zusätzlich wird jetzt auch die Transkription und Translation intermediärer Gene (engl. *intermediate genes*) initiiert ⑥. Diese Prozesse finden in sog. Virusfabriken (Virosomen) statt und werden im Wesentlichen durch die Genprodukte früherer Gene vermittelt, wohingegen die anschließende Phase der späten Genexpression ⑦ wiederum durch die Genprodukte intermediärer Gene herbeigeführt wird. Späte Gene (engl. *late genes*) kodieren insbesondere für Strukturproteine und Proteine, die essentiell für die Virion-Morphogenese sind. Sind alle Komponenten vorhanden, wird der Zusammenbau der Viruspartikel (engl. *virus assembly*) eingeleitet ⑧: halbmondförmige Membranen umgeben die viralen Core Proteine sowie das Virusgenom, das aus dem intermediären Konkatermer prozessiert wird. Es entstehen zunächst unreife Virionen, die sich anschließend zu sog. intrazellulären reifen Partikeln (engl. *intracellular mature virus* = IMV oder MV) ⑨ entwickeln. Diese besitzen lediglich eine einfache Hüllmembran und werden schließlich durch Lyse der infizierten Zelle freigegeben, oder aber zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert, wo sie mit zwei weiteren Membranen versehen werden (Schmelz *et al.*, 1994). Partikel dieser Art werden als intrazelluläre behüllte Partikel (engl. *intracellular enveloped virus* = IEV) ⑩ bezeichnet. Tritt ein IEV-Partikel mit der Zellmembran in Kontakt, kommt es zur Fusion der äußeren Virusmembran mit der Zytoplasma-Membran und es entstehen zellassoziierte Partikel mit zwei Lipiddoppelschichten (engl. *cell-associated enveloped virus* = CEV) ⑪. Nach Ablösung der CEV von der Zelloberfläche werden diese als extrazelluläre behüllte Virionen angesprochen (engl. *extracellular enveloped virus* = EEV oder EV) ⑫. Während die IMV- und EEV-Partikel vor allem der Ausbreitung der Infektion im Organismus und auf den nächsten Wirt dienen, sind CEV die Partikel, die die Virusweiterverbreitung von Zelle zu Zelle (*cell to cell spread*) verursachen. Die Kenntnisse zum Replikationszyklus der Parapockenviren basieren im Wesentlichen auf denen vom Vaccinia Virus, die bereits hinreichend bewiesen und beschrieben wurden (Moss, 1996). Da Parapockenviren allerdings homologe Gene zu zahlreichen replikationss essentiellen Genen des Vaccinia Virus besitzen (Delhon *et al.*, 2004; Hautaniemi *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 2006) und entscheidende Merkmale des Replikationszyklus innerhalb der Familie der Pockenviren hoch konserviert sind (Moss, 2001), ist davon auszugehen, dass der Ablauf prinzipiell vergleichbar ist.

Eichhörnchen Pockenvirus (SQPV; 66 %) (Thomas, 2003) und das Krokodil Pockenvirus (CPV; 62 %) (Afonso *et al.*, 2006). Erste Parapockenvirus-Gesamtgenomanalysen stammen aus dem Jahr 2004 von Delhon und Kollegen. Sie untersuchten neben dem ORFV SA00 (Ziege) und IA82 (Schaf) auch einen Vertreter der Spezies BPSV (AR02) und konnten zeigen, dass insgesamt 132 (ORFV) bzw. 133 Gene (BPSV) kodiert werden. Die später sequenzierten Genome der PCPV-Stämme VR634 und F00.120R verfügen über 131 bzw. 134 Gene (Hautaniemi *et al.*, 2010). Im Zentrum des DNA-Genoms aller Vertreter der Subfamilie *Chordopoxvirinae* findet man ein Set aus 88 konservierten Genen, die in der gleichen Reihenfolge und Orientierung auftreten. Diese Kern-Gene (engl. *core genes*), welche Homologien zu entsprechenden Genen im Vaccinia Virus-Genom aufweisen, kodieren im Wesentlichen essentielle Proteine der Transkriptions- und Replikationsmaschinerie (Gubser, 2004; Mercer *et al.*, 2006; Upton *et al.*, 2003). Demgegenüber sind am links- und rechtsterminalen Bereich der DNA nicht-essentielle, oftmals Genus- oder Spezies-spezifische Gene lokalisiert. Sie sind hauptsächlich für die Virulenz des Virus von Bedeutung oder spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Virus und Wirt. So werden hier beispielsweise auch Proteine kodiert, die bei der Regulation der Immunantwort des Wirtes eine Rolle spielen (Seet *et al.*, 2003a). Einzelne Gene bzw. offene Leserahmen (engl. *open reading frames*, ORFs) liegen meist nicht überlappend vor und zwischen ihnen finden sich lediglich sehr kurze nicht kodierende Abschnitte. Das Genom der Parapockenviren weist eine bemerkenswerte Plastizität auf. Bei der Adaptation des Virus an Zelllinien oder dem Passagieren in Zellkultur kann es bereits frühzeitig (nach nur wenigen Passagen) zur Deletion und Translokation von Genen bzw. ganzen Genombereichen kommen (Cottone *et al.*, 1998; Hautaniemi *et al.*, 2011).

1.1.3. Virulenzfaktoren

Parapockenviren haben eine Vielzahl von Strategien entwickelt das Immunsystem ihres Wirtes zu torpedieren. Ziel dabei ist es, die Entzündungsreaktion sowie eine (frühzeitige) antivirale Immunantwort zu modulieren bzw. zu inhibieren, sodass die Etablierung der Virusinfektion und die lokale Virusreplikation gewährleistet sind. Dem Parapockenvirus stehen zu diesem Zweck verschiedene Virulenzfaktoren zur Verfügung (die dazugehörigen Virulenz-Gene sind als ORF in Klammern angegeben): Ankyrin-repeat / F-box-Proteine (008, 123, 126, 128, 129; BPSV auch 003+004),

Pockenvirus Anaphase-fördernder Komplex-Regulator (014), Interferon-Resistenz-Protein (020), Chemokin-bindendes-Protein (112), GM-CSF / IL2-Inhibitor (117), NF- κ B-Inhibitor (121), vIL10 (127) und vVEGF (132; BPSV: 006).

Ankyrin-repeat / F-box-Proteine

(ORFs 008, 123, 126, 128, 129; BPSV auch 003+004)

Das Ankyrin (ANK)-repeat-Motiv ist eine gängige Sequenz aus 33 Aminosäuren, die erstmals bei Hefen und Taupflanzen beschrieben wurde (Breedon & Nasmyth, 1987), aber unter allen zellulären Lebewesen (Bakterien, Archaeen, Eukaryoten) weit verbreitet ist. Obwohl Ankyrin-repeat-Motive bei Viren selten sind, besitzen sie fast alle *Chordopoxvirinae* (Mercer *et al.*, 2005). Die ANK / F-box-Proteine der Parapockenviren verfügen über zwei Domänen: eine enthält das ANK-Motiv in 6-9 facher Wiederholung (N-terminal), bei der anderen handelt es sich um eine F-box ähnliche Domäne (C-terminal) (Mercer *et al.*, 2005). ANK-Domänen werden mit verschiedenen wichtigen Funktionen in Zusammenhang gebracht, darunter die Signalübertragung von Zelle zu Zelle, Transkription, Immunantwort und Regulation des Zellzyklus. Generell vermitteln sie Protein-Protein-Wechselwirkungen (Li *et al.*, 2006; Mosavi *et al.*, 2004; Voronin & Kiseleva, 2008). Dagegen dienen F-box-Proteine der posttranslationalen Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung (Ho *et al.*, 2006) - Zielproteine werden durch das Anhängen von Ubiquitin markiert und anschließend durch das Proteasom degradiert. Kürzlich gelang es nachzuweisen, dass die F-box des ORFV mit dem zellulären Ubiquitin-Ligase-Komplex interagiert und funktionell aktiv ist (Sonnberg *et al.*, 2008).

Wenngleich ANK / F-box-Proteine in hoher Zahl bei Pockenviren vorkommen, so ist ihre Funktionsweise und konkrete Rolle in der Pathogenese doch kaum entschlüsselt. Sonnberg *et al.* (2008) regten die Theorie an, dass das Virus die ANK / F-box-Proteine nutzt, um dem zellulären Ubiquitin-Ligase-Komplex seine eigenen Zielprotein-Präferenzen aufzuzwingen. Auf diesem Wege könnten unerwünschte Proteine der Wirtszelle einfach entfernt werden.

Pockenvirus Anaphase-fördernder Komplex-Regulator (ORF 014)

Parapockenviren kodieren für ein RING-H2-Protein mit Sequenzähnlichkeit zur Untereinheit 11 des Anaphase-fördernden Komplexes (engl. *anaphase-promoting*

complex, APC). Dieser Enzymkomplex, der bei allen Eukaryoten vorkommt, spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus (Peters, 1999). Eine Schlüsselfunktion des APC ist, die Zelle in der G0 / G1-Zellzyklusphase zu arretieren. Um in die S-Phase einzutreten muss in der Zelle APC abgeschaltet werden. Das ORFV-Homolog zu APC11 wurde Pockenvirus Anaphase-fördernder Komplex-Regulator (engl. *poxvirus anaphase-promoting complex regulator*, PACR) genannt. Er ist ebenfalls beim Molluscum contagiosum Virus, dem Krokodil Pockenvirus und dem Eichhörnchen Pockenvirus zu finden (Mo *et al.*, 2009). PACR tritt mit dem APC der Wirtszelle über APC2 in Verbindung und konkurriert dabei mit APC11 um die Aufnahme in den APC (Mo *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass ORFV diesen Virulenzfaktor nutzt, um differenzierte Zellen der Epidermis zur Bereitstellung zellulärer Faktoren zu zwingen, die die virale DNA-Replikation unterstützen. Mit Hilfe von PACR könnte das Virus die Zellen zum Übergang in die S-Phase bringen und sich damit optimale Replikationsbedingungen schaffen (Mo *et al.*, 2009).

Interferon-Resistenz-Protein (ORF 020)

Die Wirtszelle ist in der Lage durch die Freisetzung von Interferonen auf das Vorhandensein eines Pathogens (z. B. Virus) zu reagieren. Interferone sind v. a. für ihre antivirale Wirkung bekannt, die durch eine Hemmung der Virusreproduktion bzw. -replikation zustande kommt, zusätzlich haben sie immunstimulierende und proliferationshemmende Effekte (Samuel, 2001; Sen, 2001). Das Parapockenvirus-Genom verfügt linksterminal über ein Interferon-Resistenz (VIR oder IFNR)-Gen, welches ortholog zu dem Vaccinia Virus-Gen E3L ist (McInnes *et al.*, 1998). Das entsprechende Genprodukt verhindert in virusinfizierten Zellen das interferonvermittelte Abschalten der Proteinbiosynthese. Dies geschieht durch die Bindung des Interferon-Resistenz-Proteins an virale Doppelstrang-RNA (ds RNA), die über die C-terminale Bindungsstelle des Proteins vermittelt wird (McInnes *et al.*, 1998). In der Konsequenz kann eine ds RNA-abhängige Protein-Kinase (PKR) nicht mehr interferonvermittelt aktiviert werden. Das wiederum führt dazu, dass auch die Inaktivierung eines speziellen Translations-Initiations-Faktors unterbleibt, die andernfalls zur Unterdrückung der Proteintranslation führen und die Virussynthese damit unterbinden würde (Haig & Fleming, 1999). Zugleich wird der PKR auch eine Rolle im Zusammenhang mit dem „programmierten Zelltod“ (Apoptose) zugeschrieben,

sodass VIR über die Inhibition der PKR auch den Untergang von Zellen verhindern kann (Haig, 2001).

Chemokin-bindendes-Protein (ORF 112)

Wie die Vertreter der Genera Orthopox- und Leporipoxvirus exprimieren auch die Parapockenviren ein Chemokin-bindendes-Protein (CBP) (Seet *et al.*, 2003b). Chemokine sind kleine sekretorische Proteine, die der Übergruppe der Zytokine angehören. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Auslösung der Chemotaxis (Wanderung entlang eines Chemokin-Konzentrationsgradienten) bei Immunzellen, die so an den Ort einer Entzündung bzw. Infektion rekrutiert werden, aber auch bei der homöostatischen Leukozytenwanderung durch die lymphatischen Organe (Baggiolini, 1998; Cyster, 1999). Entsprechend der Anordnung der Cystein-Reste am N-Terminus unterscheidet man vier Chemokin-Untergruppen: CC, CXC, CX3C, XC (Rollins, 1997; Zlotnik & Yoshie, 2000). Das CBP der Parapockenviren gehört den Typ II CC-Chemokin-bindenden-Proteinen (CBP II, auch vCCI) an. Sie binden mit hoher Affinität an CC-Chemokine und besetzen gezielt die Strukturen, über die eine Bindung zwischen Chemokin und dem zellulären Rezeptor vermittelt wird (Couñago *et al.*, 2010). So unterbinden sie die entsprechende Wirkung des Chemokins. Seet *et al.* charakterisierten 2003 das CBP des ORFV NZ2 genauer und stellten dabei fest, dass dieses über ein einzigartiges Bindungsspektrum verfügt: es bindet nicht nur CC-Chemokine, sondern darüber hinaus auch das C-Chemokin Lymphotaktin, das chemotaktischen Einfluss vorwiegend auf Lymphozyten, natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten und B-Zellen besitzt (Huang *et al.*, 2001). Weitere Forschungsgruppen konnten demonstrieren, dass CBP die Einwanderung von Monozyten und dendritische Zellen in das entzündete Gewebe sowie in die regionalen Lymphknoten unterbindet (Lateef *et al.*, 2009, 2010).

GM-CSF / IL2-Inhibitor (ORF 117)

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es in Keratinozyten, die mit ORFV infiziert wurden, zur Hochregulierung von Genen kommt, die für inflammatorische Zytokine kodieren (Lear, 1995). Hierzu zählt auch das GM-CSF kodierende Gen (engl. *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*). Während allerdings die entsprechenden Genprodukte (z.B. IL8) in der beschriebenen Studie anschließend auch messbar waren, konnte dennoch kein GM-CSF nachgewiesen werden. Eine Erklärung

hierfür liefert der von ORFV exprimierte *GM-CSF / IL2 inhibitory factor* (GIF), der als intermediäres / spätes Genprodukt ca. 12-18 Stunden nach der Infektion der Zelle gebildet wird (Deane *et al.*, 2000). Er ist in der Lage ovines GM-CSF und Interleukin-2 (IL2) zu binden und somit zu inhibieren (Deane *et al.*, 2000; McInnes *et al.*, 2005). GM-CSF stimuliert die Differenzierung von Progenitor-Zellen in neutrophile und eosinophile Granulozyten, in Monozyten und Makrophagen und bewirkt im Rahmen von Entzündungsprozessen die Rekrutierung und Aktivierung selbiger Zellen (Haig & Fleming, 1999; McNiece, 1997). IL2 wird von T-Zellen erzeugt und für die Aktivierung von T-Zellen und natürlichen Killerzellen benötigt, zusätzlich stimuliert es deren Proliferation (Farner *et al.*, 1997; Haig, 2001; Haig & Fleming, 1999). Mittlerweile konnte auch in PCPV und BPSV ein entsprechendes GIF-Protein kodierendes Gen nachgewiesen werden. Während allerdings das GIF aus PCPV sowohl ovines als auch bovines GM-CSF und IL2 bindet, trifft dies für das GIF-Protein aus BPSV nicht zu - es zeigte keine Bindungsaktivität (Deane *et al.*, 2009). Interessanterweise konnte bisher bei keinem anderen Pockenvirus ein ähnliches Protein, das in der Lage ist diese beiden Zytokine zu binden, nachgewiesen werden. Die genaue Rolle von GIF in der Pathogenese der Parapockenviren konnte bisher nicht geklärt werden (Haig & Fleming, 1999).

NF- κ B-Inhibitor (ORF 121)

Bei NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) handelt es sich um eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die jeweils durch Aneinanderlagern Homo- bzw. Heterodimere bilden können. Diese binden spezifisch an bestimmte Promoter-Sequenzen der DNA, die κ B-Motive, und regulieren so die Expression davon abhängiger zellulärer Gene. Eine Vielzahl von Genen wird auf diese Weise durch NF- κ B gesteuert, darunter solche, die bei Entzündung, Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose und der adaptiven Immunantwort von Bedeutung sind (Oeckinghaus & Ghosh, 2009; Tripathi & Aggarwal, 2006; Vallabhapurapu & Karin, 2009). Dies konnte speziell auch für Keratinozyten demonstriert werden (Pasparakis, 2009; Weisfelner & Gottlieb, 2003). Verschiedene Stimuli, u. a. Viren, können zu einer Aktivierung von NF- κ B führen (Mohamed & McFadden, 2009) und bewirken so die verstärkte Transkription bestimmter Gene, die eine wichtige Rolle für eine frühe antivirale Immunantwort spielen. Pockenviren unterschiedlicher Genera verfügen jedoch über NF- κ B-Inhibitoren, um diesen Mechanismus zu umgehen (Mohamed &

McFadden, 2009). Der Parapockenvirus-spezifische ORF 121 des ORFV codiert einen solchen NF- κ B-Inhibitor, der durch seine Bindung an NF- κ B-p65 dessen Phosphorylierung und Translokation in den Zellkern verhindert und damit auch dessen transaktivierende Wirkung unterbindet (Diel *et al.*, 2011a). Dieser Wirkmechanismus ist unter den pockenviralen NF- κ B-Inhibitoren einzigartig (Diel *et al.*, 2011a). Auch bei den Genprodukten von ORF 002 und 024 handelt es sich um NF- κ B-Inhibitoren (Diel *et al.*, 2010, 2011b), allerdings ist nur das durch ORF 121 kodierte Protein tatsächlich von Bedeutung für die Virulenz des Virus (Diel *et al.*, 2011a).

vIL10 (ORF 127)

1997 wurde erstmals publiziert, dass ORFV virales Interleukin-10 (vIL10) exprimiert (Fleming *et al.*, 1997). Während vIL10 bereits früher auch bei Herpesviren nachgewiesen werden konnte (Moore *et al.*, 1990; Rode *et al.*, 1993), war dies für Pockenviren neu. Im Säugetier spielt das anti-inflammatorische IL10, das von Monozyten und TH2-Lymphozyten sezerniert wird, als Immunregulator eine wichtige Rolle, indem es die Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen, Epi- und Endothelzellen sowie weiteren Zellarten unterbindet (Grütz, 2005; Moore *et al.*, 1993; Slobedman *et al.*, 2009; de Waal Malefyt *et al.*, 1991). Ihm fällt damit die Aufgabe zu, eine Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren herzustellen, um so eine regulierte Immunantwort auf ein Pathogen zu ermöglichen.

Das virale IL10 der Parapockenviren ist ein Ortholog des Säuger-IL10 und verfügt über die gleiche funktionelle Aktivität (Fleming *et al.*, 2000). Sequenzanalysen haben gezeigt, dass eine 80 %ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von vIL10 des ORFV zu ovinem IL10 besteht; interessanterweise zeigen sich Unterschiede ausschließlich in der N-terminalen Region, während die C-terminalen zwei Drittel von ovinem und viralem IL10 zu 100 % identisch sind (Fleming *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass das Virus das entsprechende Gen im Laufe der Evolution von seinem Wirt, in diesem Fall dem Schaf, übernommen hat. ORFV vIL10 besitzt außerdem eine 67 %ige Übereinstimmung zu humanem IL10 (Fleming *et al.*, 2000). Auch bei anderen Parapockenviruspezies konnten in der Zwischenzeit IL10-ähnliche Gene belegt werden (Hautaniemi *et al.*, 2010; Rziha *et al.*, 2003). Nachdem die Deletion des IL10-kodierenden Gens in rekombinanten ORFV bei Versuchen mit Schafen zu deutlich weniger ausgeprägten Läsionen führte, sah man die

Kategorisierung von vIL10 als Virulenzfaktor bestätigt (Fleming *et al.*, 2007). Durch vIL10 wird die TNF- α - und IL8-Synthese in Makrophagen und Keratinozyten, ebenso wie die Interferon- γ -Produktion durch aktivierte Lymphozyten bereits frühzeitig inhibiert (Fleming *et al.*, 2000). Auf diese Weise gewinnt das Virus Zeit für die Replikation, ehe die adaptive Immunantwort greift (Haig *et al.*, 2002). Da ovine Keratinozyten kein IL10 exprimieren, ist es für das Virus umso wichtiger, selbst dazu in der Lage zu sein (Haig *et al.*, 2002). Erst kürzlich wurde vIL10 auch mit der Regulation von Hautreparaturprozessen in Zusammenhang gebracht. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die regelmäßige Behandlung von Wunden mit vIL10 die Reepithelisierung, Granulation des Wundbettes und Revaskularisierung beschleunigt und gleichzeitig die Narbenbildung reduziert (Wise *et al.*, 2014).

vVEGF (ORF 132, BPSV ORF 006)

Der erste beschriebene Virulenzfaktor der Parapockenviren war der virale vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*; VEGF) (Lyttle *et al.*, 1994). Ähnlich wie beim viralen IL10 handelt es sich auch beim vVEGF (als neue Untergruppe der VEGF-Familie als VEGF-E bezeichnet) um das virale Homolog eines entsprechenden Säugerproteins (VEGF-A). Mitglieder der VEGF Familie regulieren die Funktion und Proliferation endothelialer Zellen, die Gefäßpermeabilität und außerdem die Angio- und Lymphangiogenese (Ferrara, 2004; Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Dies geschieht über die Bindung an spezielle VEGF-Rezeptoren. Dabei nimmt das vVEGF von ORFV eine Sonderstellung ein, weil es sich als einziger Vertreter nur des VEGF-Rezeptors VEGFR-2, nicht aber des VEGFR-1-Rezeptors (wie für VEGF-A üblich) bedient sowie des neuentdeckten VEGF-Rezeptors Neuropilin-1 (Meyer *et al.*, 1999; Wise *et al.*, 1999). Das vVEGF von BPSV, das dem Säuger-VEGF-A sehr viel ähnlicher ist, zeigt dagegen auch eine Bindung an VEGFR-1 (Inder *et al.*, 2007). Das Vorhandensein dieses Virulenzfaktors wird mit dem typischen Bild der proliferativen und stark vaskularisierten Hautläsionen bei einer Parapockenvirusinfektion in Zusammenhang gebracht, das histopathologisch durch Kapillarproliferation und -dilatation gekennzeichnet ist (Savory *et al.*, 2000; Wise *et al.*, 2003). Es kommt zu einer Zunahme von endothelialen Zellen und Blutgefäßen in der Dermis, einer Zunahme der Keratinozyten und einer Verdickung der Epidermis (Wise *et al.*, 2012). Dem Virus steht so eine erhöhte Zahl an Zellen für die Replikation zur Verfügung (Haig & McInnes, 2002). Ein auffallendes Merkmal der viralen VEGFs

ist ihre starke Sequenzvariation sowohl innerhalb einer Virusspezies als auch unter den verschiedenen Spezies. So stimmen die beiden ORFV-Stämme SA00 und IA82 in diesem Genbereich beispielsweise nur zu 38 % (Delhon *et al.*, 2004), die beiden vom Rotwild stammenden Parapockenviren HL953 und PVNZ 256/08 dagegen zu 100 % (Publikation 2) in ihrer vVEGF-Aminosäuresequenz überein. Vergleicht man die vVEGF-Sequenzen der unterschiedlichen Parapockenvirusspezies miteinander, ergeben sich Übereinstimmungen zwischen 35-63 % (Hautaniemi *et al.*, 2010). Trotz großer Sequenzunterschiede bleibt die Genfunktion dennoch erhalten, womit die Plastizität der Parapockenvirus-Genome auch auf der Basis einzelner Gene demonstriert ist. Da es sich bei vVEGF um einen nicht-essentiellen Virulenzfaktor handelt, eignet sich der entsprechende Genort zur Insertion und Expression von Fremdgenen - unter Virulenzminderung des rekombinanten Trägervirus (Rziha *et al.*, 2000).

1.1.4. Immunstimulation durch Parapockenviren

Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften der Parapockenviren ist ihre Fähigkeit selbst in inaktivierter Form den erregerspezifisch reaktiven Teil des Immunsystems, das sog. angeborene oder „*innate*“ (paraspezifische) Immunsystem zu aktivieren. Diese phylogenetisch sehr alte Komponente des Immunsystems spielt eine entscheidende Rolle in der Sofortabwehr unterschiedlichster Noxen und dient damit dem Schutz des Organismus, noch bevor die spezifische Immunität überhaupt greifen kann. Die Reaktionsart des angeborenen Immunsystems ist überdies von Bedeutung als Weichenstellung für den Übergang zu adaptiven Immunreaktionen. Die zahlreichen Virulenzfaktoren, die von Parapockenviren im Laufe der Evolution entwickelt wurden, dienten der optimalen Adaptation an den Wirt und scheinen in nicht-permissiven Wirten und getrennt von der lokalen Manifestation in der Haut nach allen bisher vorhandenen Kenntnissen keine Rolle zu spielen.

Unter den Parapockenviren findet der hochattenuierte ORFV Stamm D1701 als Immunstimulans (auch Paramunitätsinducer „PIND-ORF“) Verwendung. Dieser Virusstamm ist in inaktivierter Form unter dem Handelsnamen Zylexis® (vormals Baypamun®) bekannt. Er bewirkt eine Aktivierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*), darunter Makrophagen, NK-Zellen und T-Lymphozyten und führt so gleichzeitig zur Bildung zahlreicher Zytokine (Interferon α und γ , IL1, IL2, IL12, IL15, IL18, CSF, TNF)

(Büttner, 1993; Büttner *et al.*, 1995a; Mayr, 1999; Weber *et al.*, 2003). Fachinger *et al.* (2000) konnten zeigen, dass ORFV D1701 beim Schwein sogar im Sinne eines Superantigens wirkt, wobei es zu einer Antigen-unabhängigen Aktivierung und Proliferation von T-Zellen kommt. Erst vor wenigen Jahren wurden die immunstimulierenden Komponenten von ORFV charakterisiert. Insgesamt konnten in einer Studie 27 ORFs bzw. Proteine mit (starker) immunmodulatorischer Aktivität identifiziert werden (Friebe *et al.*, 2011).

Die Paramunisierung (paraspezifische Schutzimpfung) mit ORFV D1701 dient der Prophylaxe und Metaphylaxe von infektiösen Erkrankungen (Castrucci *et al.*, 1998, 2000; Hammerl *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 1999; Kyriakis *et al.*, 1998, 2002; Mayr *et al.*, 1991; Paillot, 2013; Strube *et al.*, 1989; Winnicka *et al.*, 2000; Ziebell *et al.*, 1997a, b) und Stresszuständen (Frerking *et al.*, 1995; Siebert, 1988; Ziebell *et al.*, 1997a) und ist für die Anwendung bei Hund, Katze, Rind, Schwein und Pferd zugelassen. Aber auch andere Tierarten können von einer Behandlung mit ORFV D1701 profitieren, wie beispielsweise die Regenbogenforelle (Ortega *et al.*, 1996). Bei der Hündin wurde überdies ein positiver Effekt von ORFV D1701 im Rahmen einer Mammatumour-Behandlung festgestellt (Berg & Rüsse, 1994).

Die Stimulation der unspezifischen Immunität durch ORFV D1701 führt in bestimmten Modellen zu einer signifikanten Reduktion der ausgeschiedenen Virusmenge bei Belastung durch Pathogene (Castrucci *et al.*, 2000). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund *crowding-assoziiierter* Erkrankungen (infektiöse Faktorenkrankheiten, hervorgerufen durch das Zusammenbringen vieler Tiere unterschiedlicher Herkunft) von Relevanz, da die verminderte Virusausscheidung das Risiko einer raschen Durchseuchung des gesamten Bestandes verringern kann.

Letztlich wurde auch für den Menschen eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten für eine Immunstimulation durch inaktivierte ORFV beschrieben und deren Wirksamkeit teilweise bereits belegt (Büttner *et al.*, 1995a; Mayr, 1999; Mayr *et al.*, 1986). Im Mausmodell konnte außerdem die Induktion einer antitumoralen Immunantwort durch inaktivierte ORFV demonstriert werden (Fiebig *et al.*, 2011; Rintoul *et al.*, 2012). Dies macht sie zu vielversprechenden Kandidaten in der Entwicklung neuer Therapeutika in der Onkologie.

2 Epidemiologie der Parapockenvirusinfektion

Parapockenviren treten ubiquitär in der Wiederkäuerpopulation auf. Sie besitzen jedoch im Gegensatz zu anderen Pockenviren ein deutlich engeres Wirtsspektrum, das sich in der Hauptsache auf Hauswiederkäuer (Schafe, Ziegen und Rinder) beschränkt. In vielen Regionen der Welt ist das Virus endemisch und führt Jahreszeiten-unabhängig zum Auftreten einer kontagiösen pustulären Dermatitis (engl. *contagious pustular dermatitis*; CPD), die sich insbesondere im Kopfbereich sowie am Euter betroffener Tiere manifestiert (Glover, 1928). Die Virusübertragung erfolgt durch direkten Kontakt zu infizierten Tieren oder indirekt über unbelebte Vektoren. In abgefallenen Borken und Krusten bleibt das Virus lange Zeit infektiös und kann so als Infektionsquelle für andere Tiere dienen (McKeever & Reid, 1986; Nandi *et al.*, 2011). Über Fleisch und Fleischprodukte infizierter Tiere kann es außerdem zu einer Weiterverbreitung des Virus auch über große Distanzen hinweg kommen.

Für eine erfolgreiche Infektion muss das epitheliotrope Virus zunächst über (kleinere) Haut- oder Schleimhautläsionen Zugang zu permissiven Zielzellen im Wirtsorganismus finden. Erst nach einer mehrstündigen Eklipse beginnt in Dermalfibroblasten und Keratinozyten der sich regenerierenden Epidermis die Virusreplikation (Jenkinson *et al.*, 1990; McKeever *et al.*, 1988). Im betroffenen Areal entwickelt sich schließlich ein Exanthem, das die Stadien Papel, Vesikel und Pustel durchläuft, bis sich nach etwa einer Woche Krusten formieren (Robinson & Balassu, 1981). Diese heilen im Laufe der nächsten 3-9 Wochen in der Mehrheit der Fälle komplikationslos ab und hinterlassen keine Narben (Haig & Mercer, 2008). Allerdings bildet sich auch nach überstandener Infektion keine belastungsfähige Immunität aus, sodass es immer wieder zu Reinfektionen kommen kann (Mayr & Büttner, 1990). Ein hohes Aufkommen stacheliger Pflanzen auf der Weide (z.B. Disteln) kann durch das erhöhte Risiko kleiner Hautverletzungen die klinische Manifestation begünstigen.

Obwohl i.d.R. v.a. Jungtiere betroffen sind, können prinzipiell Tiere jeden Alters erkranken. Lämmer oder Kälber können sich über das Euter des Muttertiers infizieren, aber auch ihrerseits das Virus über Läsionen in der Maulschleimhaut beim Saugen auf das Euter der Mutter oder das eines anderen Tieres („Fremdsaugen“) übertragen. Die Morbidität in der Herde ist häufig hoch und kann bis zu 100 % betragen (Gardiner *et al.*, 1967), wohingegen die Mortalität bei guter Hygiene selten mehr als 1 % beträgt. Können betroffenen Jungtiere aufgrund hochgradig schmerzhafter Läsion im Maul nicht

mehr saugen oder kommt es zu Sekundärinfektionen durch Pilze oder Bakterien, kann die Mortalitätsrate dagegen stark ansteigen (Darbyshire, 1961; Haig & Mercer, 1998; Mazur & Machado, 1989; Robinson & Balassu, 1981). Als Virusreservoir gelten u. a. kontaminierte Weiden und subklinisch infizierte Tiere, die zum unvorhersehbaren (Wieder-)Auftreten der Erkrankung im Bestand führen können.

3 Parapockenviren bei Nutz- und Wildtieren

3.1. Parapockenviren bei Nutztieren

3.1.1. Parapockenviren bei Schaf und Ziege

Das Orf Virus, Parapockenvirus der kleinen Wiederkäuer, verursacht bei Schafen und Ziegen den Lippengrind, auch als Orf, ansteckende Pustulardermatitis oder wissenschaftlich korrekt als Ecthyma contagiosum bezeichnet. Im englischen Sprachraum sind die Begriffe *scabby mouth* oder *sore mouth* gebräuchlich. Ohne Zweifel spielt ORFV unter den Parapockenviren eine besonders wichtige Rolle und ist immer wieder für umfangreiche und teilweise schwerwiegende Krankheitsausbrüche in der Schaf- und Ziegenpopulation verantwortlich. Gerade in Ländern mit hoher Schafproduktionsrate (China, Neuseeland, Australien) ist die Kontrolle der Erkrankung von wirtschaftlicher Bedeutsamkeit. Finanzielle Einbußen ergeben sich aus einer erhöhten Lämmersterblichkeit, dem schlechten Wachstum der Jungtiere und der verminderten Produktivität adulter Tiere durch einen schlechten Allgemeinzustand.

Generell unterscheidet man bei Schaf und Ziege vier Verlaufsformen der Erkrankung, die durch eine entsprechend unterschiedliche Symptomatik gekennzeichnet sind. Bei der labialen Form sind Bläschen und Pusteln überwiegend im Bereich der Nase, der Lippen, der Ohren und der Augen lokalisiert. Sie tritt besonders häufig auf, verläuft aber vielfach milde. Dahingegen sind bei der podalen Form die Klauen und hier besonders der Kronsaum betroffen (Egerton, 2007). Da diese Veränderungen i. d. R. sehr schmerzhaft sind, können oftmals Lahmheiten beobachtet werden. Die seltenere genitale Form zeigt sich durch Effloreszenzen im Bereich der Schenkelinnenseite und der Vulva bzw. des Präputiums (Billinis *et al.*, 2012; Gouletsou & Fthenakis, 2010). Bei Mutterschafen ist vielfach das Euter betroffen, was dazu führen kann, dass die Lämmer

nicht mehr gesäugt und verstoßen werden. Charakteristisch für die maligne Form ist der besonders schwere Verlauf, der bei Lämmern häufig zum Tod führt. Es treten ausgeprägte blumenkohlartige Wucherungen und / oder blutige Läsionen („*bloody lesions*“) an Haut und Schleimhäuten auf, daneben können auch innere Organe wie der Pansen mitbetroffen sein (Bouznach *et al.*, 2013). Die Tiere zeigen ein schwer gestörtes Allgemeinbefinden, Fieber, Lymphknotenschwellungen und Ödeme (v. a. am Kopf). In vielen Fällen ist eine Nahrungsaufnahme nicht mehr oder nur noch eingeschränkt möglich, sodass die Tiere, wenn nicht manuell zugefüttert wird, verhungern können. Außergewöhnlich schwere Verläufe werden immer wieder aus verschiedenen Ländern der Welt berichtet (Abu & Housawi, 2009; de la Concha-Bermejillo *et al.*, 2003; Abu Elzein & Housawi, 1997; Gumbrell & McGregor, 1997; Guo *et al.*, 2003; Mazur & Machado, 1989; de Oliveira *et al.*, 2012). Ob dabei das individuell geschwächte Immunsystem der betroffenen Tiere oder eine erhöhte Virulenz des verursachenden Virus der ausschlaggebende Faktor ist, bleibt bisher ungeklärt.

Bestimmte Rassen, wie die Burenziege, scheinen eine ausgeprägte Empfänglichkeit für ORFV zu besitzen, wobei es besonders häufig zum Auftreten einer schweren Symptomatik kommt (de la Concha-Bermejillo *et al.*, 2003; Ndikuwera *et al.*, 1992; Scagliarini *et al.*, 2012).

Im Laufe der Erkrankung kommt es zwar zu einer zellulären und humoralen Immunantwort, dennoch besteht nur ein kurzer Immunschutz (Mayr & Büttner, 1992; Robinson & Balassu, 1981). Lämmer erhalten nach der Geburt über das Kolostrum maternale Antikörper, diese sind aber nicht protektiv und daher offensichtlich nicht virusneutralisierend (Buddle & Pulford, 1984). Um den Bestand zu schützen und insbesondere die Lämmerverluste minimal zu halten, können Schafe und Ziegen geimpft werden. Hierzu verwendet man durch mehrfaches Passagieren in Zellkultur attenuierte, avirulente Orf Virus-Stämme. Der erste experimentelle Impfstoff dieser Art stammt aus dem Jahre 1981 (Mayr *et al.*, 1981). Obwohl der Impfschutz nicht langfristig besteht und auch Reinfektionen nicht gänzlich verhindert werden können, führt die Impfung doch immerhin zu einer Abmilderung der klinischen Symptomatik (McInnes *et al.*, 2001; Nettleton *et al.*, 1996). Kommerzielle Impfstoffe sind nur in wenigen Ländern mit wirtschaftlich bedeutender Schafproduktion zugelassen.

3.1.2. Parapockenviren beim Rind

Im Vergleich zur Orf-Krankheit der kleinen Wiederkäuer spielt die Parapockenvirusinfektion beim Rind eine eher untergeordnete Rolle. Prinzipiell unterscheidet man zwei unterschiedliche Krankheitsbilder: die Stomatitis papulosa, verursacht durch BPSV sowie die Euter- oder Pseudokuhpocken, die durch PCPV hervorgerufen werden.

Bei der Stomatitis papulosa handelt es sich um zumeist gutartig verlaufende lokale Entzündungsprozesse, die hauptsächlich Kälber und Jungrinder betreffen (Fraser & Savan, 1962; Griesemer & Cole, 1960). Sie sind gekennzeichnet durch das Auftreten einer erosiven bis proliferativen Stomatitis. Betroffene Bereiche sind das Flotzmaul, das Zahnfleisch, die Zunge und der Gaumen (Jolly & Daniel, 1966). Eine auffallende Symptomatik ist nur bei Jungtieren zu erwarten, adulte Rinder erkranken gewöhnlich nicht, können aber möglicherweise klinisch inapparent infiziert sein. Durch den Zukauf solcher symptomfreier Tiere kann es insbesondere in Großbetrieben nach Stresssituationen zu Ausbrüchen mit verhältnismäßig hoher Morbidität kommen. Dass das Virus offensichtlich subklinisch im Wirtsorganismus persistieren kann, konnte 2011 von Dal Pozzo *et al.* gezeigt werden. Sie berichteten über das plötzliche Auftreten typischer BPSV-Läsionen bei zwei ursprünglich symptomlosen Kälbern, mehr als 30 Tage nachdem diese in eine insektensichere Einrichtung der biologischen Schutzstufe 3 verbracht wurden. Man geht davon aus, dass solche „ruhenden“ Infektionen durch Stress, wie beispielsweise beim Verbringen in eine neue Umgebung, reaktiviert werden können. Vereinzelt treten auch im Zusammenhang mit BPSV schwere Krankheitsverläufe auf, bei denen der Ösophagus oder Pansen in das Krankheitsgeschehen involviert sein kann (Jeckel *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 1987). Darüber hinaus gibt es die Beschreibung chronischer Fälle, die mit einer proliferativen, nekrotischen Stomatitis einhergingen und letztlich zum Tod der Tiere führten (Yeruham *et al.*, 1994). Interessanterweise wurde BPSV in einigen Fällen auch als ätiologisches Agens bei Infektionen des Euters identifiziert, wobei teilweise besonders schwere und proliferative Dermatitiden auftraten (Inoshima *et al.*, 2009; Leonard *et al.*, 2009).

Während BPSV v.a. in Kälbermastbetrieben von Bedeutung ist, spielt PCPV fast ausschließlich in der Milchviehhaltung eine Rolle. Typischer Manifestationsort für PCPV ist das (laktierende) Euter, genauer die Zitzen und Euterhaut. Zu Beginn der Erkrankung zeigen sich lokal kleinere gerötete oder geschwollene Areale. Hier

formieren sich im weiteren Verlauf Papeln, die sich zu Bläschen und Pusteln weiterentwickeln können und schließlich nach einigen Tagen verkrusten (Divers, 2007). Fallen die Krusten ab hinterlassen sie oftmals charakteristische ring- oder hufeisenförmige Areale (Merck Manual, 2013). Bei schlechter Melkhygiene (keine Desinfektion der Zitzenbecher, (An)melken der Tiere mit der Hand ohne Zwischendesinfektion) kann sich das Virus rasch im Bestand verbreiten. Wie die Stomatitis papulosa verlaufen auch die Euterpocken in den meisten Fällen gutartig und komplikationslos. Kommt es allerdings zu bakteriellen Sekundärinfektionen oder verhindert das schmerzhafte Euter das Abmelken, kann eine Mastitis die Folge sein. Dass auch PCPV nicht ausschließlich in Form der Euterpocken auftritt, zeigen Veröffentlichungen, in denen das Virus im Maulbereich von Kälbern bzw. Fressern gefunden wurde (Cargnelutti *et al.*, 2012; Yaegashi *et al.*, 2013). Weder PCPV noch BPSV sind demnach, wie früher klassischerweise angenommen, streng auf nur einen Manifestationsort im Wirt beschränkt. Erst jüngst konnte überdies nachgewiesen werden, dass das Virus auch für die genitale Infektion eines einjährigen Angus-Bullen verantwortlich war, der papuläre Läsionen an Präputium und Penis aufwies (Black *et al.*, 2014).

Präventive Impfmaßnahmen kommen zur Bekämpfung von BPSV- bzw. PCPV- Infektionen nicht zum Einsatz. Bedingt durch den milden, selbstlimitierenden Verlauf, ist auch eine Behandlung nur selten notwendig, kann aber im Einzelfall symptomatisch erfolgen.

3.2. Parapockenviren bei Wildtieren

Dass Parapockenviren ein breiteres Wirtsspektrum besitzen als zunächst vermutet, wurde offenbar, nachdem das Virus in zunehmendem Maße auch bei Wildtieren bzw. anderen Tierarten entdeckt wurde.

Es konnte mittlerweile bei Dickhornschafen (*Ovis canadensis*) (Connell, 1954; Samuel *et al.*, 1975; Wilson & McFarlane, 2012), Dall-Schafen (*Ovis dalli*) (Dieterich *et al.*, 1981), Schneeziegen (*Oreamnos americanus*) (Hebert *et al.*, 1977; Samuel *et al.*, 1975), Moschusochen (*Ovibos moschatus*) (Dieterich *et al.*, 1981; Falk, 1978; Vikøren *et al.*, 2008), japanischen Serauen (*Capricornis crispus*) (Inoshima *et al.*, 1999, 2001) und Sichuan Taki (*Budorcas taxicolor tibetana*) (Guo *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Durch experimentelle Infektionen mit ORFV konnte außerdem die Empfänglichkeit

verschiedener Antilopenarten gezeigt werden (Lance *et al.*, 1983). Auch im europäischen Raum wurde in den letzten Jahren das Auftreten von Parapockenviren bei Wildtieren beobachtet, darunter Gämsen (*Rupicapra rupicapra*) und Steinböcke (*Capra ibex*) (Huemer *et al.*, 2014; Scagliarini *et al.*, 2011). Während jedoch keine Beweise für das Vorhandensein einer eigenen Parapockenviruspezies bei den genannten Wildwiederkäuerarten existieren, wurde bei den Hirschartigen das Parapockenvirus des Rotwildes in Neuseeland (PVNZ) als separate Spezies etabliert. Horner *et al.* untersuchten 1987 erstmals das Auftreten dieses Virus auf neuseeländischen Rothirsch-Farmen. Die betroffenen Tiere zeigten Läsionen im Maul- und Kopfbereich, an den Ohren, dem Nacken und dem Bastgeweih. Nachdem schließlich die Isolation des Virusstamms RD86 in Zellkultur gelang, konnte anhand vergleichender DNA Analysen (RFLP-Analysen und DNA-Hybridisierungsversuche) gezeigt werden, dass das Virus keiner der drei etablierten Spezies zuzuordnen ist, obgleich es sich eindeutig um ein Parapockenvirus handelt (Robinson & Mercer, 1995). Ein Auftreten von PVNZ außerhalb Neuseelands erschien denkbar, wurde aber erst 2011 aus Italien berichtet (Scagliarini *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch für Deutschland das Vorkommen einer eigenständigen Parapockenviruspezies beim Rotwild belegt werden (Publikation 2). Andererseits ist zu beachten, dass nicht jede Parapockenvirusinfektion der Hirschartigen auf diese separate Rotwild-Viruspezies zurückzuführen ist, auch ORFV oder PCPV kommen in Frage (Kuhl *et al.*, 2003; Roess *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 1991).

In Skandinavien kam es seit den frühen Neunziger Jahren immer wieder zu teilweise schwerwiegenden Ausbrüchen unter (semi-domestizierten) Rentieren, die oft mit einer hohen Todesrate verbunden waren (Hautaniemi *et al.*, 2010, 2011; Klein & Tryland, 2005). So starben beispielsweise im Winter 1992-1993 in Finnland mehr als 400 Rentiere (Büttner *et al.*, 1995b). Den genannten Ausbrüchen konnte letztlich ORFV oder PCPV als ursächliches Virus zugeordnet werden. Dies deutet darauf hin, dass es beiden Viruspezies gelungen ist, sich in der Wirtsspezies Rentier zu etablieren. Immunsuppressive, Infektions- und Krankheits-begünstigende Faktoren sind weder im Wildtier noch bei Hauswiederkäuern retrospektiv exakt definierbar.

Im Jahre 1972 wurde in der Sowjetunion erstmals auch über das Auftreten von Parapockenviren bei Kamelen berichtet (Rosliakov, 1972). In den nächsten Jahren folgten Publikationen aus verschiedenen anderen Ländern: Mongolei (Dashtseren *et al.*,

1984), Sudan (Ali *et al.*, 1991), Kenia (Gitao, 1994; Munz *et al.*, 1986), Libyen (Azwai *et al.*, 1996), Arabien (Abubakr *et al.*, 2007; Housawi *et al.*, 2004) und Indien (Nagarajan *et al.*, 2010, 2011). Die Erkrankung, die als *contagious ecthyma of camels* oder Auzdyk bezeichnet wurde, betrifft in der überwiegenden Zahl der Fälle die Jungtiere. Unter den Kamelkälbern eines Bestandes kann die Morbidität bis zu 100 % betragen (Gitao, 1994).

Daneben können auch Nicht-Ungulaten von einer Parapockenvirusinfektion betroffen sein. Nach der Erstbeschreibung 1969 (Wilson *et al.*, 1969) bei einem Kalifornischen Seelöwen zeigten sich Robbenspezies aus verschiedenen Regionen der Welt empfänglich (Becher *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2003; Nettleton *et al.*, 1995; Nollens *et al.*, 2006a, b, c; Ohno *et al.*, 2011; Osterhaus, 1995; Simpson *et al.*, 1994; Tryland *et al.*, 2005). Lange Zeit bestand die Vermutung, dass es sich bei dem Parapockenvirus der Robben um eine eigene Spezies handelt - dies scheint zwischenzeitlich durch phylogenetische Studien bewiesen (Becher *et al.*, 2002; Nollens *et al.*, 2006a). Bis dato wird das Virus von der ICTV jedoch nicht offiziell als separate Spezies geführt.

4 Parapockenviren beim Menschen

Parapockenviren sind Zoonose-Erreger und somit auf natürlichem Wege vom Tier auf den Menschen übertragbar. Historisch bedingt wird die Erkrankung beim Menschen als „Melkerknoten“ bezeichnet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass zu Zeiten des Handmelkens typische Läsionen v. a. an den Händen von Melkern zu finden waren, die sich am Euter infizierter Tiere angesteckt hatten. Nach der Einführung der Melkmaschine ist dieser Übertragungsweg selten geworden. Heutzutage infiziert sich der Mensch meist über kleine Wiederkäuer.

Während die Erkrankung beim Menschen generell nur sporadisch auftritt, sind Personengruppen, die berufsbedingt regelmäßig Kontakt zu Wiederkäuern haben, einem vergleichsweise höheren Risiko ausgesetzt (z.B. Tierärzte, Landwirte, Schäfer und Schlachthofmitarbeiter). Die Übertragung des Virus erfolgt über kleinere Verletzungen nach direktem Kontakt zu einem infizierten Tier oder auf indirektem Weg, v. a. über die Wolle von Schafen (Robinson & Petersen, 1983). Ferner besteht auch im Haushalt, insbesondere bei der Zubereitung von Fleisch, die Gefahr einer Infektion; im Zusammenhang mit dem islamischen Opferfest Eid al-Adha, bei dem Schafe und

Ziegen rituell geschächtet werden, treten gehäuft humane Krankheitsfälle auf (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012; Nougairede *et al.*, 2013; Uzel *et al.*, 2005).

Typischer Manifestationsort der Melkerknoten ist auch heute noch die Hand, nur in seltenen Fällen sind andere Körperstellen, wie das Gesicht oder die Perianal-Region, betroffen (Kennedy & Lyell, 1984; Revenga *et al.*, 2001; Turk *et al.*, 2014). Die Hautveränderungen, die meist singulär auftreten, entsprechen dem typischen Bild einer durch Parapockenviren verursachten pustulären Dermatitis. Auch wenn die Läsionen bisweilen sehr gravierend erscheinen (Steinhart, 2005), ist der Krankheitsverlauf in der Regel dennoch gutartig und die Abheilung erfolgt nach etwa ein bis zwei Monaten - selbst ohne medikamentöse Behandlung. Bei immunsupprimierten Patienten dagegen wird immer wieder von besonders schwerwiegenden Erkrankungen berichtet, bei denen es zur Ausprägung bizarr großer, tumorartiger Wucherungen kommen kann, sodass dieses Krankheitsbild auch als „*giant orf*“ bezeichnet wird (Ara *et al.*, 2008; Ballanger *et al.*, 2006; Gurel *et al.*, 2002; Hunskaar, 1986; Rørdam *et al.*, 2013; Savage & Black, 1972). Die Ursache für die stark proliferativen Gewebewucherungen in der Haut ist bis heute nicht genau bekannt. Oftmals ist dann allerdings eine Behandlung indiziert. Diese wurde lokal mit Cidofovir und Imiquimod bereits erfolgreich durchgeführt (Geerinck *et al.*, 2001; Lederman *et al.*, 2007; Nettleton *et al.*, 2000). Eine besondere Gefahr stellen auch großflächige Hautverletzungen bzw. -verluste dar. So kam es 2012 auf der Verbrennungsstation eines türkischen Krankenhauses zur nosokomialen Infektion von 13 Patienten mit ORFV (Midilli *et al.*, 2013).

Prinzipiell ist die Übertragung auf den Menschen nicht nur für ORFV (Bayindir *et al.*, 2011; Kitchen *et al.*, 2014; Mercer *et al.*, 1997; Turan *et al.*, 2013) und PCPV (Abrahão *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 1997; Roess *et al.*, 2010; Samemaleki *et al.*, 2014), sondern auch für BPSV (Carson & Kerr, 1967; Holmes *et al.*, 2011; MacNeil *et al.*, 2010; Schnurrenberger *et al.*, 1980) beschrieben, wohingegen PVNZ noch nicht als Zoonose-Erreger bestätigt werden konnte. Neben Hauswiederkäuern können überdies verschiedenste Wildtiere als Infektionsquelle für den Menschen dienen. Für Moschusochsen, Rentiere, Gämsen und Robben konnte dies bereits gezeigt werden (Falk, 1978; Hicks & Worthy, 1987; Kitchen *et al.*, 2014). Und auch Hirschartige sind in der Literatur als Überträger beschrieben, jedoch wurde in diesen Fällen ORFV oder PCPV, nicht PVNZ als zugrundeliegendes Virus identifiziert (Kuhl *et al.*, 2003; Roess

et al., 2010; Smith *et al.*, 1991). Da alle übrigen Parapockenviruspezies ein ausgeprägtes zoonotisches Potential besitzen, ist anzunehmen, dass dies auch auf PVNZ zutrifft. Hypothetisch wäre es demnach denkbar, dass sich der Mensch, beispielsweise ein Jäger beim Aufbrechen von Rotwild, mit PVNZ infiziert.

Zu einer Übertragung von Mensch zu Mensch kommt es dagegen nur ausgesprochen selten (Falk, 1978; Turk *et al.*, 2014).

5 Diagnostik der Parapockenvirusinfektion

Da die Parapockenvirusinfektion sowohl beim Mensch als auch beim Tier vielfach milde und selbstlimitierend verläuft, wird i.d.R. nur ein begrenzter diagnostischer Aufwand betrieben. Allerdings kann die Abgrenzung von anderen gefährlichen oder tierseuchenrechtlich relevanten Erkrankungen von großer Bedeutung sein. Differenzialdiagnostisch kommen beim Wiederkäuer Infektionen mit Pestiviren (BVDV), Herpesviren (BHV-1 und 2), Picornaviren (MKS-Virus), Reoviren (BTV) und anderen Pockenviren (Schaf-, Ziegen-, Kuhpockenvirus, *lumpy skin disease* Virus) in Betracht (Haskell, 2008; Selbitz *et al.*, 2011). Beim Menschen können Anthrax (der Haut), chronisch-papillomatöse Pyodermien, eine Dermatitis ulcerosa, ein Panaritium oder unterschiedliche kutane Tumoren ein ähnliches Krankheitsbild hervorrufen (Steinhart, 2005). Die Gestalt und Lokalisation der Läsionen kann erste klinische Hinweise geben und ermöglichen oft schon den Ausschluss anderer Pockenviren. Denn während hier i.d.R. generalisiert Läsionen auftreten, die klassischerweise einen Pockennabel aufweisen, fehlt den Parapockenvirus-bedingten Läsionen diese zentrale Eindellung.

Weiterhin kann die Diagnostik einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung von subklinisch infizierten Tieren und zur Evaluierung der Herdengesundheit leisten.

Der Nachweis einer Parapockenvirusinfektion ist durch die alleinige oder kombinierte Verwendung unterschiedlicher Testverfahren möglich. Generell kann der Erreger direkt oder indirekt auf molekularbiologischem Wege über seine Nukleinsäure nachgewiesen werden. Serologische Methoden, mit denen Virus-Antigene oder Antikörper detektiert werden können, spielen eine untergeordnete Rolle.

Als Diagnostikmaterial eignen sich Proben veränderter Hautstellen, insbesondere Hautbiopsien, daneben können auch Geschabsel oder Krustenmaterial verwendet werden.

5.1. Erregernachweis

5.1.1. Virusisolation in Zellkultur

Die Isolation von Parapockenviren in Zellkultur gilt als langwierig und anspruchsvoll, nicht zuletzt wegen des engen Zell- bzw. Wirtsspektrums dieser Viren. Nur auf diesem Weg ist es aber möglich ausreichend (vermehrungsfähiges) Virusmaterial für weitergehende wissenschaftliche Untersuchungen zu erzeugen. Erste erfolgreiche Versuche zur Virusanzucht von Parapockenviren stammen von Andrew S. Greig aus dem Jahre 1957. Ihm gelang es ORFV in embryonalen Hautzellen vom Schaf zu kultivieren (Greig, 1957). Auch heute nutzt man gewöhnlich Primärkulturen aus fetalen Geweben von Schaf und Rind. Es kommen u. a. fetale ovine Nasenmuschelzellen (*ovine fetal turbinate cells*, OFTu) (Delhon *et al.*, 2004), primäre Kälberhodenzellen (*primary calf testis cells*) (Robinson & Mercer, 1995), fetale bovine Lungenzellen (*bovine fetal lung cells*) (Kuroda *et al.*, 1999; Menna *et al.*, 1979; Wittek *et al.*, 1980) und fetale bovine Ösophagus-Zellen (*calf oesophagus cells*) (Tikkanen *et al.*, 2004, Publikation 1 und 2) zur Anwendung. Das Virus kann u. U. auch an ein Wachstum in Zellen anderer Tierarten, beispielsweise an das in Vero-Zellen (Nierenzellen der Grünen Meerkatze), adaptiert werden (Hussain & Burger, 1989; Rziha *et al.*, 2000). Parapockenviren verursachen in Zellkultur einen zytopathischen Effekt (CPE), der sich in der Ballonierung und Abrundung von Zellen, dem Loslösen aus dem Zellverband und schließlich der Zelllyse zeigt; es ist jedoch möglich, dass dieser CPE erst nach einigen Blindpassagen zu beobachten ist (Li *et al.*, 2012; Dal Pozzo *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 1993). Die Virusisolation in Zellkultur ist nicht immer erfolgreich. Die Gründe hierfür sind oft nicht genau bekannt. Der schottische ORFV-Stamm „*MRI-scab virus*“ etwa vermehrt sich trotz intensiver Bemühungen nicht in Zellkultur und kann stattdessen nur durch das Passagieren in Schafen erhalten werden (Büttner & Rziha, 2002). Es kann spekuliert werden, dass die Zellkultur-Isolierung von Parapockenviren stets eine Selektion einer bestimmten Viruspopulation hervorbringt, die nicht mehr die heterogene Viruspopulation in einer Läsion repräsentiert. Gravierende Veränderungen im Genom

nach Zellkulturpassagen weisen auf den Einfluss von Laborbedingungen auf die Viruscharakteristika hin (Cottone *et al.*, 1998; Hautaniemi *et al.*, 2011). Auch die unzureichend protektive Wirkung von Zellkultur-Impfvirus könnte damit in Zusammenhang stehen.

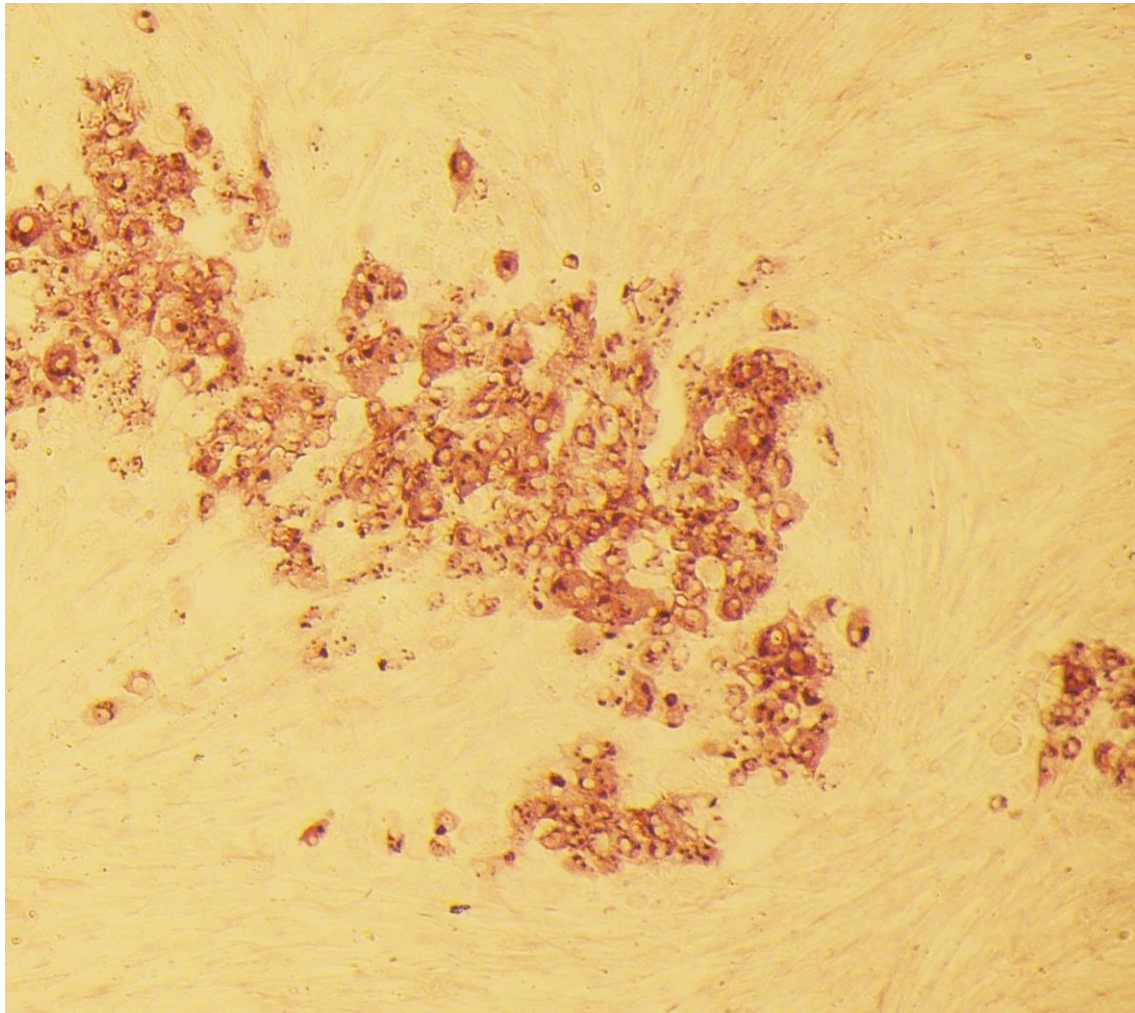


Abbildung 2 Zytopathischer Effekt der Parapockenviren in Zellkultur (bovine fetale Ösophagus Zellen). Infizierte Zellen zeigen sich abgekugelt und balloniert. Löcher im Zellrasen deuten auf eine bereits beginnende Zelllyse hin. Aufgrund einer indirekten Immunmarkierung mit dem monoklonalen Antikörper (mAb) 8D7 stellen sich infizierte Zellen dunkelrot dar. (Foto: Frau Heike Lang)

5.1.2. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung (EM) ermöglicht die direkte Visualisierung des Parapockenvirus. Da sie innerhalb von nur wenigen Stunden ein Ergebnis liefern kann, dient sie oftmals einer raschen Primärdiagnostik. In der Negativkontrastierung (engl. *negativ staining*) zeigt das Parapockenvirus seine charakteristische Wollknäuelstruktur und ist dadurch i.d.R. von anderen Viren und

insbesondere den Vertretern anderer Pockenvirus-Genera unterscheidbar (Nagington *et al.*, 1964). Eine darüberhinausgehende Typisierung ist allerdings nicht möglich, da sich alle Parapockenviren morphologisch identisch darstellen. Voraussetzung für die EM ist das Vorhandensein einer ausreichend hohen Zahl an Viruspartikeln (10^6 - 10^8 /ml) (Hazelton & Gelderblom, 2003) in der Probe, wodurch der größte Nachteil dieser Methodik, die geringe Sensitivität, offenbar wird.

5.2. Serologische Nachweismethoden

Der Wirtsorganismus reagiert auf die Parapockenvirusinfektion u.a. mit der Bildung von Antikörpern. Die individuelle humorale Immunantwort fällt jedoch qualitativ und quantitativ sehr unterschiedlich aus und die Höhe eines gemessenen Antikörpertiters korreliert weder mit dem Schutz vor einer Infektion noch mit der rascheren Abheilung der Läsionen (McKeever *et al.*, 1987). Virusneutralisierende Antikörper sind, wenn überhaupt, nur nach wiederholtem Antigenkontakt (*boost*) nachweisbar. Zugleich konnte selbst auf Ebene monoklonaler Antikörper eine ausgeprägte Überschneidung in der Antigenerkennung zwischen ORFV, PCPV und BPSV festgestellt werden (Lard *et al.*, 1991). Da Parapockenviren in der Wiederkäuerpopulation weit verbreitet sind, und jeder Kontakt mit dem Virus die Bildung nicht-neutralisierender Antikörper bewirkt, ist die zu erwartende Seroprävalenz im Normalfall hoch. Nur wenn eine Herde als immunologisch naiv in Bezug auf das Virus gilt, eignet sich die Serologie auch zu diagnostischen Zwecken.

5.2.1. Western Blot

Beim Western Blotting erfolgt die Übertragung von (Virus-)Proteinen auf eine Membran. Anschließend können einzelne Proteinbanden unter Verwendung spezifischer Antikörper identifiziert werden (Immunodetektion). Da das Verfahren vergleichsweise arbeits- und materialintensiv ist, spielt es für die Diagnostik einer Parapockenvirusinfektion keine Rolle. Gleichwohl wird der Western Blot zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen herangezogen. Er ermöglicht beispielsweise die Identifizierung immunodominanter Proteine. Auf diese Weise konnten v.a. ein entscheidendes Oberflächenprotein bestimmt werden, das im Wirtsorganismus zur Stimulation einer starken humoralen Immunantwort führt: ein 39-45 kDa Protein, Produkt des PPV Gens F1L, welches ein Homolog des VACV

Hüllprotein-Gens H3L darstellt (Czerny *et al.*, 1997; Housawi *et al.*, 1998; McKeever *et al.*, 1987; Scagliarini *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 1980). Darüber hinaus kommt der Western Blot als Kontrollmethode zum Nachweis einer erfolgreichen Fremdgenexpression durch rekombinantes Virus zum Einsatz (Fischer *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2013).

5.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA dient in erster Linie dem Nachweis von Antikörpern gegen Parapockenviren im Rahmen epidemiologischer Studien. Er wird häufig eingesetzt, um die Verbreitung der Parapockenviren in der Wildtierpopulation zu untersuchen (Huemer *et al.*, 2014; Inoshima *et al.*, 1999; Nollens *et al.*, 2006b; Suzuki *et al.*, 1993) oder um die Seroprävalenz bei Wiederkäuern in bestimmten geographischen Gebieten zu bestimmen (Azwai *et al.*, 1995; Housawi *et al.*, 1992; Sentsui *et al.*, 2000). Daneben kommt der ELISA gelegentlich auch zur Diagnose oder Bestätigung einer Parapockenvirusinfektion beim Menschen zum Einsatz (Yirrell *et al.*, 1994; Zeedan *et al.*, 2014). Nachdem eine Mikrotiterplatte mit dem gereinigten Virusantigen beschichtet wurde, erfolgt die Zugabe der zu untersuchenden Testseren. Etwaige darin enthaltene Antikörper werden schließlich mit Hilfe eines konjugierten Zweitantikörpers detektiert (Chin & Petersen, 1995). Der Vorteil der Methode liegt darin, dass innerhalb relativ kurzer Zeit eine Vielzahl an Proben gleichzeitig untersucht werden kann. Erst jüngst konnte durch ELISA-Studien gezeigt werden, dass Gämsen in den österreichischen und italienischen Alpen eine Seroprävalenz von 23,5 % bzw. 9,5 % aufweisen und so ein potentiell Virusreservoir in Europa darstellen könnten (Huemer *et al.*, 2014).

ELISA zum Parapockenvirus-Antikörpernachweis sind bisher noch nicht kommerziell erhältlich.

5.2.3. Immunfluoreszenz- und Immunperoxidasetest

Der Immunfluoreszenz- und der Immunperoxidasetest beruhen auf demselben Prinzip: zellassoziertes Virus (aus Probenmaterial oder Zellkultur) wird unter Verwendung eines Immunkonjugates sichtbar gemacht. Der Unterschied ergibt sich aus der Art der Antikörpermarkierung - sie kann mit einem Fluorochrom oder einer Peroxidase erfolgen. Dementsprechend erfolgt das Sichtbarmachen der Antigen-Antikörperbindung

über ein Fluoreszenzsignal oder durch das Umsetzen eines Substrates in Form einer Farbreaktion. Wird das Antigen unmittelbar durch den Primärantikörper markiert spricht man von einer direkten Immunmarkierung, erfolgt sie erst durch einen konjugierten Zweitantikörper, handelt es sich um eine indirekte Immunmarkierung. Das Verfahren kommt sowohl zur Detektion des Parapockenvirus (Housawi *et al.*, 1998; Inoshima *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 1985; Zhao *et al.*, 2010) als auch zum Nachweis entsprechender virusspezifischer Antikörper zum Einsatz (Huemer *et al.*, 2014; Kitchen *et al.*, 2014; Osterhaus *et al.*, 1994). Außerdem ist es geeignet, das Vorhandensein und die Lokalisation des Virus in der Zelle zu bestätigen. Allerdings ist i.d.R. keine Speziesdifferenzierung möglich, wenn auch die Abgrenzung einer oder mehrerer Spezies mit Hilfe eines Sets verschiedener monoklonaler Antikörper in Einzelfällen erfolgreich war (Housawi *et al.*, 1998; Inoshima *et al.*, 2001).

5.3. Virusgenomnachweis

5.3.1. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und DNA-Hybridisierung

Zur RFLP-Analyse wird die Nukleinsäure des Virus mit einer Restriktionsendonuklease verdaut. Anschließend erfolgt die Auftrennung der fragmentierten DNA per Gelelektrophorese, sodass sich ein Restriktionsfragmentprofil (engl. *restriction oder cleavage map*) ergibt. Komparative Analysen des spezifischen Musters, das je nach verwendetem Restriktionsenzym anders ausfällt, erlauben so die Identifikation des Virus (Menna *et al.*, 1979). Da sich die RFLP-Profile von ORFV, BPSV und PCPV hinreichend unterscheiden, dient ihr Vergleich auch der Speziesdifferenzierung. Weil aber die genomische Heterogenität nicht nur zwischen den Spezies sondern auch unter den Vertretern derselben Spezies sehr hoch sein kann (Gassmann *et al.*, 1985; Robinson *et al.*, 1982; Wittek *et al.*, 1980), ist eine Spezieszuordnung allein auf RFLP-Basis nicht gerechtfertigt. In ähnlicher Weise können auch Rekombinationsereignisse zwischen zwei Virusspezies leicht zu einer Fehlinterpretation führen (Binns & Smith, 1992). Dennoch kommt die RFLP-Analyse v.a. beim Auftreten der Parapockenvirusinfektion in einem neuen Wirt auch heute noch zum Einsatz und kann dabei wichtige Hinweise auf die Virusspezies liefern (Guo *et al.*, 2004; Hosamani *et al.*, 2007; Inoshima *et al.*, 2002; Klein & Tryland, 2005; Mazur *et al.*, 2000). Um das Ergebnis der RFLP-Analyse

zu bestätigen, werden häufig zusätzlich DNA-DNA-Hybridisierungsversuche durchgeführt. Verwendet man hierfür die hochvariablen terminalen Bereiche des Genoms, erfolgt die Hybridisierung ausschließlich an die entsprechenden Nukleotidsequenzen in der DNA der gleichen Virusspezies (Gassmann *et al.*, 1985; Robinson & Mercer, 1995).

5.3.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis der Parapockenviren gelingt besonders schnell und zuverlässig mittels PCR. Da sie außerdem unter geringem Arbeitsaufwand und in fast jedem Labor durchgeführt werden kann, ist sie die mit Abstand wichtigste Diagnostikmethode. Immer dann wenn eine Virusvermehrung in Zellkultur erfolglos war und / oder nur geringe Mengen an DNA extrahiert werden konnten, gewährleistet nur die PCR eine sichere Diagnose. Mittlerweile existiert eine ganze Reihe von PCR-Protokollen, die der Amplifikation unterschiedlicher Zielgene bzw. Zielgenfragmente der Parapockenviren dienen und so deren spezifischen Nachweis erlauben. Dabei hat sich insbesondere die PCR nach Inoshima *et al.* (2000) durchgesetzt, die auf der Detektion eines 554 bp großen Fragmentes des B2L-Gens (= *major envelope gene*, *ORF 011*) basiert. Da es sich dabei um ein hochkonserviertes Gen handelt, können alle Parapockenvirusspezies gleichermaßen nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich darüber hinaus PCR-Protokolle unter Verwendung von Zielsequenzen des vVEGF-Gens (Inoshima *et al.*, 2010; Scagliarini *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014), des VIR-Gens (Inoshima *et al.*, 2010; Kottaridi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014), des GIF-Gens (Yang *et al.*, 2014), des Topoisomerase-Gens (Nagarajan *et al.*, 2011) und des ATPase-Gens (A32L Gen) (Chan *et al.*, 2009).

Wird die PCR konventionell durchgeführt, können die amplifizierten DNA-Fragmente anschließend aus dem Elektrophorese-Gel ausgeschnitten werden und stehen so einer Sequenzierung zur Verfügung. Die gewonnene Sequenz kann auf Nukleotid- oder Aminosäure-Ebene mit Sequenzen, die bereits in der Genbank hinterlegt wurden, verglichen werden, wodurch zum einen eine Verifikation des PCR-Ergebnisses, zum anderen eine phylogenetische Analyse zur Klärung evolutionärer Verwandtschaftsbeziehungen ermöglicht wird. Seit einigen Jahren kommen auch quantitative Echtzeit-PCRs (q-PCRs) in der Parapockenvirus-Diagnostik zum Einsatz. Sie dienen dem schnellen Probenscreening unter gleichzeitigem Nachweis aller

Vertreter des Genus *Parapoxvirus* (Pan-Parapockenvirus-PCR; griechisch „pan“ = alles, gesamt) (Nitsche *et al.*, 2005) oder vorrangig dem Nachweis und der Quantifizierung von ORFV (Gallina *et al.*, 2006). Die Protokolle beider Ansätze haben die Amplifikation kleinerer Fragmente des B2L-Gens zum Ziel.

Soll das gesamte Spektrum der Pockenviren abgedeckt werden, kann eine Pan-Pockenvirus-PCR verwendet werden, bei der durch den Einsatz zweier Primerpaare Pockenviren in Abhängigkeit von ihrem GC-Gehalt detektiert werden (Li *et al.*, 2009).

5.3.3. Molekulare Virusspeziescharakterisierung

Auch die PCR bietet jedoch nicht die Möglichkeit einer umfassenden molekularen Virusspeziescharakterisierung - sie gelingt nur durch die vollständige Sequenzierung des Virusgenoms. War die Gesamtgenomsequenzierung bis vor kurzem noch extrem arbeits- und zeitaufwändig, so können heutzutage mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) schon innerhalb von Tagen bis Stunden alle Rohdaten erzeugt werden (Metzker, 2010).

Unter dem Begriff NGS werden verschiedene neuartige Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung zusammengefasst. Sie werden in Abgrenzung zu den klassischen Sequenzierverfahren nach Maxam und Gilbert (Maxam & Gilbert, 1977) und Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Sanger & Coulson, 1975) auch als Sequenziermethoden der zweiten Generation bezeichnet (Bonetta, 2006). Die Stärke des NGS liegt in der parallelen Sequenzierung einer enorm hohen Zahl an DNA-Molekülen. Auch wenn sich die einzelnen NGS-Verfahren in Details unterscheiden, so werden in allen Fällen drei Hauptschritte durchlaufen (Mardis, 2008): 1) das Erstellen einer DNA-Bibliothek (Fragmentierung der DNA und Adapterligation), 2) die klonale Amplifikation der DNA-Fragmente (an magnetische Kügelchen gebunden mittels emPCR (*emulsion-based PCR*) oder auf dem Sequenzier-Trägerglas mittels *bridge-PCR*) und schließlich 3) die eigentliche Sequenzierung (bei der das eingebaute Nukleotid i. d. R. über ein Farb- oder pH-Signal detektiert wird).

Die generierten Daten können anschließend computerbasiert zu einer Gesamtgenomsequenz zusammengesetzt werden (*assembly*). Ist ein geeignetes Referenzgenom vorhanden, können die Reads (sequenzierte DNA Fragmente) mit Hilfe einer Mapping-Software wie BWA (Li & Durbin, 2009) direkt auf das Referenzgenom

gemappt (abgebildet) werden. Genomische Veränderungen wie Deletionen, Insertionen oder Substitutionen können so vergleichsweise schnell identifiziert werden. Fehlt eine entsprechende Referenz, kann alternativ ein de-novo-Zusammenbau durchgeführt werden, wobei überlappende Sequenzbereiche der generierten Reads genutzt werden.

Letztlich können einzelne Gene und deren mutmaßliche Funktion definiert werden und stehen somit in großer Zahl auch für ausführliche phylogenetische Analysen zur Verfügung.

III PUBLIKATIONEN

1 Publikation 1



Comparative and retrospective molecular analysis of Parapoxvirus (PPV) isolates



Schirin Friederichs^a, Stefan Krebs^b, Helmut Blum^b, Eckhard Wolf^b, Heike Lang^a,
Heiner von Buttlar^c, Mathias Büttner^{a,*}

^a Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany

^b Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Centre, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

^c Institute of Immunology, College of Veterinary Medicine, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 11, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2013

Received in revised form 6 December 2013

Accepted 10 December 2013

Available online 27 December 2013

Keywords:

Parapoxvirus

B2L gene

ORF 032

Species differentiation

Milker's nodule

Whole genome sequencing

ABSTRACT

Species members of the genus *Parapoxvirus* (PPV) within the family *Poxviridae* cause contagious pustular dermatitis in small ruminants (Orf virus, ORFV) and mostly mild localized inflammation in cattle (bovine papular stomatitis virus, BPSV and pseudocowpox virus, PCPV). All PPVs are known to be zoonotic, leading to circumscribed skin lesions in humans, historically known as milker's nodules. Human PPV isolates are often ill defined concerning their allocation to an animal origin.

Here we present a comparative molecular analysis of a unique collection of 21 historic and recent human and animal PPV cell culture isolates (and two PPV DNA samples). Cell culture PPV propagation was restricted to primary ruminant fibroblasts and was strictly kept at low passages to avoid genomic changes by in vitro influences. For molecular arrangement of the isolate DNAs and their attribution to established PPV species DNA fragments of the PPVs were generated by two different discriminating PCR protocols, targeting the major part of the open reading frame (ORF) 011 (B2L gene) and the complete ORF 032. Multiple sequence alignments and phylogenetic analysis of both genes resulted in affiliation to the known PPV species. The sequences from the ORF 032 allowed discrimination of the isolate DNAs at a higher resolution. Human PPV isolates could be clearly assigned to the PPV species belonging to the reported or assumed animal host of transmission.

For the first time, a whole PPV genome sequence comparison of a human biopsy derived virus (B029) and its ovine counterpart (B015) originating from a defined Orf outbreak in Germany is provided, revealing their well conserved relationship. Thus human PPVs can be molecularly retraced to the PPV species indicating the animal of transmission. After transmission to the human host, molecular conservation of the animal's virus peculiarities indicative for a PPV species became evident.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Parapoxviruses (PPVs) are commonly known as causative agent of infections and diseases worldwide, leading to a contagious pustular dermatitis (CPD), especially in the region of the lips, nostrils, oral mucosa and teats of domestic and wild ruminants. They are gaining importance primarily because of financial and economic losses in connection with disease outbreaks in livestock and because of their zoonotic potential.

In accordance with the current nomenclature there are four established species within the PPV genus, which belongs to the *Chordopoxvirinae* within the *Poxviridae* family:

The prototype member, Orf virus (ORFV) is endemic in most sheep and goat raising countries. Bovine papular stomatitis virus

(BPSV) and pseudocowpox virus (PCPV) mainly infect cattle but are differentiated by the manifestation locus on the muzzle and the teats, respectively. Parapoxvirus of red deer in New Zealand (PVNZ) is a newly defined species of the genus and, so far, solely relevant for infection of Cervids (Robinson and Mercer, 1995).

Additionally several new tentative species are a matter of debate, such as camel contagious ecthyma virus, reindeer parapoxvirus, muskox and seal parapoxvirus (Becher et al., 2002; Dashtseren et al., 1984; Tikkanen, 2004; Vikøren et al., 2008).

All PPVs are known to be zoonotic and infect humans after direct or indirect contact with infected animals, provoking local skin lesions historically known as milker's nodules (MN).

Albeit human PPV infections are considered to be rare and rather fortuitous events, infection rates of individuals at risk (e.g. slaughtermen, veterinarians, farmers and animal caretakers) are way higher. Also people not occupationally handling animals can get infected, particularly by visiting a petting zoo or by household exposure when handling contaminated furs, skin, or meat

* Corresponding author. Tel.: +49 9131 68085389; fax: +49 9131 68085459.
E-mail address: mathias.buettner@lgl.bayern.de (M. Büttner).

(Bayindir et al., 2011; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012). Mass infection of people has been described linked to ritual sheep slaughter in celebration of Islamic holidays “Feast of Sacrifice” (Nougaiyre et al., 2013; Uzel et al., 2005).

The epitheliotropic PPVs enter via scarified or otherwise broken skin and subsequently can replicate locally in the human epidermis. Occasionally large and painful nodules evolve which are mostly localized on the hands; especially the index finger and less frequently at other skin sites, presumably by smear infection. Disease manifestation via localized lesions is benign and generally resolves within max. 1–2 month (Leavell et al., 1968), even without any medical treatment. However, there are individual cases described in the literature of severe complications; often linked to immunosuppression (Gurel et al., 2002; Larcher et al., 2009; Lederman et al., 2007). A common feature of PPV is the stimulation of vascular endothelial cells to proliferate leading to a tumor like clinical outcome described as “giant orf” in man (Ballanger et al., 2006; Geerinck et al., 2001). In sheep, severe lesion development is known as bloody lesion or cauliflower-like proliferation mostly complicated by secondary bacterial infections. Recently some exceptional co-infections with *Vaccinia virus* and ORFV or *Vaccinia virus* and PCPV in cattle were reported from Brazil (Abrahão et al., 2010; Sant’Ana et al., 2013).

PPVs possess a linear double-stranded DNA genome, which is approximately 130–150 kbp in size and exhibits an unusual high GC content (~64%). While PPV isolates initially were defined by their host origin and the circumstances of infection and disease an increasing number of genomic data including whole genome sequences are used to define PPV species (Delhon et al., 2004; Hautaniemi et al., 2010; Mercer et al., 2006). The central region of the genome contains 88 genes that are present in the subfamily *Chordopoxvirinae* and mostly occur in a common order and orientation. The ends of the genomes are cross linked. The PPV unique and pathogenesis related genes are located in the terminal regions of the genomes (Mercer et al., 2006). Interestingly Gassmann et al. (1985) showed for the first time that the virus species ORFV, BPSV and PCPV can be differentiated by probes corresponding to terminal genomic regions.

A preferred target gene to generate PCR amplified DNA fragments for sequence analysis and comparison of PPV DNA is the open reading frame (ORF) 011 (B2L gene), the PPV orthologue of the vaccinia virus Copenhagen (VACV) gene F13L, which encodes the major envelope antigen p37K (Sullivan et al., 1994).

The PPV isolates of human origin mostly designated as PCPV are often ill defined concerning the source of animal transmission and they lack a clear position in nomenclature which should become more transparent by molecular data.

In this study PCR fragment sequences of historic and recent PPV isolates of national and international origin were compared. Two different genomic target sites were chosen for PCR based sequence generation. The major part of the coding region of the B2L gene was used for PCR fragment sequencing as well as the complete open reading frame 032 (ORF 032), another genomic region hypothesized to contain sufficient sequence heterogeneity for differentiation among the PPV species. A phylogenetic analysis should reveal PPV species peculiarities especially focused on PPV isolates collected from human cases in relation to the origin of animal transmission.

2. Materials and methods

2.1. Virus isolates

Most of the PPV isolates used in this study ($n=23$) were collected in Germany ($n=15$) but in addition we could include DNA from two BPSV cases from Scotland (C. McInnes, Moredun Research

Institute, Penicuik, Scotland), one BPSV isolate from Cameroon (K. A. Lay, Tübingen, Germany) and one from Iran (M. Hessami, Razi Institute, Karaj, Iran). Also ORFV cell culture isolates from Scotland (C. McInnes, Moredun Research Institute, Penicuik, Scotland), Sweden (Z. Dinter, Uppsala, Sweden) and Japan (D. Kretzdorn, Bayer AG Monheim, Germany) as well as a human PPV isolate from France (R.N. Charrel, Marseilles, France) were included in the study.

A case of well reported ORFV transmission from sheep to human which occurred during an Orf outbreak in a flock of sheep in Dithmarschen (Schleswig Holstein, Germany) in 1996 led to successful isolation of a human biopsy derived PPV (B029) as well as an ovine counterpart (B015). This Orf outbreak came about in a group of 50 ewes and their offspring after they had been moved to the pasture in early spring 1996. In consequence of having regular contact to his infected sheep the owner of the herd developed a round, singular skin lesion with a diameter of approximately 1 cm on the inner side of his left thumb. Biopsy material of this lesion was taken and an electron microscopic examination revealed the presence of PPV virions in high numbers.

The collection of PPVs investigated in this study includes one virus isolated already in 1970 in Sweden and 22 PPVs collected over the years until 2012. Detailed information about the PPV isolates and the reference strains used for sequence comparison and phylogenetic analysis is provided in Table 1.

2.2. Propagation in cell culture and viral DNA extraction

Suspensions of grinded scab or skin biopsy material in TE buffer were supplemented with Gentamycin (Bayer AG, Mohnheim, Germany) to eliminate bacterial contamination. In some cases filtration (0.45 μm) of the supernatants of tissue suspensions was necessary to remove bacteria. The tissue debris cleared supernatants were checked for PPV particles by transmission electron microscopy (JEM-1400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan), using negative staining with 1% aqueous uranyl acetate.

All virus-containing tissue supernatants were inoculated in primary BVDV- and mycoplasma-free bovine cells either esophagus cells (KOP, cell culture collection Friedrich-Loeffler-Institute, Riems, Germany) or bovine lung or kidney fibroblasts. When cytopathic effect (CPE) was visible under light microscopy examination, the infected cell cultures were incubated until complete cell destruction had occurred. Once virus isolation had succeeded the cell culture harvests were continued up to a maximum of five passages.

Viral DNA was extracted from 200 μl of an ultra-centrifugation pellet suspension (1 ml) in TE buffer using a DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. At least 200 ml of debris cleared supernatant of infected cell cultures showing complete cytopathic effect (CPE) were ultra-centrifuged at 50,000 $\times g$ over 2.5 h in an Optima L90K centrifuge (Beckmann Coulter, Krefeld, Germany). The concentration of the extracted DNA was determined (Nanodrop 1000, peQLab Biotechnology, Erlangen, Germany) and subsequently used as template for PCR amplification.

Viral DNA from two PPV isolates (ORFV B029 and B015) was used for whole genome sequencing. DNA from the second (B029) or third (B015) cell culture passage virus was extracted from 3 to 5 ml of ultra-centrifugation pellet suspensions using a Puregene Blood Core Kit A (QIAGEN, Hilden, Germany) as specified by the manufacturer. DNA concentration and quality were verified by Nanodrop-measurements and DNA preparations of high quality and a concentration of at least 200 ng/ μl were submitted to the whole genome sequencing unit (Laboratory for Functional Genome Analysis, LAFUGA) at Gene Center, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany.

Table 1

Overview of the parapoxviruses included in this study.

PPV species	Isolate	Host	Host of transmission	Year of isolation	Country	Reference	GenBank ACC# ORF 011 (B2L)	GenBank ACC# ORF 032
BPSV	V660	Cattle	–	1974	Germany	Menna et al. (1979)	KF478805	KF478817
BPSV	V590	Cattle	–	1975	Germany	Wittek et al. (1980)	^b	^g
BPSV	Iran	Cattle	–	1979	Iran	Hessami et al. (1979)	^b	^h
BPSV	B040	Cattle	–	2001	Germany	Dal Pozzo et al. (2011)	^b	^f
BPSV	30/03	Cattle	–	2003	Cameroon	Dal Pozzo et al. (2011)	^b	KF478819
BPSV	BPS 2/07	Cattle (udder)	–	2007	Germany	This study	KF478806	KF478818
BPSV	EDI (DNA)	Cattle (esophageal lesion)	–	n/a	Scotland	Jeckel et al. (2011)	n/a	n/a
BPSV	C404 (DNA)	Cattle	–	n/a	Scotland	Moredun Research Institute	n/a	n/a
BPSV	AR02 ^a	Cattle	–	2002	Arkansas, USA	Delhon et al. (2004)	AY386265.1	AY386265.1
PCPV	PCPV 3/07	Cattle	–	2007	Germany	This study	KF478804	KF478816
PCPV	F00.120R ^a	Reindeer	–	2000	Finland	Tikkanen (2004) and Hautaniemi et al. (2010)	GQ329669	GQ329669
PCPV	B074	Man	Cattle	1995	Germany	Nitsche et al. (2005) and Deane et al. (2009)	KF478803	KF478814
PCPV	B021	Man	Cattle	1997	Germany	Nitsche et al. (2005)	^c	KF478815
PCPV	B005	Man	Cattle	2003	Germany	Nitsche et al. (2005)	KF478802	KF478813
PCPV	VR634 ^a	Man	Cattle	1963	New Zealand	Friedmann-Kien et al. (1963) and Gassmann et al. (1985)	GQ329670.1	GQ329670.1
ORFV	Orf Sweden	Sheep	–	1970	Sweden	This study	^d	ⁱ
ORFV	B047	Goat	–	1987	Germany	Li et al. (2009)	KF478799	KF478811
ORFV	S-1	Sheep	–	1983	Japan	Kretzdom (1985)	KF478801	KF478810
ORFV	B015	Sheep	–	1996	Germany	Cottone et al. (1998)	KF478796	KF478807
ORFV	B032	Sheep	–	1999	Germany	This study	KF478797	KF478808
ORFV	Orf 11	Sheep	–	2000	Scotland	McInnes et al. (2001)	^e	^k
ORFV	B044	Goat	–	2001	Germany	This study	KF478798	KF478809
ORFV	B027	Man	Sheep	1997	Germany	Nitsche et al. (2005)	^e	^k
ORFV	B029	Man	Sheep	1996	Germany	Tikkanen (2004)	^e	^k
ORFV	B006	Man	Sheep	2003	Germany	This study	KF478800	^k
ORFV	France 2011	Man	Sheep	2012	France	Nougaiere et al. (2013)	^d	KF478812
ORFV	NZ2 ^a	Sheep	–	1982	New Zealand	Robinson et al. (1982) and Mercer et al. (1987)	DQ184476	DQ184476
ORFV	IA82 ^a	Sheep	–	1982	Iowa, USA	Delhon et al. (2004)	AY386263	AY386263
ORFV	SA00 ^a	Goat	–	2000	Texas, USA	Guo et al. (2003) and Delhon et al. (2004)	AY386264.1	AY386264.1

^a Reference strains, corresponding sequences (ORF 011, ORF 032) for sequence comparison and phylogenetic analyses derived from Genbank.^b Sequence identical to BPSV strain V660.^c Sequence identical to PCPV strain B074.^d Sequence identical to ORFV strain S-1.^e Sequence identical to ORFV strain B015.^f Sequence identical to BPSV strain V660.^g Sequence identical to BPSV strain BPS 2/07.^h Sequence identical to BPSV strain 30/03.ⁱ Sequence identical to ORFV strain S-1.^k Sequence identical to ORFV strain B015.

2.3. Polymerase chain reactions

To check its PPV identity the DNA of all PPV cell culture isolates was used as template in a real time PCR protocol (Nitsche et al., 2005).

With DNA of verified PPV identity two different PCR protocols were used to obtain DNA fragments for sequencing. Both PCR targeted genomic DNA fragments were expected to lead to an amplification product with template DNA from all PPVs and sequence analysis should allow PPV species discrimination as well as an origin determination in zoonotic-human infection.

2.3.1. Open reading frame ORF 011 (B2L)-PCR

This PCR protocol targets the well-known and commonly used B2L gene (open reading frame ORF 011) locus, which is the PPV orthologue of the vaccinia virus Copenhagen (VACV) gene F13L, encoding the major envelope antigen p37K (Sullivan et al., 1994).

PCR amplifications were performed using the primer set PPV011-F (5' GTGCGCGAAGGTGTCGTCCA 3') and PPV011-R (5' ATGTGGCCGTCTCTCCATC 3'). The generated DNA fragment of 993bp represents the majority of the B2L gene coding region

(1137bp). A PCR protocol described by Guo et al. (2004) was modified because the forward primer sequence of this PCR was restricted to the ORFV NZ2 strain sequence showing various mismatches with other PPV strains and thus was replaced by a new primer named PPV011-F.

The B2L-PCR protocol was performed as follows:

1 µl template DNA was added to 49 µl of the PCR reaction mixture containing 0.5 µM of each primer, 200 µM of each dNTP, 1X Q5 reaction buffer, 1X Q5 High GC Enhancer and 1 U of Q5 High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich MA, USA).

DNA was amplified with a Thermal Cycler T3000 (Biometra, Göttingen, Germany) with cycling conditions set to: 30 s of initial denaturation followed by 35 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 65 °C and 30 s at 72 °C, completed by a final elongation of 2 min at 72 °C.

After amplification a 10 µl aliquot of the PCR product was visualized by electrophoresis in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.003%).

2.3.2. Open reading frame ORF 032-PCR

A second PCR protocol was evaluated to target a region within the ORF 032; the PPV orthologue of the VACV Copenhagen gene

I3L encoding a DNA binding phosphoprotein (Delhon et al., 2004; Hautaniemi et al., 2010; Mercer et al., 2006). This genomic region, which refers to the nucleotide positions 33615–34472 within the ORFV NZ2 strain genome, is expected to reveal heterogeneity within the PPV species (personal communication Andrew A. Mercer, University of Otago, New Zealand). Thus the corresponding region in all of the available PPV genome sequences was comparatively screened (ClustalW) and subsequently used for primer design. The following primer set was chosen for amplification of the selected stretch within ORF 032, starting in the neighboring ORF 031 (forward primer) and including a part of the ORF 033 (reverse primer): PPV032-F (5' CGAGCTTTAAATAGTGGAAACACAGC 3') and PPV032-R (5' GCACCATCATCTGTACTTCCTC 3'). The resulting amplicons are approximately 1170bp in size. Reaction mixture composition, thermal cycler conditions and post PCR examination by gel electrophoresis were identical with the B2L-PCR protocol, but the annealing temperature was set to 67 °C.

2.4. Purification of PCR products and nucleotide sequencing

DNA fragments were amplified to generate sequence information for the B2L gene and the ORF 032 using the entire PPV DNA collection. Subsequently extraction and purification of the PCR products was performed. After long range wavelength UV exposure, single DNA fragments became visible and were purified after gel excision using an Agarose Gel DNA Extraction Kit according to the manufacturer's protocol (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Germany). If the Gel-Extraction procedure lead to a suboptimal DNA amount (<5–8 ng/μl) the DNA in question was Ethanol precipitated in a second step.

To characterize the viral DNA of the PCR fragments from the 23 PPVs in more detail, the PCR products were sequenced and subjected to molecular analysis.

DNA from amplicons of three independent PCR runs was sequenced in both directions by EUROFINIS (Ebersberg, Germany) using the cycle sequencing technology on ABI 3730XL sequencing machines with the PPV011- and PPV032-primer pair, respectively. Partial B2L and complete ORF 032 nucleotide and aa sequences of all PPV cell culture isolates ($n = 21$) were deposited in GenBank (for accession # see Table 1).

2.5. Sequence alignment and phylogenetic analysis

The ORF 011 (B2L) and ORF 032 sequence data of the tested PPVs were aligned and compared with the available corresponding ORFV, BPSV and PCPV reference sequences from GenBank (GenBank acc. #: SA00: AY386264.1; IA82: AY386263; NZ2: DQ184476; AR02: AY386265.1; VR634: GQ329670.1; F00.120R: GQ329669).

Multiple sequence alignments at both, nucleotide and deduced amino acid levels, were constructed using the ClustalW program (Thompson et al., 1994).

Calculation of the percent amino acid identities (aa Id) between the analyzed ORF 011 (B2L) and ORF 032 sequences, as well as of the B029 genome ORFs with the reference ORFV IA82 ORFs was carried out with MatGat 2.02 (Campanella et al., 2003).

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were performed with the MEGA 5.0 software (Tamura et al., 2011) using distance- as well as character-based methods. Based on the deduced amino acid (aa) sequences of the partial ORF 011 (B2L) (299 aa) and the complete ORF 032 (283 aa) four different phylogenetic trees were constructed for each of the two ORFs, using the Neighbor-Joining-, the Minimum Evolution-, the Maximum Parsimony- and the Maximum Likelihood method. The chosen amino acid substitution model was the Jones–Taylor–Thornton model (Jones et al., 1992). The significance of all deduced phylogenetic trees was verified by bootstrap analysis of 1000 replicates.

MEGA 5.0 was also used to compute pairwise distances (number of amino acid substitutions per site) between the sequences.

2.6. Whole genome sequencing of B015 and B029

Sequencing libraries were prepared from 1 ng of genomic DNA with the Illumina Nextera XT kit (Illumina, San Diego, CA, USA). DNA is concurrently fragmented and adaptor-ligated by enzymatic random transposition of an Illumina adapter sequence using the so-called tagmentation reaction. Briefly, an exact amount of 1 ng of double-stranded DNA was determined with the Qubit DNA HA assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and subjected to a 10 min incubation at 55 °C with a transposase reaction mix from the Nextera XT kit. The resulting products were amplified in a 12-cycle PCR reaction with barcoded primers yielding sequence-ready libraries. Libraries were analyzed on a Bioanalyzer DNA1500 chip (Agilent, Santa Clara, CA, USA) for assessment of correct insert size distribution and for quantification. Finally denatured and diluted libraries were clustered at 9 pM final concentration on a MiSeq v2 flowcell and sequenced in paired end mode with a read length of 2×250 bp.

Raw fastq files were imported to a local instance of the GALAXY workspace (Goecks et al., 2010). Reads were filtered for a minimal 31-mer frequency of 10 using the kmernator program (<https://github.com/JGI-Bioinformatics/Kmernator>) and mapped with BWA (Li and Durbin, 2009) to the ORFV IA82 genome sequence (GenBank acc. #: AY386263). Raw sequence reads were deposited in the Sequence Read Archive (SRA) (SRA acc. #: B015: SRR946434; B029: SRR946435). A draft genome was generated by assembling the Illumina reads into contigs using the programs VELVET (Zerbino and Birney, 2008), SOAP (Li et al., 2010) and SPAdes (Bankevich et al., 2012). The obtained contigs were manually joined and scaffolded based on their alignment to the ORFV IA82 genome sequence. Putative open reading frames of this draft were annotated by orthology to the IA82 genome. The assembled sequence data of ORFV B029 was deposited in GenBank (acc. #: KF837136). B015 reads were mapped to the draft B029 genome in order to find differences between the two isolates.

B015 and B029 sequence data were inspected on the Integrative Genomics Viewer (IGV) a high-performance visualization tool for interactive exploration of large, integrated genomic datasets (Robinson et al., 2011).

3. Results

3.1. Cell culture isolation of PPV

All samples yielding a positive PPV particle diagnosis in electron microscopy were used for tissue culture propagation attempts. From the supernatants of 21 tissue samples from diseased bovine or animals (Table 1) PPV could be isolated in primary bovine cells. The occurrence of first signs of CPE lasted at least five days, in some cases up to ten days. After harvest of the first cell culture passage by repeated freeze thawing further cell passages were most efficient by simultaneous inoculation at cell splitting. High titer virus ($>10^7$ TCID₅₀/ml) was regularly obtained after three cell culture passages. The DNAs extracted from infected cell culture supernatants were all tested positive in real time PCR also targeting the PPV B2L gene (Nitsche et al., 2005).

3.2. Analysis of PCR derived DNA fragments

From all PPV isolates PCR amplicons of the expected sizes were obtained. The nucleotide sequences of the DNA fragments obtained

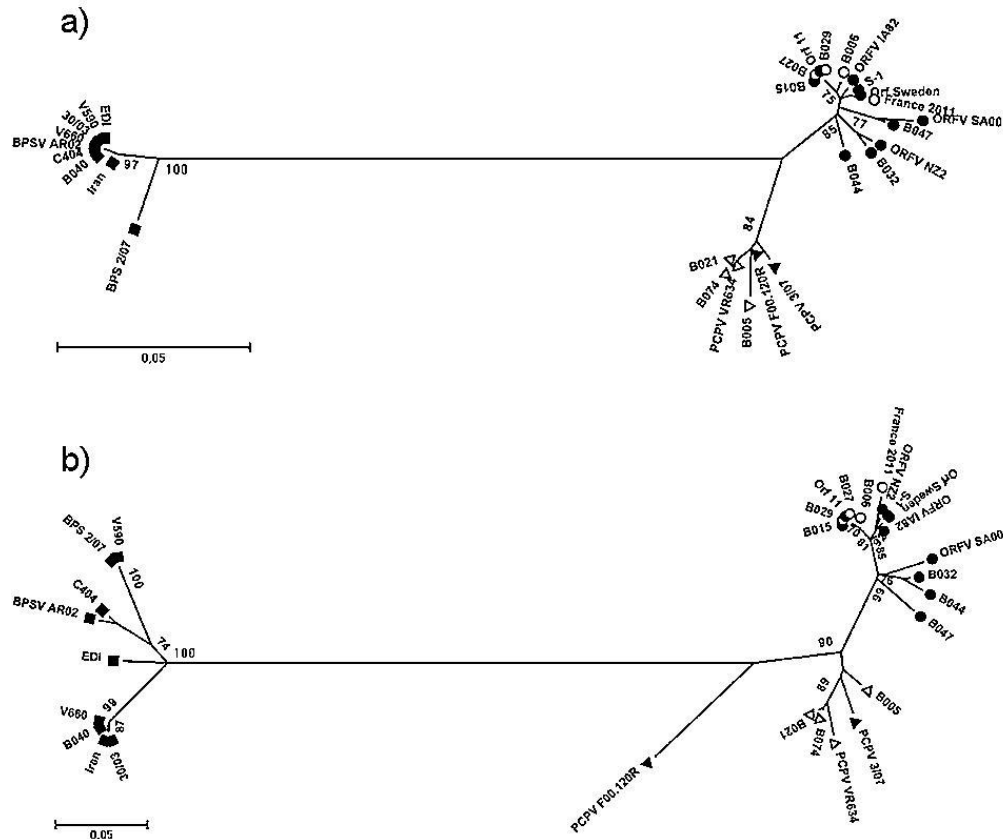


Fig. 2. Maximum Likelihood trees constructed from the deduced amino acid sequences of two different genomic regions of 23 PPVs and six reference strains. Numbers at the branching points indicate the bootstrap support calculated for 1000 replicates – only values higher than 70% are shown. The trees are drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis is based on 299 aa of the B2L gene (a) and 283 aa of the ORF 032 (b). PPV isolates originating from (small) ruminants are marked by filled geometrical shapes, human PPV isolates are provided with unfilled forms. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011).

To better visualize the genetic relationship of the PPV isolates comparatively among themselves and to reference PPV genomes, phylogenetic trees were constructed on the basis of aa alignments for the ORFs 011 and 032 using different methods (specified under 2.5). The phylogenetic trees did not differ significantly, hence only the maximum likelihood trees are presented (Fig. 2a, b). The two trees share a similar basic structure and in both genomic locations the results revealed three distinct clusters with high bootstrap support, each representing one of the PPV species, namely ORFV, PCPV and BPSV. Despite the variability in the ORF 032 aa sequences within species members, their attribution to the particular species is still perceptible (Fig. 2b). Eight of the PPV isolates included in the study can be found within the BPSV cluster, along with the reference strain AR02. While nearly all BPSV isolates in the B2L sequence based tree (Fig. 2a) can be found on one single branch (with the exception of BPS 2/07), the branching pattern in the ORF 032 sequence based tree (Fig. 2b) is much more diverse (Fig. 2b). Additionally, it could be clearly demonstrated that BPS 2/07 belongs to the BPSV species, although it has been isolated from the udder of a cow.

The second cluster is formed by the PCPV isolates according to the leader sequences given by PCPV F00.120R (reindeer) and VR634 (human) as reference strains. Three German PPV

isolates (B005, B074, B021), derived from typical milker's nodules of different patients that reportedly had contact to infected cattle and one isolate from the teat of a cow (PCPV 3/07) can be found in this group. It is remarkable, that the reindeer isolate F00.120R, which clusters with the human PPVs in the B2L-tree, is located on a separate branch based on the ORF 032 aa sequences.

PPVs of sheep or goat origin and all human PPV infections that developed after contact to infected small ruminants are clustered in the ORFV group. Within this group PPVs of goat origin can be found in close relationship with the SA00 reference genome that has been obtained from an Orf infected goat. NZ2 and IA82 serve as ORFV reference genomes of sheep origin.

Both phylogenetic trees indicate a high degree of relationship for the "matching pair" B015 (sheep isolate) and B029 (human isolate), which are linked to the Orf outbreak in Dithmarschen, Germany. The 100% aa identity in the PCR fragment sequences of both targeted genes confirms the close genetic relationship of both isolates (Figs. 1a and 2a and b). To obtain a broad comparative basis about the relationship of these two isolates whole genome sequencing was applied.

Comparison of the molecular data of older and newer PPV isolates did not show significant differences or changes, in addition

no peculiar sequence features could be observed for PPV isolates of different geographic origin.

3.3. Whole genome sequencing of B015 and B029

The genome sequences of ORFV B015 (sheep) and B029 (human) were assembled into contiguous sequences of about 134,000 bp. Hairpin loop sequences at the end of the genomes could not be resolved by Next Generation Sequencing (NGS) due to ambiguous mapping to ORFV reference genomes and failure to assemble *de novo*. Like other parapoxviruses the B015 and B029 genomes possess a remarkably high G + C content of approximately 64%.

Similarity to well defined proteins in the ORFV IA82 reference genome led us to predict 122 genes in the NGS generated sequences. Numbering of the ORFs was adopted from [Delhon et al. \(2004\)](#) in order to allow comparisons with other PPV genomes published so far. [Table 3](#) provides an overview of the individual ORFs in the B029 genome.

87 of the conserved 88 genes located in the genomic core region could be identified in the B015 and B029 genomes; ORF 110 (VACV Copenhagen A34R) a putative EEV glycoprotein is not present. Three additional ORFs (ORF 103, 109 and 134) that are not part of the genomic core region were found to be missing as well.

Both ORFV genomes contain all of the known or putative PPV virulence factor encoding genes: the ankyrin like repeat (ANK)/F-box protein genes (ORFs 008, 123, 126, 128, 129), the interferon-resistance protein gene (ORF 020), the chemokine-binding protein gene (ORF112), the GM-CSF inhibitory factor gene (ORF 117), viral interleukin-10 gene (ORF 127) and viral vascular endothelial growth factor gene (vVEGF, ORF 132). However, one of the (ANK)/F-box protein genes (ORF 128) appears to be non-functional due to minor insertions (nt position 128131: G and nt position 128135: TGCC) in the left terminal part of the gene that cause a reading frame shift that leads to a truncated translation product (stop codon after 25 base triplets).

In the region of ORFs 002, 111 and 118 ambiguous mapping results prevented analysis of the sequences. However, the affected ORFs seem to be considerably truncated or deleted and no functional proteins are expected.

In summary, the comparative whole-genome-analysis of B015 and B029 indicates an extraordinary high degree of conservation between the two isolates. Both present the same distribution of 1245 identical single nucleotide polymorphisms (SNP) when compared to the ORFV IA82 reference genome. This observation matches the results from comparative analysis of the B015 and B029 PCR fragments obtained in this study that show 100% aa identity. In the final analysis only two variations between these two genomes could be determined: one SNP located in the non-coding DNA region upstream of ORF 005 at nucleotide position 3404 (G (B015) vs. A (B029)) and one missing nucleotide (G) in the B029 genome at nucleotide position 11936 which causes a reading frame shift in ORF 013. The predicted B029 protein (function unknown) is truncated by three amino acids and shows a reduced aa sequence identity of 72.2% with the corresponding IA82 protein and may therefore be dysfunctional, while the B015 protein is 92.4% identical to the corresponding IA82 protein.

A high level of conservation of the analyzed genomes is also obvious when compared to the ORFV IA82 reference genome. 108 (88.5%) of 122 proteins of the two isolates show an aa identity of 95% or higher with the corresponding ORFV IA82 proteins, justifying their ORFV species affiliation. Comparative genome-wide SNP- and INDEL (insertion/deletion) analysis between B029 and IA82 revealed 1257 SNPs and 110 INDELs within the mappable genome sequences. The percent aa identities between the identified B029- and the corresponding IA82 ORFs are summarized in [Table 3](#).

4. Discussion

As part of the PPV genomic core region both PCR amplified DNA fragments used in this study are well conserved. Above all the B2L gene is known to be conserved in PPV genomes. A PCR-protocol resulting in a 594 bp fragment of the B2L gene has been widely used for detection and diagnosis of PPVs and beyond that for identification of different PPV species ([Hosamani et al., 2006](#); [Inoshima et al., 2000, 2001](#); [Nagarajan et al., 2011](#); [Scagliarini et al., 2011](#)). The PPV011-primer pair used in this study allows the analysis of a 993 bp fragment of the B2L gene. Due to the high degree of conservation on inter- and intra-species level within this gene the analysis of large B2L fragments or the complete gene may lead to a more reliable and more precise PPV species classification.

The PCR-amplified DNA fragment sequences obtained from the B2L gene as well as from the ORF 032 allowed the resolution of the genomic variation between 23 PPV isolates. Thus an accurate allocation of PPVs to the appropriate established species is possible. Additionally it may even allow the classification of new PPVs. Especially the ORF 032 sequence derived phylogenetic tree showed a highly diversified branching and consequently provides an improved basis for the assessment of the relationship between and within the PPV species. Combined phylogenetic analysis of ORF 011 and 032, possibly also as concatenated sequences and ideally along with NGS of PPVs can be used as a valuable tool to determine PPV species characteristics. If sole analysis of a smaller B2L fragment, like the 554 bp fragment commonly used, provides the same validity is questionable.

Serial cell culture passages and adaptation of PPV to growth in cell lines can lead to substantial changes in the genome as proven for the highly attenuated ORFV strain D1701 ([Cottone et al., 1998](#)). Recently it was demonstrated that already after seven cell culture passages larger deletions within the PPV genome can occur ([Hautaniemi et al., 2011](#)). Because of these findings our cell culture isolation was restricted to primary bovine cells and virus passages were limited to a maximum of five. Since no original lesion-derived DNA was available a direct comparison of the targeted sequences was not possible, however based on the current experiences we assume no major influence of the few cell culture passages on aa sequence alterations. It should be noted that the reference sequences used are also derived from culture grown PPV strains ([Delhon et al., 2004](#)). Virus isolation in cell culture allows production and purification of sufficient PPV as well as high quality DNA thereof, providing the opportunity for further comprehensive analyses, e.g. NGS.

Starting in the early 70s a unique collection of cell culture derived PPV strains was established at the Institute of Medical Microbiology of the Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany and was continued until now. PPV strains and isolates from different countries worldwide were included in the collection and comparatively analyzed in this study for the first time.

Our findings on the relationship of the three PPV species with each other are consistent with previous findings showing that the evolutionary distance between BPSV and PCPV is much higher than between PCPV and ORFV, despite the fact that BPSV and PCPV share the same bovine host ([Hosamani et al., 2006](#); [Inoshima et al., 2001](#); [Thomas, 2003](#); [Tikkanen, 2004](#)). It cannot be ruled out that recombinants of PPVs in an individual host may occur. Therefore limited sequence analysis within small genomic regions will not reveal recombinant viruses. The latter will be subject of whole genome sequence comparison ideally with a defined BPSV and PCPV representative after simultaneous infection of cattle.

The fact that no considerable changes could be observed within the analyzed DNA fragments of PPV isolates being more than 40 years old and those isolated just recently point to a

Table 3
PPV B029 open reading frames (ORFs) in comparison to the ORFV IA82 reference genome.

ORF	ORFV B029 ^a		Orientation	Length (aa)	% Id ^b vs. ORFV IA82	ORFV IA82 Length (aa)	Predicted function
	Nucleotide position Start	End					
001	2624	3073	–	149	97.3	149	Unknown
002	?	?	–	unclear ^c	?	117	Unknown
003	Not present	Not present	–	Not present	–	Not present	Ankyrin/F-box protein
004	Not present	Not present	–	Not present	–	Not present	Ankyrin/F-box protein
005	4037	4279	–	80	78.8	71	Unknown
006	present in RT ^d (132)	present in RT ^d (132)	–	present in RT ^d (132)	–	present in RT ^d (132)	VEGF
007	4362	4844	–	160	93.8	159	dUTPase
008	4907	6457	–	516	97.1	516	Ankyrin/F-box protein
009	6625	7986	–	453	99.1	453	Unknown
010	8011	9942	–	643	99.8	643	EEV maturation protein
011	10,012	11,148	–	378	98.9	378	EEV envelope phospholipase
012	11,177	11,446	–	89	93.3	89	Unknown
013 ^e	11,754	11,984	+	76	72.2	79	Unknown
014	12,027	12,308	–	93	96.8	93	Modified RING finger protein
015	12,311	13,930	–	539	99.3	539	Unknown
016	14,000	14,779	–	259	97.7	259	Unknown
017	15,039	15,356	+	105	94.3	105	DNA-binding phosphoprotein
018	15,381	16,799	–	472	99.4	472	Poly-A polymerase catalytic subunit
019	16,807	18,984	–	725	99.2	725	Unknown
020	19,117	19,668	–	183	97.8	183	dsRNA-binding PKR inhibitor, interferon resistance
021	19,698	20,279	–	193	99.0	193	RNA polymerase subunit RPO30
022	20,366	22,069	+	567	99.8	567	Unknown
023	22,090	22,908	+	272	100	272	Membrane protein
024	22,968	23,846	+	292	96.2	288	Unknown
025	23,847	26,885	–	1012	99.7	1012	DNA polymerase
026	26,903	27,193	+	96	100	96	IMV redox protein, virus assembly
027	27,190	27,603	–	137	100	137	Virion core protein
028	27,590	29,755	–	721	97.2	718	Unknown
029	29,798	32,233	–	811	100	811	Unknown
030	32,416	33,381	–	321	99.4	321	DNA-binding virion protein
031	33,391	33,603	–	70	100	70	Unknown
032	33,610	34,467	–	285	98.2	285	DNA-binding phosphoprotein
033	34,500	34,736	–	78	97.4	78	IMV membrane protein
034	34,737	35,906	–	389	99.7	389	Telomere-binding protein
035	35,903	37,195	–	430	100	430	Virion core protease
036	37,201	39,252	+	683	99.6	683	RNA helicase NPH-II
037	39,227	41,038	–	603	99.5	603	Metalloprotease, virion morphogenesis
038	41,375	42,070	–	231	99.6	231	Late transcription elongation factor
039	41,049	41,381	+	110	98.2	110	Unknown
040	41,995	42,408	–	137	100	137	Glutaredoxin 2, virion morphogenesis
041	42,411	43,769	+	452	99.1	452	FEN-1 like endonuclease
042	43,771	43,962	+	63	100	63	RNA polymerase subunit RPO7
043	43,981	44,538	+	185	100	185	Unknown
044	44,535	45,731	–	398	99.5	398	Virion core protein
045	45,764	46,564	+	266	100	266	Late transcription factor
046	46,555	47,400	+	281	19.8	340	Myristylated protein
047	47,576	48,310	+	244	100	244	Myristylated IMV envelope protein
048	48,356	48,628	+	90	100	90	Unknown
049	48,635	49,891	–	418	98.6	418	Unknown
050	49,921	50,700	+	259	99.6	259	DNA-binding virion core protein VP8
051	50,723	51,109	+	128	99.2	128	Membrane protein
052	51,063	51,518	+	151	99.3	151	Membrane protein, morphogenesis
053	51,588	52,598	+	336	99.1	336	Poly-A polymerase small subunit VP39 PAPS
054	52,513	53,073	+	186	99.5	186	RNA polymerase subunit RPO22
055	53,024	53,527	–	167	100	167	Late membrane protein
056	53,611	57,480	+	1289	100	1289	RNA polymerase subunit RPO147
057	57,524	58,069	–	181	98.9	181	Thyrosine phosphatase, virus assembly
058	57,699	58,664	+	321	99.4	321	IMV, viral entry
059	58,669	59,682	–	337	98.8	338	IMV protein VP55, morphogenesis
060	59,683	62,097	–	804	99.9	804	RNA polymerase-associated protein RAP94
061	62,206	62,883	+	225	97.8	228	Late transcription factor VLTf-4
062	62,908	63,864	+	318	99.7	318	Topoisomerase type I
063	63,857	64,273	+	138	99.3	138	Unknown
064	64,308	66,833	+	841	99.5	841	mRNA capping enzyme large subunit
065	66,795	67,259	–	154	96.8	156	Virion protein
066	67,033	67,908	+	291	97.6	291	Virion protein
067	67,908	68,606	+	232	98.3	231	Uracil DNA glycosidase
068	68,620	70,983	+	787	99.7	787	NTPase
069	70,990	72,897	+	635	99.7	635	Early transcription factor VETfs
070	72,934	73,506	+	190	98.9	190	RNA polymerase subunit RPO18

Table 3 (Continued)

ORF	ORFV B029 ^a		Orientation	Length (aa)	% Id ^b vs. ORFV IA82	ORFV IA82 Length (aa)	Predicted function
	Nucleotide position Start	End					
071	73,536	74,210	+	224	100	224	NPH-PPH downregulator
072	74,200	76,116	–	638	99.8	638	NPH-I
073	76,179	76,745	–	188	98.9	188	Unknown
074	76,790	77,692	–	300	99.0	300	mRNA capping enzyme small subunit
075	77,700	79,337	–	545	100	545	Rifampicin resistance, membrane protein
076	79,358	79,810	–	150	100	150	Late transcription factor VLTf-2
077	79,849	80,523	–	224	100	224	Late transcription factor VLTf-3
078	80,520	80,768	–	82	97.6	82	Thioredoxin-like protein
079	80,779	82,806	–	675	99.9	675	Virion core protein P4b precursor
080	82,822	83,775	–	317	93.9	324	Virion core protein
081	83,814	84,332	+	172	100	172	RNA polymerase subunit RPO19
082	84,339	85,475	–	378	98.9	378	Unknown
083	85,511	88,036	–	841	99.8	841	Early transcription factor VETfL
084	87,699	88,610	+	303	100	303	Intermediate transcription factor VITf-3
085	88,579	88,860	–	93	100	93	Late virion membrane protein
086	88,875	91,592	–	905	99.7	905	Virion core protein P4a precursor
087	91,607	92,617	+	336	99.7	336	Virion formation
088	92,618	93,403	–	261	97.7	261	Virion core protein
089	93,420	93,698	–	92	98.9	92	Virion membrane protein
090	93,722	93,994	–	90	97.8	90	IMV phosphorylated membrane protein
091	94,011	94,172	–	53	100	53	IMV membrane protein, putative virulence factor
092	94,173	94,442	–	89	98.9	89	Unknown
093	94,429	95,505	–	358	98.9	358	Myristylated protein
094	95,532	96,122	–	196	100	196	Phosphorylated IMV membrane protein
095	96,137	97,603	+	488	99.8	488	DNA helicase
096	97,575	97,847	–	90	95.6	91	Zn-finger protein
097	98,183	99,472	–	429	99.5	429	DNA polymerase processivity factor
098	97,858	98,184	+	108	100	108	Unknown
099	99,469	99,909	+	146	99.3	146	Holiday junction resolvase
100	99,932	101,074	+	380	100	380	Intermediate transcription factor VITf-3
101	101,099	104,584	+	1161	99.8	1161	RNA polymerase subunit RPO132
102	104,723	106,285	–	520	69.8	518	A type inclusion protein, fusion peptide
103	Not present	Not present	–	Not present	–	522	A type inclusion protein
104	107,918	108,190	–	90	95.6	90	Fusion peptide
105	108,231	108,653	–	140	100	140	IMV surface protein
106	108,669	109,613	–	314	98.7	314	RNA polymerase subunit RPO35
107	109,613	109,795	–	60	100	60	Virion morphogenesis
108	109,964	110,788	–	274	94.2	266	DNA packaging protein/ATPase
109	Not present	Not present	–	Not present	–	159	EEV glycoprotein
110	Not present	Not present	–	Not present	–	165	EEV glycoprotein
111	?	?	–	Unclear ^c	?	198	Unknown
112	112,675	113,562	+	295	86.9	286	Chemokine-binding protein
113	113,635	114,267	+	210	96.7	211	Unknown
114	114,311	115,351	+	346	98.3	346	Unknown
115	115,469	115,906	+	145	91.0	143	Unknown
116	115,975	116,646	+	223	84.6	234	Unknown
117	116,821	117,618	+	265	98.9	265	GM-CSF/IL-2 inhibition factor-like protein
118	?	?	–	Unclear ^c	?	221	Unknown
119	118,110	118,730	+	206	98.1	204	Unknown
120	119,182	119,766	+	194	90.0	199	Unknown
121	119,887	120,789	+	300	98.0	300	Unknown
122	120,843	121,814	+	323	98.1	323	Unknown
123	121,905	123,482	+	525	99.2	525	Ankyrin/F-box protein
124	123,517	125,118	+	533	98.1	532	Unknown
125	125,211	125,732	+	173	98.3	173	Apoptosis inhibitor
126	125,839	127,332	+	497	99.2	497	Ankyrin/F-box protein
127	127,410	127,970	+	186	96.8	186	iL-10
128	?	?	–	Unclear ^c	?	527	Ankyrin/F-box protein
129	129,711	131,273	+	520	98.7	520	Ankyrin/F-box protein
130	131,360	132,853	+	497	99.6	498	Protein kinase
131	132,816	133,490	+	224	96.4	225	Membrane protein
132	133,539	133,940	+	133	76.3	137	vascular endothelial growth factor-like protein (VEGF)
133	Not present	Not present	–	Not present	–	Not present	Unknown
134	Not present	Not present	–	Not present	–	149	Unknown

^a Unless specified otherwise ORFV B029 and B015 ORFs are 100% identical.^b % Id, percent amino acid identity.^c Ambiguous mapping results, region could not be resolved.^d RT, right terminal genomic region.^e Differences in ORF 013 sequence between ORFV B029 and B015.

high level of conservation for the ORF 011 (B2L) and ORF 032. This is supported by the finding, that PPV isolates of different geographic origins likewise do not show significant genomic variation within these regions on an intra-species level. According to this individual species characteristics seem to be alterable to a very limited extent and to be conserved over time and space.

Comparison of the PPVs in both phylogenetic trees showed that the reindeer isolate F00.120R can be found within the PCPV cluster when considering the B2L sequence based tree (Fig. 2a), whereas it appears on a separate branch in the ORF 032 derived tree (Fig. 2b) – however still in close relationship to the PCPV group. This may be generally due to the higher sequence variability in the ORF 032 or it could be a host-influenced phenomenon but F00.120R obviously remains a member of the PCPV species, as postulated by Hautaniemi et al. (2010).

The PPV isolate BPS 2/07, which definitely originates from the teat of an infected cow, has to be classified as BPSV. This classification is supported by both phylogenetic analyses, based on the ORF 011 (B2L) and ORF 032 aa sequences. It is the first report describing BPSV in a cow not affecting the muzzle but rather the typical PCPV affection site. Recently, Yaegashi et al. (2013) reported the opposite case presenting a PCPV isolated from the muzzle of a cow. These molecular findings uncover that in PPV affected cattle both species BPSV and PCPV are not necessarily restricted to a single manifestation site (muzzle or teats). Thus the current PPV nomenclature should be reconsidered.

The situation is similar with respect to human PPV isolates. Man-derived PPVs or PPV-DNA is often ill defined simply as PCPV disregarding the animal host of transmission. Historically the milker's nodule cases certainly were mostly caused by viruses from cow teats and PCPV (or BPSV) was the typical etiological agent of human PPV infection. However nowadays close contact with PPV infected bovine udder or teats plays a minor role as source of infection for humans. In our experience consistent with worldwide reports contact with small ruminants causes the majority of human PPV infections (Bayindir et al., 2011; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012; Chahidi et al., 1993; Johannessen et al., 1975; Karakas et al., 2012; Leavell et al., 1968; Nougairede et al., 2013; Uzel et al., 2005). Phylogenetic analyses of eight human PPV isolates revealed their ORFV ($n=4$) or PCPV ($n=4$) species affiliation (Fig. 2a, b). The clustering of each human isolate was consistent with its particular case report, declaring contact to either sheep (ORFV) or cattle (PCPV). Hence our findings indicate that ORFV and PCPV maintain their species peculiarities even after changing from a ruminant to a human host.

These findings are also well supported by the results of the next generation sequencing of the ovine (B015) and the associated human (B029) PPV genomes, revealing complete congruence except for two variations. This shows that ORFV B015 as well preserved its integrity after changing the host species. By using next generation sequencing we were able to confirm and extend our previous results from phylogenetic analyses and to gain a genome-wide insight into the molecular features of the two analyzed ORFV DNAs. For the first time sequence data are available of an almost complete genomic DNA of a matching PPV pair namely ORFV isolated from a sheep as source for human PPV infection that occurred during a local Orf outbreak in Dithmarschen, Germany.

For future studies the PCR strategies as well as whole genome sequencing can rapidly provide a molecular basis for species allocation of human PPV infection as well as animal-derived PPV DNA. In addition it might be helpful to elucidate genome-wide PPV molecular peculiarities by application of the described strategies to improve characterization of new PPV species candidates and to update existing nomenclature.

Acknowledgments

We thank Anton Mayr a pioneer of German post war poxvirus research for his permanent enthusiasm and encouragement. We also thank A.A. Mercer and H.-J. Rzhia for fruitful discussions. Finally we thank S. Gellert and F. Sedlmaier for excellent technical support.

References

- Abrahão, J.S., Silva-Fernandes, A.T., Assis, F.L., Guedes, M.I., Drumond, B.P., Leite, J.A., Coelho, L.F.L., Turrini, F., Fonseca, F.G., Lobato, Z.I.P., Madureira, M., Ferreira, P.C., Bonjardim, C.A., Trindade, G.S., Kroon, E.G., 2010. Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: clinical description and phylogenetic characterization. *J. Clin. Virol.* 48, 69–72.
- Ballanger, F., Barbarot, S., Mollat, C., Bossard, C., Cassagnau, E., Renac, F., Stalder, J.F., 2006. Two giant orf lesions in a heart/lung transplant patient. *Eur. J. Dermatol.* 16, 284–286.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477.
- Bayindir, Y., Bayraktar, M., Karadag, N., Ozcan, H., Kayabas, U., Otlu, B., Durmaz, R., Doganay, M., 2011. Investigation and analysis of a human orf outbreak among people living on the same farm. *New Microbiol.* 34, 37–43.
- Becher, P., König, M., Müller, G., Siebert, U., Thiel, H.-J., 2002. Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses. *Arch. Virol.* 147, 1133–1140.
- Campanella, J.J., Bitincka, L., Smalley, J., 2003. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 4, 29.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012. Human Orf virus infection from household exposures – United States, 2009–2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 61, 245–248.
- Chahidi, N., De Fontaine, S., Lacotte, B., 1993. Human orf. *Br. J. Plast. Surg.* 46, 532–534.
- Cottone, R., Büttner, M., Bauer, B., Henkel, M., Hettich, E., Rzhia, H.J., 1998. Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Res.* 56, 53–67.
- Dal Pozzo, F., Martinelle, L., Gallina, L., Mast, J., Sarradin, P., Thiry, E., Scagliarini, A., Buttner, M., Saegerman, C., 2011. Original findings associated with two cases of bovine papular stomatitis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4397–4400.
- Dashtseren, T., Solovyev, B.V., Varejka, F., Khokhoo, A., 1984. Camel contagious ecthyma (pustular dermatitis). *Acta Virol.* 28, 122–127.
- Deane, D., Ueda, N., Wise, L.M., Wood, A.R., Percival, A., Jepson, C., Inglis, N.F., Fleming, S.B., Mercer, A.A., McInnes, C.J., 2009. Conservation and variation of the parapoxvirus GM-CSF-inhibitory factor (GIF) proteins. *J. Gen. Virol.* 90, 970–977.
- Delhon, G., Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., De la Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H.D., Piccone, M.E., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2004. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *J. Virol.* 78, 168–177.
- Friedmann-Kien, A.E., Rowe, W.P., Banfield, W.G., 1963. Milker's nodules: isolation of a poxvirus from a human case. *Science* 140, 1335–1336.
- Gassmann, U., Wyler, R., Wittek, R., 1985. Analysis of parapoxvirus genomes. *Arch. Virol.* 83, 17–31.
- Geerinck, K., Lukito, G., Snoeck, R., De Vos, R., De Clercq, E., Vanrenterghem, Y., Degreef, H., Maes, B., 2001. A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream. *J. Med. Virol.* 64, 543–549.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., Galaxy Team, T., 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 11, R86.
- Guo, J., Rasmussen, J., Wünschmann, A., De la Concha-Bermejillo, A., 2004. Genetic characterization of orf viruses isolated from various ruminant species of a zoo. *Vet. Microbiol.* 99, 81–92.
- Guo, J., Zhang, Z., Edwards, J.F., Emel, R.W., Taylor Jr., C., De la Concha-Bermejillo, A., 2003. Characterization of a North American orf virus isolated from a goat with persistent, proliferative dermatitis. *Virus Res.* 93, 169–179.
- Gurel, M.S., Ozardali, I., Bitiren, M., San, I., Zeren, H., 2002. Giant orf on the nose. *Eur. J. Dermatol.* 12, 183–185.
- Hautaniemi, M., Ueda, N., Tuimala, J., Mercer, A.A., Lahdenpera, J., McInnes, C.J., 2010. The genome of pseudocowpoxvirus: comparison of a reindeer isolate and a reference strain. *J. Gen. Virol.* 91, 1560–1576.
- Hautaniemi, M., Vaccari, F., Scagliarini, A., Laaksonen, S., Huovilainen, A., McInnes, C.J., 2011. Analysis of deletion within the reindeer pseudocowpoxvirus genome. *Virus Res.* 160, 326–332.
- Hessami, M., Keney, D.A., Pearson, L.D., Storz, J., 1979. Isolation of parapox viruses from man and animals: cultivation and cellular changes in bovine fetal spleen cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2, 1–7.
- Hosamani, M., Bhanuprakash, V., Scagliarini, A., Singh, R.K., 2006. Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 116, 317–324.
- Inoshima, Y., Morooka, A., Sentsui, H., 2000. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 84, 201–208.

- Inoshima, Y., Murakami, K., Yokoyama, T., Sentsui, H., 2001. Genetic heterogeneity among parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capri-cornis crispus*). *J. Gen. Virol.* 82, 1215–1220.
- Jeckel, S., Bidewell, C., Everest, D., McInnes, C., Wood, A., Dare, J., Schock, A., 2011. Severe oesophagitis in an adult bull caused by bovine papular stomatitis virus. *Vet. Rec.* 169, 317.
- Johannessen, J.V., Krugh, H.-K., Solberg, I., Dalen, A., Wijngaarden, H., Johansen, B., 1975. Human Orf. *J. Cutan. Pathol.* 2, 265–283.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 275–282.
- Karakas, A., Oguzoglu, T.C., Coskun, O., Artuk, C., Mert, G., Gul, H.C., Sener, K., Ozkul, A., 2012. First molecular characterization of a Turkish orf virus strain from a human based on a partial B2L sequence. *Arch. Virol.* 158, 1105–1108.
- Kretzdom, D., (thesis) 1985. Untersuchungen über das Vorkommen von Parapocken bei Rind und Schaf in Japan. DVM, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany.
- Larcher, C., Daniel, E., Pagani, E., Maier, K., Pasquetto, V., Mellina-Bares, M.F., Nemati, E., Egarter-Vigl, E., Zampieri, P., Huemer, H.P., 2009. Generalized parapoxvirus infection associated with increased antibody titres for varicella zoster virus and measles. *Eur. J. Dermatol.* 19, 375–379.
- Leavell Jr., U.W., McNamara, M.J., Mueller, R., Talbert, W.M., Rucker, R.C., Dalton, A.J., 1968. Orf. Report of 19 human cases with clinical and pathological observations. *JAMA* 204, 657–664.
- Lederman, E.R., Green, G.M., DeGroot, H.E., Dahl, P., Goldman, E., Greer, P.W., Li, Y., Zhao, H., Paddock, C.D., Damon, I.K., 2007. Progressive ORF virus infection in a patient with lymphoma: successful treatment using imiquimod. *Clin. Infect. Dis.* 44, e100–e103.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.
- Li, R., Zhu, H., Ruan, J., Qian, W., Fang, X., Shi, Z., Li, Y., Li, S., Shan, G., Kristiansen, K., Li, S., Yang, H., Wang, J., Wang, J., 2010. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res.* 20, 265–272.
- Li, Y., Meyer, H., Zhao, H., Damon, I.K., 2009. GC content-based Pan-Pox universal PCR assays for poxvirus detection. *J. Clin. Microbiol.* 48, 268–276.
- McInnes, C.J., Wood, A.R., Nettleton, P.E., Gilray, J.A., 2001. Genomic comparison of an avirulent strain of Orf virus with that of a virulent wild type isolate reveals that the Orf virus G2L gene is non-essential for replication. *Virus Genes* 22, 141–150.
- Menna, A., Wittek, R., Bachmann, P.A., Mayr, A., Wyler, R., 1979. Physical characterization of a stomatitis papulosa virus genome: a cleavage map for the restriction endonucleases HindIII and EcoRI. *Arch. Virol.* 59, 145–156.
- Mercer, A.A., Fraser, K., Barns, G., Robinson, A.J., 1987. The structure and cloning of orf virus DNA. *Virology* 157, 1–12.
- Mercer, A.A., Ueda, N., Friederichs, S.-M., Hofmann, K., Fraser, K.M., Bateman, T., Fleming, S.B., 2006. Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus Res.* 116, 146–158.
- Nagarajan, G., Swami, S.K., Dahiya, S.S., Sivakumar, G., Narnaware, S.D., Tuteja, F.C., Patil, N.V., 2011. Sequence analysis of topoisomerase gene of pseudocowpox virus isolates from camels (*Camelus dromedarius*). *Virus Res.* 158, 277–280.
- Nitsche, A., Büttner, M., Wilhelm, S., Pauli, G., Meyer, H., 2005. Real-time PCR detection of Parapoxvirus DNA. *Clin. Chem.* 52, 316–319.
- Nougairede, A., Fossati, C., Salez, N., Cohen-Bacrie, S., Ninove, L., Michel, F., Aboukais, S., Büttner, M., Zandotti, C., De Lamballerie, X., Charrel, R.N., 2013. Sheep-to-human transmission of Orf virus during Eid al-Adha religious practices, France. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 102–105.
- Robinson, A.J., Ellis, G., Balassu, T., 1982. The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep. *Arch. Virol.* 71, 43–55.
- Robinson, A.J., Mercer, A.A., 1995. Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus. *Virology* 208, 812–815.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26.
- Sant'Ana, F.J.F., Leal, F.A.A.d., Rabelo, R.E., Vulcani, V.A.S., Moreira, C.A., Cargnelutti, J.F., Flores, E.F., 2013. Coinfection by Vaccinia virus and an Orf virus-like parapoxvirus in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in midwestern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 267–272.
- Scagliarini, A., Vaccari, F., Turrini, F., Bianchi, A., Cordioli, P., Lavazza, A., 2011. Parapoxvirus infections of Red Deer, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 684–687.
- Sullivan, J.T., Mercer, A.A., Fleming, S.B., Robinson, A.J., 1994. Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K. *Virology* 202, 968–973.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Thomas, K., 2003. A novel poxvirus lethal to red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *J. Gen. Virol.* 84, 3337–3341.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Tikkanen, M.K., 2004. Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox virus. *J. Gen. Virol.* 85, 1413–1418.
- Uzel, M., Sasmaz, S., Bakaris, S., Cetinus, E., Bilgic, E., Karaoguz, A., Ozkul, A., Arican, O., 2005. A viral infection of the hand commonly seen after the feast of sacrifice: human orf (orf of the hand). *Epidemiol. Infect.* 133, 653–657.
- Vikøren, T., Lillehaug, A., Akerstedt, J., Bretten, T., Haugum, M., Tryland, M., 2008. A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-ranging musk ox (*Ovibos moschatus*) population in Norway. *Vet. Microbiol.* 127, 10–20.
- Witteck, R., Herlyn, M., Schümperli, D., Bachmann, P.A., Mayr, A., Wyler, R., 1980. Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains. *Intervirology* 13, 33–41.
- Yaegashi, G., Sasaki, I., Chiba, S., Murakami, K., 2013. Molecular analysis of Parapoxvirus detected in eight calves in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*
- Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829.

2 Publikation 2

Parapoxvirus (PPV) of red deer reveals subclinical infection and confirms a unique species

Schirin Friederichs,¹ Stefan Krebs,² Helmut Blum,² Heike Lang¹ and Mathias Büttner¹

Correspondence

Mathias Büttner
Mathias.Buettner@gl.bayern.de

¹Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleißheim, Germany

²Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Centre, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

Parapoxvirus (PPV) infections are of worldwide importance, particularly in sheep and goat herds. Owing to the zoonotic potential of all PPV species, they are a permanent threat to human health as well. The virus is also known to affect wildlife, as reported for pinnipeds, red deer and several other wild ruminants. PPVs found in red deer have been claimed as a unique species according to certain genomic features. So far infection of wildlife has been recognized because of clinical manifestation such as inflammation, stomatitis or typical pox-like lesions in the skin or mucous membranes. Here we report the use of targeted molecular diagnostics for the presence of PPV genomes in tonsil swabs of apparently healthy red deer in the Bavarian Alps. Out of 1764 swabs, 0.79% tested positive for PPV genome presence. From one sample, PPV was successfully isolated in cell culture. This virus became the subject of complete genome characterization using next generation sequencing and various subsidiary PCR protocols. Strikingly, about a quarter of all ORFs were found to be larger than the corresponding ORFs in the reference PPV genome sequences used for comparison. To our knowledge this is the first genome-wide analysis that confirms red deer PPV as a unique species within the genus *Parapoxvirus* in Europe. Persistence of PPV in Alpine red deer indicates a source for virus transmission to susceptible livestock and hunters. The findings provide a further example of wildlife animals playing an important role as an inconspicuous reservoir of zoonotic diseases.

Received 20 November 2014

Accepted 1 February 2015

INTRODUCTION

Members of the family *Poxviridae* infect a broad range of vertebrates (subfamily *Chordopoxvirinae*) and insects (subfamily *Entomopoxvirinae*). The subfamily *Chordopoxvirinae* is subdivided into ten genera, one of which is the genus *Parapoxvirus* (PPV). To date there are four confirmed PPV species recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>): the prototype member orf virus (ORFV) is endemic in most sheep- and goat-raising countries, whereas bovine popular stomatitis virus (BPSV) and pseudocowpox virus (PCPV) mainly infect cattle. Parapoxvirus of red deer in New Zealand (PVNZ) was first described by Robinson & Mercer (1995) and has become established as a fourth PPV species.

Throughout the world, PPV is known as causative agent of contagious pustular dermatitis in small ruminants

(ORFV). After PPV infection in cattle, mild localized inflammation is commonly reported (bovine popular stomatitis; pseudocowpox). Occasionally, severe cases of contagious pustular dermatitis and bovine popular stomatitis occur, most likely linked to immune-suppressive events or secondary bacterial infections (Abu Elzein & Housawi, 1997; Guo *et al.*, 2003; Inoshima *et al.*, 2009; Leonard *et al.*, 2009). All PPVs can readily be transmitted to humans through direct or indirect contact with infected animals, which normally results in the development of circumscribed skin lesions, historically known as milker's nodules.

PPV infection of domesticated ruminants is well recognized by farmers, but reported infrequently, whereas the recorded occurrence of PPV in wild animals mainly originates from scientific investigations. Publications about PPV wildlife infections refer to pinnipeds from North America, Canada and Europe (Becher *et al.*, 2002; Hicks & Worthy, 1987; Roess *et al.*, 2011; Tryland *et al.*, 2005), chamois from Austria and Italy (Kitchen *et al.*, 2014; Scagliarini *et al.*, 2011), white-tailed deer from the United States (Roess *et al.*, 2010, 2013), red deer from New Zealand and Italy (Horner *et al.*, 1987; Robinson & Mercer,

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the HL953 sequence of red deer parapoxvirus is KM502564.

Two supplementary figures and one supplementary table are available with the online Supplementary Material.

1995; Scagliarini *et al.*, 2011), and finally reindeer and musk oxen from Scandinavia (Falk, 1978; Tikkanen *et al.*, 2004). In the majority of diseased wildlife the aetiological agent has been identified as either ORFV or PCPV, whereas seal parapoxvirus has been suggested as a new tentative species and so far PPVs originating from red deer have been attributed to PVNZ.

Virus strain RD86 (originally known as deerpox virus, DPV) was isolated from lesions on the velvet of a farmed deer in New Zealand (Robinson & Mercer, 1995). Comparisons of restriction endonuclease profiles and DNA hybridization analysis revealed the conspicuous genetic distance from other PPV species and led to its classification as a new member of the genus. For many years PVNZ has not been recognized outside New Zealand, although it has been assumed that PPV might be present in red deer outside New Zealand, especially in Europe, since red deer were originally brought to New Zealand from this continent. In 2008, severe cases of pustular stomatitis in wild ruminants (chamois, ibex and red deer) were reported in the Italian Alps (Scagliarini *et al.*, 2011). Based on (partial) sequence information of two genes, the B2L gene and the viral vascular endothelial growth factor (vVEGF) gene, Scagliarini *et al.* (2011) proposed PVNZ as causative agent of the disease in red deer.

Even though whole-genome sequence data are available at least for one prototype species of PPV, little is known about the whole-genome characteristics of PVNZ or other red deer PPV. In general, PPVs possess a linear double-stranded DNA genome that is approximately 140 kbp in length and exhibits a notably higher G + C content (~64 %) than most other poxviruses. The central genomic region of all chordopoxviruses comprises 88 well-conserved genes. These core genes usually occur in a common order and orientation and encode proteins of the transcription and replication machinery (Mercer *et al.*, 2006; Upton *et al.*, 2003). Genes located outside the central genomic region, however, are considered non-essential for *in vivo* growth and tend to be genus- or even species-specific. They are of particular importance concerning PPV virulence and virus–host interactions. The ends of the genomes form a typical terminal hairpin loop.

In the course of a survey about the occurrence of wildlife tuberculosis we analysed 1764 tonsil swabs of apparently healthy red deer in the Bavarian Alps; 14 of them tested positive for PPV genome presence. From one swab sample, PPV was successfully isolated in cell culture and was therefore available in sufficient quantity for further genome-wide molecular analysis. To our knowledge, this is the first study that presents next generation sequencing data of a European red deer PPV isolate and confirms the status of red deer PPV as a separate species in close relationship to PVNZ. We also show viral DNA presence in tonsil swabs of macroscopically inconspicuous organs. Thus, in addition to the extraordinary stability of PPV in the environment, the possibility of virus persistence in healthy host animals may contribute to pathogenesis.

Manifestation of disease via infection of small wounds in the oral cavity will be promoted. Additionally, shedding of the virus by apparently healthy animals may facilitate virus transmission among wildlife (e.g. red deer) and to susceptible livestock and hunters.

RESULTS

PCR

PCR results are summarized in Table 1, which also provides further information about all PPV tonsil swabs presenting a positive result in real-time PCR. In total, 14 (0.79 %) of 1764 swab-derived DNA preparations tested positive for PPV genome presence, but yielded rather high cycle threshold values (C_t ; 33.5–39.8). For nine of the 14 samples the result could be confirmed for poxvirus high-G + C genomes by conventional PCR.

Mycobacterial DNA could not be detected in any of the samples.

PPV isolate HL953

PPV HL953 could successfully be isolated in primary bovine cells, and after five cell culture passages ultracentrifugation yielded high-titre virus (10^9 TCID₅₀ ml⁻¹). Electron-microscopical examination of the HL953 concentrate revealed typical PPV virion particles in high quantities.

Whole-genome sequencing of HL953. PPV HL953 sequences were assembled into a contiguous sequence of >139 kbp; however, hairpin loop sequences at the end of the genome, as well as the presumed first and last two ORFs, could not be resolved by next generation sequencing owing to ambiguous mapping and failure to assemble *de novo*. The assembled genome showed a high G + C content of about 65 % – a feature common to all members of the genus *Parapoxvirus*.

Based on their localization within the HL953 genome, their orientation, the size of the predicted protein and their similarity to well-defined proteins in other PPV reference genomes, 130 genes were predicted in this genome. Table 2 provides an overview of the individual ORFs in the HL953 genome and their amino acid (aa) identity to available reference genome sequences. ORFs are numbered according to the original numbering introduced by Delhon *et al.* (2004) to allow comparisons with other PPV genomes available through GenBank.

All of the 88 conserved genes that constitute the minimal essential chordopoxvirus genome backbone could be identified in the HL953 genome sequence. The same is true for a set of 12 genes (001/134, 005, 012, 012.5, 013, 024, 073, 113, 115, 124, 125, 006/132) that have been shown to be present in all PPV genomes but not in other chordopoxviruses sequenced to date. Of these, only the

S. Friederichs and others

Table 1. PCR results and features of tonsil swabs testing positive for PPV genome presence by pan-PPV real-time PCR

Designation	Year of sampling	Bavarian county	Age	PCR results	
				Pan-PPV PCR	Pox high-GC PCR
D078	2011	Miesbach	>2 years	ct 36.34	+
F345	2012	Oberallgäu	1–2 years	ct 33.62	+
F575	2012	Bad Tölz-Wolfratshausen	5–7 years	ct 33.97	–
HL953	2012	Oberallgäu	Calf	ct 37.03	+
F1130	2012	Oberallgäu	3 years	ct 33.47	+
F1134	2012	Oberallgäu	Calf	ct 36.26	+
F1392	2013	Oberallgäu	Calf	ct 37.01	–
F1396	2013	Oberallgäu	8 years	ct 39.84	–
F1440	2013	Oberallgäu	1–2 years	ct 38.27	–
F1441	2013	Oberallgäu	Calf	ct 36.10	+
F1575	2013	Traunstein	1–2 years	ct 35.56	+
F1753	2013	Oberallgäu	3 years	ct 34.46	+
F1755	2013	Oberallgäu	1–3 years	ct 36.95	+
F2020	2013	Oberallgäu	1–3 years	ct 38.22	–

HL953 ORF 001/134 could not be resolved by next generation sequencing and thus its presence remains unclear.

It is of particular note that 26.8 % of all deduced HL953 proteins were found to be (at least 4 aa) larger than the corresponding protein in all PPV reference genomes available for comparison (see Table 2). This applies especially to ORF 007, encoding a deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) that presumably consists of 499 aa in the HL953 genome and hence appears to be more than three times larger than every other described parapoxviral dUTPase (Cottone *et al.*, 2002; Delhon *et al.*, 2004; Hautaniemi *et al.*, 2010).

Sequence homologies to defined BPSV, ORFV and PCPV proteins were remarkably low (Table 2): only 38.6 % of the predicted proteins showed an aa identity of 80 % or higher when compared with the corresponding reference proteins. In 81 ORFs (63.8 %), the highest aa identity rates were found within the BPSV AR02 genome, indicating a comparatively close relationship of HL953 to this species. ORFV IA82 showed the highest aa identity in 14 ORFs (11.0 %), ORFV SA00 in 15 ORFs (11.8 %), PCPV F00.120R in 12 ORFs (9.4 %) and PCPV VR634 in 16 ORFs (12.6 %). In some cases, two or more reference PPV ORFs showed equal (highest) aa identities with the corresponding HL953 ORF.

Comparative whole-genome analysis also revealed the presence of two BPSV-specific ANK proteins, encoded by ORF 003 and ORF 004, whereas ORF 118, so far only described in ORFV, was absent. Major contiguous gene deletions – as demonstrated for the PCPV genomes F00.120R (ORFs 116–121) and VR634 (ORFs 118–120) – could not be determined within the analysed HL953 sequence, even though the ORFV-specific ORF 118 and in addition ORF 119 (function unknown) are not present either. HL953 contains all of the known or putative virulence-factor-encoding genes: several

ankyrin-like repeat (ANK)/F-box protein genes (ORFs 003, 004, 008, 123, 126, 129), the interferon-resistance protein gene (ORF 020), the chemokine-binding protein gene (ORF 112), the GM-CSF inhibitory factor gene (ORF 117), the viral interleukin-10 gene (ORF 127) and the viral vascular endothelial growth factor gene (vVEGF, ORF 132). The vVEGF-encoding gene is unique to PPV genomes but has also been shown to be non-essential (Rziha *et al.*, 2000). Therefore, the existence and sequence peculiarity of HL953 vVEGF were of special interest. In Fig. 1, sequence alignments of the deduced vVEGF aa sequences of twelve PPVs of different species are demonstrated. Despite the known hyper-variability of the vVEGF gene, HL953 shows high sequence homologies to other PPVs originating from red deer. Strikingly, the vVEGF aa sequences of HL953 and the Italian PVNZ 256/08 are 100 % identical. This is in contrast to the vVEGF aa identities between HL953 and other PPV species, ranging from 31 to 50 %. Similar results were found by Ueda *et al.* (2007) for PVNZ RD86, which shows 37–54 % aa identity to vVEGFs encoded by ORFV, PCPV and BPSV.

Phylogenetic analysis. To clarify the genetic relationship between HL953 and available PPV reference genomes, molecular phylogenetic analysis using the maximum-likelihood method was applied. The resulting phylogenetic tree (Fig. 2a) based on concatenated protein sequence data of HL953 and seven PPV reference genomes revealed four distinct clusters, three of them representing the PPV species ORFV, BPSV and PCPV, whereas HL953 is arranged on a separate branch. It becomes evident that HL953 is genetically more closely related to BPSV AR02 than to any other of the ORFV or PCPV species members, but cannot be allocated to the BPSV species.

The phylogenetic analysis with other poxviruses (Fig. 2b) reveals a relatively close relationship of HL953 to other G+C-rich poxviruses, e.g. squirrelpox virus.

Table 2. PPV HL953 open reading frames (ORFs) compared to the BPSV AR02, ORFV IA82 and SA00, PCPV F00.120R and VR634 reference genomes

ORF	HL953		BPSV AR02		ORFV IA82		ORFV SA00		PCPV F00.120R		PCPV VR634		Predicted function
			Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*			
	Nucleotide position	Orientation	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	
	Start	End											
001	?	?	Unclear§	—	147	—	149	—	150	—	NP	—	Unknown
002	?	?	Unclear§	—	n.p.	—	117	—	RT† (132.5)	—	NP	—	Unknown
003	497	2 089	530	—	496	57.55	NP	—	NP	—	NP	—	Ankyrin/F-box protein
004	2 156	3 721	521	—	519	55.19	NP	—	NP	—	NP	—	Ankyrin/F-box protein
005	3 805	4 143	112	—	98	55.00	71	36.00	95	38.00	NP	—	Unknown
006	Present in RT† (132)	+	Present in RT† (132)	37.25	152	Present in RT† (132)	41.07	Present in RT† (132)	49.61	Present in RT† (132)	Present in RT† (132)	45.32	VEGF
007	4 173	5 672	499	—	163	65.71	159	62.41	160	64.96	NP	—	dUTPase
008	5 783	7 348	521	—	518	62.84	516	57.00	516	57.71	NP	—	Ankyrin/F-box protein
009	7 516	8 856	446	—	465	59.44	453	57.52	441	57.39	442	56.92	Unknown
010	9 288	11 219	643	—	643	76.55	643	71.23	643	70.92	645	71.83	EEV maturation protein
011	11 295	12 431	378	—	378	86.77	378	81.22	378	81.48	378	82.28	EEV envelope phospholipase
012	12 460	12 729	89	—	85	51.72	89	58.82	89	57.65	90	56.98	Unknown
012.5	12 820	12 999	59	—	56	67.00	60	68.00	60	65.00	60	63.33	Unknown
013	13 129	13 365	78	+	73	60.00	79	46.67	79	50.00	78	44.62	Unknown
014	13 584	13 889	101	—	93	64.36	93	71.91	93	65.35	93	67.33	Modified RING finger protein
015	13 907	15 526	539	—	536	60.45	539	61.15	539	61.52	539	59.48	Unknown
016	15 709	16 563	284	—	249	52.63	259	53.15	259	53.97	260	50.39	Unknown
017	16 958	17 299	113	+	105	61.06	105	54.87	105	55.75	108	55.36	DNA-binding phosphoprotein
018	17 352	18 941	529	—	481	74.47	472	76.49	472	76.30	474	74.95	Poly-A polymerase catalytic subunit
019	18 964	21 144	726	—	725	76.55	725	74.48	725	74.62	725	74.76	Unknown
020	21 245	21 892	215	—	195	38.62	183	37.86	183	39.81	182	35.92	dsRNA-binding PKR inhibitor, interferon resistance
021	21 958	22 548	196	—	199	83.16	193	78.01	193	77.89	193	78.42	RNA polymerase subunit RP030

S. Friederichs and others

Table 2. cont.

ORF	HL953		BPSV AR02		ORFV IA82		ORFV SA00		PCPV F00.120R		PCPV VR634		Predicted function		
			Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*			
	Nucleotide position	Orientation	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*			
	Start	End													
022	22 681	24 384	+	567	566	84.13	567	82.92	567	83.10	567	82.57	567	82.75	Unknown
023	24 410	25 228	+	272	272	85.66	272	85.66	272	85.66	272	86.03	272	85.66	Membrane protein
024	25 356	26 327	+	323	227	67.61	288	64.60	292	64.60	335	67.31	266	56.69	Unknown
025	26 430	29 462	−	1010	1009	87.12	1012	85.40	1008	85.31	1008	85.33	1008	85.53	DNA polymerase
026	29 492	29 806	+	104	97	85.42	96	86.46	96	86.46	96	85.42	96	85.42	IMV redox protein, virus assembly
027	29 877	30 290	−	137	137	86.86	137	83.94	137	84.67	137	84.67	137	85.40	Virion core protein
028	30 277	32 424	−	715	700	65.87	718	63.86	709	64.53	727	62.74	724	63.55	Unknown
029	32 471	34 864	−	797	807	68.76	811	66.42	797	66.79	797	66.33	797	65.96	Unknown
030	35 212	36 201	−	329	322	85.40	321	79.81	321	80.38	321	79.19	321	79.19	DNA-binding virion protein
031	36 268	36 477	−	69	69	69.57	70	65.71	70	65.71	70	68.57	70	67.14	Unknown
032	36 492	37 394	−	300	288	69.97	285	61.00	285	61.33	285	65.33	285	65.67	DNA-binding phosphoprotein
033	37 427	37 666	−	79	86	67.95	78	66.67	78	65.38	78	65.82	78	67.09	IMV membrane protein
034	37 667	38 842	−	391	389	81.59	389	79.54	389	79.80	389	80.31	389	80.31	Telomere-binding protein
035	38 839	40 158	−	339	430	84.25	430	81.05	430	80.82	430	80.82	430	81.28	Virion core protease
036	40 164	42 239	+	691	684	79.02	683	77.39	683	77.39	684	77.42	684	78.15	RNA helicase NPH-II
037	42 214	44 031	−	605	602	80.20	603	74.71	603	74.88	602	74.88	602	74.38	Metalloprotease, virion
038	44 387	45 088	+	233	233	77.25	231	71.67	231	72.10	233	72.53	233	72.53	morphogenesis
039	44 058	44 393	−	111	111	78.38	110	73.87	110	76.58	110	77.48	110	77.48	Late transcription elongation factor
040	45 007	45 435	−	142	138	82.09	137	73.72	137	72.99	139	76.12	139	73.94	Unknown
041	45 438	46 814	+	458	441	65.73	452	66.96	452	65.43	454	67.81	456	68.26	Glutaredoxin 2, virion
042	46 816	47 007	+	63	63	85.71	63	82.54	63	82.54	63	77.78	63	80.95	morphogenesis FEN-1-like endonuclease
043	47 029	47 610	+	193	192	74.18	185	68.33	185	67.78	186	69.44	186	70.00	RNA polymerase subunit RPO7
044	47 620	48 837	−	405	391	67.41	398	62.14	398	61.90	396	63.73	396	61.63	Unknown
															Virion core protein

Parapoxvirus (PPV) of red deer

Table 2. cont.

ORF	HL953			BPSV AR02		ORFV IA82		ORFV SA00		PCPV F00.120R		PCPV VR634		Predicted function	
	Nucleotide position		Orientation	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)			
	Start	End													
045	48 870	49 670	+	266	94.36	266	92.11	266	92.11	266	91.35	266	90.98	Late transcription factor	
046	49 681	50 688	+	335	334	78.51	334	75.52	334	72.84	334	72.54	334	72.54	Myristylated protein
047	50 689	51 423	+	244	244	90.12	244	88.07	244	88.48	244	89.30	244	89.30	Myristylated IMV envelope protein
048	51 478	51 750	+	90	89	73.75	90	70.51	90	70.51	90	71.79	90	67.95	Unknown
049	51 759	53 030	-	423	376	63.36	418	57.98	417	58.43	435	55.92	234	56.39	Unknown
050	53 060	53 830	+	256	256	82.57	259	78.28	259	77.46	259	78.28	259	77.87	DNA-binding virion core protein VP8
051	53 886	54 278	+	130	129	72.50	128	70.97	128	71.77	127	69.60	127	71.20	Membrane protein
052	54 232	54 687	+	151	151	76.82	151	74.17	151	74.83	151	73.51	151	74.17	Membrane protein, morphogenesis
053	54 757	55 770	+	337	337	87.24	336	83.38	336	83.09	336	82.20	336	82.49	Poly-A polymerase small subunit VP39
054	55 685	56 245	+	186	186	84.41	186	80.65	186	81.72	186	82.26	186	82.26	RNA polymerase subunit RPO22
055	56 196	56 726	-	176	167	76.00	167	74.86	167	74.86	167	75.43	167	76.00	Late membrane protein
056	56 818	60 681	+	1287	1289	90.53	1289	90.14	1289	90.30	1288	90.45	1288	90.37	RNA polymerase subunit RPO147
057	60 742	61 275	-	177	179	72.16	181	72.73	181	73.30	181	76.70	181	76.70	Thyrosine phosphatase, virus assembly
058	61 282	61 866	+	194	194	84.02	191	82.23	191	82.23	191	80.10	191	80.10	IMV, viral entry
059	61 940	63 007	-	355	340	60.45	338	60.80	342	62.22	356	62.25	354	62.39	IMV protein VP55, morphogenesis
060	63 008	65 431	-	807	803	84.94	804	85.87	804	85.87	804	84.99	804	84.86	RNA polymerase-associated protein
061	65 543	66 268	+	241	242	57.03	228	50.00	227	49.15	235	51.03	232	50.00	RAP94
062	66 315	67 277	+	320	320	85.16	318	84.14	318	84.47	318	84.47	318	84.79	Late transcription factor VLTIF-4
063	67 270	67 689	+	139	139	65.47	138	68.12	138	69.06	138	71.94	138	71.94	Topoisomerase type I
															Unknown

S. Friederichs and others

Table 2. cont.

ORF	HL953		BPSV AR02		ORFV IA82		ORFV SA00		PCPV F00.120R		PCPV VR634		Predicted function	
			Orientation	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*			
	Nucleotide position	Start										End		
064	67 731	70 280	+	849	842	83.08	841	85.20	841	85.08	841	85.32	841	mRNA capping enzyme large subunit
065	70 242	70 703	—	153	158	75.33	156	76.47	155	76.47	157	75.82	157	Virion protein
066	70 702	71 430	+	242	225	62.05	221	60.19	221	60.52	221	62.78	221	Virion protein
067	71 372	72 151	+	259	247	82.24	231	88.11	230	87.67	232	87.56	232	Uracil DNA glycosidase
068	72 165	74 531	+	788	788	89.97	787	88.83	787	88.83	787	87.82	787	NTPase
069	74 603	76 507	+	634	650	93.69	635	91.65	635	91.81	635	91.50	635	Early transcription factor VETfs
070	76 581	77 144	+	187	176	88.68	190	83.05	190	84.88	186	81.97	182	RNA polymerase subunit RP018
071	77 184	77 906	+	240	223	77.93	224	75.68	224	76.13	224	77.03	224	NPH-PPH downregulator
072	77 896	79 812	—	638	638	87.91	638	87.28	638	87.28	638	87.60	638	NPH-I
073	79 904	80 500	—	198	194	69.33	188	70.34	188	68.49	192	72.11	192	Unknown
073.5	NP	NP	—	NP	NP	—	NP	—	NP	—	183	—	183	Unknown; similar to ORF 073
074	80 672	81 556	—	294	290	84.69	289	82.71	289	82.71	289	82.31	289	mRNA capping enzyme small subunit
075	81 708	83 345	—	545	545	80.55	545	81.10	545	81.10	545	81.47	545	Rifampicin resistance, membrane protein
076	83 365	83 820	—	151	150	88.74	150	82.78	150	82.78	150	83.44	150	Late transcription factor VLTf-2
77	83 847	84 521	—	224	224	95.07	224	90.63	224	90.63	224	91.07	224	Late transcription factor VLTf-3
078	84 549	84 794	—	81	80	73.42	82	76.32	82	77.03	83	83.56	83	Thioredoxin-like protein
079	84 818	86 887	—	689	683	76.67	675	72.41	675	71.68	679	71.39	679	Virion core protein p4b precursor
080	86 903	87 706	—	267	244	45.72	324	40.59	328	41.11	263	53.43	262	Virion core protein
081	87 745	88 263	+	172	171	79.65	172	79.65	173	82.86	172	82.14	172	RNA polymerase subunit RP019
082	88 268	89 440	—	390	384	79.23	378	73.54	378	72.75	378	75.13	378	Unknown

Table 2. cont.

ORF	HL953			BPSV AR02		ORFV IA82		ORFV SA00		PCPV F00.120R		PCPV VR634		Predicted function
	Nucleotide position		Orientation	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*			
	Start	End												
083	89 562	91 682	—	706	90.23	706	87.07	706	86.95	706	89.50	706	89.36	Early transcription factor VETFL
084	91 756	92 667	+	303	85.52	303	85.86	303	85.52	303	85.52	303	85.17	Intermediate transcription factor VITF-3
085	92 645	93 058	—	137	93.98	93	88.51	93	91.25	94	84.78	94	84.78	Late virion membrane protein
086	93 091	95 820	—	909	77.14	905	73.46	905	73.57	906	73.46	907	73.57	Virion core protein P4a precursor
087	95 835	96 875	+	346	85.39	336	85.88	336	85.30	336	84.44	336	84.73	Virion formation
088	96 936	97 679	—	247	53.41	261	53.50	260	52.45	262	55.98	262	61.20	Virion core protein
089	97 762	98 007	—	81	60.76	92	60.49	92	60.49	92	63.75	92	63.75	Virion membrane protein
090	98 054	98 341	—	95	63.16	90	64.21	91	65.26	92	62.50	92	62.50	IMV phosphorylated membrane protein
091	98 358	98 519	—	53	86.79	53	86.79	53	86.79	53	81.13	53	81.13	IMV membrane protein, putative virulence factor
092	98 509	98 787	—	92	67.39	89	69.66	89	68.54	89	65.17	89	68.54	Unknown
093	98 771	99 850	—	359	77.31	358	75.42	358	75.42	358	74.02	358	74.30	Myristylated protein
094	99 915	100 523	—	202	84.58	196	80.20	196	80.20	199	80.79	199	81.28	Phosphorylated IMV membrane protein
095	100 538	102 016	+	492	88.01	488	85.34	488	85.34	488	86.18	488	86.18	DNA helicase
096	101 988	102 248	—	86	76.81	91	67.65	90	65.67	95	66.20	95	63.38	Zn-finger protein
097	102 603	103 895	+	430	77.28	429	71.73	429	71.96	429	72.43	429	72.66	DNA polymerase
098	102 269	102 604	—	111	76.00	108	69.61	108	71.57	108	68.63	108	69.61	processivity factor
099	103 913	104 362	+	149	89.04	146	86.99	146	86.99	146	87.67	146	87.67	Unknown
100	104 373	105 518	+	381	82.01	380	83.07	380	82.80	380	84.13	380	83.86	Holiday junction resolvase
101	105 551	109 069	+	1172	90.78	1161	91.04	1161	90.78	1161	90.44	1161	90.70	Intermediate transcription factor VITF-3
														RNA polymerase subunit RP0132

S. Friederichs and others

Table 2. cont.

ORF	HL953		BPSV AR02		ORFV IA82		ORFV SA00		PCPV F00.120R		PCPV VR634		Predicted function		
			Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*					
	Nucleotide position	Orientation	Length (aa)												
Start	End														
102	109 338	110 909	—	523	520	66.48	518	60.00	520	63.88	519	58.75	518	60.00	A-type inclusion protein, fusion peptide
103	110 949	112 496	—	515	519	55.45	522	48.88	516	55.70	523	48.89	525	47.41	A-type inclusion protein
104	112 536	112 808	—	90	89	62.64	90	63.33	90	62.22	90	61.11	91	59.34	Fusion peptide
105	112 855	113 277	—	140	140	86.43	140	80.71	140	80.71	140	77.86	140	78.57	IMV surface protein
106	113 368	114 381	—	337	319	82.90	314	78.88	314	79.54	316	78.88	316	79.54	RNA polymerase subunit RP035
107	114 381	114 566	—	61	62	83.61	60	71.67	60	70.00	59	69.49	59	69.49	Virion morphogenesis
107.5	114 698	114 865	—	55	58	46.15	49	45.45	49	47.73	49	54.55	57	42.31	Unknown
108	114 951	115 754	—	267	259	88.76	266	92.74	274	88.93	272	87.59	257	93.09	DNA packaging protein/ATPase
109	115 852	116 370	+	172	162	43.68	159	47.65	164	52.60	161	50.87	159	47.40	EEV glycoprotein
110	116 378	116 884	+	168	167	50.30	165	52.41	167	71.69	167	70.48	165	54.22	EEV glycoprotein
111	116 921	117 460	+	179	184	63.13	179	61.45	179	60.89	179	63.13	179	63.69	Unknown
111.5	117 544	118 374	+	276	NP	—	NP	—	NP	—	NP	—	NP	—	Similar to ORF 112
112	118 466	119 299	+	277	297	39.10	286	37.37	288	38.21	289	38.46	283	40.64	Chemokine-binding protein
112.5	119 426	120 304	+	292	NP	—	NP	—	NP	—	NP	—	NP	—	Similar to ORF 112
113	120 409	121 125	+	238	199	45.85	211	37.91	200	43.93	210	38.54	214	44.51	Unknown
114	121 171	122 178	+	335	331	69.20	346	61.38	344	62.07	344	61.38	344	62.07	Unknown
115	122 273	122 710	+	145	132	29.37	143	29.63	149	29.76	146	29.76	146	32.14	Unknown
116	122 843	123 328	+	Unclear\$	258	—	234	—	206	—	NP	—	240	—	Unknown
117	123 556	124 374	+	272	264	44.34	265	41.62	265	41.62	NP	—	265	39.39	GM-CSF/IL-2 inhibition factor-like protein
118	NP	NP	+	NP	NP	—	119	—	102	—	NP	—	NP	—	Unknown
119	NP	NP	+	NP	116	—	204	—	206	—	NP	—	NP	—	Unknown
120	124 044	124 619	+	191	140	39.71	199	45.00	194	32.00	NP	—	NP	—	Unknown
121	124 732	125 727	+	331	269	33.53	300	36.26	302	37.56	NP	—	158	—	Unknown
122	125 809	126 783	+	324	322	59.38	323	54.43	323	53.54	264	54.88	322	54.10	Unknown
123	126 982	128 697	+	571	517	65.31	525	61.18	525	59.55	540	58.54	539	58.82	Ankyrin/F-box protein
124	128 778	130 391	+	537	506	62.72	532	59.95	532	59.68	542	59.46	548	60.27	Unknown

Table 2. cont.

ORF	HL953		BPSV AR02		ORFV IA82		ORFV SA00		PCPV F00.120R		PCPV VR634		Predicted function
	Nucleotide position	Orientation	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	Length (aa)	% ID*	
	Start	End											
125	130534	131052	+	172	177	58.64	173	60.24	173	58.43	173	58.43	Apoptosis inhibitor
126	131188	132708	+	506	506	56.33	497	61.93	502	62.04	502	61.63	Ankyrin/F-box protein
127	132854	133396	+	180	185	68.12	186	66.21	184	66.90	NP	—	IL-10
128	NP	NP	+	NP	517	—	508	—	501	—	503	—	Ankyrin/F-box protein
129	133527	135065	+	512	515	60.31	520	56.87	516	56.84	517	57.23	Ankyrin/F-box protein
129.5	135236	136792	+	518	NP	—	NP	—	NP	—	NP	—	Ankyrin/F-box protein
130	136868	138382	+	504	479	85.47	498	82.11	498	82.53	498	84.85	Protein kinase
131	138360	139046	+	228	224	74.01	225	77.40	226	77.65	229	77.97	Membrane protein
132	139142	139588	+	148	LT‡ (006)	37.25	137	41.07	149	49.61	152	45.32	VEGF
132.5	?	?	+	Unclear\$	NP	—	LT‡ (002)	—	LT‡ (002)	—	119	—	Unknown
133	?	?	+	Unclear\$	149	—	NP	—	NP	—	NP	—	Unknown
134	?	?	+	Unclear\$	147	—	149	—	150	—	150	—	Unknown

NP, Not present.

*% ID, percent amino acid identity.

†RT, right terminal genomic region.

‡LT, left terminal genomic region.

\$Unclear, ambiguous mapping results/region could not be resolved.

S. Friederichs and others

HL953	MRL--IQCSVLILCLIQIHWIYASS----GGSSNSGGSLADWMQTSKSKMPRDT
PVNZ_256/08	
PVNZ_348/08	N.....
PVNZ_168/09	V.....N.....
PVNZ_RD86	N.....
BPSV_AR02	.KC.IVCM.W.LA.L...QCVK.MQ.AP-----T...GNHEVEK.SDVY.N.R.Q.MK.
ORFV_SA00	.K.TAT-.VV.A.LI.MYNLPKCVS-----QDND.PP.TN..VR.L...G.R....
ORFV_IA82	.K.VG----ILVAV..H--QYLLNAD-----S.T-----KR.SEVLKG.E.R..PI
ORFV_NZ2	.K.VG----ILVAV..H--QYLLNAD-----SNT-----KG.SEVLKG.E.K..PI
ORFV_B029	.K.VG----ILVAV..H--QYLLNAD-----S.T-----KK.PEVLKG.E.K..PI
PCPV_VR634	.K.ITT-L.FA.A.LI.MYNLPECFSG.TGGSSS.G.S.AS..SS.LD..E..S.K....
PCPV_F00.120R	.K.ITT-L.VA.A.LI.MYNLPECLSG.TGGSS..G.S.AS..SS.LE.TER.R.KL..V
HL953	VVYIGNEYPGSVGERYNPCVTVKRCGGCCGGDNKVCSTSTETANTTVMVMTAVSSSSG-
PVNZ_256/08	K.....N.....G.....-
PVNZ_348/08	K.....N.....G.....-
PVNZ_168/09	K.....N.....G.....-
PVNZ_RD86	K.....N.....G.....-
BPSV_AR02	P.KVSD...DNTND.HS.P...LM.....NDESLE.VP...S.V.MQI.T.SAYNDG.-
ORFV_SA00	...L.D...ENTNLQ...R.....S...N.EGQI..AV..R...V.S.S.....-
ORFV_IA82	..PVSETH.ELTSQ.F..P...LM.....NDESLE.VP..E..V.MEF.GVG.-----
ORFV_NZ2	..PVSETH.ELTSQ.F..P...LM.....NDESLE.VP..EV.V.MELLGA-----
ORFV_B029	..PVSEAH.ELTSQ.F..P...M.....NDESLE.VP..EV.V.MELLGA-----
PCPV_VR634	..QLIS...D.EQ...R...R.....NDESQI..AI...V...L.G.....-
PCPV_F00.120R	..DLSS.LTNDISK-...TV...S...S.SQI..AI..K...I...K.K.T.TG.E
HL953	-----NGASSNFRDISMSDEKKCECREKFTTTP---PPTTMPPR-----
PVNZ_256/08	-----I.....T.....
PVNZ_348/08	-----I.....T.....
PVNZ_168/09	-----I.....T.....
PVNZ_RD86	-----I.....T.....
BPSV_AR02	-----TSG.I..GM.EM.FLQHN...P.S.PP.---ET.EESH.....
ORFV_SA00	-----ANS.V.N.LQR..LT.HT..D.IGR---T--PP.T..RE.....
ORFV_IA82	-----SST.S.VSTQHLEFV.HT..D.QPRGGQQ-----T.PT...RRRAY
ORFV_NZ2	-----SGS.SN-GMQRL.FV.H..D..PR.....T..R...RR---
ORFV_B029	-----SGS.SN-GMQRL.FI.H..D..PR.....T..R...RR---
PCPV_VR634	-----GST..T...QT..VE.HT..K.EFQ--S--PTTT..KE.....
PCPV_F00.120R	TGSGGETGSG.V...HTVVVT.HT...P.D..S.TSPT.TSND.....

Fig. 1. Amino acid alignment of the vVEGF sequences of twelve PPVs. GenBank accession numbers for vVEGF reference sequences: PVNZ 256/08, ADQ42314.1; PVNZ 168/09, ADQ42313.1; PVNZ 348/09, ADQ42315.1; PVNZ RD86, ABI96953.1; BPSV AR02, AAR98363.1; ORFV SA00, AAR98357.1; ORFV IA82, AAR98227.1; ORFV NZ2, ABA00650.1; ORFV B029, AHJ34315.1; PCPV VR634, ADC54031.1; PCPV F00.120R, ADC53897.1. PPVs originating from red deer are shown in bold. Dots indicate identical and lines indicate missing aas in comparison with the leader sequence given by HL953. Amino acid residues that are identical in all species are highlighted in grey. Alignment was performed with CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

Restriction endonuclease digestion of DNA. The fragments of *KpnI* restriction endonuclease digestion of HL953 DNA flanked by the DNA fragment patterns of ORFV Orf11 and D1701-B, BPSV V660 and PCPV B021 are shown in Fig. 3. Fragment patterns obtained from HL953 DNA obviously do not resemble any of the patterns generated by *KpnI* treatment of DNA from ORFV, BPSV or PCPV. Thus, the genetic distance of HL953 from other PPV species is additionally supported by RFLP generated by an enzyme that yields a high number of fragments owing to its GC-rich palindrome.

Reactivity of monoclonal antibodies against Orf virus with HL953. Testing of six PPV-specific mAbs in immune-peroxidase staining of HL953-infected cells revealed reactivity for mAbs 1D9, 8D7 and 10E6, whereas no reactivity was detected with mAbs 2E5, 6E8 and 11D7

(Housawi *et al.*, 1998). Table 3 provides an overview of the reactivity of the mAbs tested with various PPVs in this study compared with previous results from Housawi *et al.* (1998). According to the reactivity of HL953 with the indicated mAbs in infected permissive cells, a relationship to the BPSV representative V660 is more likely than to ORFV and PCPV.

Western blotting. Western blot experiments were performed using PPVs of every species purified from infected bovine oesophagus (KOP) cell supernatants. Initially, mAb 6E8 was tested against PPV proteins of ORFV D1701-A, PCPV B021, BPSV V660 and PPV HL953. Monoclonal antibody 6E8 recognized a protein of about 39 kDa in D1701-A and B021, but it failed to detect any virus protein in V660 and HL953 (Fig. S1, available in the online Supplementary Material).

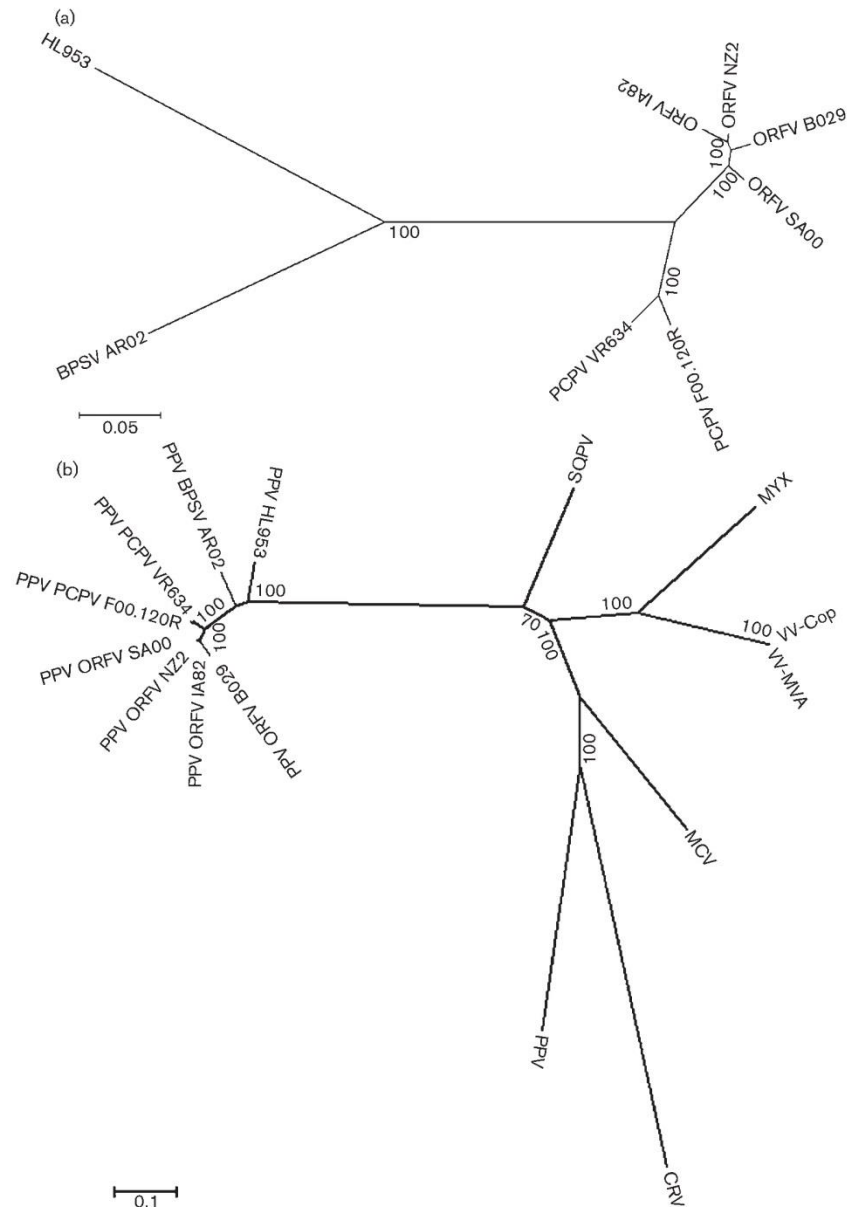


Fig. 2. Phylogenetic tree reconstructed from (a) concatenated aa sequences of 125 proteins of PPV HL953 (KM502564), ORFV (IA82, AY38626; SA00, AY386264.1; NZ2, DQ184476; B029, KF837136), PCPV (F00.120R, GQ329669; VR634, GQ329670.1) and BPSV (AR02, AY386265.1) and (b) concatenated aa sequences of 16 conserved poxvirus proteins of PPV HL953, ORFV IA82, SA00, NZ2 and B029, PCPV F00.120R and VR634, BPSV AR02 and other poxviruses: crocodilepox virus (CRV, DQ356948), fowlpox virus (FPV, AF198100), molluscum contagiosum virus (MCV, U60315), myxoma virus (MYX, AF170726), squirrelpox virus (SQPV, HE601899), vaccinia virus Copenhagen (VV-Cop, M35027) and modified vaccinia virus Ankara (VV-MVA, U94848). Numbers on the branches indicate percentage bootstrap support calculated for 100 replicates. The scale bar corresponds to 0.05 (a) or 0.1 (b) aa substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) using the maximum-likelihood method based on the JTT matrix-based model.

S. Friederichs and others

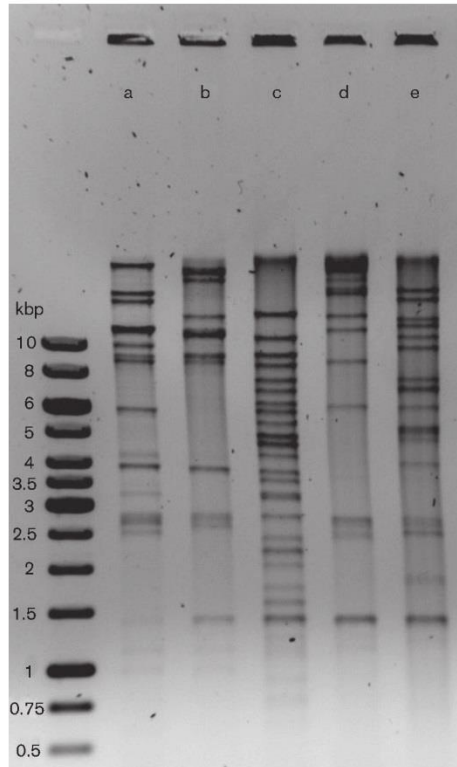


Fig. 3. Restriction fragments after *KpnI* DNA cleavage of ORFV Orf11 (lane a), D1701-B (lane b), BPSV V660 (lane c), PCPV B021 (lane d) and PPV HL953 (lane e).

When using serum from an Orf virus-hyper-immunized rabbit, prominent protein bands at ~39–40, ~56 and ~60 kDa were marked in all samples. It is well known though, that reactivity of polyclonal serum Abs with proteins of different PPV species cannot be used for virus species differentiation. Thus, the protein-marking pattern of HL953 with rabbit serum antibodies also did not show a species-differentiating reactivity. Negative control sera from two non-infected rabbits did not show a detectable reaction (Fig. S2).

DISCUSSION

In this study we present next generation sequencing data and further molecular and serological analyses of a European red deer PPV isolate from Germany.

To date, only one PPV found in red deer (RD86) has been isolated in cell culture (Robinson & Mercer, 1995). However, only virus propagation in cell culture allows production and purification of sufficient PPV as well as high quality DNA thereof. The successful isolation of PPV

HL953 from the tonsil swab of a red deer allowed the extracted viral DNA to be used for next generation sequencing and enabled us to gain a genome-wide insight into the molecular features of the analysed DNA. On the other hand, cell culture passages and adaptation of PPV to growth in cell lines can lead to substantial changes in the genome, as shown for the highly attenuated ORFV strain D1701-B (Cottone *et al.*, 1998). Recently, it was demonstrated that after seven cell culture passages larger deletions within the PPV genome can have already occurred (Hautaniemi *et al.*, 2011). Based on this information, virus passages for the present study were limited to a maximum of five.

The HL953 genome sequence revealed typical PPV genome features. At the same time, electron microscopic examination showed characteristic PPV particles displaying the distinct ‘ball of wool’ morphology. Thus, HL953 can conclusively be assigned to the genus *Parapoxvirus*. The fact that about a quarter of all HL953 ORFs were found to be larger than the corresponding ORFs in the reference PPV genome sequences may be indicative of the plasticity of PPV genomes. The most striking difference in size was found for HL953 ORF 007 (dUTPase). A literature search revealed that even other large DNA viruses, like herpesviruses, are not equipped with a dUTPase of this size (e.g. Epstein–Barr virus type 2 dUTPase: 278 aa). The unusual size of ORF 007 in the HL953 genome sequence is the result of a missing stop codon, possibly due to a reading-frame shift mutation. While the initial part of ORF 007 shows homologies to other dUTPase genes, no homologies – on the nucleotide or aa level – to parapoxvirus genes can be found for the remaining two-thirds of ORF 007. For this reason, however, it must be expected that HL953 does not encode a functional dUTPase.

So far only a limited amount of (partial) sequence information for single genes of PPV from red deer or PVNZ is available for comparison. Concerning virulence genes, the vVEGF gene sequences of four PPVs originating from red deer are available: PVNZ RD86 from New Zealand (Robinson & Mercer, 1995) and PVNZ 256/08, 348/08 and 168/09 from Italy (Scagliarini *et al.*, 2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a specific proliferation-promoting protein that acts on endothelial cells. In PPVs it is assumed to be an orthologue of the mammalian VEGF-A (=VEGF) and has been detected in all established species of the *Parapoxvirus* (Delhon *et al.*, 2004; Lytle *et al.*, 1994; Mercer *et al.*, 2006; Ueda *et al.*, 2003, 2007). A remarkable feature of the vVEGF is the exceptional high sequence variation at the inter- and intra-species level. For example, the vVEGF sequences of IA82 and SA00, isolates of the same species (ORFV), share as little as 38% aa identity (Delhon *et al.*, 2004). Extraordinarily high sequence homologies between HL953 and the four PVNZ vVEGF sequences deposited in GenBank, however, indicate that HL953 and the PVNZ strains from New Zealand and Italy are members of the same species. Even though comparative whole-genome sequence

Table 3. Reactivity of six monoclonal antibodies generated against ORFV with proteins of different PPV species. Results from this study are highlighted in grey; all other results originate from Housawi *et al.* (1998)

mAb	BPSV		ORFV						Human PPV (ORFV)	Human PPV (PCPV)	Red deer PPV	Seal PPV	Squirrel PPV
	V660	B177	D1701-A	D1701-B	B015	NZ2	Orf 11	B029	B074	HL953			
1D9	+	NT	+	+	NT	+	+	NT	+	+	—	—	—
2E5	—	NT	NT	+	NT	+	+	NT	+	—	—	—	—
6E8	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
8D7	+	NT	NT	+	NT	+	+	NT	+	+	+	—	—
10E6	+	NT	NT	+	NT	+	+	NT	+	+	+	—	—
11D7	+	NT	NT	+	NT	+	+	NT	+	—	—	—	—

NT, Not tested.

*Negative result in Housawi *et al.* (1998).

analyses are required to ultimately confirm this presumption, we were able to show by a phylogenetic analysis based on 125 genes that HL953 is to be allocated to a species separate from ORFV, BPSV and PCPV. This is further confirmed by the results from RFLP analysis with *KpnI*. Reactivity of HL953 proteins with PPV-specific mAbs points to a closer relationship between HL953 and BPSV (Table 3), as is also indicated by the phylogenetic analysis (Fig. 2). It can be concluded that PPV of red deer in fact forms a unique species within the PPV genus and that HL953 is a representative of this species. The extraordinary length of ORFs in the HL953 genome will be the subject of further research.

Out of 1764 tonsil swabs from hunted Alpine red deer, 14 (0.79 %) tested positive for PPV genome presence by PCR. Affected animals appeared to be healthy and did not show any lesions on their muzzle, head or antlers. This is in contrast to previous reports on diseased red deer showing mild to severe lesions or that even involved fatal clinical outcomes (Horner *et al.*, 1987; Robinson & Mercer, 1995; Scagliarini *et al.*, 2011). By demonstrating the presence of PPV in tonsil swabs of red deer without any clinical signs, the subclinical persistence of PPV in red deer became evident. Virus persistence has already been assumed for BPSV, where typical BPSV lesions were detected in two formerly symptom-free calves 4 weeks after they had been brought to an A3 facility (Dal Pozzo *et al.*, 2011). It can be hypothesized that persistent PPV infections (in wild ruminants and other hosts) with periodical virus shedding and lesion manifestation facilitate virus survival and spread under promoting conditions.

It has not yet been clarified if natural transmission of PVNZ to domestic animals is possible, but inoculation of the virus into ORFV-susceptible sheep led to the formation of mild lesions (Robinson & Mercer, 1995). In the Alpine regions, cattle summer pastures are commonly co-inhabited by red deer, allowing for virus transmission from wild to domestic ruminants. Wild ruminants like reindeer, musk oxen and chamois have already been proven to be an

animal source of PPV infection in humans (Falk, 1978; Kitchen *et al.*, 2014). The transmission of PPVs from cervids to humans has been reported for white-tailed deer and other deer species (Kuhl *et al.*, 2003; Roess *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 1991). None of these cases, however, involved the presence of PVNZ; the transmitted virus was found to be ORFV or PCPV. Although zoonotic human infection with PVNZ or related red deer PPV has yet to be demonstrated, virus transmission to humans, e.g. to hunters handling deer carcasses, should be considered a potential risk.

METHODS

Parapoxviruses used in this study. The origin and features of all PPVs included in this study are presented in Table S1. Reference sequences of AR02, F00.120R, VR634, SA00, IA82 and NZ2 for sequence and phylogenetic analyses were obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Sample collection. In the years 2011–2014, a large-scale tuberculosis-monitoring programme was executed in hunted red deer in the Bavarian Alps. Swabs (Sigma-Transwab; Medical Wire & Equipment) were taken by pathologists from tonsils of 1764 hunted animals without clinical or macroscopic visible pathological signs at the time of inspection. In the context of red deer tuberculosis monitoring, swabs were sent to the laboratory of the Bavarian Health and Food Safety Authority for further analysis and were stored at -80°C when not processed immediately for DNA extraction.

DNA extraction. After an incubation time of 1 h in 500 μl medium (PBS with Ca and Mg, 1 % Gibco antibiotic-antimycotic, 2 % Fungizone antimycotic and 0.3 % gentamicin), swabs were squeezed out and 50 μl of the resulting suspension was subsequently used for pooled DNA extraction (each pool comprising four samples) with a DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

PCR

Pox high-GC-PCR and pan-PPV-PCR. The presence of poxviral and parapoxviral DNA respectively was verified by two PCR assays.

S. Friederichs and others

Pooled samples ($n=4$) were screened for PPV genome presence by a pan-PPV real-time PCR, targeting a 95 bp fragment of the B2L gene (Nitsche *et al.*, 2006). If tested positive for PPV genome presence, the relevant pool was resolved by using each sample separately as a template in a second pan-PPV-PCR run.

Extracted DNA of swabs yielding a positive result in the pan-PPV-PCR was subsequently analysed by the pox high-GC PCR assay, which was designed to amplify high-GC content poxviruses (Li *et al.*, 2010).

Verification of potential tuberculosis co-infections. In order to clarify a potential co-occurrence of PPV and mycobacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, extracted DNA was additionally tested for the presence of mycobacterial DNA following a protocol of the National Veterinary Reference Laboratory for Tuberculosis (Federal Research Institute for Animal Health, Jena, Germany) (Federal Research Institute for Animal Health, 2014).

PPV isolate HL953. PPV HL953 was isolated from a tonsil swab of a red deer calf (*Cervus elaphus*) hunted in Oberallgäu, Bavaria, Germany in January 2013. The animal was apparently healthy and PPV lesions could not be observed.

Propagation in cell culture. Virus-containing medium (see above: DNA extraction), free of bacterial contamination, was inoculated in primary BVDV- and mycoplasma-free KOP cells (cell culture collection, Friedrich-Loeffler-Institute, Riems, Germany). When cytopathic effects became visible under the light microscope, the infected cell cultures were incubated for 7 days until complete cell destruction had occurred. Once virus isolation had succeeded, cell culture passages were continued up to a maximum of five.

Virus concentration and viral DNA extraction. The debris-cleared supernatants of infected cell cultures showing complete cytopathic effects were ultracentrifuged at 50 000 *g* for 2.5 h in an Optima L90K centrifuge (Beckmann Coulter). The supernatant was checked for PPV particles by transmission electron microscopy (JEM-1400; JEOL), using negative staining with 1% aqueous uranyl acetate.

Viral DNA was subsequently extracted from 2 ml of resuspended pellet of the fifth cell culture passage virus using a Puregene Blood Core kit A (Qiagen) as specified by the manufacturer.

Next generation sequencing. Whole-genome sequencing libraries were prepared as small insert (300–700 bp) paired-end libraries and as long-jumping mate-pair libraries (insert sizes from 1.5 to 8 kb). The paired-end libraries were prepared from 1 ng genomic DNA by a tagmentation method (NexteraXT library prep kit; Illumina) following the manufacturer's protocol. The bar-coded library was sequenced on a fraction of a 2 × 250 bp MiSeq Run, yielding approximately 250 000 read pairs. Long-jumping mate-pair libraries were prepared from 1 ng genomic DNA using the Nextera Mate-pair kit from Illumina. Briefly, large adaptor-ligated fragments were generated by tagmentation, circularized, exonuclease-digested to enrich for circularized DNA, sonicated to small fragments and then adaptor-ligated and amplified to obtain the finalized library. The bar-coded library was sequenced on a fraction of a 2 × 150 bp Rapid Run on a HiSeq1500 yielding approximately four Mio pairs containing the junction adaptor. Paired-end and mate-pair reads were assembled with VELVET by running the VelvetOptimizer routine in Galaxy (Goecks *et al.*, 2010). The contigs were aligned to related PPV genomes to identify possible gaps. From the borders of putative gaps, primer sequences were derived and gap-spanning PCR products were generated. Sanger sequences from these amplicons were used for manual gap-closing.

The assembled genome sequence of HL953 has been deposited in GenBank under accession no. KM502564.

Sequence analysis. Illumina read pairs and the Sanger sequences were aligned to the draft genome of HL953 with BWA (Li & Durbin, 2009) and inspected on the Integrative Genomic Viewer, a high-performance visualization tool for interactive exploration of large, integrated genomic datasets (Robinson *et al.*, 2011).

The Genome Annotation Transfer Utility (GATU) (Tcherepanov *et al.*, 2006) was used to identify and determine ORFs putatively encoding genes within the HL953 genome. Potential ORFs not covered by GATU were manually checked by using BLASTP, provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

VEGF gene sequences of different PPV species available through GenBank and of HL953 were aligned at both nt and aa levels with CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

Phylogenetic analysis. Predicted protein sequences of HL953 and protein sequence data of representatives of ORFV, BPSV and PCPV were used to determine phylogenetic relationships within the PPV genus. For this purpose, a maximum-likelihood tree was reconstructed based on concatenated data of those proteins present in all analysed PPV genomes, namely ORF 009–115 (excluding ORF 073.5), ORF 122–126 and ORF 129–132/006. Analyses were performed with MEGA 6.0 software (Tamura *et al.*, 2013), using the Jones–Taylor–Thornton model for aa substitutions. The result was verified by bootstrap analysis of 100 replicates.

To visualize the relationship of HL953 to other poxviruses, an additional phylogenetic analysis, using 16 conserved poxvirus proteins, was conducted. This set of proteins has already been used by Gubser *et al.* (2004) to compare chordopoxviruses and includes important proteins of the transcription and replication machinery and structural components: vaccinia virus Copenhagen E9L, E9L, I7L, I8R, G9R, J3R, J6R, H2R, H4L, H6R, D1R, D5R, D6R, D13L, A16L and A24R (D11L could not be identified in the squirrelpox virus and thus was not included in the analysis). Poxviruses selected for this analysis were crocodilepox virus, fowlpox virus, molluscum contagiosum virus, myxoma virus, squirrelpox virus, vaccinia virus Copenhagen and modified vaccinia virus Ankara. The maximum-likelihood tree was generated as described above.

Restriction endonuclease digestion of DNA. One microgram of DNA of HL953 and at least one member of every other PPV species (Orf 11 and D1701-B (ORFV), V660 (BPSV) and B021 (PCPV)) was used for comparative restriction endonuclease digestion with *KpnI* (Thermo Fisher Scientific). Restriction enzyme cleavage was performed according to the instructions of the manufacturer, and the resulting DNA restriction fragments were separated by agarose gel electrophoresis on an ethidium bromide-stained 0.5% agarose gel for 3 h at 60 V.

Reactivity of monoclonal antibodies against Orf virus with HL953. A set of six mouse mAbs (kindly provided by Peter Nettleton, Moredun Research Institute, Edinburgh, UK) was tested for its reactivity with HL953: 1D9, 2E5, 6E8, 8D7, 10E6 and 11D7 (Housawi *et al.*, 1998). Monoclonal antibody 6E8 was also tested with BPSV V660 and B177, ORFV D1701, B015 and B029, and the reactivity of mAb 1D9 with D1701 and of mAbs 8D7 and 11D7 with V660 was determined.

For the indirect immunoperoxidase assay, KOP cells were simultaneously inoculated with PPV (100 µl per well) in a 6-well plate and incubated for 3–4 days (37 °C, 5% CO₂) until cytopathic effect was visible. After discarding the cell supernatants and washing [washing solution (ws) I] the cell culture plate three times, cells were fixed in ethanol/methanol (3:1) for 20 min at 4 °C. The plate was washed (ws I) again. The relevant mouse monoclonal antibody (1:500 in PBS with 2% horse serum) was applied, followed by an incubation of 1 h

at 37 °C in a humidity chamber and washing (ws II) of the plate (three times). This procedure was repeated using a horseradish-labelled rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) (1:500) as secondary antibody. The cells in the plates were covered with the substrate (Vector VIP substrate; Vector Laboratories), incubated for 15–20 min in the dark at room temperature, washed (ws I), and examined under a light microscope (CKX41; Olympus). All washing steps were conducted with ws I [Aqua bidest : ws II (2:1)] or ws II (PBS with 0.1 % Tween 20).

Western blotting. PPVs for Western blot analysis (HL953, D1701-A, B021, V660) were grown in KOP cells up to a maximum of five passages and subsequently purified by ultracentrifugation through a sucrose cushion. Protein quantification was carried out with the BCA Protein Macro Assay kit (SERVA Electrophoresis), a bicinchoninic acid-based protein assay method. Viral proteins (5–6 µg) were resolved by SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions using a 12 % NuPage Novex Bistris Mini Gel of the NuPAGE electrophoresis system (Life Technologies, Invitrogen). Proteins were transferred to a 0.45 µm polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane with a Pierce Fast-Semi-Dry Blotter (Pierce Biotechnology) and the PVDF membrane was subsequently blocked overnight with Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween 20, 20 % FBS and 2 % BSA. Monoclonal antibody 6E8 (Santa Cruz Biotechnology), which has been shown to react with the 39 kDa immunodominant envelope protein in ORFV (Housawi *et al.*, 1998), and serum from an ORFV hyper-immunized rabbit (kindly provided by C.-P. Czerny, Faculty of Agricultural Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Georg-August University, Göttingen, Germany) were used as primary antibodies. Membranes were finally probed with horseradish-labelled rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or goat anti-rabbit IgG (Promega) followed by ECL chemiluminescent substrate (Life Technologies, Invitrogen). The resulting protein bands of the blots were visualized with a Fusion FX Imaging System (Vilber Lourmat).

ACKNOWLEDGEMENTS

Parts of this project were funded by the Bavarian State Ministry of the Environment and Consumer Protection (grant no. 11–39). We thank S. Gellert for excellent technical support and M. Müller for qualified pathological examination and sampling of tonsil swabs from hunted red deer.

REFERENCES

- Abu Elzein, E. M. & Housawi, F. M. (1997). Severe long-lasting contagious ecthyma infection in a goat's kid. *Zentralbl Veterinarmed B* **44**, 561–564.
- Becher, P., König, M., Müller, G., Siebert, U. & Thiel, H.-J. (2002). Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses. *Arch Virol* **147**, 1133–1140.
- Cottone, R., Büttner, M., Bauer, B., Henkel, M., Hettich, E. & Rziha, H. J. (1998). Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Res* **56**, 53–67.
- Cottone, R., Büttner, M., McInnes, C. J., Wood, A. R. & Rziha, H.-J. (2002). Orf virus encodes a functional dUTPase gene. *J Gen Virol* **83**, 1043–1048.
- Dal Pozzo, F., Martinelle, L., Gallina, L., Mast, J., Sarradin, P., Thiry, E., Scagliarini, A., Büttner, M. & Saegerman, C. (2011). Original findings associated with two cases of bovine papular stomatitis. *J Clin Microbiol* **49**, 4397–4400.
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., de la Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H. D., Piccone, M. E., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2004). Genomes of the parapoxviruses Orf virus and bovine papular stomatitis virus. *J Virol* **78**, 168–177.
- Falk, E. S. (1978). Parapoxvirus infections of reindeer and musk ox associated with unusual human infections. *Br J Dermatol* **99**, 647–654.
- Federal Research Institute for Animal Health (2014). Official collection of methods for the sampling and investigation of materials of animal origin for notifiable animal diseases. *Method Collection* **2014**, 438–458.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J. & Galaxy Team (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* **11**, R86.
- Gubser, C., Hué, S., Kellam, P. & Smith, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* **85**, 105–117.
- Guo, J., Zhang, Z., Edwards, J. F., Ermel, R. W., Taylor, C., Jr & de la Concha-Bermejillo, A. (2003). Characterization of a North American orf virus isolated from a goat with persistent, proliferative dermatitis. *Virus Res* **93**, 169–179.
- Hautaniemi, M., Ueda, N., Tuimala, J., Mercer, A. A., Lahdenperä, J. & McInnes, C. J. (2010). The genome of pseudocowpoxvirus: comparison of a reindeer isolate and a reference strain. *J Gen Virol* **91**, 1560–1576.
- Hautaniemi, M., Vaccari, F., Scagliarini, A., Laaksonen, S., Huovilainen, A. & McInnes, C. J. (2011). Analysis of deletion within the reindeer pseudocowpoxvirus genome. *Virus Res* **160**, 326–332.
- Hicks, B. D. & Worthy, G. A. (1987). Sealpox in captive grey seals (*Halichoerus grypus*) and their handlers. *J Wildl Dis* **23**, 1–6.
- Horner, G. W., Robinson, A. J., Hunter, R., Cox, B. T. & Smith, R. (1987). Parapoxvirus infections in New Zealand farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J* **35**, 41–45.
- Housawi, F. M., Roberts, G. M., Gilray, J. A., Pow, I., Reid, H. W., Nettleton, P. F., Sumption, K. J., Hibma, M. H. & Mercer, A. A. (1998). The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein. *Arch Virol* **143**, 2289–2303.
- Inoshima, Y., Nakane, T. & Sentsui, H. (2009). Severe dermatitis on cattle teats caused by bovine papular stomatitis virus. *Vet Rec* **164**, 311–312.
- Kitchen, M., Müller, H., Zobl, A., Windisch, A., Romani, N. & Huemer, H. (2014). Orf virus infection in a hunter in Western Austria, presumably transmitted by game. *Acta Derm Venereol* **94**, 212–214.
- Kuhl, J. T., Huerter, C. J. & Hashish, H. (2003). A case of human Orf contracted from a deer. *Cutis* **71**, 288–290.
- Leonard, D., Otter, A., Everest, D., Wood, A., McInnes, C. & Schock, A. (2009). Unusual bovine papular stomatitis virus infection in a British dairy cow. *Vet Rec* **164**, 65.
- Li, H. & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760.
- Li, Y., Meyer, H., Zhao, H. & Damon, I. K. (2010). GC content-based pan-pox universal PCR assays for poxvirus detection. *J Clin Microbiol* **48**, 268–276.
- Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A. & Robinson, A. J. (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus Orf virus. *J Virol* **68**, 84–92.
- Mercer, A. A., Ueda, N., Friederichs, S.-M., Hofmann, K., Fraser, K. M., Bateman, T. & Fleming, S. B. (2006). Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus Res* **116**, 146–158.
- Nitsche, A., Büttner, M., Wilhelm, S., Pauli, G. & Meyer, H. (2006). Real-time PCR detection of parapoxvirus DNA. *Clin Chem* **52**, 316–319.

S. Friederichs and others

- Robinson, A. J. & Mercer, A. A. (1995). Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus. *Virology* **208**, 812–815.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**, 24–26.
- Roess, A. A., Galan, A., Kitces, E., Li, Y., Zhao, H., Paddock, C. D., Adem, P., Goldsmith, C. S., Miller, D. & other authors (2010). Novel deer-associated parapoxvirus infection in deer hunters. *N Engl J Med* **363**, 2621–2627.
- Roess, A. A., Levine, R. S., Barth, L., Monroe, B. P., Carroll, D. S., Damon, I. K. & Reynolds, M. G. (2011). Sealpox virus in marine mammal rehabilitation facilities, North America, 2007–2009. *Emerg Infect Dis* **17**.
- Roess, A. A., McCollum, A. M., Gruszynski, K., Zhao, H., Davidson, W., Lafon, N., Engelmeyer, T., Moyer, B., Godfrey, C. & other authors (2013). Surveillance of parapoxvirus among ruminants in Virginia and Connecticut. *Zoonoses Public Health* **60**, 543–548.
- Rziha, H.-J., Henkel, M., Cottone, R., Bauer, B., Auge, U., Götz, F., Pfaff, E., Röttgen, M., Dehio, C. & Büttner, M. (2000). Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *J Biotechnol* **83**, 137–145.
- Scagliarini, A., Vaccari, F., Turrini, F., Bianchi, A., Cordioli, P. & Lavazza, A. (2011). Parapoxvirus infections of red deer, Italy. *Emerg Infect Dis* **17**, 684–687.
- Smith, K. J., Skelton, H. G., III, James, W. D. & Lupton, G. P. (1991). Parapoxvirus infections acquired after exposure to wildlife. *Arch Dermatol* **127**, 79–82.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- Tcherepanov, V., Ehlers, A. & Upton, C. (2006). Genome Annotation Transfer Utility (GATU): rapid annotation of viral genomes using a closely related reference genome. *BMC Genomics* **7**, 150.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Tikkanen, M. K., McInnes, C. J., Mercer, A. A., Büttner, M., Tuimala, J., Hirvelä-Koski, V., Neuvonen, E. & Huovilainen, A. (2004). Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox virus. *J Gen Virol* **85**, 1413–1418.
- Tryland, M., Klein, J., Nordøy, E. S. & Blix, A. S. (2005). Isolation and partial characterization of a parapoxvirus isolated from a skin lesion of a Weddell seal. *Virus Res* **108**, 83–87.
- Ueda, N., Wise, L. M., Stacker, S. A., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2003). Pseudocowpox virus encodes a homolog of vascular endothelial growth factor. *Virology* **305**, 298–309.
- Ueda, N., Inder, M. K., Wise, L. M., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2007). Parapoxvirus of red deer in New Zealand encodes a variant of viral vascular endothelial growth factor. *Virus Res* **124**, 50–58.
- Upton, C., Slack, S., Hunter, A. L., Ehlers, A. & Roper, R. L. (2003). Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *J Virol* **77**, 7590–7600.

IV DISKUSSION

1 Parapockenvirus-Nachweis mittels Pan-Parapockenvirus-PCR

1.1. Detektion unterschiedlicher Parapockenviruspezies

Als besonders nützlich zur schnellen und hochsensitiven Detektion aller Parapockenviruspezies hat sich die Pan-Parapockenvirus real-time-PCR nach Nitsche *et al.* (2005) erwiesen. Sie war in der Lage nicht nur ORFV, PCPV und BPSV sondern auch PVNZ zuverlässig nachzuweisen und kam aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität auch zum Probenscreening der 1764 Tonsillentupfer vom Rotwild zum Einsatz (Publikation 2). Da allerdings nur ein sehr kleines Fragment von 95 bp amplifiziert wird, eignet sie sich nicht für eine weitergehende Charakterisierung der erhaltenen PCR-Produkte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu diesem Zwecke zwei konventionelle Pan-Parapockenvirus-PCR-Protokolle entwickelt. Bei der Auswahl einer geeigneter Zielsequenz wurde hierbei Folgendes beachtet: der zu amplifizierende Genort sollte einerseits so hoch konserviert sein, dass alle Vertreter des Genus erfasst werden, andererseits aber gleichzeitig über eine ausreichende Heterogenität verfügen, sodass eine anschließende phylogenetische Analyse der DNA-Fragmente eine klare Speziesdifferenzierung erlaubt. Dazu wurde zunächst das „Standard-Gen“ (B2L-Gen) der Parapockenvirus-Diagnostik gewählt, welches ein Ortholog des VACV-Copenhagen-Gens F13L ist. Genprodukt des B2L-Gens ist das Haupthüll-Protein p42K, das bei allen Parapockenviren ein potentes Antigen ist und im Wirtsorganismus zu einer starken Antikörper-Antwort führt (Sullivan *et al.*, 1994). Von dem insgesamt 1137 bp großen ORF werden i. d. R. mit Hilfe des PCR-Protokolls nach Inoshima *et al.* (2000) nur 554 bp amplifiziert. Da es sich jedoch um ein hoch konserviertes Gen handelt (vgl. Publikation 1), sollte der Mangel an Heterogenität durch eine Erweiterung der Zielsequenz ausgeglichen werden (993 bp mit dem PPV011-Primerpaar; Publikation 1). Daneben wurde der ORF 032, Ortholog des VACV Copenhagen Gens I3L, als zweiter PCR-Amplifikationsbereich ausgewählt. Für VACV ist bekannt, dass es sich bei dem I3L kodierten Protein um ein Core-Protein handelt

(Chung *et al.*, 2006), das mit hoher Affinität Einzelstrang-DNA bindet (*ss DNA binding protein*) und bereits in der frühen bzw. intermediären Phase der Infektion exprimiert wird (Rochester & Traktman, 1998). Dementsprechend geht man davon aus, dass es eine entscheidende Rolle im viralen Vermehrungszyklus spielt und möglicherweise auch in die DNA-Replikation und -Reparatur involviert ist (Rochester & Traktman, 1998). Da die mutmaßliche Sequenzvariation dieses Gens zwischen den Parapockenviruspezies höher war, sollte das entsprechende PCR-Protokoll der verbesserten Speziesdifferenzierung dienen.

Es konnte gezeigt werden, dass beide PCR-Protokolle geeignet waren, alle untersuchten Parapockenviren (n = 23) der Spezies ORFV, BPSV und PCPV zu detektieren. Das Virusgenom war darüber hinaus in Proben von Mensch und Wiederkäuer gleich gut nachweisbar.

Im Rahmen der Publikation 1 wurde fast ausschließlich in Zellkultur isoliertes Virusmaterial und daraus extrahierte DNA verwendet. Dies schließt jedoch nicht aus, dass auch direkt aus klinischen Proben (Krusten / Läsionen) gewonnene DNA für die vorgestellten PCR-Ansätze genutzt werden kann. Die bei den PCR-Ansätzen eingesetzte DNA-Menge (*template*) war mit durchschnittlich 3-4 ng nur gering und sollte daher auch ohne vorherige Virusvermehrung aus Probenmaterial gewonnen werden können. Ferner konnte die zur Verfügung gestellte DNA aus den schottischen Proben EDI und C404, die ohne Zellkultur-Isolierung direkt aus den Läsionen gewonnen wurde, problemlos detektiert werden.

1.2. Speziesdifferenzierung mittels phylogenetischer Analyse der DNA aus PCR-Fragmenten

Die Sequenzierung der PCR-Produkte und die anschließende Verwendung ihrer Aminosäure-Sequenz zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume konnte die überlegene Speziesdifferenzierung auf Basis des ORF 032 bestätigen. Die höhere inner- und zwischenartliche Sequenzvariation im ORF 032 führte zu einer differenzierteren Auftrennungsmöglichkeit der untersuchten Parapockenviren (Publikation 1, Fig. 2). Die entwickelten PCR-Protokolle ermöglichen somit zum einen den allgemeinen Nachweis von Parapockenviren, zum anderen kann die Sequenz des ORF 032 allein oder in Kombination mit der entsprechenden B2L-Sequenz des Virus (auch als sog. *concatenated sequence*) im zweiten Schritt dazu genutzt werden, eine

schnelle und zuverlässige Spezieszuordnung durchzuführen. Ob die Verwendung eines nur 554 bp großen Fragments des höher konservierten B2L-Gens allein ebenso valide ist, erscheint demgegenüber zweifelhaft.

Eine genaue Einordnung des Virus in das taxonomische Gefüge ist aus klinischer Sicht weitgehend irrelevant, da die Kenntnis der Virusspezies keine therapeutische Konsequenz hat. Sie ist aber durchaus von wissenschaftlichem Interesse, sodass die vorgestellte Diagnostikmethode zur Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen herangezogen werden kann, beispielsweise zur Aufklärung der ursächlichen Virusspezies einer pustulären Dermatitis in einem (neuen) Wildtierwirt oder zur Nachverfolgung möglicher Übertragungswege zwischen Haus-, Wildwiederkäuern und dem Menschen.

Es ist nicht auszuschließen, dass Simultaninfektionen mit Parapockenviren zum Auftreten von Rekombinanten führen könnten. Solche Rekombinationsereignisse würden jedoch durch die PCRs nicht erfasst bzw. nicht erkennbar, da insgesamt nur ein sehr kleiner genomischer Bereich abgedeckt wird (etwa 1,5 % des Gesamtgenoms). Auch eine eingehende molekulare Charakterisierung der Virusspezies kann letztlich nicht über die Analyse eines oder zweier PCR-Fragmente gelingen, sondern bleibt der Gesamtgenomsequenzierung vorbehalten.

1.3. Molekulare Epidemiologie humaner Parapockenvirusinfektionen

Die Parapockenvirusinfektion des Menschen ist im Allgemeinen nur schlecht charakterisiert. Da Personen mit einem berufsbedingt höheren Risiko in vielen Fällen mit der Erkrankung vertraut sind und daher auch ihren komplikationslosen und selbstlimitierenden Verlauf kennen, unterbleibt ein Arztbesuch häufig. Dies bedingt, dass die Inzidenz humaner Fälle letztlich unbekannt ist, vermutlich aber höher liegt als angenommen (Lederman *et al.*, 2013). Auch wenn medizinischer Rat in Anspruch genommen wird, ist die Anamnese des Patienten oft schon ausschlaggebend, um die Diagnose „*barnyard / farmyard parapoxvirus*“ (Bauernhof-Parapockenviren) zu stellen (Shelley & Shelley, 1983). Dieser Sammelbegriff verdeutlicht, dass eine weitere Differenzierung i. d. R. unterbleibt.

Unter Anwendung des ORF 011- und ORF 032-PCR Protokolls (Publikation 1) konnten acht humane Parapockenvirus-Isolate erfolgreich einer Virusspezies zugeordnet werden.

Ein vorberichtlicher Kontakt des Patienten zu Schafen oder zu Rindern stimmte dabei mit der gefunden Virusspezies, nämlich ORFV ($n = 4$) oder PCPV ($n = 4$), überein. Die phylogenetische Analyse der PCR-Produkte ermöglicht demnach die Rückverfolgung zum virusübertragenden Tier, sofern es sich dabei um einen Hauswiederkäuer handelt und legt die Vermutung nahe, dass Parapockenviren ihre genomische Integrität auch beim Wechsel von einem Wiederkäuer- zu einem humanen Wirt wahren. Dass selbiges auch für BPSV gilt, lassen andere Berichte annehmen (Holmes *et al.*, 2011; MacNeil *et al.*, 2010), konnte in dieser Studie aufgrund fehlender humaner BPSV-Fälle jedoch nicht gezeigt werden.

Auch dann wenn kein Tierkontakt bekannt ist oder das virusübertragende Tier keine direkten Schlüsse auf die Parapockenvirusspezies zulässt, wie z. B. bei der Infektion des Menschen über das Rentier (ORFV oder PCPV) (Hautaniemi *et al.*, 2010; Klein & Tryland, 2005; Tikkanen *et al.*, 2004) oder über andere Wirtstiere, deren Empfänglichkeit für Parapockenviren sich erst überraschend neu zeigt, kann über die Kombination aus PCR und anschließender phylogenetischer Analyse der PCR-Produkte das ätiologische Agens aufgeklärt werden.

Um zu entschlüsseln, inwieweit sich das Virus nach einer Übertragung vom Tier auf den Menschen genomisch verändert oder stabil bleibt, wurde ein korrespondierendes Paar zweier Parapockenvirus-Isolate von Schaf und Mensch mittels vergleichender Gesamtgenomanalyse untersucht. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

2 Gesamtgenomanalyse von Parapockenviren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das DNA-Genom dreier Parapockenvirus-Isolate (B029, B015 und HL953) mittels NGS nahezu vollständig sequenziert und anschließend zusammengesetzt. Einzelne Gene wurden manuell oder mit Hilfe eines Software-Tools (*Genome Annotation Transfer Utility*, GATU) (Tcherepanov *et al.*, 2006) annotiert und konnten so für weiterführende vergleichende Analysen verwendet werden. Die Benennung einzelner Gene erfolgte in Anlehnung an die von Delhon *et al.* (2004) eingeführte Nomenklatur. In der Genbank sind bereits vollständige Genom-Sequenzen der folgenden Virusisolate zu finden: ORFV IA82 (Schaf) und SA00 (Ziege) (Delhon *et al.*, 2004), NZ2 (Schaf) (Mercer *et al.*, 2006) und D1701-B (hoch attenuiert nach

mehreren hundert Zellkulturpassagen) (McGuire *et al.*, 2012), BPSV AR02 (Rind) (Delhon *et al.*, 2004), PCPV VR634 (Mensch nach Übertragung vom Rind) und F00.120R (Rentier) (Hautaniemi *et al.*, 2010). Diese wurden als Referenzsequenzen herangezogen.

Zur Gesamtgenom-Sequenzierung ist eine Virusisolierung und -vermehrung in Zellkultur vorteilhaft, da so DNA in ausreichender Menge und Qualität gewonnen werden kann. Allerdings ist aufgrund der hohen Plastizität des Parapockenvirus-Genoms zu berücksichtigen, dass Mehrfachpassagen in Zellkultur zu beträchtlichen Veränderungen im Genom führen können (Cottone *et al.*, 1998). Hautaniemi *et al.* (2011) konnten zeigen, dass nach nur sieben Passagen bereits größere Deletionen zu beobachten sind. Um dieser Erkenntnis Genüge zu tun, wurde die Zahl der Zellkulturpassagen in der vorliegenden Studie auf ein Maximum von fünf beschränkt.

Dass die Virusisolate B029, B015 und HL953 dem Genus *Parapoxvirus* zuzuordnen sind, wurde zunächst anhand positiver PCR-Ergebnisse in Parapockenvirus-spezifischen-PCRs und des Nachweises typischer Virionen in der Elektronenmikroskopie (vgl. Publikation 1 und 2) gezeigt. Diese Einordnung konnte nach der Gesamtgenomsequenzierung auf DNA-Ebene bestätigt werden: die generierten Sequenzen weisen einen Parapockenvirus-typischen GC-Gehalt von 64 bzw. 65 % auf, verfügen über die 88 konservierten, zentralen Kern-Gene, die allen Mitgliedern der Subfamilie *Chordopoxvirinae* gemeinsam sind (Gubser, 2004; Mercer *et al.*, 2006; Upton *et al.*, 2003) sowie darüber hinaus über ein Set von 12 Genen (001/134, 005, 012, 012.5, 013, 024, 073, 113, 115, 124, 125, 006/132), die als Parapockenvirus spezifisch gelten (Hautaniemi *et al.*, 2010).

Wenngleich die Gesamtgenomsequenzierung mittels NGS einzigartige Einblicke in die Gesamtheit der molekularen Eigenschaften eines Pathogens liefert und dementsprechend eine wertvolle Methodik darstellt, so ist auch sie nicht frei von Schwächen. Der hohe GC-Gehalt der Parapockenviren und das Vorliegen repetitiver Nukleotidsequenzen können die Sequenzierung erschweren (Kieleczawa, 2006; Treangen & Salzberg, 2012). So traten insbesondere in der HL953 Genomsequenz Lücken auf, die zunächst noch mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte geschlossen werden mussten. Die Sequenzierung der terminalen Haarnadel-Strukturen ist ebenfalls nicht ohne weiteres möglich (Kieleczawa, 2006),

weshalb die Sequenz der Genomenden der untersuchten Virus-DNAs fehlt. Wie jede Technologie besitzen auch die verschiedenen NGS-Methoden eine gewisse Fehlerrate (Henson *et al.*, 2012; Loman *et al.*, 2012). Die wichtigsten Nachteile sind jedoch eine nur geringe Leselänge (ca. 50-150 bp pro Read) (Treangen & Salzberg, 2012), eine höhere *base call error rate* (Ableitung der Basenabfolge von physikalischen Signalen) und Plattform-spezifische Artefakte (Chen *et al.*, 2014). Erscheint es zunächst noch als Vorteil, dass pro Durchlauf enorme Datenmengen erzeugt werden, so stellt die nachfolgende Auswertung eine entscheidende bioinformatische Herausforderung dar, die ohne speziell ausgebildetes Personal und die entsprechende Hard- und Software nicht zu bewältigen ist.

2.1. Vergleich eines korrespondierenden ORFV-Paares von Schaf und Mensch

Bei einem CPD-Ausbruch in Dithmarschen (Schleswig-Holstein) 1996 kam es zur Virus-Übertragung von Schaf zu Mensch. Das jeweilige Virus konnte aus Krustenmaterial (B015, Schaf) bzw. Biopsie-Material (B029, Mensch) angezüchtet und isoliert werden, sodass dieses einzigartige korrespondierende Viruspaar nach der Sequenzierung vergleichend analysiert werden konnte.



Abbildung 3 Klinische Ausprägung der Infektion mit dem Parapockenvirus B015 (Schaf) und B029 (Mensch). Das Schaf diente dabei als Infektionsquelle für den Besitzer der Schafherde (Fotos: Frau Gisela Dührsen).

Unter Verwendung des Genoms des ORFV IA82 als Referenz, konnten in den DNA-Sequenzen von B015 bzw. B029 122 ORFs identifiziert werden. Dabei erfolgte

die Definition eines ORF „manuell“, entsprechend seiner Orientierung, Lage im Genom, Vorhandensein eines Start-/ Stopcodons und Sequenzhomologien mit entsprechenden ORFs in der Referenz. Nach Veröffentlichung der Publikation 1 konnten mittels GATU sieben weitere ORFs identifiziert werden, die in Tabelle 2 aufgelistet sind, sodass sich die Zahl der ORFs auf insgesamt 129 erhöht. Der Genbankeintrag (KF837136) wurde demgemäß aktualisiert.

Eine durchschnittlich 95,8%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz einzelner ORFs zu der des ORFV IA82 Referenzgenoms zeigt in Einklang mit PCR-Ergebnissen und Wirtstierspezies, dass es sich bei den Isolaten um ORFV handelt. Dies wird durch das Fehlen BPSV-spezifischer Gene (ORF 003 + 004 und ORFV 133) (Delhon *et al.*, 2004) weiter gestützt. Gene die der Spezies PCPV oder PVNZ vorbehalten sind, sind demgegenüber bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Das Mapping der B015-Reads auf das fertiggestellte B029-Genom ermöglichte den umfassenden Vergleich beider Virusgenomsequenzen. Die Tatsache, dass beide Sequenzen nahezu vollständig identisch sind und ferner in allen SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) und INDELs (Insertionen und Deletionen) gegenüber der Referenz übereinstimmen, lässt den Schluss zu, dass auch nach einem Wechsel der Wirtsspezies keine gravierenden Änderungen auf Genom-Ebene vorliegen und das Virus B015 somit tatsächlich seine genomische Stabilität nach Übertragung auf den Menschen bewahrt hat. Ob dies allerdings generell gilt oder es sich hier um einen Einzelfall handelt, bei dem noch keine Wirtsadaptation stattgefunden hat, bleibt offen. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass Zellkulturisolate untersucht wurden (vgl. Literaturübersicht Punkt 5.1.1.). Letztlich konnten nur zwei Unterschiede zwischen den Isolaten B015 und B029 erfasst werden, ein SNP vor ORF 005 und eine Einzelnukleotid-Deletion in der Genomsequenz von B029 innerhalb des ORF 013. Während der Austausch des Nukleotids (von G (B015) nach A (B029)) an Position 3404 mit hoher Wahrscheinlichkeit folgenlos bleibt, da es sich um einen nicht-kodierenden Bereich der DNA handelt, führt der Verlust nur eines Nukleotids in ORF 013 zu einer Leserasterverschiebung. Dies wiederum bedingt, dass das entsprechende Genprodukt möglicherweise funktionslos bleibt. Da jedoch nicht bekannt ist, welche Art von Protein durch ORF 013 kodiert wird, ist die Einschätzung einer potentiellen biologischen Konsequenz nicht möglich.

2.2. Molekulare Charakterisierung eines Parapockenvirus-Isolates vom Rotwild aus Deutschland

Aus einem der 1764 untersuchten Rothirsch-Tonsillentupfer konnte erfolgreich ein Parapockenvirus in Zellkultur isoliert werden (HL953). Erste Hinweise auf die Virusspezies wurden durch eine RFLP-Analyse mit KpnI gewonnen. Sie konnte zeigen, dass das Restriktionsfragment-Profil von HL953 keinem der drei etablierten Parapockenvirusspezies entsprach und ließ daher die Vermutung zu, dass möglicherweise eine zusätzliche vierte Spezies vorliegt. Immunfärbungen und Westernblot-Analysen sind generell nicht geeignet die Spezieszugehörigkeit von Parapockenviren aufzuklären. Die Reaktivität von HL953 mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (mAbs) deutete jedoch zumindest eine vergleichsweise enge Verwandtschaft mit BPSV an, die später auf Genomebene bestätigt werden konnte.

Die extrahierte HL953-DNA wurde schließlich genutzt, um daraus die erste (nahezu vollständige) Genomsequenz eines Parapockenvirus vom Rotwild zu erstellen. Insgesamt konnten 130 mutmaßliche ORFs mit Hilfe von GATU definiert werden. Auffällig dabei war, dass fast ein Drittel aller HL953-ORFs größer war als der entsprechende ORF jedes Referenzgenoms. Vor dem Hintergrund, dass Deletionen unidirektionale Ereignisse sind, es also wahrscheinlicher ist, dass ein Virus im Laufe der Evolution Nukleotide verliert, anstatt in zahlreichen Genen hinzugewinnt, erscheint es demnach denkbar, dass es sich bei HL953 um ein phylogenetisch vergleichsweise altes Parapockenvirus handelt. Um dies genauer zu verifizieren sind weitere Untersuchungen nötig.

Offenbar besteht überdies ein relativ engeres Verwandtschaftsverhältnis zwischen HL953 und der Spezies BPSV; in insgesamt 81 ORFs zeigen sich die größten Sequenzhomologien zwischen HL953 und der BPSV-Referenz AR02. Zusätzlich konnten in der HL953-Genomsequenz zwei vermeintlich BPSV-spezifische ANK-Protein-Gene (ORF 003 + 004) lokalisiert werden. Der ebenfalls bisher nur in BPSV beschriebene ORF 133 konnte nicht identifiziert werden, allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass die HL953-Sequenz jenseits des ORF 132 mittels NGS nicht erschlossen werden konnte.

Nichtsdestoweniger ist HL953 nicht der Virusspezies BPSV zuzuordnen. Die phylogenetische Analyse von 125 ORFs, die in allen vollständig sequenzierten Parapockenviren gleichermaßen zu finden waren, konnte eindeutig zeigen, dass HL953

im phylogenetischen Stammbaum einen separaten Ast für sich beansprucht (Publikation 2, Fig. 2). Das Auffinden einer eigenständigen Parapockenvirusspezies bei neuseeländischen Rothirschen (PVNZ) (Robinson & Mercer, 1995) legt nahe, dass es sich bei HL953 um ein Mitglied dieser Spezies handelt. Diese Annahme wird bestärkt durch die vergleichende Analyse des vVEGF (vgl. auch Literaturübersicht Punkt 1.1.3). Der einzigartige Virulenzfaktor vVEGF, der bereits bei allen Parapockenvirusspezies nachgewiesen werden konnte (Delhon *et al.*, 2004; Lyttle *et al.*, 1994; Mercer *et al.*, 2006; Ueda *et al.*, 2003, 2007), weist eine außerordentlich hohe inner- und zwischenartliche Sequenzvariation auf, sodass die vVEGF-Aminosäuresequenz selbst bei Vertretern der gleichen Virusspezies weit weniger als 50 % übereinstimmen kann (Delhon *et al.*, 2004). Dagegen entspricht die HL953-vVEGF-Sequenz zu 96-100 % der anderer als PVNZ definierter Parapockenviren und macht die Einordnung von HL953 als PVNZ glaubhaft. Abschließend geklärt werden könnte dies durch einen umfassenden Vergleich der HL953-Genomsequenz und der eines definierten PVNZ-Isolates (als Standard gilt das neuseeländische PVNZ-Isolat RD86). Jedoch steht bisher keine entsprechende Sequenz in der Genbank zur Verfügung.

Neben dem vVEGF-kodierenden ORF 132 konnten auch Gene aller anderen definierten und typischen Virulenzfaktoren der Parapockenviren (Delhon *et al.*, 2004; Hautaniemi *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 2006) bei HL953 nachgewiesen werden (siehe Publikation 2). Wenngleich das Hirschkalb, welches das Virus beherbergte, keine Haut- oder Schleimhautläsionen zeigte, so beweist dies doch die potentielle Virulenz von HL953.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Gesamtgenomanalyse bestätigt werden, dass Rotwild auch in Deutschland über eine eigenständige Parapockenvirusspezies verfügt und HL953 ein Repräsentant dieser Spezies ist.

3 Phylogenetische Beziehung der vier Parapockenvirusspezies

Unter Verwendung eines Sets aus 16 konservierten Pockenvirus-Proteinen, kann das Verwandtschaftsverhältnis der Parapockenviren im Gefüge der Familie *Poxviridae* übersichtsartig dargestellt werden. Dieses Set, das wichtige Proteine der Transkriptions- und Replikationsmaschinerie sowie struktureller Komponenten beinhaltet, wurde bereits in anderen Studien verwendet, um Pockenviren phylogenetisch zu untersuchen (Gubser, 2004).

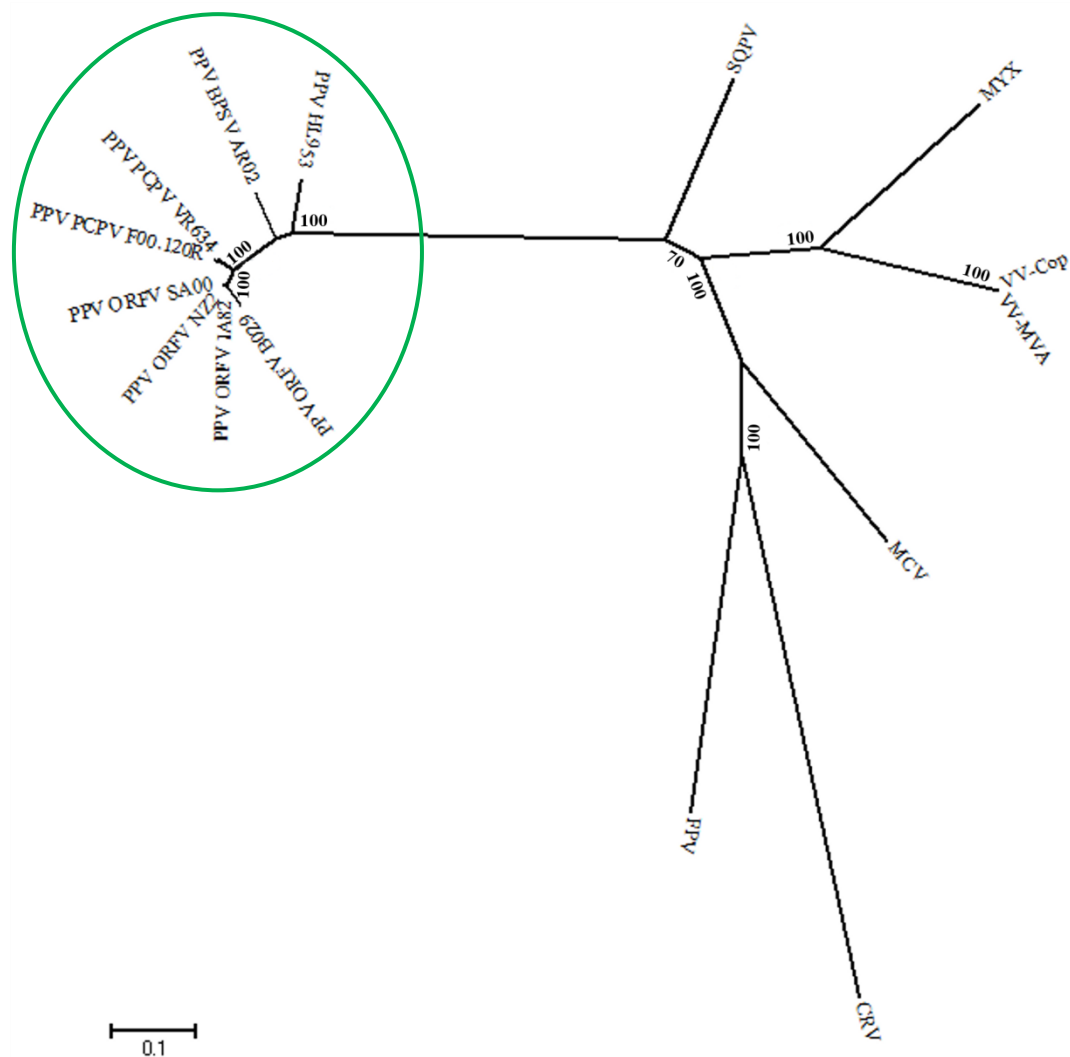


Abbildung 4 Phylogenetischer Stammbaum (*maximum likelihood tree*) ausgewählter Pockenviren, basierend auf einem Set aus 16 konservierten Pockenvirus-Proteinen. Die Gattung der Parapockenviren ist durch einen grünen Kreis markiert.

Der gezeigte Stammbaum (Abbildung 4) offenbart zunächst die Bildung eines separaten Clusters durch die Parapockenviren, die demgemäß ein eigenes Genus bilden und bestärkt die Zugehörigkeit von HL953 zu diesem Cluster. Darüber hinaus wird ein besonders nahes Verwandtschaftsverhältnis der Parapocken zu dem Pockenvirus der Eichhörnchen (SQPV) erkennbar. Dieses ebenfalls auffallend GC-reiche Pockenvirus wird mit dem massenhaften Sterben roter Eichhörnchen (*Sciurus vulgaris*) nach der Einfuhr des Grauhörnchens (*Sciurus carolinensis*) im Vereinigten Königreich in Verbindung gebracht (McInnes, 2006; McInnes *et al.*, 2009; Naulty *et al.*, 2013; Thomas, 2003). Nachdem es zunächst als Parapockenvirus klassifiziert wurde (Rushton *et al.*, 2000; Sainsbury *et al.*, 2000; Tompkins *et al.*, 2002), konnten neuere Studien

zeigen, dass es sich bei SQPV tatsächlich vielmehr um den Vertreter einer bis dato unbekannten Gattung innerhalb der Subfamilie *Chordopoxvirinae* handelt (Thomas, 2003). Auch der vorliegende Stammbaum (Abbildung 4) unterstützt diese These.

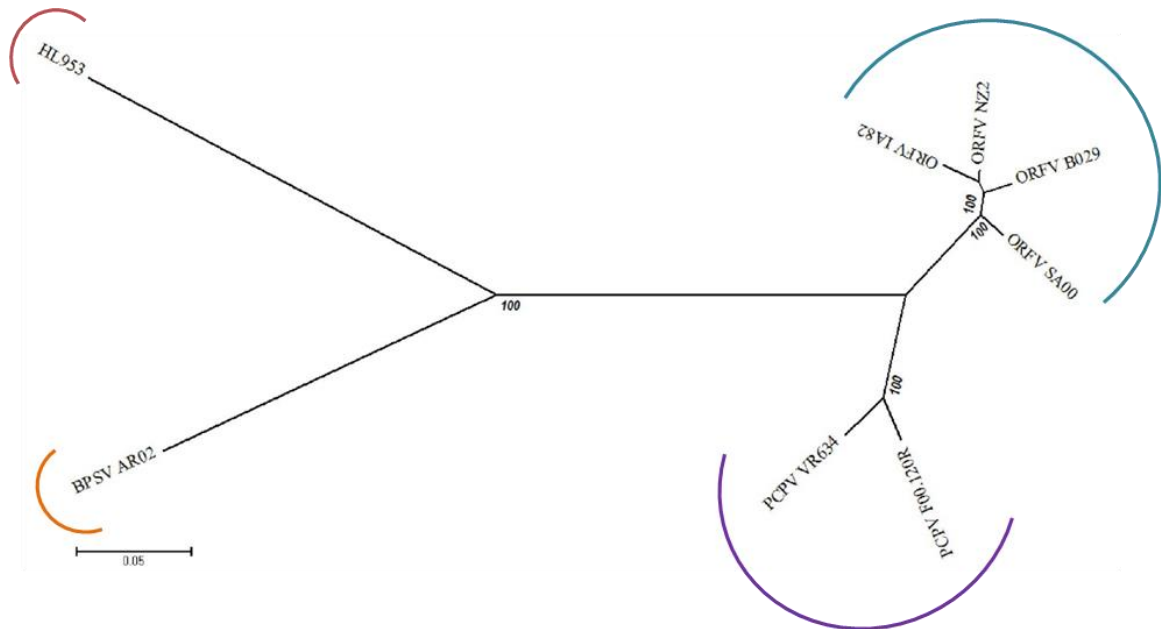


Abbildung 5 Phylogenetischer Stammbaum (*maximum likelihood tree*) der Parapockenviren. Zur Erstellung wurde jeweils die zusammengefügte Aminosäuresequenz von 125 ORFs verwendet, die in allen vollständig sequenzierten Parapockenvirus-Isolaten gleichsam gefunden wurden.

Bei der alleinigen Betrachtung der Gattung *Parapoxvirus* auf der Basis von 125 Genen (Abbildung 5), zeigen sich vier unterschiedliche Gruppen, die den vier Virusspezies entsprechen: ORFV, PCPV, BPSV und dem Parapockenvirus des Rotwildes. Dabei wird auch hier die vergleichsweise nahe Verwandtschaft zwischen HL953 und der Spezies BPSV offenbar. Besonders bemerkenswert ist überdies die Tatsache, dass PCPV, obwohl es sich mit BPSV dieselbe Wirtspezies (Rind) teilt, offensichtlich eine sehr viel engere Verwandtschaftsbeziehung zu ORFV (Schaf, Ziege) besitzt.

4 Epidemiologie der Parapockenvirusinfektion beim deutschen Rotwild

Es wird vielfach angenommen, dass subklinische Parapockenvirusinfektionen für das Infektionsgeschehen eine wichtige Rolle spielen. Dass das Virus in der Lage ist symptomlos im Wirtsorganismus zu persistieren wurde für BPSV bereits beschrieben

(Dal Pozzo *et al.*, 2011), dabei scheint es während der symptomlosen Phase in lymphatischem Gewebe beherbergt zu werden (Iketani *et al.*, 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in 0,79 % aller untersuchten Tonsillentupfer vom Rotwild mittels PCR ein Parapockenvirus nachgewiesen werden, ohne dass die Tiere zum Zeitpunkt der Probennahme Symptome einer Parapockenvirusinfektion aufwiesen. Es ist demnach davon auszugehen, dass das Virus subklinisch in der Rothirschpopulation verbreitet ist. Bisher wurde im Zusammenhang mit Parapockenviren beim Rotwild über eine milde bis oftmals sogar schwerwiegende Symptomatik berichtet (Horner *et al.*, 1987; Scagliarini *et al.*, 2011), sodass es vorstellbar erscheint, dass es unter bestimmten prädisponierenden Voraussetzungen (Immunsuppression, Stress) auch beim deutschen Rotwild zu einer Reaktivierung des Virus mit der Ausbildung von Läsionen und verstärkter Virusausscheidung kommen kann. Der Nachweis aller gängigen Parapockenvirus-Virulenzgene im HL953-Genom unterstützt diese Annahme. Beweise dafür, dass das Virus auf natürlichem Wege vom Rothirsch auf Hauswiederkäuer übertragen werden kann stehen noch aus, jedoch konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Infektion von Schafen mit PVNZ milde Läsionen hervorruft (Robinson & Mercer, 1995). Berücksichtigt man die Tatsache, dass HL953 eine noch deutlich engere Verwandtschaft zu BPSV als zu ORFV aufweist, ist nicht auszuschließen, dass das Virus auch an Rinder weitergegeben werden könnte. Gerade im alpinen Raum ist ein Kontakt zwischen Rotwild und Rindern, die sich oft dieselben Sommeralmflächen teilen, nicht selten. Dass es sich hier um eine wichtige Schnittstelle für den Erregeraustausch zwischen Wild- und Hauswiederkäuern handelt, ist auch im Zusammenhang mit anderen Infektionserregern beschrieben (Domogalla *et al.*, 2013).

Da Parapockenviren Zoonoseerreger sind, könnte das Virus schließlich in ähnlicher Weise auf den Menschen übertragen werden. Auch dieses Szenario bleibt allerdings zunächst noch spekulativ, da Parapockenviren vom Rotwild noch nicht als ätiologisches Agens einer humanen Parapockenvirusinfektion nachgewiesen werden konnten. Gleichwohl kann der Kontakt zu Hirschartigen zu einer Infektion des Menschen mit ORFV oder PCPV führen (Kuhl *et al.*, 2003; Roess *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 1991). Da nur HL953 erfolgreich in Zellkultur isoliert und somit eindeutig als Vertreter einer separaten Parapockenvirusspezies beim Rotwild identifiziert werden konnte, bleibt offen, ob es sich bei den Viren der übrigen positiven Tupferproben ebenfalls um Angehörige dieser Virusspezies handelt oder gegebenenfalls um ORFV oder PCPV.

Der Kontakt zu gefallenem oder erlegtem Rotwild stellt demgemäß ein potentiellies Infektionsrisiko dar (beispielsweise für Jäger oder Wildhüter). Insbesondere dann wenn Verletzungen an den Händen bestehen, ist daher beim Umgang mit Rotwild das Tragen von Handschuhen angeraten.

5 Ausblick

Der erfolgreiche Parapockenvirus-Nachweis aus Tonsillentupfern beim Rotwild hat gezeigt, dass die Tonsillen, wenn sie auch nicht primäres Manifestationsorgan sind, dennoch geeignet sind, das Vorhandensein des Virus im Organismus zu bestätigen. So erscheint es vorstellbar, dass die Untersuchung von Tonsillentupfern auch in Zukunft genutzt werden kann, um wichtige Erkenntnisse über die Verbreitung und das Auftreten von Parapockenviren in der Haus- und Wildtierpopulation zu erhalten. Neben dem Rothirsch haben sich in den letzten Jahren auch freilebende Gämsen und Steinböcke in Europa für Parapockenviren empfänglich gezeigt (Huemer *et al.*, 2014; Scagliarini *et al.*, 2011). Noch nicht geklärt ist indes die Frage, ob es sich dabei jeweils um echte Reservoirwirte handelt, die einen eigenständigen Infektionszyklus in der Population aufrechterhalten. Im Fall des Rotwilds erscheint dies aufgrund des Vorhandenseins einer eigenen Virusspezies wahrscheinlich, Infektionen bei Gämsen und Steinböcken (ORFV) dagegen könnten auch immer wieder neu über Hauswiederkäuer in die Population eingetragen werden.

Durch umfangreichere Sequenzvergleiche könnte entschlüsselt werden, ob es sich bei den Parapockenviren des deutschen und neuseeländischen Rotwildes um die gleiche Virusspezies handelt. Angesichts der Tatsache, dass Rotwild wie jede andere Hirschart in Neuseeland nicht ursprünglich heimisch war, sondern erst im 19. Jahrhundert aus Europa nach Neuseeland eingeführt wurde (Feldhamer, 2012), ist dies wahrscheinlich. So könnte auch das Virus auf diesem Weg in das Land miteingeschleppt worden sein. Zusätzlich erwiesen sich Parapockenviren über lange Zeit und weitentfernte geographische Gebiete hinweg als genetisch stabil (vgl. Publikation 1), sodass das deutsche bzw. europäische und neuseeländische Virus vermutlich auch heute noch in sehr enger verwandtschaftlicher Beziehung zueinander stehen.

Dass auch die genaue Abklärung humaner Erkrankungsfälle durchaus von Relevanz sein kann, wurde erst kürzlich durch einen Bericht aus den USA wieder deutlich

(Osadebe *et al.*, 2015). Das amplifizierte DNA-Fragment (RNA-Polymerase-Gen) des nachgewiesenen Pockenvirus zweier Humanfälle zeigte hohe Sequenzübereinstimmungen mit Vertretern der Genera *Parapoxvirus* und *Molluscipoxvirus*, allerdings konnte das Virus weder als Mitglied des einen noch des anderen Genus klassifiziert werden, was die Autoren dazu veranlasste davon auszugehen, dass es sich hierbei möglicherweise um ein neuartiges zoonotisches Pockenvirus handelt.

Einen wichtigen Schlüssel zur Aufklärung dieses und anderer Fälle stellt die molekulare Viruscharakterisierung mittels Gesamtgenomanalyse dar. Sie ermöglicht es, umfassende Einblicke in die molekularen Eigenschaften eines Erregers zu erhalten. Künftig wird sie in weiterentwickelter Form zur Diagnostik direkt aus relevantem Probenmaterial eine entscheidende Rolle spielen (Carpenter *et al.*, 2013; Depledge *et al.*, 2011; Hasman *et al.*, 2014), um bereits bekannte, besonders aber auch um neue Pathogene zu identifizieren, zu charakterisieren und schließlich in die bestehende taxonomische Ordnung einzufügen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die epitheliotropen Parapockenviren sind Mitglieder der Familie *Poxviridae* und treten ubiquitär in der Wiederkäuerpopulation auf. Sie verursachen kontagiöse, pustulöse Haut- und Schleimhautläsionen, die meist auf den Bereich des Kopfes oder des Euters beschränkt sind (Lokalinfektion). Die Erkrankung verläuft unter Ausprägung milder bis schwerwiegender Symptome und ist i.d.R. durch eine hohe Morbidität, aber geringe Mortalität gekennzeichnet. Derzeit existieren vier in das Genus eingeordnete Virusspezies: ORFV (Schaf und Ziege), PCPV und BPSV (Rind), sowie PVNZ (neuseeländisches Rotwild). Mit Ausnahme von PVNZ konnte eine Übertragung aller Parapockenviren auf den Menschen nachgewiesen werden (Zoonoseerreger). Die Infektion des Menschen führt zum Auftreten lokal begrenzter Hautläsionen, die historisch bedingt als „Melkerknoten“ bezeichnet werden. Nach erfolgter Parapocken-Diagnose werden Humaninfektionen unter Vernachlässigung der virusübertragenden Wirtstierspezies meist lapidar als erworbene Tierpocken oder pauschal als PCPV bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine einzigartige Kollektion von 21 historischen und aktuellen Parapockenvirus-Zellkultur-Isolaten von Mensch und Tier (sowie zwei Parapockenvirus-DNA-Proben aus Schottland) untersucht. Dabei kamen zwei selbstentwickelte diskriminierende PCR-Protokolle zur Anwendung, die einen sicheren Nachweis der Parapockenviren erlauben. Die phylogenetische Analyse der DNA Fragmente aus den PCR-Ergebnissen ermöglicht die Zuordnung zu einer der etablierten Virusspezies sowie die Rückverfolgung humaner Parapockenvirus Isolate zum animalen Ursprungswirt.

Überdies wurden die DNA-Genome dreier Virusisolate mittels NGS sequenziert. Um genomische Veränderungen durch in-vitro Einflüsse auszuschließen, wurde die Anzahl der Zellkulturpassagen strikt niedrig gehalten. Die sequenzierten Virusgenome offenbarten Parapockenvirus typische Eigenschaften: eine Größe von rund 140 kbp, einen hohen GC-Gehalt von 64-65 %, das Vorhandensein eines Sets aus 88 Genen, die innerhalb der Subfamilie *Chordopoxvirinae* konserviert sind, sowie weiterer 12 Parapockenvirus-spezifischer Gene.

Die vergleichende Analyse der Genomsequenzen eines korrespondierenden ORFV-Paares von Schaf (B015) und Mensch (B029) konnte zeigen, dass das Virus auch nach einer Übertragung auf eine neue Wirtsspezies seine genetische Integrität zu nahezu 100 % bewahrt.

Das Auftreten der Parapockenviruspezies PVNZ war lange Zeit auf Neuseeland beschränkt, obgleich eine weitere Verbreitung, insbesondere auch in Europa, für wahrscheinlich gehalten wurde. Im Rahmen eines Monitorings wurden 1764 Tonsillentupfer von Rotwild im bayerischen Alpenraum untersucht. In 14 (0,79 %) wurde die Präsenz von Parapockenvirus-DNA mit einer real-time-PCR nachgewiesen. Aus einer Probe konnte erfolgreich ein Virus (HL953) in Zellkultur isoliert und seine DNA anschließend sequenziert werden, was in der ersten (nahezu) vollständigen Genomsequenz eines Parapockenvirus vom Rotwild resultierte. Tests auf klassische biologische Eigenschaften sowie die eingehende molekulare Charakterisierung des Virus mit phylogenetischer Analyse anhand von 125 Genen, ermöglichten seine Identifizierung als Vertreter einer eigenen Parapockenviruspezies beim Rotwild in nächster Verwandtschaftsbeziehung zu PVNZ. Auffälligerweise war ca. ein Viertel aller HL953-ORFs größer als die entsprechenden ORFs in den verwendeten Parapockenvirus-Referenzgenomen.

Das Fehlen klinischer Symptome beim infizierten Rotwild deutet darauf hin, dass es persistierende, asymptomatische Infektionsverläufe gibt. Hieraus ergibt sich eine weitere potentielle Infektionsquelle für empfängliche Nutztiere und den Menschen.

VI SUMMARY

The epitheliotropic parapoxviruses belong to the family *Poxviridae* and are found ubiquitously among ruminants. They cause contagious pustular skin and mucosa lesions that are generally localized at the head or udder. The disease exhibits mild to severe symptoms and is normally characterized by a high morbidity but low mortality.

Currently the genus consists of four classified virus species: ORFV (sheep and goat), PCPV and BPSV (cattle) and PVNZ (red deer from New Zealand). The transmission to humans has been proven for all parapoxviruses (zoonotic agent), except for PVNZ. In humans the infection causes circumscribed skin lesions, historically referred to as „milker’s nodules”. When PPV-diagnosis is made, human infections are mostly oversimplified as acquired animal pox or PCPV, disregarding the animal origin of virus transmission.

In the present work a unique collection of 21 historic and recent human and animal PPV cell culture isolates (and two DNA samples from Scotland) was investigated. Two different discriminating PCR protocols were developed, to assure PPV detection. Phylogenetic analysis of the DNA fragments from PCR results allowed for the affiliation of the virus isolates to one of the established virus species as well as tracing back the human PPV isolates to the animal host of origin.

Moreover the DNA genome of three virus isolates was sequenced by NGS. To avoid genomic changes by in vitro influences cell culture passages were strictly kept at low numbers. The generated virus genome sequences revealed typical features of PPVs: a size of about 140 kbp, a high G+C content of 64-65 % and the presence of a set of 88 genes, which are conserved within the subfamily *Chordopoxvirinae* as well as 12 additional genes that are known to be PPV specific.

Comparative analysis of the genome sequences of a corresponding ORFV pair from a sheep (B015) and a contact person (B029) demonstrated that the virus preserves its genomic integrity at almost 100 % even after the transmission to a new host species.

The presence of the PPV species PVNZ has long been restricted to New Zealand, albeit a more widespread occurrence in other countries, especially in Europe, was assumed.

In the context of a monitoring program 1764 tonsil swabs of red deer in the Bavarian Alps were examined for the presence of PPV specific DNA using a real time PCR. Fourteen samples (0.79 %) tested positive for PPV DNA. From one sample, a virus (HL953) was successfully isolated in cell culture. Subsequently the viral DNA was sequenced and yielded the first (nearly) complete genome sequence of a PPV of red deer. In addition to classical biological features, detailed molecular characterization of the virus, including a phylogenetic analysis based on 125 genes, allowed for its classification as a member of a separate PPV species in red deer in close relation to PVNZ. Strikingly, about a quarter of all HL953 ORFs were found to be larger than the corresponding ORFs in the reference PPV genome sequences used for comparison.

The absence of clinical symptoms in infected red deer indicates the asymptomatic persistence of the virus, creating another potential source of virus transmission to susceptible livestock and humans.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Abdussalam, M. & Cosslett, V. E. (1957).** Contagious pustular dermatitis virus. I. Studies on morphology. *J Comp Pathol* **67**, 145–156.
- Abrahão, J. S., Silva-Fernandes, A. T., Assis, F. L., Guedes, M. I., Drumond, B. P., Leite, J. A., Coelho, L. F. L., Turrini, F., Fonseca, F. G. & other authors. (2010).** Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *J Clin Virol* **48**, 69–72.
- Abubakr, M. I., Abu-Elzein, E. M. E., Housawi, F. M. T., Abdelrahman, A. O., Fadlallah, M. E., Nayel, M. N., Adam, A. S., Moss, S., Forrester, N. L. & other authors. (2007).** Pseudocowpox virus: the etiological agent of contagious ecthyma (Auzdyk) in camels (*Camelus dromedarius*) in the Arabian peninsula. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N* **7**, 257–260.
- Abu, E. M. E. E. & Housawi, F. M. T. (2009).** Drastic cutaneous multi-focal orf infection in goats, causing severe dysfunctioning. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot* **28**, 1025–1029.
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Viljoen, G. J., Wallace, D. B., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2006).** Genome of crocodilepox virus. *J Virol* **80**, 4978–4991.
- Ali, O. A., Kheir, S. A., Abu Damir, H. & Barri, M. E. (1991).** Camel (*Camelus dromedarius*) contagious ecthyma in the Sudan. A case report. *Rev Délevage Médecine Vét Pays Trop* **44**, 143–145.
- Ara, M., Zaballos, P., Sánchez, M., Querol, I., Zubiri, M. L., Simal, E. & Hörndler, C. (2008).** Giant and recurrent orf virus infection in a renal transplant recipient treated with imiquimod. *J Am Acad Dermatol* **58**, S39–40.
- Azwai, S. M., Carter, S. D. & Woldehiwet, Z. (1995).** Immune responses of the camel (*Camelus dromedarius*) to contagious ecthyma (Orf) virus infection. *Vet Microbiol* **47**, 119–131.
- Azwai, S. M., Carter, S. D., Woldehiwet, Z. & Wernery, U. (1996).** Serology of Orthopoxvirus cameli infection in dromedary camels: analysis by ELISA and western blotting. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **19**, 65–78.
- Baggiolini, M. (1998).** Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565–568.
- Ballanger, F., Barbarot, S., Mollat, C., Bossard, C., Cassagnau, E., Renac, F. & Stalder, J. F. (2006).** Two giant orf lesions in a heart/lung transplant patient. *Eur J Dermatol EJD* **16**, 284–286.
- Bayindir, Y., Bayraktar, M., Karadag, N., Ozcan, H., Kayabas, U., Otlu, B., Durmaz, R. & Doganay, M. (2011).** Investigation and analysis of a human orf outbreak among people living on the same farm. *New Microbiol* **34**, 37–43.
- Becher, P., König, M., Müller, G., Siebert, U. & Thiel, H.-J. (2002).** Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses. *Arch Virol* **147**, 1133–1140.
- Berg, G. & Rüsse, M. (1994).** Der Einsatz von Baypamun HK in der Mammatumorbildung der Hündin. *Tierärztl Umsch* **49**, 476–480.
- Billinis, C., Mavrogianni, V. S., Spyrou, V. & Fthenakis, G. C. (2012).** Phylogenetic analysis of strains of Orf virus isolated from two outbreaks of the disease in sheep in Greece. *Virol J* **9**, 24.

- Binns, M. M. & Smith, G. L. (Eds.). (1992).** *Recombinant poxviruses*. Boca Raton: CRC.
- Black, W., Walburger, M. T., Baker, R., Ostertag-Hill, C., Reed, A., Whipple, M. & Jin, L. (2014).** Identification of Pseudocowpox Virus in Angus Bull with Failure to Breed. *Austin Virol Retro Virol* **1**, 5.
- Bonetta, L. (2006).** Genome sequencing in the fast lane. *Nat Methods* **3**, 141–147.
- Bouznach, A., Hahn, S., Stram, Y., Menasherov, S., Eder, N., Shicaht, N., Kenigswald, G. & Perl, S. (2013).** Case Report: Contagious Ecthyma - Deviations in the Anatomical Appearance of Lesions in an Outbreak in Lambs in Israel. *Isr J Vet Med* **68**, 246–251.
- Breeden, L. & Nasmyth, K. (1987).** Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. *Nature* **329**, 651–654.
- Buddle, B. M. & Pulford, H. D. (1984).** Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. *Vet Microbiol* **9**, 515–522.
- Büttner, M. (1993).** Principles of paramunization. Option and limits in veterinary medicine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **16**, 1–10.
- Büttner, M. & Rziha, H. J. (2002).** Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**, 7–16.
- Büttner, M., Czerny, C. P., Lehner, K. H. & Wertz, K. (1995a).** Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Vet Immunol Immunopathol* **46**, 237–250.
- Büttner, M., von Einem, C., McInnes, C. & Oksanen, A. (1995b).** Klinik und Diagnostik einer schweren Parapocken-Epidemie beim Rentier in Finnland. *Tierärztl Prax* **23**, 614–618.
- Cargnelutti, J. F., Flores, M. M., Teixeira, F. R. M., Weiblen, R. & Flores, E. F. (2012).** An outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc* **24**, 437–441.
- Carpenter, M. L., Buenrostro, J. D., Valdiosera, C., Schroeder, H., Allentoft, M. E., Sikora, M., Rasmussen, M., Gravel, S., Guillén, S. & other authors. (2013).** Pulling out the 1%: Whole-Genome Capture for the Targeted Enrichment of Ancient DNA Sequencing Libraries. *Am J Hum Genet* **93**, 852–864.
- Carson, C. A. & Kerr, K. M. (1967).** Bovine papular stomatitis with apparent transmission to man. *J Am Vet Med Assoc* **151**, 183–187.
- Castrucci, G., Frigeri, F., Osburn, B. I., Ferrari, M., Barreca, F. & Salvatori, D. (1998).** Further investigations on the efficacy of a non-specific defence inducer evaluated in calves exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **21**, 155–163.
- Castrucci, G., Osburn, B. I., Frigeri, F., Ferrari, M., Salvatori, D., Lo Dico, M. & Barreca, F. (2000).** The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **23**, 163–173.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012).** Human Orf virus infection from household exposures - United States, 2009-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **61**, 245–248.
- Chan, K.-W., Hsu, W.-L., Wang, C.-Y., Yang, C.-H., Lin, F.-Y., Chulakasian, S. & Wong, M.-L. (2009).** Differential diagnosis of orf viruses by a single-step PCR. *J Virol Methods* **160**, 85–89.

- Chen, C., Khaleel, S. S., Huang, H. & Wu, C. H. (2014).** Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol Med* **9**, 8.
- Chin, J. C. & Petersen, R. K. (1995).** Comparison of native and subunit antigens as ELISA reagents for the detection of antibodies against scabby mouth virus. *Vet Microbiol* **46**, 327–334.
- Chung, C.-S., Chen, C.-H., Ho, M.-Y., Huang, C.-Y., Liao, C.-L. & Chang, W. (2006).** Vaccinia Virus Proteome: Identification of Proteins in Vaccinia Virus Intracellular Mature Virion Particles. *J Virol* **80**, 2127–2140.
- De la Concha-Bermejillo, A., Guo, J., Zhang, Z. & Waldron, D. (2003).** Severe Persistent Orf in Young Goats. *J Vet Diagn Invest* **15**, 423–431.
- Connell, R. (1954).** Contagious Ecthyma in Rocky Mountain Sheep. *Can J Comp Med Vet Sci* **18**, 59–60.
- Cottone, R., Büttner, M., Bauer, B., Henkel, M., Hettich, E. & Rziha, H. J. (1998).** Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Res* **56**, 53–67.
- Couñago, R. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A. & Krause, K. L. (2010).** Crystallization and preliminary X-ray analysis of the chemokine-binding protein from orf virus (Poxviridae). *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **66**, 819–823.
- Cyster, J. G. (1999).** Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286**, 2098–2102.
- Czerny, C. P., Waldmann, R. & Scheubeck, T. (1997).** Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses. *Arch Virol* **142**, 807–821.
- Darbyshire, J. (1961).** A fatal ulcerative mucosal condition of sheep associated with the virus of contagious pustular dermatitis. *Br Vet J* **117**, 97–105.
- Dashtseren, T., Solovyev, B. V., Varejka, F. & Khokhoo, A. (1984).** Camel contagious ecthyma (pustular dermatitis). *Acta Virol* **28**, 122–127.
- Deane, D., McInnes, C. J., Percival, A., Wood, A., Thomson, J., Lear, A., Gilray, J., Fleming, S., Mercer, A. & Haig, D. (2000).** Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. *J Virol* **74**, 1313–1320.
- Deane, D., Ueda, N., Wise, L. M., Wood, A. R., Percival, A., Jepson, C., Inglis, N. F., Fleming, S. B., Mercer, A. A. & McInnes, C. J. (2009).** Conservation and variation of the parapoxvirus GM-CSF-inhibitory factor (GIF) proteins. *J Gen Virol* **90**, 970–977.
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., de la Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H. D., Piccone, M. E., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2004).** Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *J Virol* **78**, 168–177.
- Depledge, D. P., Palser, A. L., Watson, S. J., Lai, I. Y.-C., Gray, E. R., Grant, P., Kanda, R. K., Leproust, E., Kellam, P. & Breuer, J. (2011).** Specific Capture and Whole-Genome Sequencing of Viruses from Clinical Samples. *PLoS ONE* **6**, e27805 (R. Jhaveri, Ed.).
- Diel, D. G., Delhon, G., Luo, S., Flores, E. F. & Rock, D. L. (2010).** A Novel Inhibitor of the NF- B Signaling Pathway Encoded by the Parapoxvirus Orf Virus. *J Virol* **84**, 3962–3973.
- Diel, D. G., Luo, S., Delhon, G., Peng, Y., Flores, E. F. & Rock, D. L. (2011a).** Orf virus ORFV121 encodes a novel inhibitor of NF-kappaB that contributes to virus virulence. *J Virol* **85**, 2037–2049.

- Diel, D. G., Luo, S., Delhon, G., Peng, Y., Flores, E. F. & Rock, D. L. (2011b).** A Nuclear Inhibitor of NF- B Encoded by a Poxvirus. *J Virol* **85**, 264–275.
- Dieterich, R. A., Spencer, G. R., Burger, D., Gallina, A. M. & VanderSchalie, J. (1981).** Contagious ecthyma in Alaskan musk-oxen and Dall sheep. *J Am Vet Med Assoc* **179**, 1140–1143.
- Divers, T. J. (2007).** *Rebhun's diseases of dairy cattle*, 2nd ed. St. Louis, Mo: Saunders/Elsevier.
- Domogalla, J., Prodingner, W. M., Blum, H., Krebs, S., Gellert, S., Müller, M., Neuendorf, E., Sedlmaier, F. & Büttner, M. (2013).** Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. *J Clin Microbiol* **51**, 1381–1388.
- Dubochet, J., Adrian, M., Richter, K., Garces, J. & Wittek, R. (1994).** Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *J Virol* **68**, 1935–1941.
- Egerton, J. R. (2007).** Diseases of the Feet. In *Dis Sheep*, pp. 273–282. Edited by I. D. Aitken. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Abu Elzein, E. M. & Housawi, F. M. (1997).** Severe long-lasting contagious ecthyma infection in a goat's kid. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B J Vet Med Ser B* **44**, 561–564.
- Esteban, M. & Holowczak, J. A. (1977).** Replication of vaccinia DNA in mouse L cells I. In vivo DNA synthesis. *Virology* **78**, 57–75.
- Fachinger, V., Schlapp, T. & Saalmüller, A. (2000).** Evidence for a parapox ovis virus-associated superantigen. *Eur J Immunol* **30**, 2962–2971.
- Falk, E. S. (1978).** Parapoxvirus infections of reindeer and musk ox associated with unusual human infections. *Br J Dermatol* **99**, 647–654.
- Farner, N. L., Hank, J. A. & Sondel, P. M. (1997).** *Interleukin-2: molecular and clinical aspects. in Cytokines in health and disease*, 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker.
- Feldhamer, G. A. (2012).** *Deer: the animal answer guide*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Ferrara, N. & Davis-Smyth, T. (1997).** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**, 4–25.
- Ferrara, N. (2004).** Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **25**, 581–611.
- Fiebig, H.-H., Siegling, A., Volk, H.-D., Friebe, A., Knolle, P., Limmer, A. & Weber, O. (2011).** Inactivated orf virus (Parapoxvirus ovis) induces antitumoral activity in transplantable tumor models. *Anticancer Res* **31**, 4185–4190.
- Fischer, T., Planz, O., Stitz, L. & Rziha, H.-J. (2003).** Novel Recombinant Parapoxvirus Vectors Induce Protective Humoral and Cellular Immunity against Lethal Herpesvirus Challenge Infection in Mice. *J Virol* **77**, 9312–9323.
- Fleming, S. B., McCaughan, C. A., Andrews, A. E., Nash, A. D. & Mercer, A. A. (1997).** A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* **71**, 4857–4861.
- Fleming, S. B., Haig, D. M., Nettleton, P., Reid, H. W., McCaughan, C. A., Wise, L. M. & Mercer, A. (2000).** Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus. *Virus Genes* **21**, 85–95.
- Fleming, S. B., Anderson, I. E., Thomson, J., Deane, D. L., McInnes, C. J., McCaughan, C. A., Mercer, A. A. & Haig, D. M. (2007).** Infection with recombinant orf viruses demonstrates that the viral interleukin-10 is a virulence factor. *J Gen Virol* **88**, 1922–1927.

- Fraser, C. M. & Savan, M. (1962). Bovine Papular Stomatitis. *Can Vet J Rev Vét Can* **3**, 107–111.
- Fraser, K. M., Hill, D. F., Mercer, A. A. & Robinson, A. J. (1990). Sequence analysis of the inverted terminal repetition in the genome of the parapoxvirus, orf virus. *Virology* **176**, 379–389.
- Frerking, H., Kramer, R., Schiele, R. & Röder, B. (1995). [Clinical experiences in the use of para-immunity inducers in cattle during animal exhibitions]. *DTW Dtsch Tierärztl Wochenschr* **102**, 188–189.
- Friebe, A., Friederichs, S., Scholz, K., Janssen, U., Scholz, C., Schlapp, T., Mercer, A., Siegling, A., Volk, H.-D. & Weber, O. (2011). Characterization of immunostimulatory components of orf virus (parapoxvirus ovis). *J Gen Virol* **92**, 1571–1584.
- Gallina, L., Dal Pozzo, F., Mc Innes, C. J., Cardeti, G., Guercio, A., Battilani, M., Ciulli, S. & Scagliarini, A. (2006). A real time PCR assay for the detection and quantification of orf virus. *J Virol Methods* **134**, 140–145.
- Gardiner, M. R., Craig, J. & Nairn, M. E. (1967). An unusual outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep. *Aust Vet J* **43**, 163–165.
- Gassmann, U., Wyler, R. & Wittek, R. (1985). Analysis of parapoxvirus genomes. *Arch Virol* **83**, 17–31.
- Geerinck, K., Lukito, G., Snoeck, R., De Vos, R., De Clercq, E., Vanrenterghem, Y., Degreef, H. & Maes, B. (2001). A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream. *J Med Virol* **64**, 543–549.
- Gitao, C. G. (1994). Outbreaks of contagious ecthyma in camels (*Camelus dromedarius*) in the Turkana district of Kenya. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot* **13**, 939–945.
- Glover, R. E. (1928). Contagious pustular dermatitis of the sheep. *J Comp Pathol* **41**, 318–340.
- Gouletsou, P. G. & Fthenakis, G. C. (2010). Clinical evaluation of reproductive ability of rams. *Small Rumin Res* **92**, 45–51.
- Greig, A. S. (1957). Contagious Ecthyma Of Sheep. II - In Vitro Cultivation Of The Virus. *Can J Comp Med Vet Sci* **21**, 304–308.
- Griesemer, R. A. & Cole, C. R. (1960). Bovine papular stomatitis. I. Recognition in the United States. *J Am Vet Med Assoc* **137**, 404–410.
- Grütz, G. (2005). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* **77**, 3–15.
- Gubser, C. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* **85**, 105–117.
- Gumbrell, R. C. & McGregor, D. A. (1997). Outbreak of severe fatal orf in lambs. *Vet Rec* **141**, 150–151.
- Guo, J., Zhang, Z., Edwards, J. F., Ermel, R. W., Taylor, C. & de la Concha-Bermejillo, A. (2003). Characterization of a North American orf virus isolated from a goat with persistent, proliferative dermatitis. *Virus Res* **93**, 169–179.
- Guo, J., Rasmussen, J., Wünschmann, A. & de la Concha-Bermejillo, A. (2004). Genetic characterization of orf viruses isolated from various ruminant species of a zoo. *Vet Microbiol* **99**, 81–92.
- Gurel, M. S., Ozardali, I., Bitiren, M., San, I. & Zeren, H. (2002). Giant orf on the nose. *Eur J Dermatol EJD* **12**, 183–185.

- Haig, D. M. & Fleming, S. (1999).** Immunomodulation by virulence proteins of the parapoxvirus orf virus. *Vet Immunol Immunopathol* **72**, 81–86.
- Haig, D. M. & McInnes, C. J. (2002).** Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res* **88**, 3–16.
- Haig, D. M., Thomson, J., McInnes, C. J., Deane, D. L., Anderson, I. E., McCaughan, C. A., Imlach, W., Mercer, A. A., Howard, C. J. & Fleming, S. B. (2002).** A comparison of the anti-inflammatory and immuno-stimulatory activities of orf virus and ovine interleukin-10. *Virus Res* **90**, 303–316.
- Haig, D. M. (2001).** Subversion and piracy: DNA viruses and immune evasion. *Res Vet Sci* **70**, 205–219.
- Haig, D. M. & Mercer, A. A. (1998).** Ovine diseases. Orf. *Vet Res* **29**, 311–326.
- Haig, D. M. & Mercer, A. A. (2008).** Parapoxviruses. In *Encycl Virol 3rd Revis Ed V 1-5*, 3rd edn., pp. 57–63. Academic Press Inc.
- Hammerl, J., Wolf, G. & Berner, H. (1995).** Klinische Untersuchungen zur Wirkung des Paramunitätsinducers Baypamun als Prophylaxe beim MMA-Komplex der Sau **50**, 383–386.
- Hansen. (1879).** Tidsskr Vet 9: 298; cited in Hodgson-Jones IS (1951) Orf in London. *Br Med J* **1**, 795–796.
- Hartmann, K., Block, A., Ferk, G., Beer, B., Vollmar, A. & Lutz, H. (1999).** Treatment of feline leukemia virus (FeLV) infection. *Vet Microbiol* **69**, 111–113.
- Haskell, S. R. R. (Ed.). (2008).** *Blackwell's five-minute veterinary consult: Ruminant*, 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub.
- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C. A., Frimodt-Møller, N. & Aarestrup, F. M. (2014).** Rapid Whole-Genome Sequencing for Detection and Characterization of Microorganisms Directly from Clinical Samples. *J Clin Microbiol* **52**, 139–146.
- Hautaniemi, M., Ueda, N., Tuimala, J., Mercer, A. A., Lahdenpera, J. & McInnes, C. J. (2010).** The genome of pseudocowpoxvirus: comparison of a reindeer isolate and a reference strain. *J Gen Virol* **91**, 1560–1576.
- Hautaniemi, M., Vaccari, F., Scaciarini, A., Laaksonen, S., Huovilainen, A. & McInnes, C. J. (2011).** Analysis of deletion within the reindeer pseudocowpoxvirus genome. *Virus Res* **160**, 326–332.
- Hazelton, P. R. & Gelderblom, H. R. (2003).** Electron Microscopy for Rapid Diagnosis of Emerging Infectious Agents1. *Emerg Infect Dis* **9**, 294–303.
- Hebert, D. M., Samuel, W. M. & Smith, G. W. (1977).** Contagious ecthyma in mountain goat of coastal British Columbia. *J Wildl Dis* **13**, 135–136.
- Henson, J., Tischler, G. & Ning, Z. (2012).** Next-generation sequencing and large genome assemblies. *Pharmacogenomics* **13**, 901–915.
- Hicks, B. D. & Worthy, G. A. (1987).** Sealpox in captive grey seals (*Halichoerus grypus*) and their handlers. *J Wildl Dis* **23**, 1–6.
- Holmes, P., Richey, M., McInnes, C., Wood, A., Schock, A., Wilson, E. & Verney, P. (2011).** Zoonotic transmission of bovine papular stomatitis virus. *Vet Rec* **169**, 235–236.
- Ho, M. S., Tsai, P.-I. & Chien, C.-T. (2006).** F-box proteins: the key to protein degradation. *J Biomed Sci* **13**, 181–191.

- Horner, G. W., Robinson, A. J., Hunter, R., Cox, B. T. & Smith, R. (1987).** Parapoxvirus infections in New Zealand farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J* **35**, 41–45.
- Hosamani, M., Yadav, S., Kallesh, D. J., Mondal, B., Bhanuprakash, V. & Singh, R. K. (2007).** Isolation and characterization of an Indian ORF virus from goats. *Zoonoses Public Health* **54**, 204–208.
- Housawi, F. M., Abu Elzein, E. M., al Afaleq, A. I. & Amin, M. M. (1992).** Sero-surveillance for orf antibodies in sheep and goats in Saudi Arabia employing the ELISA technique. *J Comp Pathol* **106**, 153–158.
- Housawi, F. M., Roberts, G. M., Gilray, J. A., Pow, I., Reid, H. W., Nettleton, P. F., Sumption, K. J., Hibma, M. H. & Mercer, A. A. (1998).** The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein. *Arch Virol* **143**, 2289–2303.
- Housawi, F. M., Abu Elzein, E. M., Gameel, A., Mustafa, M., Al-Afaleq, A. I., Gilray, J., Al-Hulaibi, A. & Nettleton, P. (2004).** Severe Auzdyk infection in one-month old camel calves (*Camelus dromedarius*). *Vet Arch* **74**, 467–474.
- Huang, H., Li, F., Cairns, C. M., Gordon, J. R. & Xiang, J. (2001).** Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 378–382.
- Huemer, H. P., Zobl, A., Windisch, A., Glawischig, W., Büttner, M., Kitchen, M. & Trevisiol, K. (2014).** Serological evidence for Parapoxvirus infection in chamois from the Tyrol regions of Austria and Italy. *Vet Ital* **50**, 233–236.
- Hunnskaar, S. (1986).** Giant orf in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Dermatol* **114**, 631–634.
- Hussain, K. A. & Burger, D. (1989).** In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanism. *Vet Microbiol* **19**, 23–36.
- Iketani, Y., Inoshima, Y., Asano, A., Murakami, K., Shimizu, S. & Sentsui, H. (2002).** Persistent parapoxvirus infection in cattle. *Microbiol Immunol* **46**, 285–291.
- Inder, M. K., Ueda, N., Mercer, A. A., Fleming, S. B. & Wise, L. M. (2007).** Bovine papular stomatitis virus encodes a functionally distinct VEGF that binds both VEGFR-1 and VEGFR-2. *J Gen Virol* **88**, 781–791.
- Inoshima, Y., Shimizu, S., Minamoto, N., Hirai, K. & Sentsui, H. (1999).** 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* **6**, 388–391.
- Inoshima, Y., Murakami, K., Yokoyama, T. & Sentsui, H. (2001).** Genetic heterogeneity among parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capricornis crispus*). *J Gen Virol* **82**, 1215–1220.
- Inoshima, Y., Murakami, K., Wu, D. & Sentsui, H. (2002).** Characterization of parapoxviruses circulating among wild Japanese serows (*Capricornis crispus*). *Microbiol Immunol* **46**, 583–587.
- Inoshima, Y., Nakane, T. & Sentsui, H. (2009).** Severe dermatitis on cattle teats caused by bovine papular stomatitis virus. *Vet Rec* **164**, 311–312.

- Inoshima, Y., Ito, M. & Ishiguro, N. (2010).** Spatial and temporal genetic homogeneity of orf viruses infecting Japanese serows (*Capricornis crispus*). *J Vet Med Sci Jpn Soc Vet Sci* **72**, 701–707.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2012).** *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (A. M. Q. King, Ed.). London ; Waltham, MA: Academic Press.
- Jeckel, S., Bidewell, C., Everest, D., McInnes, C., Wood, A., Dare, J. & Schock, A. (2011).** Severe oesophagitis in an adult bull caused by bovine papular stomatitis virus. *Vet Rec* **169**, 317.
- Jenkinson, D. M., McEWAN, P. E., Moss, V. A., Elder, H. Y. & Reid., H. W. (1990).** Location and Spread of Orf Virus Antigen in Infected Ovine Skin. *Vet Dermatol* **1**, 189–195.
- Jenner, E. (1863).** *On the Origin of the Vaccine Inoculation*. London, Soho: G. Elsieck.
- Jolly, R. D. & Daniel, R. C. (1966).** Papular stomatitis of cattle. *N Z Vet J* **14**, 168–170.
- Kennedy, C. T. & Lyell, A. (1984).** Perianal orf. *J Am Acad Dermatol* **11**, 72–74.
- Kieleczawa, J. (2006).** Fundamentals of sequencing of difficult templates-an overview. *J Biomol Tech JBT* **17**, 207–217.
- Kitchen, M., Müller, H., Zobl, A., Windisch, A., Romani, N. & Huemer, H. (2014).** ORF virus infection in a hunter in Western Austria, presumably transmitted by game. *Acta Derm Venereol* **94**, 212–214.
- Klein, J. & Tryland, M. (2005).** Characterisation of parapoxviruses isolated from Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Virol J* **2**, 79.
- Kottaridi, C., Nomikou, K., Teodori, L., Savini, G., Lelli, R., Markoulatos, P. & Mangana, O. (2006).** Phylogenetic correlation of Greek and Italian orf virus isolates based on VIR gene. *Vet Microbiol* **116**, 310–316.
- Kuhl, J. T., Huerter, C. J. & Hashish, H. (2003).** A case of human orf contracted from a deer. *Cutis* **71**, 288–290.
- Kuroda, Y., Yoshida, M., Shibahara, T., Matsui, T., Nakane, T., Hara, H., Inoshima, Y. & Sentsui, H. (1999).** An epidemic of parapoxvirus infection among cattle: isolation and antibody survey. *J Vet Med Sci Jpn Soc Vet Sci* **61**, 749–753.
- Kyriakis, S. C., Tzika, E. D., Lyras, D. N., Tsinas, A. C., Saoulidis, K. & Sarri, K. (1998).** Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. *Res Vet Sci* **64**, 187–190.
- Kyriakis, S. C., Saoulidis, K., Lekkas, S., Miliotis, C. C., Papoutsis, P. A. & Kennedy, S. (2002).** The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* **126**, 38–46.
- Lance, W. R., Hibler, C. P. & DeMartini, J. (1983).** Experimental contagious ecthyma in mule deer, white-tailed deer, pronghorn and wapiti. *J Wildl Dis* **19**, 165–169.
- Lard, S. L., Roehrig, J. T. & Pearson, L. D. (1991).** Differentiation of parapoxviruses by application of orf virus-specific monoclonal antibodies against cell surface proteins. *Vet Immunol Immunopathol* **28**, 247–258.
- Lateef, Z., Baird, M. A., Wise, L. M., Mercer, A. A. & Fleming, S. B. (2009).** Orf virus-encoded chemokine-binding protein is a potent inhibitor of inflammatory monocyte recruitment in a mouse skin model. *J Gen Virol* **90**, 1477–1482.

- Lateef, Z., Baird, M. A., Wise, L. M., Young, S., Mercer, A. A. & Fleming, S. B. (2010). The chemokine-binding protein encoded by the poxvirus orf virus inhibits recruitment of dendritic cells to sites of skin inflammation and migration to peripheral lymph nodes. *Cell Microbiol* **12**, 665–676.
- Lear, A. (1995). *The Characterisation of the Ovine Skin Response to Orf Virus Infection*. Edinburgh University.
- Lederman, E., Tao, M., Reynolds, M., Li, Y., Zhao, H., Smith, S., Sitler, L., Haberling, D., Davidson, W. & other authors. (2013). An Investigation of a Cluster of Parapoxvirus Cases in Missouri, Feb–May 2006: Epidemiologic, Clinical and Molecular Aspects. *Animals* **3**, 142–157.
- Lederman, E. R., Green, G. M., DeGroot, H. E., Dahl, P., Goldman, E., Greer, P. W., Li, Y., Zhao, H., Paddock, C. D. & Damon, I. K. (2007). Progressive ORF virus infection in a patient with lymphoma: successful treatment using imiquimod. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **44**, e100–103.
- Leonard, D., Otter, A., Everest, D., Wood, A., McInnes, C. & Schock, A. (2009). Unusual bovine papular stomatitis virus infection in a British dairy cow. *Vet Rec* **164**, 65–65.
- Li, H. & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl* **25**, 1754–1760.
- Li, H., Zhu, X., Zheng, Y., Wang, S., Liu, Z., Dou, Y., Li, H., Cai, X. & Luo, X. (2013). Phylogenetic analysis of two Chinese orf virus isolates based on sequences of B2L and VIR genes. *Arch Virol* **158**, 1477–1485.
- Li, J., Mahajan, A. & Tsai, M.-D. (2006). Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry (Mosc)* **45**, 15168–15178.
- Li, W., Ning, Z., Hao, W., Song, D., Gao, F., Zhao, K., Liao, X., Li, M., Rock, D. L. & Luo, S. (2012). Isolation and phylogenetic analysis of orf virus from the sheep herd outbreak in northeast China. *BMC Vet Res* **8**, 229.
- Li, Y., Meyer, H., Zhao, H. & Damon, I. K. (2009). GC Content-Based Pan-Pox Universal PCR Assays for Poxvirus Detection. *J Clin Microbiol* **48**, 268–276.
- Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., Wain, J. & Pallen, M. J. (2012). Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* **30**, 434–439.
- Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A. & Robinson, A. J. (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* **68**, 84–92.
- MacNeil, A., Lederman, E., Reynolds, M. G., Ragade, N. J., Talken, R., Friedman, D., Hall, W., Shwe, T., Li, Y. & other authors. (2010). Diagnosis of Bovine-Associated Parapoxvirus Infections in Humans: Molecular and Epidemiological Evidence. *Zoonoses Public Health* **57**, e161–164.
- Mardis, E. R. (2008). Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**, 387–402.
- Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 560–564.

- Mayr, A. (1999).** Paraspezifische Vaccinen aus Pockenviren (Paramunitätsinducer): eine neue Art von Impfstoff. *Ärztz Für Naturheilverfahren* **40**, 550–557.
- Mayr, A. & Büttner, M. (1990).** Ecthyma (Orf) virus. In *Virus Infections of Ruminants*, vol. 3(7), pp. 33–42. Edited by Z. Dinter & B. Morein. Amsterdam: Elsevier.
- Mayr, A. & Büttner, M. (1992).** Paraspezifisches Immunsystem, Paraimmunisierung, Paraimmunität. *Vet* **7**, 31–37.
- Mayr, A., Herlyn, M., Mahnel, H., Danco, A., Zach, A. & Bostedt, H. (1981).** [Control of ecthyma contagiosum (pustular dermatitis) of sheep with a new parenteral cell culture live vaccine]. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B J Vet Med Ser B* **28**, 535–552.
- Mayr, A., Büttner, M., Pawlas, S., Erfle, V., Mayr, B., Brunner, R. & Osterkorn, K. (1986).** [Comparative studies of the immunostimulating (paramunizing) effectiveness of BCG, levamisole, Corynebacterium parvum and preparations of pock viruses in various in vivo and in vitro tests]. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B J Vet Med Ser B* **33**, 321–339.
- Mayr, B., Deininger, S. & Büttner, M. (1991).** Treatment of chronic stomatitis of cats by local paramunization with PIND-ORF. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B J Vet Med Ser B* **38**, 78–80.
- Mazur, C. & Machado, R. D. (1989).** Detection of contagious pustular dermatitis virus of goats in a severe outbreak. *Vet Rec* **125**, 419–420.
- Mazur, C., Ferreira, I. ., Rangel Filho, F. . & Galler, R. (2000).** Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. *Vet Microbiol* **73**, 253–259.
- McFadden, G. (2005).** Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**, 201–213.
- McGuire, M. J., Johnston, S. A. & Sykes, K. F. (2012).** Novel immune-modulator identified by a rapid, functional screen of the parapoxvirus ovis (Orf virus) genome. *Proteome Sci* **10**, 4.
- McInnes, C. J. (2006).** Genomic characterization of a novel poxvirus contributing to the decline of the red squirrel (Sciurus vulgaris) in the UK. *J Gen Virol* **87**, 2115–2125.
- McInnes, C. J., Wood, A. R. & Mercer, A. A. (1998).** Orf virus encodes a homolog of the vaccinia virus interferon-resistance gene E3L. *Virus Genes* **17**, 107–115.
- McInnes, C. J., Wood, A. R., Nettleton, P. E. & Gilray, J. A. (2001).** Genomic comparison of an avirulent strain of Orf virus with that of a virulent wild type isolate reveals that the Orf virus G2L gene is non-essential for replication. *Virus Genes* **22**, 141–150.
- McInnes, C. J., Deane, D., Haig, D., Percival, A., Thomson, J. & Wood, A. R. (2005).** Glycosylation, disulfide bond formation, and the presence of a WSXWS-like motif in the orf virus GIF protein are critical for maintaining the integrity of Binding to ovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. *J Virol* **79**, 11205–11213.
- McInnes, C. J., Coulter, L., Dagleish, M. P., Fiegna, C., Gilray, J., Willoughby, K., Cole, M., Milne, E., Meredith, A. & other authors. (2009).** First cases of squirrelpox in red squirrels (Sciurus vulgaris) in Scotland. *Vet Rec* **164**, 528–531.
- McKeever, D. J. & Reid, H. W. (1986).** Survival of orf virus under British winter conditions. *Vet Rec* **118**, 613–614.

- McKeever, D. J., Reid, H. W., Inglis, N. F. & Herring, A. J. (1987).** A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. *Vet Microbiol* **15**, 229–241.
- McKeever, D. J., Jenkinson, D. M., Hutchison, G. & Reid, H. W. (1988).** Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *J Comp Pathol* **99**, 317–328.
- McNiece, I. (Ed.). (1997).** *Interleukin-3 and the colony-stimulating factors. in Cytokines in health and disease*, 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker.
- Menna, A., Wittek, R., Bachmann, P. A., Mayr, A. & Wyler, R. (1979).** Physical characterization of a stomatitis papulosa virus genome: a cleavage map for the restriction endonucleases HindIII and EcoRI. *Arch Virol* **59**, 145–156.
- Mercer, A., Fleming, S., Robinson, A., Nettleton, P. & Reid, H. (1997).** Molecular genetic analyses of parapoxviruses pathogenic for humans. *Arch Virol Suppl* **13**, 25–34.
- Mercer, A. A., Fraser, K., Barns, G. & Robinson, A. J. (1987).** The structure and cloning of orf virus DNA. *Virology* **157**, 1–12.
- Mercer, A. A., Fleming, S. B. & Ueda, N. (2005).** F-box-like domains are present in most poxvirus ankyrin repeat proteins. *Virus Genes* **31**, 127–133.
- Mercer, A. A., Ueda, N., Friederichs, S.-M., Hofmann, K., Fraser, K. M., Bateman, T. & Fleming, S. B. (2006).** Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus Res* **116**, 146–158.
- Merck Manual. (2013, December).** Pseudocowpox.
http://www.merckmanuals.com/vet/integumentary_system/pox_diseases/pseudocowpox.html.
- Metzker, M. L. (2010).** Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* **11**, 31–46.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H. J. & Dehio, C. (1999).** A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **18**, 363–374.
- Midilli, K., Erki1iç, A., Kuşku1u, M., Analay, H., Erki1iç, S., Benzonana, N., Yildirim, M. S., Mülayim, K., Acar, H. & Ergonul, O. (2013).** Nosocomial outbreak of disseminated orf infection in a burn unit, Gaziantep, Turkey, October to December 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* **18**, 20425.
- Modrow, S., Falke, D., Schätzl, H. & Truyen, U. (2008).** *Pockenviren. In Molekulare Virologie*. Heidelberg, Neckar: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mohamed, M. R. & McFadden, G. (2009).** NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle Georget Tex* **8**, 3125–3132.
- Mo, M., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2010).** Orf virus cell cycle regulator, PACR, competes with subunit 11 of the anaphase promoting complex for incorporation into the complex. *J Gen Virol* **91**, 3010–3015.
- Mo, M., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2009).** Cell cycle deregulation by a poxvirus partial mimic of anaphase-promoting complex subunit 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19527–19532.

- Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A. & Mosmann, T. R. (1990).** Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* **248**, 1230–1234.
- Moore, K. W., O’Garra, A., Malefyt, R. W., Vieira, P. & Mosmann, T. R. (1993).** Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* **11**, 165–190.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. & Peng, Z. (2004).** The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* **13**, 1435–1448.
- Moss, B. (1996).** *Poxviridae: the viruses and their replication*. In *Fields Virology*, 3rd ed, pp. 2637–2671. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Moss, B. (2001).** *Poxviridae: the viruses and their replication*. In *Fields Virology*, 4th ed, pp. 2849–2883. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Müller, G., Gröters, S., Siebert, U., Rosenberger, T., Driver, J., König, M., Becher, P., Hetzel, U. & Baumgärtner, W. (2003).** Parapoxvirus infection in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German North Sea. *Vet Pathol* **40**, 445–454.
- Munz, E., Schillinger, D., Reimann, M. & Mahnel, H. (1986).** Electron microscopical diagnosis of Ecthyma contagiosum in camels (*Camelus dromedarius*). First report of the disease in Kenya. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B J Vet Med Ser B* **33**, 73–77.
- Nagarajan, G., Ghorui, S. K., Kumar, S. & Pathak, K. M. L. (2010).** Complete nucleotide sequence of the envelope gene of pseudocowpox virus isolates from Indian dromedaries (*Camelus dromedarius*). *Arch Virol* **155**, 1725–1728.
- Nagarajan, G., Swami, S. K., Dahiya, S. S., Sivakumar, G., Narnaware, S. D., Tuteja, F. C. & Patil, N. V. (2011).** Sequence analysis of topoisomerase gene of pseudocowpox virus isolates from camels (*Camelus dromedarius*). *Virus Res* **158**, 277–280.
- Nagington, J. & Horne, R. W. (1962).** Morphological studies of orf and vaccinia viruses. *Virology* **16**, 248–260.
- Nagington, J., Plowright, W. & Horne, R. W. (1962).** The morphology of bovine papular stomatitis virus. *Virology* **17**, 361–364.
- Nagington, J., Newton, A. A. & Horne, R. W. (1964).** The structure of orf virus. *Virology* **23**, 461–472.
- Nandi, S., De, U. K. & Chowdhury, S. (2011).** Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep—A global perspective. *Small Rumin Res* **96**, 73–82.
- Naulty, F., Everest, D., Warnock, N. D., Phelan, K. & Callanan, J. J. (2013).** Squirrelpox virus in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in the Republic of Ireland. *J Wildl Dis* **49**, 1070–1073.
- Ndikuwera, J., Odiawo, G. O., Usenik, E. A., Kock, N. D., Ogaa, J. S. & Kuiper, R. (1992).** Chronic contagious ecthyma and caseous lymphadenitis in two Boer goats. *Vet Rec* **131**, 584–585.
- Nettleton, P. F., Munro, R., Pow, I., Gilray, J., Gray, E. W. & Reid, H. W. (1995).** Isolation of a parapoxvirus from a grey seal (*Halichoerus grypus*). *Vet Rec* **137**, 562–564.
- Nettleton, P. F., Brebner, J., Pow, I., Gilray, J. A., Bell, G. D. & Reid, H. W. (1996).** Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *Vet Rec* **138**, 184–186.
- Nettleton, P. F., Gilray, J. A., Reid, H. W. & Mercer, A. A. (2000).** Parapoxviruses are strongly inhibited in vitro by cidofovir. *Antiviral Res* **48**, 205–208.

- Nitsche, A., Büttner, M., Wilhelm, S., Pauli, G. & Meyer, H. (2005). Real-Time PCR Detection of Parapoxvirus DNA., *Clin Chem* **52**, 316–319.
- Nollens, H. H., Gulland, F. M. D., Jacobson, E. R., Hernandez, J. A., Klein, P. A., Walsh, M. T. & Condit, R. C. (2006a). Parapoxviruses of seals and sea lions make up a distinct subclade within the genus Parapoxvirus. *Virology* **349**, 316–324.
- Nollens, H. H., Gulland, F. M. D., Hernandez, J. A., Condit, R. C., Klein, P. A., Walsh, M. T. & Jacobson, E. R. (2006b). Seroepidemiology of parapoxvirus infections in captive and free-ranging California sea lions *Zalophus californianus*. *Dis Aquat Organ* **69**, 153–161.
- Nollens, H. H., Jacobson, E. R., Gulland, F. M. D., Beusse, D. O., Bossart, G. D., Hernandez, J. A., Klein, P. A. & Condit, R. C. (2006c). Pathology and preliminary characterization of a parapoxvirus isolated from a California sea lion (*Zalophus californianus*). *J Wildl Dis* **42**, 23–32.
- Nougairede, A., Fossati, C., Salez, N., Cohen-Bacrie, S., Ninove, L., Michel, F., Aboukais, S., Buttner, M., Zandotti, C. & other authors. (2013). Sheep-to-Human Transmission of Orf Virus during Eid al-Adha Religious Practices, France. *Emerg Infect Dis* **19**, 102–105.
- Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. (2009). The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000034–a000034.
- Ohno, Y., Inoshima, Y., Maeda, K. & Ishiguro, N. (2011). Molecular analysis of parapoxvirus from a spotted seal *Phoca largha* in Japan. *Dis Aquat Organ* **97**, 11–16.
- Okada, H. M., Chihaya, Y. & Matsukawa, K. (1987). An ultrastructural observation of esophageal lesion in bovine papular stomatitis. *Nihon Juigaku Zasshi Jpn J Vet Sci* **49**, 729–731.
- De Oliveira, C. H. S., Assis, F. L., Neto, J. D. B., Oliveira, C. M. C., Lopes, C. T. de A., Bomjardim, H. D. A., Vinhote, W. M. S., Silva, A. G. M., Abrahão, J. S. & Kroon, E. G. (2012). Multifocal cutaneous ORF virus infection in goats in the Amazon region, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N* **12**, 336–340.
- Ortega, C., Ruiz, I., De Blas, I., Muzquiz, J. L., Fernandez, A. & Alonso, J. L. (1996). Furunculosis control using a paraimmunization stimulant (Baypamun) in rainbow trout. *Vet Res* **27**, 561–568.
- Osadebe, L. U., Manthiram, K., McCollum, A. M., Li, Y., Emerson, G. L., Gallardo-Romero, N. F., Doty, J. B., Wilkins, K., Zhao, H. & other authors. (2015). Novel poxvirus infection in 2 patients from the United States. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **60**, 195–202.
- Osterhaus, A. (1995). Comment on: Isolation of parapoxvirus from grey seals (Nettelton et al.). *Vet Rec* **136**, 108.
- Osterhaus, A. D., Broeders, H. W., Visser, I. K., Teppema, J. S. & Kuiken, T. (1994). Isolation of a parapoxvirus from pox-like lesions in grey seals. *Vet Rec* **135**, 601–602.
- Paillot, R. (2013). A systematic review of the immune-modulators Parapoxvirus ovis and *Propionibacterium acnes* for the prevention of respiratory disease and other infections in the horse. *Vet Immunol Immunopathol* **153**, 1–9.
- Pasparakis, M. (2009). Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* **9**, 778–788.
- Peters, J. M. (1999). Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res* **248**, 339–349.

- Pospischil, A. & Bachmann, P. A. (1980).** Nuclear changes in cells infected with parapoxviruses stomatitis papulosa and orf: an in vivo and in vitro ultrastructural study. *J Gen Virol* **47**, 113–121.
- Dal Pozzo, F., Martinelle, L., Gallina, L., Mast, J., Sarradin, P., Thiry, E., Scagliarini, A., Buttner, M. & Saegerman, C. (2011).** Original Findings Associated with Two Cases of Bovine Papular Stomatitis. *J Clin Microbiol* **49**, 4397–4400.
- Revenga, F., Paricio, J. F., del Agua, C. & Merino, F. J. (2001).** Facial orf. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* **15**, 80–81.
- Rintoul, J. L., Lemay, C. G., Tai, L.-H., Stanford, M. M., Falls, T. J., de Souza, C. T., Bridle, B. W., Daneshmand, M., Ohashi, P. S. & other authors. (2012).** ORFV: A Novel Oncolytic and Immune Stimulating Parapoxvirus Therapeutic. *Mol Ther* **20**, 1148–1157.
- Robinson, A. J. & Balassu, T. C. (1981).** Contagious pustular dermatitis (orf). *Vet Bull* **51**, 771–782.
- Robinson, A. J. & Mercer, A. A. (1995).** Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus. *Virology* **208**, 812–815.
- Robinson, A. J. & Petersen, G. V. (1983).** Orf virus infection of workers in the meat industry. *N Z Med J* **96**, 81–85.
- Robinson, A. J., Ellis, G. & Balassu, T. (1982).** The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep. *Arch Virol* **71**, 43–55.
- Rochester, S. C. & Traktman, P. (1998).** Characterization of the single-stranded DNA binding protein encoded by the vaccinia virus I3 gene. *J Virol* **72**, 2917–2926.
- Rode, H. J., Janssen, W., Rösen-Wolff, A., Bugert, J. J., Thein, P., Becker, Y. & Darai, G. (1993).** The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene. *Virus Genes* **7**, 111–116.
- Roess, A. A., Galan, A., Kitces, E., Li, Y., Zhao, H., Paddock, C. D., Adem, P., Goldsmith, C. S., Miller, D. & other authors. (2010).** Novel deer-associated parapoxvirus infection in deer hunters. *N Engl J Med* **363**, 2621–2627.
- Rohde, J., Amann, R. & Rziha, H.-J. (2013).** New Orf virus (Parapoxvirus) recombinant expressing H5 hemagglutinin protects mice against H5N1 and H1N1 influenza A virus. *PloS One* **8**, e83802.
- Rollins, B. J. (1997).** Chemokines. *Blood* **90**, 909–928.
- Rørdam, O. M., Grimstad, Ø., Spigset, O. & Ryggen, K. (2013).** Giant orf with prolonged recovery in a patient with psoriatic arthritis treated with etanercept. *Acta Derm Venereol* **93**, 487–488.
- Rosliakov, A. A. (1972).** [Comparative ultrastructure of viruses of camel pox, pox-like disease of camels (‘auzdyk’) and contagious ecthyma of sheep]. *Vopr Virusol* **17**, 26–30.
- Rushton, S. P., Lurz, P. W. W., Gurnell, J. & Fuller, R. (2000).** Modelling the spatial dynamics of parapoxvirus disease in red and grey squirrels: a possible cause of the decline in the red squirrel in the UK? *J Appl Ecol* **37**, 997–1012.
- Rziha, H.-J., Henkel, M., Cottone, R., Bauer, B., Auge, U., Götz, F., Pfaff, E., Röttgen, M., Dehio, C. & Büttner, M. (2000).** Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *J Biotechnol* **83**, 137–145.

- Rziha, H.-J., Bauer, B., Adam, K.-H., Röttgen, M., Cottone, R., Henkel, M., Dehio, C. & Büttner, M. (2003).** Relatedness and heterogeneity at the near-terminal end of the genome of a parapoxvirus bovis 1 strain (B177) compared with parapoxvirus ovis (Orf virus). *J Gen Virol* **84**, 1111–1116.
- Sainsbury, A. W., Nettleton, P., Gilray, J. & Gurnell, J. (2000).** Grey squirrels have high seroprevalence to a parapoxvirus associated with deaths in red squirrels. *Anim Conserv* **3**, 229–233.
- Samemaleki, E., Mahmoudi, M., Akhtari, K. & Alizadeh, M. (2014).** Case report of pseudocowpox in a 3 years old cow and the resulting lesions in a 35 years old woman. *Eur J Exp Biol* **4**, 142–144.
- Samuel, C. E. (2001).** Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778–809, table of contents.
- Samuel, W. M., Chalmers, G. A., Stelfox, J. G., Loewen, A. & Thomsen, J. J. (1975).** Contagious ecthyma in bighorn sheep and mountain goat in western Canada. *J Wildl Dis* **11**, 26–31.
- Sanchez, R. L., Hebert, A., Lucia, H. & Swedo, J. (1985).** Orf. A case report with histologic, electron microscopic, and immunoperoxidase studies. *Arch Pathol Lab Med* **109**, 166–170.
- Sanger, F. & Coulson, A. R. (1975).** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **94**, 441–448.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463–5467.
- Savage, J. & Black, M. M. (1972).** ‘Giant’ orf of finger in a patient with a lymphoma. *Proc R Soc Med* **65**, 766–768.
- Savory, L. J., Stacker, S. A., Fleming, S. B., Niven, B. E. & Mercer, A. A. (2000).** Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection. *J Virol* **74**, 10699–10706.
- Scagliarini, A., Ciulli, S., Battilani, M., Jacoboni, I., Montesi, F., Casadio, R. & Prosperi, S. (2002).** Characterisation of immunodominant protein encoded by the F1L gene of orf virus strains isolated in Italy. *Arch Virol* **147**, 1989–1995.
- Scagliarini, A., Vaccari, F., Turrini, F., Bianchi, A., Cordioli, P. & Lavazza, A. (2011).** Parapoxvirus Infections of Red Deer, Italy. *Emerg Infect Dis* **17**, 684–687.
- Scagliarini, A., Piovesana, S., Turrini, F., Savini, F., Sithole, F. & McCrindle, C. M. (2012).** Orf in South Africa: Endemic but neglected. *Onderstepoort J Vet Res* **79**.
- Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E. J., Shida, H., Hiller, G. & Griffiths, G. (1994).** Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol* **68**, 130–147.
- Schnurrenberger, P. R., Swango, L. J., Bowman, G. M. & Luttgen, P. J. (1980).** Bovine papular stomatitis incidence in veterinary students. *Can J Comp Med Rev Can Médecine Comparée* **44**, 239–243.
- Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A. & McFadden, G. (2003a).** Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* **21**, 377–423.
- Seet, B. T., McCaughan, C. A., Handel, T. M., Mercer, A., Brunetti, C., McFadden, G. & Fleming, S. B. (2003b).** Analysis of an orf virus chemokine-binding protein: Shifting ligand specificities among a family of poxvirus viroceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15137–15142.

- Selbitz, H.-J., Alber, G., Truyen, U., Valentin-Weigand, P., Rolle, M. & Mayr, A. (2011). *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.*, 420–434. Stuttgart: Enke.
- Sen, G. C. (2001). Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**, 255–281.
- Senkevich, T. G., Bugert, J. J., Sisler, J. R., Koonin, E. V., Darai, G. & Moss, B. (1996). Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. *Science* **273**, 813–816.
- Sentsui, H., Inoshima, Y., Minami, A., Yamamoto, Y., Murakami, K. & Shimizu, S. (2000). Survey on Antibody against Parapoxvirus among Cattle in Japan. *Microbiol Immunol* **44**, 73–76.
- Shelley, W. B. & Shelley, E. D. (1983). Farmyard pox: parapox virus infection in man. *Br J Dermatol* **108**, 725–727.
- Siebert, M. (1988). *Untersuchungen über den Einfluss des paraspezifischen Immunstimulans 'PIND-ORF' (Paramunitätsinducer) auf den durch Transportstress ausgelösten Kortisolanstieg beim Voll- und Warmblut.* Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Simpson, V. R., Stuart, N. C., Stack, M. J., Ross, H. A. & Head, J. C. (1994). Parapox infection in grey seals (*Halichoerus grypus*) in Cornwall. *Vet Rec* **134**, 292–296.
- Skinner, M. A., Buller, R. M., Damon, I. K., Lefkowitz, E. J., McFadden, G., McInnes, C. J., Mercer, A. A., Moyer, B. & Upton, C. (2012). *Poxviridae. In Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (A. M. Q. King, Ed.). London ; Waltham, MA: Academic Press.
- Slobedman, B., Barry, P. A., Spencer, J. V., Avdic, S. & Abendroth, A. (2009). Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J Virol* **83**, 9618–9629.
- Smith, K. J., Skelton, H. G., James, W. D. & Lupton, G. P. (1991). Parapoxvirus infections acquired after exposure to wildlife. *Arch Dermatol* **127**, 79–82.
- Sonnberg, S., Seet, B. T., Pawson, T., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2008). Poxvirus ankyrin repeat proteins are a unique class of F-box proteins that associate with cellular SCF1 ubiquitin ligase complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10955–10960.
- Spehner, D., De Carlo, S., Drillien, R., Weiland, F., Mildner, K., Hanau, D. & Rziha, H.-J. (2004). Appearance of the bona fide spiral tubule of ORF virus is dependent on an intact 10-kilodalton viral protein. *J Virol* **78**, 8085–8093.
- Steeb, J. H. (1787). *Von der Schaaf-Raude (Grind) und wie derselben durch Polizei-Anstalten gesteuert werden kan.* Tübingen: Heerbrandt.
- Steinhart, B. (2005). Orf in humans: dramatic but benign. *CJEM* **7**, 417–419.
- Strube, W., Kretzdorn, D., Grunmach, J., Bergle, R. D. & Thein, P. (1989). [The effectiveness of the paramunity inducer Baypamun (PIND-ORF) for the prevention and metaphylaxis of an experimental infection with the infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle]. *Tierärztl Prax* **17**, 267–272.
- Sullivan, J. T., Mercer, A. A., Fleming, S. B. & Robinson, A. J. (1994). Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K. *Virology* **202**, 968–973.

- Suzuki, T., Minamoto, N., Sugiyama, M., Kinjo, T., Suzuki, Y., Sugimura, M. & Atoji, Y. (1993). Isolation and antibody prevalence of a parapoxvirus in wild Japanese serows (*Capricornis crispus*). *J Wildl Dis* **29**, 384–389.
- Tcherepanov, V., Ehlers, A. & Upton, C. (2006). Genome Annotation Transfer Utility (GATU): rapid annotation of viral genomes using a closely related reference genome. *BMC Genomics* **7**, 150.
- Thomas, K. (2003). A novel poxvirus lethal to red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *J Gen Virol* **84**, 3337–3341.
- Thomas, V., Flores, L. & Holowczak, J. A. (1980). Biochemical and electron microscopic studies of the replication and composition of milker's node virus. *J Virol* **34**, 244–255.
- Tikkanen, M. K., McInnes, C. J., Mercer, A. A., Büttner, M., Tuimala, J., Hirvelä-Koski, V., Neuvonen, E. & Huovilainen, A. (2004). Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox virus. *J Gen Virol* **85**, 1413–1418.
- Tompkins, D. M., Sainsbury, A. W., Nettleton, P., Buxton, D. & Gurnell, J. (2002). Parapoxvirus causes a deleterious disease in red squirrels associated with UK population declines. *Proc Biol Sci* **269**, 529–533.
- Treangen, T. J. & Salzberg, S. L. (2012). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet* **13**, 36–46.
- Tripathi, P. & Aggarwal, A. (2006). NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Curr Sci India* **90**, 519–531.
- Tryland, M., Klein, J., Nordøy, E. S. & Blix, A. S. (2005). Isolation and partial characterization of a parapoxvirus isolated from a skin lesion of a Weddell seal. *Virus Res* **108**, 83–87.
- Turan, E., Yesilova, Y. & Ucmak, D. (2013). A case of orf (ecthyma contagiosum) with multiple lesions. *JPMA J Pak Med Assoc* **63**, 786–787.
- Turk, B. G., Senturk, B., Dereli, T. & Yaman, B. (2014). A rare human-to-human transmission of orf. *Int J Dermatol* **53**, e63–65.
- Ueda, N., Wise, L. M., Stacker, S. A., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2003). Pseudocowpox virus encodes a homolog of vascular endothelial growth factor. *Virology* **305**, 298–309.
- Ueda, N., Inder, M. K., Wise, L. M., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2007). Parapoxvirus of red deer in New Zealand encodes a variant of viral vascular endothelial growth factor. *Virus Res* **124**, 50–58.
- Upton, C., Slack, S., Hunter, A. L., Ehlers, A. & Roper, R. L. (2003). Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. *J Virol* **77**, 7590–7600.
- Uzel, M., Sasmaz, S., Bakaris, S., Cetinus, E., Bilgic, E., Karaoguz, A., Ozkul, A. & Arican, O. (2005). A viral infection of the hand commonly seen after the feast of sacrifice: human orf (orf of the hand). *Epidemiol Infect* **133**, 653–657.
- Vallabhapurapu, S. & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* **27**, 693–733.
- Vikøren, T., Lillehaug, A., Akerstedt, J., Bretten, T., Haugum, M. & Tryland, M. (2008). A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-ranging musk ox (*Ovibos moschatus*) population in Norway. *Vet Microbiol* **127**, 10–20.

- Voronin, D. A. & Kiseleva, E. V. (2008). Functional role of proteins containing ankyrin repeats. *Cell Tissue Biol* 2, 1–12.
- De Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H. & de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174, 915–924.
- Weber, O., Siegling, A., Friebe, A., Limmer, A., Schlapp, T., Knolle, P., Mercer, A., Schaller, H. & Volk, H.-D. (2003). Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol* 84, 1843–1852.
- Weisfelner, M. E. & Gottlieb, A. B. (2003). The role of apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J Drugs Dermatol JDD* 2, 385–391.
- Wilson, D. J. & McFarlane, L. (2012). Contagious ecthyma in a Rocky Mountain bighorn sheep from Utah. *Hum-Wildl Interact* 6, 7–11.
- Wilson, T. M., Cheville, N. F. & Karstad, L. (1969). Seal pox. *Bull Wildl Dis Assoc* 5., 412–418.
- Winnicka, A., Klucinski, W., Kawiak, J., Hoser, G. & Sikora, J. (2000). Effect of Baypamun on blood leucocytes in normal and dexamethasone treated goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47, 385–394.
- Wise, L. M., Veikkola, T., Mercer, A. A., Savory, L. J., Fleming, S. B., Caesar, C., Vitali, A., Makinen, T., Alitalo, K. & Stacker, S. A. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3071–3076.
- Wise, L. M., Ueda, N., Dryden, N. H., Fleming, S. B., Caesar, C., Roufail, S., Achen, M. G., Stacker, S. A. & Mercer, A. A. (2003). Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens. *J Biol Chem* 278, 38004–38014.
- Wise, L. M., Inder, M. K., Real, N. C., Stuart, G. S., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2012). The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cell Microbiol* 14, 1376–1390.
- Wise, L. M., Stuart, G. S., Real, N. C., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2014). Orf virus IL-10 accelerates wound healing while limiting inflammation and scarring. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 22, 356–367.
- Wittek, R., Herlyn, M., Schümperli, D., Bachmann, P. A., Mayr, A. & Wyler, R. (1980). Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains. *Intervirology* 13, 33–41.
- Yaegashi, G., Sasaki, I., Chiba, S. & Murakami, K. (2013). Molecular Analysis of Parapoxvirus Detected in Eight Calves in Japan. *J Vet Med Sci*.
- Yang, H., Meng, Q., Qiao, J., Peng, Y., Xie, K., Liu, Y., Zhao, H., Cai, X. & Chen, C. (2014). Detection of genetic variations in Orf virus isolates epidemic in Xinjiang China. *J Basic Microbiol* 54, 1273–1278.
- Yeruham, I., Abraham, A. & Nyska, A. (1994). Clinical and pathological description of a chronic form of bovine papular stomatitis. *J Comp Pathol* 111, 279–286.

- Yirrell, D. L., Vestey, J. P. & Norval, M. (1994).** Immune responses of patients to orf virus infection. *Br J Dermatol* **130**, 438–443.
- Zeedan, G. S. G., Hassanain, M. A. & Shaapan, R. M. (2014).** Isolation of Parapoxviruses from Skin Lesion of Man and Animals in Middle Egypt. *Glob Vet* **12**, 19–25.
- Zhao, K., Song, D., He, W., Lu, H., Zhang, B., Li, C., Chen, K. & Gao, F. (2010).** Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China. *Vet Microbiol* **142**, 408–415.
- Ziebell, K. L., Steinmann, H., Kretzdorn, D., Schlapp, T., Failing, K. & Schmeer, N. (1997a).** The use of Baypamun N in crowding associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4-10 month old horses. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B J Vet Med Ser B* **44**, 529–536.
- Ziebell, K. L., Kretzdorn, D., Auer, S., Failing, K. & Schmeer, N. (1997b).** The use of Baypamun N in crowding-associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 2-week-old veal calves. *J Vet Med Ser B* **44**, 415–424.
- Zlotnik, A. & Yoshie, O. (2000).** Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121–127.

VIII ANHANG

Tabelle 1 Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Parapockenviren

PPV Spezies	Isolat	Wirt	Überträger- wirt	Jahr der Isolation	Land	Referenz	GenBank ACC# ORF 011 (B2L)	GenBank ACC# ORF 032	GenBank ACC# Gesamtgenom
BPSV	V660	Rind	-	1974	Deutschland	Menna <i>et al.</i> , 1979	KF478805	KF478817	n/a
BPSV	V590	Rind	-	1975	Deutschland	Witek <i>et al.</i> , 1980	b	g	n/a
BPSV	Iran	Rind	-	1979	Iran	Hessami <i>et al.</i> , 1979	b	h	n/a
BPSV	B 177	Rind	-	1984	Deutschland	Rziha <i>et al.</i> 2002	n/a	n/a	n/a
BPSV	B040	Rind	-	2001	Deutschland	Dal Pozzo <i>et al.</i> , 2011	b	f	n/a
BPSV	AR02 ^a	Rind	-	2002	Arkansas, USA	Delhon <i>et al.</i> 2004	AY386265.1	AY386265.1	AY386265.1
BPSV	30/03	Rind	-	2003	Kamerun	Dal Pozzo <i>et al.</i> , 2011	b	KF478819	n/a
BPSV	BPS 2/07	Rind (Euter)	-	2007	Deutschland	Publikation 1	KF478806	KF478818	n/a
BPSV	EDI (DNA)	Rind (Ösophagus Läsion)	-	n/a	Schottland	Jeckel <i>et al.</i> , 2011	n/a	n/a	n/a
BPSV	C404 (DNA)	Rind	-	n/a	Schottland	Moredun Research Institute	n/a	n/a	n/a
PCPV	VR634 ^a	Mensch	Rind	1963	Neuseeland	Friedman-Kien <i>et al.</i> , 1963; Gassmann <i>et al.</i> , 1985	GQ329670.1	GQ329670.1	GQ329670.1
PCPV	B074	Mensch	Rind	1995	Deutschland	Nitsche <i>et al.</i> , 2005, Deane <i>et al.</i> , 2009	KF478803	KF478814	n/a
PCPV	B021	Mensch	Rind	1997	Deutschland	Nitsche <i>et al.</i> , 2005	c	KF478815	n/a
PCPV	F00.120R ^a	Rentier	-	2000	Finnland	Tikkanen <i>et al.</i> , 2004; Hautaniemi <i>et al.</i> , 2010	GQ329669	GQ329669	GQ329669
PCPV	B005	Mensch	Rind	2003	Deutschland	Nitsche <i>et al.</i> , 2005	KF478802	KF478813	n/a
PCPV	PCPV 3/07	Rind	-	2007	Deutschland	Publikation 1	KF478804	KF478816	n/a
ORFV	Orf Schweden	Schaf	-	1970	Schweden	Publikation 1	d	i	n/a
ORFV	D1701-A*	Schaf	-	1972	Deutschland	Mayr <i>et al.</i> , 1981	n/a	n/a	n/a
ORFV	NZ2 ^a	Schaf	-	1982	Neuseeland	Robinson <i>et al.</i> , 1982; Mercer <i>et al.</i> , 1987	DQ184476	DQ184476	DQ184476

ORFV	IA82 ^a	Schaf	-	1982	Iowa, USA	Delhon <i>et al.</i> 2004	AY386263	AY386263	AY386263
ORFV	S-1	Schaf	-	1983	Japan	Kretzdorn, 1985	KF478801	KF478810	n/a
ORFV	B047	Ziege	-	1987	Deutschland	Li <i>et al.</i> , 2009	KF478799	KF478811	n/a
ORFV	B015	Schaf	-	1996	Deutschland	Cottone <i>et al.</i> , 1998	KF478796	KF478807	1
ORFV	B029	Mensch	Schaf	1996	Deutschland	Tikkanen <i>et al.</i> , 2004	e	k	KF837136
ORFV	B027	Mensch	Schaf	1997	Deutschland	Nitsche <i>et al.</i> , 2005	e	k	n/a
ORFV	D1701-B*	Schaf	-	1998	Deutschland	Cottone <i>et al.</i> , 1998; McGuire <i>et al.</i> , 2012	HM133903.1	HM133903.1	HM133903.1
ORFV	B032	Schaf	-	1999	Deutschland	Publikation 1	KF478797	KF478808	n/a
ORFV	SA00 ^a	Ziege	-	2000	Texas, USA	Guo <i>et al.</i> , 2003; Delhon <i>et al.</i> , 2004	AY386264.1	AY386264.1	AY386264.1
ORFV	Orf 11	Schaf	-	2000	Schottland	McInnes <i>et al.</i> , 2001	e	k	n/a
ORFV	B044	Ziege	-	2001	Deutschland	Publikation 1	KF478798	KF478809	n/a
ORFV	B006	Mensch	Schaf	2003	Deutschland	Publikation 1	KF478800	k	n/a
ORFV	France 2011	Mensch	Schaf	2012	Frankreich	Nougairde <i>et al.</i> , 2013	d	KF478812	n/a
PVNZ	RD86	Rothirsch	-	1995	Neuseeland	Robinson & Mercer, 1995	n/a	n/a	n/a
PVNZ	348/08	Rothirsch	-	2008	Italien	Scagliarini <i>et al.</i> , 2011	n/a	n/a	n/a
PVNZ	256/08	Rothirsch	-	2008	Italien	Scagliarini <i>et al.</i> , 2011	n/a	n/a	n/a
PVNZ	168/09	Rothirsch	-	2009	Italien	Scagliarini <i>et al.</i> , 2011	n/a	n/a	n/a
deutsches Rotwild ppv	HL953	Rothirsch	-	2013	Deutschland	Publikation 2	KM502562	KM502563	KM502564

^a Referenz Stämme; die entsprechenden Sequenzen (ORF 011, ORF 032) für den Sequenzvergleich und die phylogenetische Analyse stammen aus der Genbank

^b Sequenz identisch zu der von BPSV V660; ^c Sequenz identisch zu der von PCPV B074; ^d Sequenz identisch zu der von ORFV S-1; ^e Sequenz identisch zu der von ORFV B015

^f Sequenz identisch zu der von BPSV V660; ^g Sequenz identisch zu der von BPSV BPS 2/07; ^h Sequenz identisch zu der von BPSV 30/03;

ⁱ Sequenz identisch zu der von ORFV S-1; ^k Sequenz identisch zu der von ORFV B015¹ Sequenz nahezu 100% identisch mit B029 (vgl. Publikation 1)

* D1701-A: attenuiert und Plaque-gereinigt nach 135 Passagen in Kulturen von fetalen Schaffären-Zellen; D1701-B: D1701-A weiter vermehrt in der bovinen Nierenzelllinie BK-KL3A

Tabelle 2 Nachträglich definierte ORFs in der Sequenz von ORFV B029

ORF	ORFV B029*				ORFV IA82	
	Nucleotide position	orientation	Length (aa)	% Id vs. ORFV	Length (aa)	predicted function
	start end					
12.5	11524 11706	-	60	100	60	Unknown
103	106328 107878	-	516	53.5	522	A-type inclusion protein
107.5	109796 109945	-	49	87.8	49	Unknown
109	110873 111361	+	162	54.1	159	EEV-glycoprotein
110	111377 111883	+	168	48.5	165	EEV-glycoprotein
111	111912 112451	+	179	98.4	198	Unknown
128	128148 129650	+	500	85.5	527	Ankyrin/F-box protein

* Sequenzen identisch im ORFV B015 Genom enthalten

IX DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich und meine Arbeit in den letzten Jahren unterstützt haben.

Als erstes ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Mathias Büttner vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit die Doktorarbeit in seiner Abteilung (Infektiologie) auszuführen. Dabei konnte ich stets auf ein offenes Ohr und seine umfassende Unterstützung zählen. Insbesondere möchte ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken, die verschiedenen Möglichkeiten auch außerhalb des LGL Erfahrungen zu sammeln und zu wachsen und selbstverständlich für die hervorragende Betreuung.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter von der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich mich für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit und die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Danke an Frau Gisela Dührsen, die uns die Photographien von Schaf und Mensch nach Parapockenvirusinfektion mit B015 und B029 zur Verfügung gestellt hat.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt- und Verbraucherschutz (StMUV) danke ich für die Bereitstellung finanzieller Mittel.

Vielen Dank weiterhin an die Mitarbeiter des Genzentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Sequenzierung der Virusisolate. Speziell Herrn Dr. Stefan Krebs und Herrn Dr. Helmut Blum möchte ich für die umfassende Hilfe bei der Sequenzauswertung, die vielen kreativen Ideen und die investierte Zeit danken.

Liebe Heike, liebe Susi euch danke ich von Herzen für alles, was ihr mir beigebracht habt. Dafür, dass ich immer auf euch zählen konnte und ihr mir echte Freundinnen geworden seid. Ihr habt die Messlatte für zukünftige Kollegen außerordentlich hoch gelegt.

Liebe Hanna, danke für deine hochkompetente Korrekturhilfe und dafür, dass du mir seit vielen Jahren eine so gute Freundin bist.

Ein großes Dankeschön an euch liebe Oma, lieber Opa für all eure Hilfe und Unterstützung. Ihr habt mir die Möglichkeit gegeben den Weg zu gehen, den ich einschlagen wollte.

Liebe Mama, dir habe ich alles zu verdanken. Ohne dich wäre ich buchstäblich nichts und erst recht nicht, wer ich heute bin. Danke, dass du mir so viel gegeben und ermöglicht hast und mich stets voll Liebe begleitest.

Danke Gina, dass du mir eine so grandiose Schwester bist. Ich weiß, wieso ich mich von Anfang an auf dich gefreut habe. Ich kann mich glücklich schätzen, dass uns ein so besonderes Band verbindet.

Kilian, danke, dass du mich immer wieder liebevoll über meine Grenzen drängst.

Ohne dich wäre es tiefdunkel.

<3