

Ocena występowania i charakterystyka molekularna astrowirusów w populacji drobiu grzebiącego w Polsce.

STRESZCZENIE

Od czasu pierwszego odkrycia astrowirusów (AstV) w 1975 r. u dzieci, są one wykrywane u wielu gatunków zwierząt, w tym także u ptaków i związane są głównie ze stanami patologicznymi jelit (enteropatie). Wraz z dynamicznym wzrostem produkcji drobiu w Polsce obserwuje się wzrost problemów zdrowotnych, w tym również na tle enteropatii. Kluczowe znaczenie w ocenie występowania zakażeń astrowirusowych w krajowej populacji drobiu grzebiącego oraz oszacowaniu czy odgrywają one istotną rolę w wywoływaniu enteropatii stanowi posiadanie nowoczesnego warsztatu diagnostycznego opartego na metodach biologii molekularnej.

W celu wykrycia wszystkich typów astrowirusów wdrożono jednoetapową reakcję RT-PCR według Tanga i wsp. [116]. Spośród 293 badanych stad indyków mięsnych, w wieku od 1 dnia do 19 tygodnia życia, obecność astrowirusów wykazano w 143 (48,8%) stadach. Materiał wirusowy ze 117 stad AstV-dodatnich poddano dalszej analizie mającej na celu identyfikację typu AstV (TAstV-1, TAstV-2, ANV i CAstV), stosując szereg reakcji RT-PCR (konwencjonalne i w czasie rzeczywistym) oraz sekwencjonowanie. Uzyskane wyniki wskazały, że w krajowych stadach indyków dominuje zakażenie typem TAstV-2, którego prewalencja w zależności od stosowanego sposobu detekcji wynosiła 61,5% – 82,9%. Astrowirus indyczy typu 1 zidentyfikowano w zależności od sposobu dochodzenia w 22 (18,8%) lub 33 (28,2%) stadach. Stosując tylko metody PCR do wykrywania/identyfikacji AstV, w żadnym indyczym stadzie nie wykryto wirusa zakaźnego zapalenia nerek (ANV). Jednak zastosowany drugi sposób detekcji, PCR i sekwencjonowanie jego produktu, umożliwił identyfikację ANV w jednym stadzie indyczym, co stanowiło 0,9% wszystkich stad astrododatnich.

Ocenę występowania astrowirusów w populacji kur oparto o badania molekularne 113 stad. Obecność astrowirusów wykazano w 10 (8,8%) stadach, spośród których w próbkach z ośmiu stad określono typ AstV stosując metodę sekwencjonowania produktu PCR. Pięć z

nich należało do CAstV, dwa do TAsTV-1, natomiast jeden AstV okazał się wirusem zapalenia nerek.

Przeprowadzona analiza filogenetyczna w oparciu o znajdujący się w obrębie ORF2 gen wirusowego kapsydu wykazała, że wszystkie badane polskie astrowirusy zidentyfikowane u indyków, przynależą do gatunku *Avastrovirus 3*. Z kolei astrowirusy wykryte w stadach kur przynależą do grupy B, która najprawdopodobniej będzie kanwą utworzenia nowego gatunku w obrębie rodzaju *Avastrovirus*. U indyków zidentyfikowano także infekcje mieszane typów TAsTV-1 i TAsTV-2. Wśród polskich astrowirusów wykazano dużą zmienność genetyczną, zarówno pod względem budowy RdRp jak i białka kapsydu, co potwierdza wcześniejsze spostrzeżenia z wielu krajów. Porównanie sekwencji nukleotydowej (nt) fragmentu genu polimerazy wirusa pomiędzy polskimi szczepami TAsTV-1 wykazało homologię na poziomie 86,6% - 97,9%, zaś wśród polskich szczepów TAsTV-2 homologię rzędu 88,5% - 100%. Zidentyfikowane dwa krajowe szczepy ANV w porównaniu nt fragmentu genu RdRp wykazały niską homologię (73,3%). Z kolei homologia polskich astrowirusów kurzych w analizie nt fragmentu genu polimerazy była w zakresie 82,5% - 96,2%.

W celu oszacowania wpływu zakażenia astrowirusami na status zdrowotny ptaków, analizie statystycznej poddano 293 stada indyków, spośród których w 206 (70,3%) notowano zaburzenia ze strony układu pokarmowego (PEC/PEMS), a w 66 (22,5%) nie stwierdzano objawów chorobowych. Zakażenia astrowirusami stwierdzono w 105 (51%) stadach wykazujących symptomy PEC/PEMS i w 30 (45,5%) stadach zdrowych, co wskazuje na brak korelacji pomiędzy występowaniem astrowirusów a kondycją zdrowotną w zakażonych stadach indyków. Z pozostałych 21 (7,2%) stad poddanych analizie, o nieznanym statusie zdrowotnym, w 8 (38,1%) stadach wykryto obecność AstV.

Wykazano natomiast dużą zależność pomiędzy występowaniem zakażeń astrowirusami a wiekiem indyków. Największy odsetek (68,4%) ptaków zakażonych AstV obejmował ptaki w początkowym okresie tuczu (grupa wiekowa od 1 dnia do 4 tygodnia życia), natomiast w pozostałych grupach wiekowych, w przedziałach: 5-12 tydzień życia i powyżej 12 tygodnia życia odsetek ten był wyraźnie niższy, odpowiednio: 28,6% i 33,3%. Najstarsze indyki, u których stwierdzono zakażenie TAsTV były w wieku 18 tygodni.

SUMMARY

Astroviruses were first described in children in 1975 as the cause of gastrointestinal problems in intestines (enteritis). They are frequently associated with enteritic diseases in many species of animals, including birds. Together with the dynamic increase in poultry production in Poland a rise in the number of health problems, including enteritis-related problems, has been observed. A crucial element in both the assessment of astrovirus-related infections in the domestic population of gallinaceous poultry and estimating their role in enteritic diseases is having access to advanced molecular diagnostic approaches.

For the detection all types of astroviruses a one tube RT-PCR, according to Tang et. al., was performed [116]. Among 293 meat-type turkey flocks, aged 1 day to 19 weeks, astroviruses were detected in 143 (48.8%) flocks. Virus material from 117 AstV-positive flocks was further analysed to identify the AstV type (TAsV-1, TAsV-2, ANV and CAsV) using different RT-PCR assays (both conventional and real-time) as well as sequencing. The obtained results have indicated that the dominant type among the domestic turkey flocks is the TAsV-2, whose prevalence, depending on the detection method used, was 61.5% to 82.9%. Type 1 turkey astrovirus was detected, depending on the method, in 22 (18.8%) and 33 (28.2%) flocks. Using only the PCR methods for AstV detection/identification, avian nephritis virus (ANV) was not detected in any of the flocks. However, using PCR product sequencing method, identification of ANV in one turkey flock was possible, and this accounts for 0.9% of all astrovirus-positive flocks.

To estimate the prevalence of the astrovirus in chickens, molecular tests of 113 flocks were performed. The presence of the astrovirus was demonstrated in 10 (8.8%) flocks. To distinguish between different AstV types detected in eight out of these, the PCR product sequencing method was used. In turn, five out of these were CAsV, two were TAsV-1, while one flock was infected by the avian nephritis virus.

A phylogenetic analysis based on the partial ORF2 amino acid sequences revealed that all the Polish turkey astroviruses belonged to the *Avastrovirus 3* species. In turn, the astroviruses detected in chicken flocks belonged to group B, which will likely give grounds for the creation of a new species within the genus *Avastrovirus*. In turkey flocks, a mixed TAsV-1 and TAsV-2 infection was also identified. The Polish astroviruses demonstrated great genetic

variability, both in RdRp and capsid protein sequences, which corroborated earlier findings from other countries. A comparison of nucleotide (nt) sequence from virus polymerase gene fragment between Polish TAstV-1 strains showed 86.6% - 97.9% nt similarity to each other, while for Polish TAstV-2 strains nt identity was between 88.5% and 100% nt. In a comparison of the nucleotide sequences of the ORF1b region the two identified domestic ANV strains showed a low level of homology (73.3%). In turn, nucleotide sequence similarity in a polymerase gene fragment in Polish CAstV was in the 82.5% to 96.2% range.

In order to assess the impact of astrovirus infection on the health condition of the birds, 293 flocks were analysed statistically, with 206 (70.3%) flocks showing one or more enteritis symptoms (PEC/PEMS) and 66 (22.5%) flocks where the birds were in good health. Astrovirus infection was detected in 105 (51%) of the flocks displaying PEC/PEMS symptoms and in 30 (45.5%) healthy flocks, which suggests lack of correlation between the presence of astroviruses and health condition of infected turkey flocks. Of the remaining 21 (7.2%) flocks analysed, with unknown health status, AstV presence was detected in 8 (38.1%).

It was demonstrated that there exists a strong correlation between the presence of astrovirus infections and the age of the turkeys. The largest percentage (68.4%) of AstV-infected birds was in the initial stages of the fattening period (from 1 day to 4 weeks old), while for the other age groups – 5-12 weeks and over 12 weeks – that percentage was distinctly lower: 28.6% and 33.3% respectively. The oldest turkeys in which TAstV infection was detected were 18 weeks old.