

## Molekularna charakterystyka zoonotycznych szczepów rotawirusa świń

### Streszczenie

Zakażenia rotawirusami (RV) są istotnym problemem epidemiologicznym zarówno u ludzi jak i wielu gatunków zwierząt gospodarskich. Wywołują one ostre infekcje przewodu pokarmowego, którym towarzyszy spadek łaknienia, apatia i biegunka o różnym stopniu nasilenia. Przebieg infekcji rotawirusowej u ludzi podobnie jak u zwierząt uzależniony jest od wieku i kondycji układu immunologicznego zakażonych osób. U świń, zakażenia RV stwierdzane są głównie u prosiąt i skutkują zahamowaniem przyrostu masy ciała, jak również są przyczyną upadków zwierząt prowadząc do strat w hodowli. Dotychczas zidentyfikowano szereg szczepów RV człowieka i zwierząt, które na podstawie właściwości antygenowych białka VP6 kapsydu zaklasyfikowano do 8 serogrup (A-H). Za najważniejszą epidemiologicznie grupę serologiczną uważa się rotawirusy grupy A (RVA). Segmentowa budowa genomu RV sprzyja reasortacji genetycznej pomiędzy szczepami, która z kolei prowadzi do powstawania odmiennych antygenowo szczepów wirusa w tym szczepów zoonotycznych zdolnych do międzygatunkowej transmisji. Analiza sekwencji nukleotydowych poszczególnych segmentów wirusowego RNA i obserwowane w nich zmiany były podstawą klasyfikacji RVA na genotypy (G, P, I, R, C, M, A, N, T, E, H). Na szczególną uwagę zasługują geny kodujące główne białka kapsydu VP7 i VP4, które analizuje się w celu ustalenia genotypów wirusa. Dotychczas zidentyfikowano 27 genotypów G i 35 genotypów P RVA krążących w populacji ludzi i zwierząt. Celem pracy była molekularna identyfikacja i charakterystyka RVA obecnych u świń z uwzględnieniem roli tego gatunku zwierząt jako rezerwuaru RVA patogennych dla człowieka. Ocenie poddano również stopień rozpowszechnienia u ludzi zoonotycznych szczepów wirusa pochodzących od świń.

Do badań użyto 920 próbek kału świń pobranych w latach 2011-2015 od zwierząt zdrowych oraz wykazujących objawy biegunki, w wieku od 1. tyg. do dwóch lat, które utrzymywane były w 131 średnio- lub wielkotowarowych fermach zlokalizowanych na terenie całego kraju. Zwierzęta, od których pobierano materiał zostały podzielone na cztery grupy wiekowe, tj. 1-4 tyg., 5-8 tyg., 9-16 tyg. i >17 tyg. życia. Badaniami objęto również 166 próbek kału człowieka, pobranych od osób z objawami infekcji rotawirusowej zamieszkujących te regiony kraju, w których utrzymywane były

świnie zakażone szczepami G4P[6], G5P[6] i G9P[6] RVA, które uznano za zoonotyczne. Badania próbek kału świń w kierunku obecności antygeny RV przeprowadzono metodą ELISA oraz przy użyciu narzędzi molekularnych i filogenetycznych. Do amplifikacji poszczególnych segmentów genomu szczepów RVA kodujących strukturalne (VP1-VP4, VP6, VP7) i niestrukturalne (NSP1-NSP5) białka zastosowano jednostopniowy RT-PCR. Uzyskane produkty amplifikacji poszczególnych fragmentów genów poddano analizie sekwencyjnej celem identyfikacji genotypów G i P. W przypadku zoonotycznych szczepów G4P[6] ustalano ich pełen genotyp odpowiadający wszystkim 11 segmentom wirusowego RNA. Wyniki dotyczące prevalencji zakażeń RVA u świń i częstości występowania genotypów wirusa u świń i ludzi w Polsce poddano analizie statystycznej z zastosowaniem metody dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

Obecność antygeny RV stwierdzono w 353 spośród 920 badanych próbek kału świń. Infekcje RV przebiegały głównie bezobjawowo z prevalencją zakażeń na poziomie 38,3%. U zwierząt w wieku powyżej 9 tyg. życia odnotowano istotnie niższą prevalencję RVA ( $p < 0,0001$ ) niż w grupach zwierząt młodszych. Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic ( $p > 0,05$ ) w częstości infekcji u zwierząt w obrębie tych samych grup wiekowych w fermach zlokalizowanych w różnych województwach na terenie kraju. Genotypy G i/lub P określono odpowiednio dla 229 i 160 szczepów RVA świń i człowieka. Stwierdzono, że rotawirusy krążące w krajowej populacji trzody chlewnej reprezentowane są odpowiednio przez 8 i 12 genotypów G (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G9, G11) i P (P[6], P[7], P[8], P[11], P[13], P[14], P[22], P[23], P[26], P[27], P[32], P[34]). Natomiast za zachorowania u ludzi w Polsce odpowiadają typowe dla człowieka szczepy RVA o genotypach G8, P[4] i P[9], jak i identyfikowane u świń szczepy posiadające genotyp G1, G2, G3, G4, G9, P[6] i P[8]. U trzody chlewnej rozpowszechnienie RVA o genotypach G5, P[6] i P[13] było istotnie wyższe niż wirusów należących do pozostałych genotypów G i P ( $p < 0,0001$ ). Najrzadziej odnotowywano u świń zakażenia wywołane przez G6 RVA ( $p < 0,0001$ ). W przypadku RVA człowieka żaden z wykrytych genotypów G nie był dominującym ( $p > 0,05$ ). Natomiast zakażenia ludzi szczepami RVA o genotypie P[8] stwierdzano istotnie częściej w porównaniu do wirusów posiadających pozostałe genotypy P ( $p < 0,0001$ ). W badaniach własnych, większą różnorodność ( $p < 0,0001$ ) genotypów G i P wśród szczepów RVA obserwowano u zwierząt utrzymywanych w województwach północno-zachodniej Polski oraz województwie lubelskim niż w innych regionach kraju, co korelowało z wielkością pogłowia trzody chlewnej obecnej w danym

województwie. Szczepy RVA zidentyfikowane w krajowej populacji trzody chlewnej należały do 33 genotypów GXP[X], zaś u ludzi do 8 genotypów. Oprócz szczepów posiadających typowe genotypy dla RVA świń, zakażenia zwierząt również wywoływały nowe szczepy wirusa jak G5P[34], G9P[34] oraz G1P[8], który dotychczas był wyłącznie identyfikowany u człowieka. Ponadto u świń stwierdzono zoonotyczne szczepy G4P[6], G5P[6] i G9P[6]. U prosiąt do 4. tyg. życia częściej wykrywano G4P[6] RVA niż pozostałe zoonotyczne szczepy RVA ( $p < 0,05$ ). Natomiast wykryty u dziecka w województwie podkarpackim szczep G4P6/Hu/POL/188 RVA o genotypie G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 posiadał wyższe pokrewieństwo do szczepów RVA świń (G4P6/Po/POL/868 i G4P6/Po/POL/1046) niż do pozostałych szczepów G4 RVA człowieka. Również segmenty 4. i 9. genomu G4P6/Hu/POL/188 RVA (G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) charakteryzowały się 100% pokrewieństwem do odpowiednich fragmentów sekwencji nukleotydowych w genomach zoonotycznych szczepów GXP6/Po/POL/653 (G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1) i G4P6/Po/POL/868 (GX-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1). Sekwencje nukleotydowe segmentu 6. (genotyp I1) szczepów G4P[6] RVA świń wskazują na reasortację genetyczną, która miała miejsce pomiędzy RVA świń i człowieka.

Wyniki analizy filogenetycznej przeprowadzonej w oparciu o sekwencje nukleotydowe genów kodujących białka VP7 i VP4 kapsydu RVA również potwierdziły istnienie u świń potencjalnie zoonotycznych szczepów RVA. Należały one do genotypu P[6] i P[8] oraz do wszystkich genotypów G z wyjątkiem G1, G6 i G11 RVA świń. Ponadto uznane za potencjalnie zoonotyczne szczepy RVA charakteryzowały się wyższym wzajemnym pokrewieństwem do krajowych szczepów RVA człowieka niż do szczepów RVA świń o tym genotypie. Obecne one były u zwierząt utrzymywanych w tych samych regionach kraju, z których pochodziły osoby zakażone szczepami RVA posiadającymi ten sam genotyp.

## Summary

Rotavirus (RV) infections are a major epidemiological problem in humans and farm animals. Rotaviruses cause acute gastroenteritis manifested by apathy, decrease in appetite and diarrhoea of varying degrees of severity. The course of infection in humans and animals depends on the age of infected individuals and the efficiency of their immune system. In pigs, RV infections are mainly encountered in piglets, in which they lead to weight stasis and death. So far, a number of human and animal RV strains have been identified. Based on the antigenic properties of the VP6 capsid protein they have been classified into eight serogroups (A–H), the most important of them being group A (RVA) from the epidemiological perspective. The segmented structure of the virus genome favours genetic reassortment between RV strains, which results in the formation of antigenically different virus strains. The structure and sequence analysis of the viral RNA segments were the basis for RVA classification into genotypes (G, P, I, R, C, M, A, N, T, E, H). The differences observed within the nucleotide sequences of the genes encoding the main capsid proteins (VP7 and VP4) allowed the identification of 27 G and 35 P RVA genotypes circulating in humans and animals. The emergence of new RVA strains, including zoonotic strains, is the result of a genetic reassortment occurring between different virus strains. Molecular identification and strain characterization studies for pig RVA have been conducted in Poland previously. However, none of them have focused on the species as the reservoir of human pathogenic RVA strains, which the present work addresses. Subsequently to the examination of swine RVAs, zoonotic rotavirus strains in humans were detected and their prevalence was assessed.

In total, 920 faecal samples collected from the years 2011 to 2015 from healthy and diarrhoeic pigs were used in the study. The animals between the ages of one week and two years old were housed in 131 small and commercial-scale farms located all over the country. The sampled pigs were divided into four age groups: 1–4 weeks, 5–8 weeks, 9–16 weeks and >17 weeks. Additionally, 166 human faecal samples were also included in the study. They were collected from patients with symptoms of rotavirus infection. The infected individuals came from the same regions as pigs infected with the zoonotic G4P[6], G5P[6], and G9P[6] RVA strains. RVAs were detected in pig faeces using ELISA and molecular methods with subsequent strain characterisation by the use of phylogenetic tools. One-step RT-PCR was employed for amplification of each RVA genome segment

which encodes structural (VP1–VP4, VP6, and VP7) and nonstructural (NSP1–NSP5) viral proteins. Furthermore, the obtained amplification products were subjected to sequence analysis followed by identification of G and P virus genotypes. In the case of zoonotic G4P[6] RVA strains, all genotypes corresponding to eleven segments of the virus genome were determined. The results for the prevalence of RVAs in pigs in Poland and the frequency of the occurrence of virus strains having a particular genotype in pig and human populations were statistically assessed using analysis of variance (ANOVA).

The presence of RV antigen was detected in 353 out of 920 pig faeces samples. RV infections in pigs were mainly asymptomatic, and the virus prevalence was 38.3% in the tested animal population. In pigs older than 9 weeks significantly lower virus prevalence was observed than in younger animals ( $p < 0.0001$ ). The farms of any one province did not differ from the farms of any other province with statistical significance ( $p > 0.05$ ) regarding the frequency of infections among animals from the same age groups. Virus G and/or P genotypes were identified for 229 pig and 160 human RVA strains. In the Polish pig population infections were caused by RVA strains belonging to 8 G (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G9, and G11) and 12 P (P[6], P[7], P[8], P[11], P[13], P[14], P[22], P[23], P[26], P[27], P[32], and P[34]) genotypes. In addition to strains having human-specific G8, P[4], and P[9] genotypes causing infections in humans, human infections were also caused by strains possessing G1, G2, G3, G4, G9, P[6], and P[8] genotypes identified among pig virus strains. In pigs, the prevalences of G5, P[6], and P[13] RVA were significantly higher than those of virus strains with other G and P genotypes ( $p < 0.0001$ ). Infections caused by G6 RVAs were the least common in pigs ( $p < 0.0001$ ). In the case of human RVAs none of the detected G genotypes was dominant ( $p > 0.05$ ). In addition, infections caused by P8 RVAs were more frequently detected than those caused by strains having other P genotypes ( $p < 0.0001$ ). In this study, greater diversity ( $p < 0.0001$ ) of G and P genotypes among RVA strains was observed in animals kept in north-western Poland and Lubelskie province than in other regions of the country. Genotype diversity also correlated with the size of the pig population in the given province. The RVA strains found in pigs and humans belonged to 33 and 8 GXP[X] genotypes respectively. Besides typical pig RVA strains, novel strains such as G5P[34], G9P[34], and human G1P[8] were identified for the first time in an animal host. Furthermore, zoonotic strains such as G4P[6], G5P[6] and G9P[6] RVA were found in pigs. In piglets at age up to 4 weeks G4P[6] RVAs were more frequently detected than in animals from other (and older) age groups ( $p < 0.05$ ).

The G4P6/Hu/POL/188 (G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) RVA strain detected in a child from Podkarpackie province was characterised by a higher phylogenetic relatedness to pig virus strains G4P6/Po/POL/868 and G4P6/Po/POL/1046 than to other G4 human RVAs. In addition, the fourth and ninth genome segments of G4P6/Hu/POL/188 RVA showed a 100% phylogenetic similarity with genome sequences of the zoonotic GXP6/Po/POL/653 (GX-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1) and G4P6/Po/POL/868 (G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1) RVA strains. Additionally, the phylogenetic analyses of the nucleotide sequences of the sixth genome segment (genotype I1) of G4P[6] pig RVAs provide evidence for genetic reassortment between human and animal RVAs.

Furthermore the results of phylogenetic analyses of the VP7 and VP4 gene sequences confirmed the presence in pigs potentially zoonotic RVA strains representing P[6], P[8] genotypes and all G genotypes except G1, G6 and G11 identified in pigs. RVA strains considered as potentially zoonotic showed a higher mutual sequence homology to human than to pig RVA strains possessing the same genotype. They were identified in pigs kept in the same provinces in which infected persons with RVA holding the same virus genotypes lived.